

UJI PROFIL PROTEIN KELENJAR LUDAH *Anopheles sp.* TERINFEKSI *P. berghei* PASCA IRADIASI GAMMA DENGAN TEKNIK SDS-PAGE UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN MALARIA*

Devita Tetriana, Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN
Jl. Lebakbulus Raya No. 49 Jakarta
Email: dtetriana@gmail.com

Diterima: 30-07-2013
Diterima dalam bentuk revisi: 20-09-2013
Disetujui: 14-12-2013

ABSTRAK

UJI PROFIL PROTEIN KELENJAR LUDAH *Anopheles sp.* TERINFEKSI *P. berghei* PASCA IRADIASI GAMMA DENGAN TEKNIK SDS-PAGE UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN MALARIA. Sporozoit merupakan tahapan siklus hidup parasit malaria yang paling invasif dan merupakan kandidat vaksin paling tepat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin malaria yang dibuat dengan melemahkan sporozoit *Plasmodium sp* menggunakan sinar gamma terbukti lebih efektif. Studi efek radiasi terhadap protein dalam pengembangan vaksin iradiasi juga berperan sangat penting. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui profil protein kelenjar ludah *Anopheles sp* terinfeksi sporozoit pasca iradiasi gamma dengan teknik *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Tahapan uji meliputi penginfeksian nyamuk *Anopheles sp* dengan *P. berghei*, pemeliharaan nyamuk terinfeksi selama 14-16 hari untuk memperoleh sporozoit, iradiasi nyamuk secara *in vivo - in vitro*, preparasi sampel kelenjar ludah dan elektroforesis pada SDS-PAGE 10% serta pewarnaan Commassie blue. Hasil uji menunjukkan perbedaan profil protein antara kelenjar ludah *Anopheles sp* terinfeksi dan tidak terinfeksi. Terdapat penambahan jumlah pita protein pada dosis iradiasi lebih tinggi (200 Gy) dimana terdeteksi profil protein sporozoit *P. berghei* (BM 62 kDa), tetapi tidak terdeteksi profil *circumsporozoite protein* (CSP) antar dosis iradiasi gamma 150, 175 dan 200 Gy. Hasil tersebut memberikan informasi dasar yang akan mengarah pada studi lanjut tentang peranan protein sporozoit dalam pengembangan vaksin malaria.

Kata kunci : malaria, kelenjar ludah, *P. berghei*, sporozoit, profil protein, sinar gamma

ABSTRACT

EXAMINATION ON THE PROTEIN PROFILES OF SALIVARY GLANDS OF *P. berghei* INFECTED *Anopheles sp.* POST GAMMA IRRADIATION USING SDS-PAGE TECHNIQUE FOR DEVELOPING MALARIA VACCINE. Sporozoite is a step of malaria parasitic live cycle that is most invasive and appropriate vaccine candidate. Result of experiments showed that malaria vaccine created by attenuating *Plasmodium sp* sporozoites with gamma rays was proven more effective. Study on the effects of irradiation to the profiles of protein in vaccine development is also important. The aim of this research was to examine the protein profile of salivary glands in sporozoite infected *Anopheles sp* post gamma irradiation using *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) technique. Examination covered the infection of *Anopheles sp* with *Plasmodium sp*, maintenance of infected mosquitoes for 14-16 days to obtain sporozoites, *in vivo - in vitro* irradiation of mosquitoes, preparation of salivary glands, electrophoresis on 10% SDS-PAGE, and Commassie blue staining. Results showed a different protein profile of infected and non infected salivary glands of *Anopheles sp*. There was additional protein band numbers at higher dose of irradiation (200 Gy) from sporozoite protein of *P. berghei* (MW 62 kDa). However, no difference of the profiles of

* Dipresentasikan pada Seminar Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia, BATAN – Unpad, 4 Juli 2013

circumsporozoite protein (CSP) observed among gamma irradiation doses of 150, 175 and 200 Gy. These results provide basic information that would lead to further study on the role of sporozoite proteins in malaria vaccine development.

Keywords: malaria, salivary glands, *P. berghei*, sporozoites, protein profile, gamma rays

1. PENDAHULUAN

Malaria menyebabkan 1-3 juta kematian setiap tahun terutama wanita dan anak-anak di Afrika dan Asia Tenggara (1-3). Malaria tersebar di sekitar 109 negara dengan tingkat risiko hingga 40% (2) dan merupakan penyakit yang menyita perhatian cukup besar bagi baik praktisi kesehatan maupun peneliti. Menurut data Kementerian Kesehatan, jumlah pen-derita penyakit ini di Indonesia adalah 50 orang per 1.000 penduduk. Dalam target pembangunan kesehatan yakni "Indonesia Sehat 2015", jumlah itu diusahakan menurun menjadi sepersepuluhnya. Jumlah penderita malaria yang meninggal tahun 2005 mencapai 0,92 persen, tahun 2006 turun menjadi 0,42 persen dan tahun 2007 turun lagi menjadi 0,2 persen (4).

Malaria sulit diberantas akibat resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria dan resistensi nyamuk *Anopheles* terhadap insek-tisida (5,6). Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah tindakan pencegahan dengan pemberian vaksin. Penelitian dan pengembangan vaksin terus mengalami kemajuan antara lain melalui *Malaria Vaccine Technology Roadmap* yang bertujuan untuk mempercepat pengembangan vaksin sehingga diharapkan pada tahun 2025 telah diperoleh vaksin dengan efektivitas lebih dari 80% dengan

daya proteksi lebih dari 4 tahun serta aman (7). Penelitian vaksin yang dibuat dengan iradiasi telah dimulai sejak 1967 oleh Nussenzweig dkk yang mem-buktikan bahwa imunisasi mencit dengan sporozoit *Plasmodium berghei* yang di-atenuasi dengan radiasi mampu mem-proteksi tantangan sporozoit infeksi (8).

Parasit yang dimasukkan pertama kali ke dalam aliran darah inang vertebrata oleh vektor nyamuk adalah tahap sporozoit dari *P. falciparum* yang kemudian menginvasi sel-sel hati (9). Telah diketahui potensi yang penting dari tahapan sporozoit dalam men-stimulasi imunitas protektif dalam inang vertebrata. Sejauh ini yang dibuat adalah vaksin yang merupakan hasil pelemahan atau atenuasi seluruh bagian parasit sehingga tidak lagi berbahaya. Sporozoit merupakan tahap paling invasif dari siklus hidup *Plasmodium* sehingga paling menarik untuk diteliti. Daya infeksi sporozoit ini harus dinetralisir karena satu sporozoit dapat menghasilkan sekitar 40.000 merozoit dan terus melipat ganda dalam stadium darah. Selama perkembangannya dalam vektor nyamuk dan inang vertebrata, sporozoit menunjukkan sifat atau tabiat yang paling bervariasi, mulai dari keberadaannya dalam kelenjar ludah nyamuk, invasi sel hingga migrasi saat meninggalkan sel sasarannya (10). Vaksin sporozoit memiliki spesifitas tinggi dari sistem imun sehingga perlindungan

an dari infeksi *P. falciparum* memiliki arti penting dimana sejumlah kecil sporozoit yang terhindar dari perusakan oleh sistem imun akan meningkatkan derajat perkembang biakan parasit dalam hati. Sejumlah besar parasit stadium skizon eritrositik akan menyebabkan keadaan fatal pada inang atau hospes (11).

Karakterisasi gen dan ekspresi protein sporozoit yang infeksiif dan perkembangan parasit tahap hati merupakan hal yang sangat penting untuk mengidentifikasi target vaksin dan untuk memahami karakteristik biologi dasar parasit yang mematikan ini. Analisis transkripsi dan proteomik pada tahap hati ini dan tahapan berikutnya akan menjadi acuan dalam proses pengungkapan genom parasit malaria secara lengkap (12) yang sangat berkaitan dengan pengembangan vaksin yang khas untuk penduduk Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein kelenjar ludah *Anopheles sp* terinfeksi sporozoit pasca iradiasi gamma dengan teknik SDS-PAGE. Profil pita protein dapat memberi informasi tentang protein spesifik berdasarkan berat molekul (BM). Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dasar penting yang mengarah pada studi pengembangan lebih lanjut tentang peranan protein sporozoit sebagai bahan vaksin malaria potensial.

2. BAHAN DAN TATA KERJA

2.1 Rearing Nyamuk *Anopheles sp.* di Laboratorium.

Rearing nyamuk dilakukan di insektarium BATAN pada suhu 24 -26°C, kelembapan 70 - 80% dan penerangan

secukupnya, sesuai kondisi alaminya. Koloni stok nyamuk *Anopheles sp* jantan dan betina dimasukkan ke dalam kandang (*bugdorm*) yang didalamnya terdapat nampan tanah liat berdiameter ± 5 cm berlapis kertas saring dan diberi air sebagai tempat bertelur. Telur yang menempel pada kertas saring langsung dipindahkan ke dalam nampan plastik berisi air dan setelah menetas menjadi larva diberi makanan tepung hingga mencapai instar ke-3. Pupa kemudian dipindahkan ke botol kecil berisi air dan diletakkan dalam *bugdorm* lain. Nyamuk jantan dewasa diberi larutan glukosa 10% dan albumin yang diteteskan pada kapas, sedangkan nyamuk betina diberi makanan berupa darah dengan menempatkan marmut setiap hari ke dalam kandang selama 1-2 jam.

2.2 Penginfeksi Mencit dengan *P. berghei* dan Pembuatan Apusan Darah Tipis

Penginfeksi *P. berghei* strain ANKA pada mencit dilakukan dengan menyuntikkan secara intraperitoneal $\pm 1 \times 10^6$ parasit /ml inokulum stadium eritrositik. Dua hari kemudian diamati parasitemia dalam darah mencit dengan menempelkan darah perifer dari ujung ekor mencit pada kaca preparat dan dibuat apusan tipis. Setelah mengering, apusan kemudian difiksasi dengan metanol selama 30 detik, diwarnai dengan 10% larutan Giemsa selama 20 menit. Selanjutnya preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000x. Parasitemia dihitung dengan memilih bagian-bagian dimana tiap lapangan pandang mengandung sel dengan susunan tidak

saling menumpuk. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dihitung dari sekitar 1000 sel eritrosit dan 200 sel leukosit. Pembuatan apusan darah diulang setiap hari hingga parasitemia dan gametositemia dalam darah mencit masing-masing mencapai kisaran 5-10% dan 0,01-0,1% dan pada kondisi ini mencit siap diumpankan ke nyamuk.

2.3 Penginfeksi Anopheles sp dengan P. berghei

Penginfeksi *Anopheles sp* dengan *P. berghei* dilakukan dengan membiarkan sekitar 150 ekor nyamuk berumur 3 hari menggigit mencit terinfeksi (parasitemia sekitar 5-10%) yang diletakkan di dalam kandang selama 1 jam. Nyamuk yang telah mengkonsumsi darah mencit (*gravid*) disedot dari kandang menggunakan aspirator khusus dan dipelihara dalam wadah karton volume ½ liter dengan tutup kain kasa. Di atas wadah diletakkan kapas yang dibasahi madu 10% serta diletakkan di dalam plastik transparan, dilengkapi dengan tabung sentrifus yang diisi dengan akuabides dan ditutup dengan kapas sebagai *humidifier*. Pemeliharaan dilakukan selama 14-16 hari pasca penggigitan.

2.4 Isolasi Sporozoit dan Iradiasi Gamma *in vivo*

Empat belas-enam belas hari kemudian, beberapa ekor nyamuk gravid yang diduga telah mengandung sporozoit pada kelenjar ludahnya di dalam kandangnya dipersiapkan untuk diiradiasi gamma dengan dosis 0, 150, 175, dan 200 Gy pada laju dosis 381,2 Gy/jam. Iradiasi

gamma dilakukan dengan "Irradiator IRPASENA", di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN. Selanjutnya nyamuk dibagi ke dalam dua kelompok, masing-masing kelompok minimal terdiri dari 3 ekor nyamuk. Nyamuk pada kelompok pertama diisolasi sporozoit dari kelenjar ludahnya dan nyamuk pada kelompok lainnya digunakan untuk propagasi *P. berghei* teriradiasi dalam tubuh nyamuk pada mencit sehat.

2.5 Preparasi Sporozoit dan Iradiasi Gamma *In vitro*.

Isolasi sporozoit dari sekelompok nyamuk lain dilakukan pada 14 –16 hari pasca penginfeksi dengan membius nyamuk dalam *freezer* selama 3 menit, kemudian kaki dan sayapnya dibuang. Nyamuk dibedah menggunakan jarum bedah khusus serangga jarum khusus. Bagian kelenjar ludah nyamuk diambil serta disuspensi dalam akuabides steril dan sebagian kecil diletakkan pada preparat serta ditutup dengan *coverglass* untuk diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 400 -1000 kali. Kelenjar ludah nyamuk ditempatkan dalam tabung mikrosentrifus steril ukuran 1,5 ml berisi larutan fisiologis atau *Bovine Serum Albumine* (BSA) BSA kemudian diiradiasi dengan dosis dan laju dosis seperti prosedur sebelumnya.

Cara lain untuk isolasi sporozoit adalah menggunakan metode sentrifugasi untuk memurnikan sporozoit dari tubuh nyamuk yang diperkenalkan oleh Ozaki (14). Tubuh nyamuk disuspensi dalam 200 µl media uji dan di atasnya dilapisi dengan *glass wool* volume 100 µl dalam tabung

mikrosentrifus 1,5 ml dan disentrifuse dengan RCF 16.000 g selama 3 menit. Sporozoit dikocok dengan menyedot-menyemprotkan suspensi sporozoit menggunakan *syringe*. Sporozoit murni terkumpul sebagai pelet pada bagian bawah tabung, kemudian diiradiasi dengan dosis dan laju dosis seperti prosedur sebelumnya.

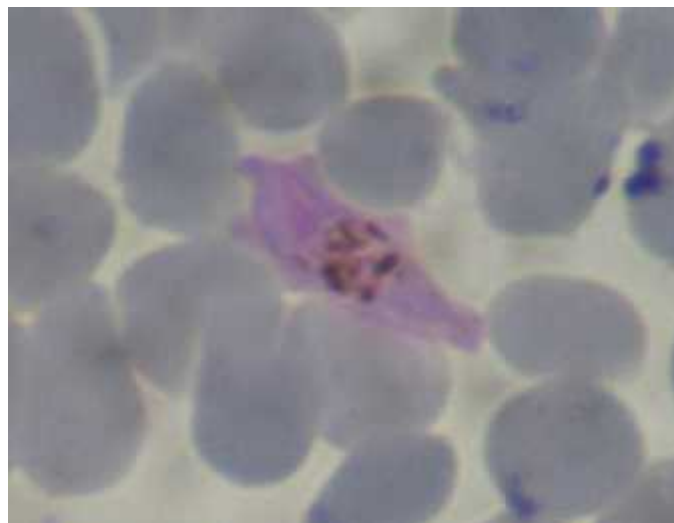
2.6 Uji Ekspresi Protein.

Ekstrak kelenjar ludah iradiasi dan kontrol (masing-masing 8-10 kelenjar ludah) dicampur dengan *sample buffer* (1:1 atau 1:2), disonikasi selama 20 menit, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit, diletakkan di atas es dan dielektroforesis dalam gel 10% *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) satu dimensi selama 60-70 menit pada suhu ruang. Gel diwarnai dengan *commassie blue solution* selama satu malam, difiksasi selama 1 jam, dan dilakukan *destaining* dalam akuabides selama waktu tertentu hingga diperoleh gel

berwarna bening/cerah. Gel difoto dengan *Geldoc Imaging System* dan dianalisis dengan *soft-ware* Image Lab versi 3.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

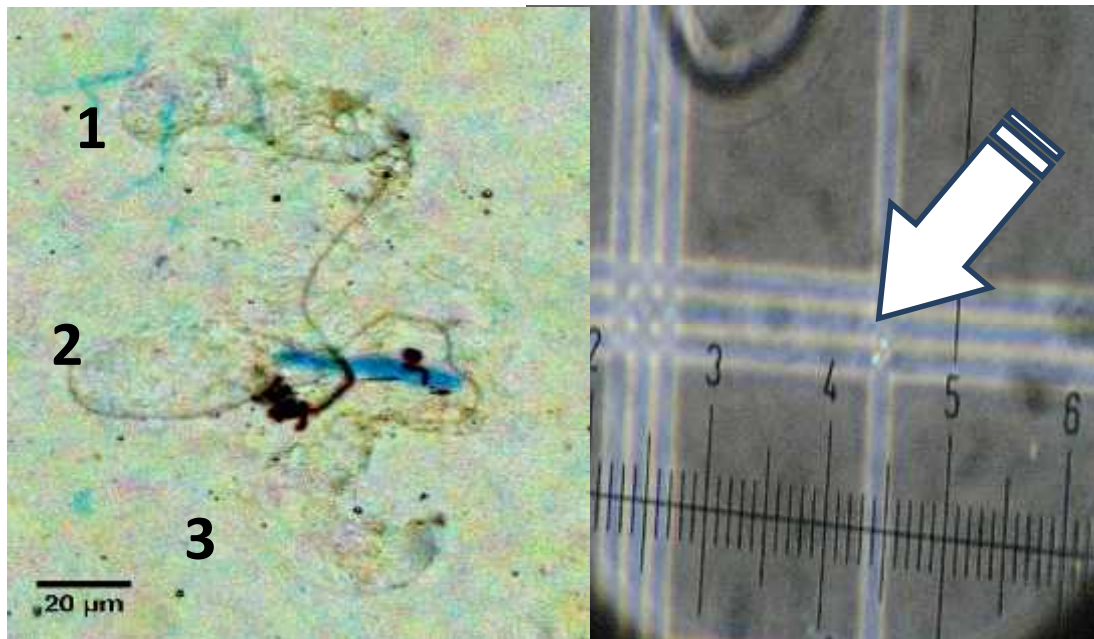
Dalam penelitian ini untuk memperoleh sporozoit terlebih dahulu dilakukan penginfeksian mencit dengan menyuntikkan *P. berghei* secara intra-peritoneal dan kandungan parasit dalam darahnya (parasitemia) dipantau. Setelah parasitemia mencapai sekitar 2-5%, selanjutnya dilakukan penginfeksian nyamuk dengan membiarkan nyamuk menggigit mencit terinfeksi. Persentase ini sangat penting untuk diperhatikan karena berpengaruh pada kandungan gametosit di dalamnya (Gambar 1). Dengan parasitemia lebih rendah dari 5%, diharapkan darah mencit masih mengandung stadium gametosit. Selain itu perlu diperhatikan pula masa hidup nyamuk setelah mengkonsumsi darah (*gravid*).



Gambar 1. Tampilan mikroskopis parasit bentuk gametosit dalam darah yang siap diambil oleh nyamuk untuk selanjutnya menjadi sporozoit di kelenjar ludah.

Tabel 1. Jumlah nyamuk *gravid* (mengkonsumsi darah) pada awal dan akhir pemeliharaan untuk memperoleh sporozoit (gabungan dari 3-5 kelompok penggigitan berbeda per spesies nyamuk)

Spesies <i>Anopheles</i>	Parasit dalam darah	Jumlah awal nyamuk <i>gravid</i>	Jumlah nyamuk sisa pada hari ke 14
<i>A. aconitus</i>	<i>P. berghei</i> (6,6%)	33 – 97	2 - 70
<i>A. farauti</i>	<i>P. berghei</i> (10%)	31 – 90	8 - 12
<i>A. maculatus</i>	<i>P. berghei</i> (5%)	25 – 90	0 - 12



Gambar 2. Tampilan mikroskopis kelenjar ludah nyamuk dengan tiga lobus (kiri) dan sporozoit (kanan, tanda panah).

Untuk memperoleh sporozoit, nyamuk terinfeksi dipelihara selama 14 hari pada kondisi tertentu. Hasilnya menunjukkan bahwa nyamuk terinfeksi yang dapat bertahan hidup hingga 14 hari berkisar dari 10% hingga 80% dari jumlah awal (Tabel 1).

Keberhasilan dalam memperoleh sporozoit dari kelenjar ludah nyamuk (Gambar 2) dipengaruhi suhu ruangan selama propagasi dan adanya gametosit dalam darah yang siap diambil oleh nyamuk. Dalam penelitian ini iradiasi gamma dilakukan secara *in vivo* (nyamuk diiradiasi) dan secara *in vitro* (isolat kelenjar ludah

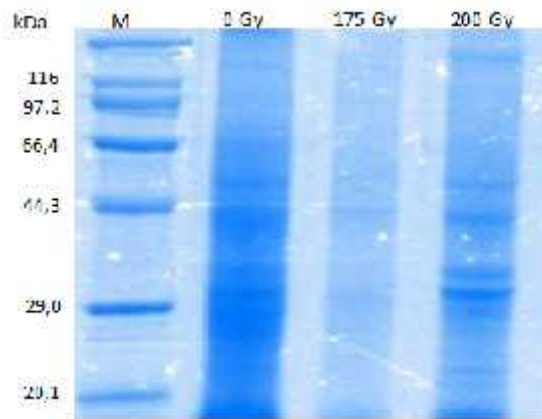
mengandung sporozoit diiradiasi). Untuk *in vitro*, isolasi sporozoit dilakukan baik dengan cara manual yakni membedah nyamuk dan mengambil kelenjar ludahnya (Gambar 2) maupun dengan cara sentrifugasi.

Untuk satu eksperimen, uji profil protein sporozoit dilakukan dengan SDS-PAGE dan dilanjutkan dengan visualisasi dengan *Gel Doc Imaging system* untuk sampel yang masing-masing mengandung 10-12 kelenjar ludah nyamuk terinfeksi sporozoit *P. berghei* (Gambar 3) yang diiradiasi gamma dosis 0, 175 dan 200 Gy. Terlihat adanya perbedaan jumlah pita

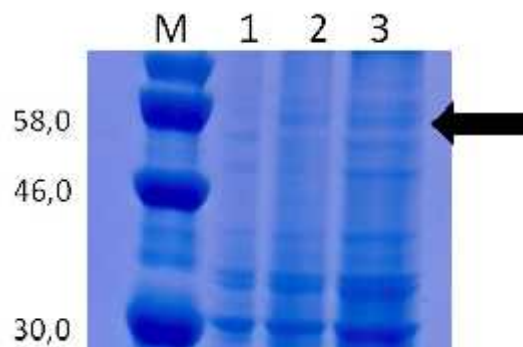
protein pada gel akrilamid dimana lebih banyak protein muncul pada dosis lebih tinggi (200 Gy) meskipun sekilas tidak berbeda dengan jumlah pita pada dosis 0 Gy. Akan tetapi, pada dosis 175 Gy, yang diketahui paling efektif melemahkan parasit berdasarkan uji parasitemia hanya sedikit muncul pita protein, meskipun demikian terlihat protein berukuran 44 kDa pada ketiga dosis. Hasil analisis profil *circumsporozoit protein* (CSP) lebih lanjut menunjukkan tidak terdeteksinya protein tersebut. Profil protein *P. berghei* iradiasi juga menunjukkan perbedaan profil antara kelenjar ludah terinfeksi dan tidak terinfeksi, yang menunjukkan adanya perbedaan pita protein yaitu munculnya pita dengan berat

molekul (BM) sekitar 60 kDa (Gambar 4). Protein tersebut diduga sebagai protein spesifik parasit dalam kelenjar ludah nyamuk.

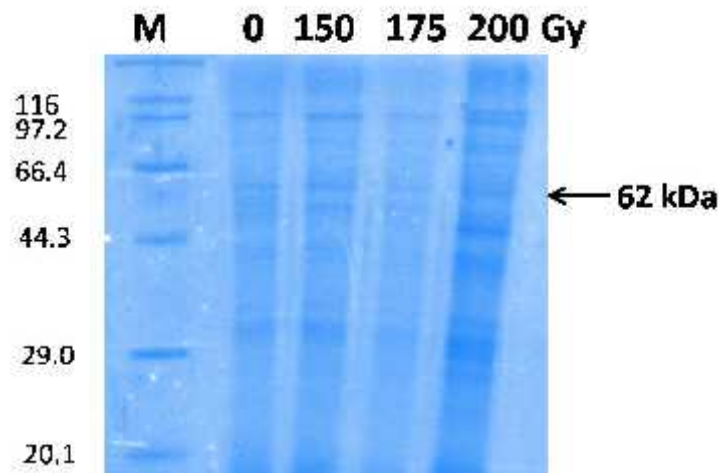
Hasil uji profil/ekspresi protein sporozoit *P. berghei* iradiasi (BM 62 kDa) berikutnya menunjukkan tidak adanya perbedaan profil CSP antar dosis iradiasi gamma 150, 175 dan 200 Gy (Gambar 5) dimana lebih banyak pita terjadi pada dosis lebih tinggi (200 Gy). Dalam studi dengan SDS-PAGE ini diketahui bahwa uji profil protein kelenjar ludah *Anopheles sp.* Terinfeksi *P. Berghei* menunjukkan adanya 4 pita polipeptida utama dengan BM sekitar 80, 58, 40, dan 32 kDa.



Gambar 3. Profil protein kelenjar ludah terinfeksi sporozoit *P. berghei* iradiasi. M, marker protein standard.



Gambar 4. Profil protein kelenjar ludah *Anopheles sp.* tidak terinfeksi (1) dan terinfeksi (2, 3) sporozoit *P. berghei* (tanda panah). M, marker protein standard.



Gambar 5. Profil protein sporozoit *P. berghei* iradiasi (BM 62 kDa) dengan SDS-PAGE.

Di samping itu, dalam penelitian ini tidak dilakukan pemisahan antara kelenjar ludah daerah lateral-distal yang memiliki protein berbeda yang fungsi dan profilnya pun berbeda. Protein utama terdeteksi pada berat molekul 62 dan 110 kDa. Protein dengan BM 110 kDa ini terdeteksi hanya pada dosis 200 Gy.

Penelitian tentang sporozoit iradiasi telah banyak dilakukan (2,8,9,13,15,16) tetapi studi profil protein sporozoit pasca iradiasi gamma masih sangat jarang ditemukan di berbagai literatur. Penelitian Chatterjee dkk (15) menemukan bahwa mencit C57BL6 terlindungi dari infeksi sporozoit *P. berghei* setelah diimunisasi dengan sporozoit iradiasi 120 Gy (12 krad) tetapi tidak oleh sporozoit iradiasi 200 Gy. Iradiasi 120 Gy menghasilkan antibodi tingkat rendah pada parasit tahap hati meskipun hanya setelah pemberian 100 sporozoit. Penelitian profil protein pada *Eimeria tenella* yang dilakukan oleh Jenkins MC dkk (17) menemukan ekspresi antigen berukuran 7-10 kDa dari sporozoit intra-seluler yang diiradiasi 250 Gy (25 kRad) dan

eksprinya lebih tinggi dibandingkan dengan non iradiasi dan iradiasi 150 Gy. Studi profil protein dan peptida lebih lanjut telah dikembangkan oleh para peneliti menggunakan pendekatan proteomik (18) dan *High Purified Liquid Chromatography* (19).

Pengumpulan kelenjar ludah nyamuk juga merupakan suatu pekerjaan yang memakan waktu lama dan tidak efisien, terlebih lagi untuk memperoleh sampel sporozoit. Oleh karena itu dikembangkan metode sentrifugasi yang lebih cepat tetapi memiliki kelemahan yakni kemungkinan tercampurnya kelenjar ludah dengan bagian tubuh nyamuk lainnya. Di samping itu, sebagian besar peneliti menggunakan kelenjar ludah sehingga integritas protein kelenjar ludah merupakan faktor kritis dalam memperoleh data penting dari analisis imunologi dan biokimia untuk mendukung pengembangan vaksin sporozoit iradiasi.

Sebagian besar protein pada permukaan membran parasit apikompleksa

dicirikan oleh adanya glikosilfosfatidili nositol atau domain trans-membran (20). Terdapat satu protein permukaan sirkum sporozoit yang merupakan molekul utama pada membran sporozoit *Plasmodium spp* yakni CSP (21). CSP merupakan protein multi-fungsional yang diperlukan oleh sporozoit untuk perkembangan biakan dan diduga memediasi beberapa langkah selama perjalanan (*journey*) mulai dari kelenjar ludah nyamuk, selanjutnya dalam kulit inang hingga sel hati mamalia, untuk kemudian menimbulkan infeksi. Saat ini masih dipertanyakan mengapa atau bagaimana satu protein ini dapat berfungsi dalam berbagai kondisi (22,23). Studi oleh Coppi A dkk (24) menunjukkan bahwa CSP memiliki 2 macam konformasi, yakni konformasi *adhesive* dimana TSR terpapar dan konformasi *non-adhesive* dimana TSR tertutup oleh ujung N-nya. Diduga masing-masing konformasi berkaitan dengan sifat fungsional yang berbeda. CSP memiliki satu sentral daerah berulang (*repeat region*), yang merupakan target dari antibodi inang. CSP juga sangat penting untuk motilitas, daya infeksi dan transmisi malaria secara efisien, menutupi seluruh permukaan sporozoit dewasa dan berkontribusi 10- 20% protein yang disintesis oleh sporozoit.

Karena sporozoit berperan penting dalam infeksi malaria, maka pengetahuan tentang sifat biologiknya, adalah penting untuk pengembangan metode intervensi melawan infeksi awal seperti vaksin dan penyakit yang ditimbulkannya (25). Hanya sekitar 25 protein yang esensial untuk perkembangan dan infeksi sporozoit yang telah dikarakterisasi, termasuk beberapa protein yang berpotensi sebagai vaksin

subunit, seperti CSP dan *thrombospondin related anonymous protein* (TRAP). Jumlah sporozoit juga bervariasi dari satu spesies ke spesies lain, yakni antara 4.000 hingga 10.000 pada *P. falciparum* dan untuk menyelesaikan proses sporogoni diperlukan antara 7 hingga 8 minggu, bergantung pada spesies parasit (26).

4. KESIMPULAN

Hasil uji protein *P. berghei* iradiasi menunjukkan perbedaan profil protein antara kelenjar ludah terinfeksi dan tidak terinfeksi. Terdapat penambahan jumlah pita protein pada dosis iradiasi lebih tinggi (200 Gy) dimana terdeteksi protein sporozoit *P. Berghei* (BM 62 kDa), tetapi tidak terdapat perbedaan profil *circumsporozoite protein* (CSP) antar dosis iradiasi gamma 150, 175 dan 200 Gy. Beberapa faktor mempengaruhi keberhasilan dalam memperoleh sporozoit seperti suhu ruangan selama propagasi dalam tubuh nyamuk dan adanya gametosit dalam darah yang siap diambil oleh nyamuk untuk berubah menjadi sporozoit. Uji profil protein pasca iradiasi sangat penting dalam pengembangan vaksin malaria karena dosis iradiasi mempengaruhi viabilitas parasit sebagai bahan vaksin malaria yang "*live attenuated*".

5. DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization, Initiative for Vaccine Research. Malaria. In: State the art of vaccine research and development; 2006.p 48-56. sumber: <http://www.who.int/vaccines->

- documents.
2. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. The Journal of Experimental Biology. 2003; 206:3803-8.
 3. Syarifuddin D, Asih PB, Casey GJ, Maguire J, Baird JK, Nagesha HS, Cowman AF, Reeder JC. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 72(2): 174-81.
 4. Directorate of Communicable Disease Control (Ministry of Health). RI-CDC Technical Report : Malaria Situation in Indonesia. Jakarta, Indonesia. Unpublished 2006.
 5. Trager W. Living together: The biology of animal parasitism. New York: Plenum Press; 1986.
 6. Safitri I (Guru Besar dari Bagian Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga). Vaksin Malaria Semakin Dekat? Surabaya, Indonesia; 2003.
 7. Okiro E, Hay S, Gikandi P, Sharif, S, Noor A, Peshu N, Marsh K, Snow R. The decline in paediatric malaria admissions on the coast of Kenya. Malarial Journal. 2007; 15(6 Pt 1): 151-5.
 8. Nussenzweig R, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. Nature. 1967; 216: 160.
 9. Clyde DF, McCarthy, Miller RM, Woodward WE. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1975; 24: 397-401.
 10. Kappe SHI, Kaiser K, Matuschewski K. The plasmodium sporozoite journey: a rite of passage. Trends in Parasitology. 2003; 19(3): 135–43.
 11. Nussenzweig RS, Chen D. The antibody response to sporozoites of simian and human malaria parasites: Its stage and species specificity and strain cross-reactivity. Bulletin of World Health Organization. 1974; 50(3-4): 293–7.
 12. Blair P , Carucci D. Functional proteome and expression analysis of sporozoite and hepatic stages of malaria development. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2005; 295: 417-38.
 13. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, *et a.*, Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial, Lancet. 2004; 364: 1411-20.
 14. Ozaki LS, Gwadz RW, Godson GN. Simple centrifugation method for rapid separation of sporozoites from mosquitoes. Journal of Parasitology. 1984; 70; 831-3.
 15. Chatterjee S, Druilhe P, Wery M. Irradiated sporozoites prime mice to produce high antibody titres upon viable *Plasmodium berghei* sporozoite challenge, which act upon liver-stage development. Parasitology. 1999; 118 (3): 219-25.

16. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacchi J, *et al.* Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 1155-64.
17. Jenkins MC, Chute MB, Danforth HD, Lillehoj HS. Gamma-irradiated and nonirradiated *Eimeria tenella* sporozoites exhibit differential uracil uptake and expression of a 7- to 10-kDa metabolic antigen. *Experimental Parasitology.* 1995; 80(4): 645–53.
18. Lasonder E, Janse CJ, van Gemert GJ, Mair GR, Vermunt AM, Douradinha BG, *et al.* Proteomic profiling of *Plasmodium* sporozoite maturation identifies new proteins essential for parasite development and infectivity. *PLoS Pathog.* 2008; 4(10): e1000195.
19. Zocevic A, Carmi-Leroy A, Sautereau J, d'Alayer J, Lenormand P, Rousselle JC, *et al.* New markers in *Anopheles gambiae* salivary glands after *Plasmodium berghei* infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2013; 13(XX).
20. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg M, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 1285-92.
21. Roditi I, Liniger M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends Microbiol.* 2002; 10: 128-34.
22. Ménard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect.* 2000; 2: 633–42.
23. Sinnis P, Nardin E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin related anonymous protein. In : *Malaria Immunology.* P. Perlmann, M. Troye-Blomberg. editors. S. Karger AG (edited). Basel, Switzerland. 2002; p 70–96.
24. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, *et al.* The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *Journal of Experimental Medicine.* 2011; 208(2): 341-56.
25. Ben Mamoun C, Gluzman IY, Hott C, Mac Millan SK, Amarakone AS, Anderson DL, *et al.* Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed by microarray analysis. *Mol Microbiol.* 2001; 39: 26–36.
26. Eling W, Hooghof J, van de Vegte-Bolmer M, Sauerwein R, van Gemert GJ. Tropical temperatures can inhibit development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the mosquito. *Proc. Exper. Appl. Entomol. Nev Amsterdam.* 2001; 12: 151-6.

