

## PERUBAHAN JENIS LEUKOSIT PADA MENCIT YANG DIIMUNISASI DENGAN PLASMODIUM BERGHEI YANG DIRADIASI

Darlina, Tur Rahardjo, dan Siti Nurhayati

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi  
Jl. Raya Pasar Jumat Lebak Bulus Jakarta Selatan

### ABSTRAK

**PERUBAHAN JENIS LEUKOSIT PADA MENCIT YANG DIIMUNISASI DENGAN Plasmodium berghei YANG DIRADIASI.** Untuk mengidentifikasi mekanisme kekebalan yang bersifat protektif telah dilakukan penelitian pengaruh radiasi terhadap perubahan jenis leukosit pada mencit yang diimunisasi dengan P.berghei yang diradiasi dengan dosis 175 Gy. Perubahan sel yang diidentifikasi meliputi sel limfosit, monosit, dan granulosit. Mencit diimunisasi dengan 0,3 ml vaksin P.berghei stadium eritrositik yang mengandung  $\pm 1 \times 10^7$  parasit stadium eritrositik secara intraperitoneal. Pengamatan yang dilakukan pada hari ke-1 hingga 14 meliputi angka parasitemia, jumlah sel limfosit, monosit dan granulosit. Pengambilan sampel darah mencit diamati setiap dua hari sekali dengan mengambil darah perifer dari ujung ekor. Darah yang diperoleh dibuat sediaan apus darah tipis untuk menghitung jenis sel leukosit. Jumlah sel limfosit, monosit dan granulosit dihitung berdasarkan prosentase sel dan jumlah sel leukosit. Hasil penelitian jenis sel leukosit yang berperan dalam respon imun, menunjukkan hasil sebagai berikut: mencit yang diinfeksi dengan parasit yang diradiasi kadar limfositnya meningkat 2 kali dari kadar normal pada hari ke-6 bahkan 20% lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang tidak diimunisasi. Pada mencit yang diimunisasi jumlah sel monosit meningkat hingga mencapai 8 kalinya pada hari ke-8. Persentase neutrofil tidak mengalami peningkatan bahkan terjadi sedikit penurunan dari jumlah awal. Keadaan tersebut mengesankan jenis leukosit yang berperan dalam mekanisme imunitas protektif selama infeksi malaria adalah limfosit dan monosit.

Kata kunci: P.berghei, Vaksin, leukosit, limfosit, monosit, granulosit

### ABSTRACT

**CHANGES OF LEUKOCYTES TYPE IN MICE IMMUNIZED WITH IRRADIATED Plasmodium berghei.** In an effort to identify the mechanisms of protective immunity it was conducted the study of radiation effects of the alterations of leukocytes types in mice immunized with P.berghei irradiated with dose of 175 Gy. Cell changes identified include lymphocytes, monocytes, and granulocytes. Mice immunized intraperitoneal with 0.3 ml of vaccine containing P.berghei of erythrocytic stage  $\pm 1 \times 10^7$  parasites. Observations were made on days 1 to 14 includes number of parasitemia, the number of lymphocytes, monocytes and granulocytes. Blood sampling of mice were observed every two day by taking peripheral blood from the tail. This blood was made for thin blood smears for counting leukocyte cell types. The number of lymphocytes, monocytes and granulocytes was calculated based on the percentage of cells and cell numbers of leukocytes. The results of studies of the role of leukocyte cell types in the immune response, shows the following results of lymphocytes levels mice infected with irradiated parasites was increased 2 times than the normal levels even 20% higher compared to not immunized mice. In immunized mice monocyte cell number was increased to eight time when 8 day. The percentage of neutrophils did not increase even a slight decrease from the initial amount. From these results it can be concluded that the situation is impressive types of leukocytes that play a role in the mechanisms of protective immunity during malaria infection are lymphocytes and monocytes.

Key words: P.berghei, Vaccines, leukocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit malaria sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di negara beriklim tropis seperti di Indonesia. Malaria bahkan sudah tersebar di seluruh pulau dengan derajat endemisitas yang berbeda-beda. Pada tahun 2003 malaria sudah tersebar di 6.053 desa pada 226 kabupaten di 30 provinsi. Kondisi tersebut diperberat dengan semakin luasnya parasit yang resisten terhadap obat anti malaria yang selama ini digunakan dan nyamuk yang resisten terhadap insektisida. Kemampuan parasit untuk tahan terhadap obat baru dan kemampuan vektor nyamuk untuk tahan terhadap insektisida, membuat vaksin terhadap malaria sangat dibutuhkan [1].

*Plasmodium* sp, parasit malaria mempunyai lingkaran hidup yang kompleks di dalam tubuh inangnya, dimulai dari masuknya sporozoit lewat gigitan nyamuk diikuti dengan pertumbuhan parasit di dalam sel hati [2]. Dengan selesainya siklus parasit dalam hati akan terbentuk banyak merozoit yang akan menginvasi sel darah merah. Kehidupan *plasmodium* di dalam sel darah merah ini merupakan stadium yang bertanggung jawab atas timbulnya berbagai kelainan klinis, patologis maupun imunologis pada tubuh penderitanya [3]. Beratnya penyakit malaria berhubungan dengan densitas parasit, serta berhubungan dengan kemampuan parasit bermitosis dengan baik di dalam hati maupun di dalam eritrosit. Siklus eritrositik ini menimbulkan tanda dan gejala karakteristik dan terus tidak mereda sampai inang tersebut mati. Vaksin malaria stadium eritrositik digunakan untuk menghambat perkembangan parasit di dalam eritrosit serta mengurangi manifestasi klinis yang timbul dengan mengaktifkan respon imun [4].

Pelemahan (atenuasi) mikroorganisme patogen merupakan strategi untuk pengembangan vaksin sejak pertama kali ditemukan oleh Louis Pasteur tahun 1870. Pembuatan vaksin dapat dilakukan dari seluruh bagian agen atau suatu bagian yang diisolasi dari agen penginfeksi yang diatenuasi/dilemahkan atau dinon-aktifkan. Salah satu alternatif untuk pembuatan vaksin adalah menggunakan teknik nuklir [5]. Young melaporkan bahwa iradiasi dapat mengubah agen patogen menjadi non patogen yang mampu menstimulasi sistem kekebalan dalam tubuh. Iradiasi secara teknik merupakan proses sederhana yang mempertahankan sifat struktural mikroorganisme patogen tanpa menghancurkan antigen alamiah atau adjuvant intrinsik oleh karena itu suatu respon imun yang kuat akan terbentuk pada inang yang divaksin [6].

Salah satu reaksi imunologis yang menjadi ciri khusus dari infeksi malaria adalah pembesaran limpa yang mungkin disebabkan oleh naiknya jumlah sel limfosit dan/atau sel makrofag serta sel darah lainnya. Naiknya jumlah sel-sel tersebut

dipengaruhi oleh zat pembentukan darah (*hemopoietic stimulating factor*) yang diproduksi oleh sel imunitas setelah dirangsang oleh antigen malaria tertentu [7].

Untuk merencanakan pembuatan vaksin malaria yang efektif diperlukan pengetahuan dasar tentang reaksi kekebalan tubuh yang terjadi selama infeksi malaria. Oleh karena itu perlu dipelajari reaksi imunitas yang terjadi dalam tubuh inang baik yang imun maupun yang tidak imun selama infeksi malaria. Leukosit merupakan komponen darah yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh [7]. Pada makalah ini dipelajari pengaruh radiasi terhadap perubahan jenis leukosit pada mencit yang diimunisasi dengan *P.berghei* yang diradiasi dengan dosis 175 Gy. Perubahan sel yang diidentifikasi meliputi sel limfosit, monosit, dan granulosit.

## 2. BAHAN DAN TATA KERJA

### Parasit

*Plasmodium berghei* strain ANKA diperoleh dari Lembaga Eijkman dan Depkes Jakarta. Pengembang biakan parasit dilakukan dengan cara menginfeksikannya ke dalam tubuh mencit strain Swiss di laboratorium Biomedika PTKMR BATAN.

### Hewan coba

Mencit (*Swiss Webster*) jantan berumur sekitar 2 bulan dengan berat sekitar 35 gram. Mencit dipelihara dalam kandang fiber glass dengan tutup stainless stel serta makanan pelet dan minuman secara *ad libitum* (secukupnya).

### Kultur *Plasmodium* sp *in vivo*

*Plasmodium berghei* dibiakan dalam tubuh mencit Swiss. Tiap inang diinfeksi dengan parasit stadium eritrositik melalui penyuntikan secara intraperitoneal. Parasitemia diperiksa setiap dua hari dengan membuat apusan darah dari ujung ekor mencit.

### Pembuatan crude vaksin *Plasmodium* sp iradiasi

Apabila parasitemia telah mencapai lebih dari 20%, mencit dianestesi dengan eter dan darahnya dikoleksi dari fungsi jantung menggunakan syringe 1 ml yang berisi anti koagulan (*citrat phospat dextrose*/CPD). Darah ditampung dalam beberapa tabung eppendorf selanjutnya dilakukan radiasi pada dosis 175 Gy dengan laju dosis 380,5 Gy/jam dengan menggunakan "Irradiator IRPASENA", Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN. Sebagai kontrol positif adalah *P.berghei* yang tidak diradiasi (0 Gy)

### Vaksinasi dan infeksi pada hewan coba

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *in vivo* pada hewan coba. Vaksin adalah *Plasmodium* yang telah dilemahkan dengan

sinar gamma dengan dosis 175 Gy. Mencit diimunisasi dengan 0,3 ml vaksin *P.berghei* stadium eritrositik yang mengandung  $\pm 1 \times 10^7$  parasit stadium eritrositik secara intraperitoneal.

### Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada hari ke-2 hingga 14 meliputi perubahan jenis leukosit yaitu, sel limfosit, monosit dan granulosit. Pengambilan sampel darah mencit diamati setiap dua hari sekali dengan mengambil darah perifer dari ujung ekor. Darah yang diperoleh dibuat sediaan apus darah tipis. Apusan dibiarkan mengering kemudian difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Apusan diwarnai dengan 10 % larutan Giemsa dan dibiarkan selama 30 menit [8]. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dihitung diantara 10.000 eritrosit yang diperiksa.

Penghitungan leukosit dalam darah dilakukan dengan mengambil sepuluh mikroliter darah dicampur dengan larutan "Turk" yang mengandung asam asetat 8%. Jumlah sel yang berinti dihitung dengan menggunakan hemositometer. Sediaan apus darah disiapkan untuk hitung jenis sel leukosit. Jumlah sel limfosit dihitung berdasarkan prosentase sel limfosit dan jumlah sel leukosit.

Setiap 4 hari dua ekor mencit dibunuh dengan menggunakan eter. Rongga perut Isolasi dibuka dan limpa dan hati diangkat dari rongga perut mencit secara aseptis, kemudian ditempatkan dalam cawan petri kemudian ditimbang dengan timbangan analitik.

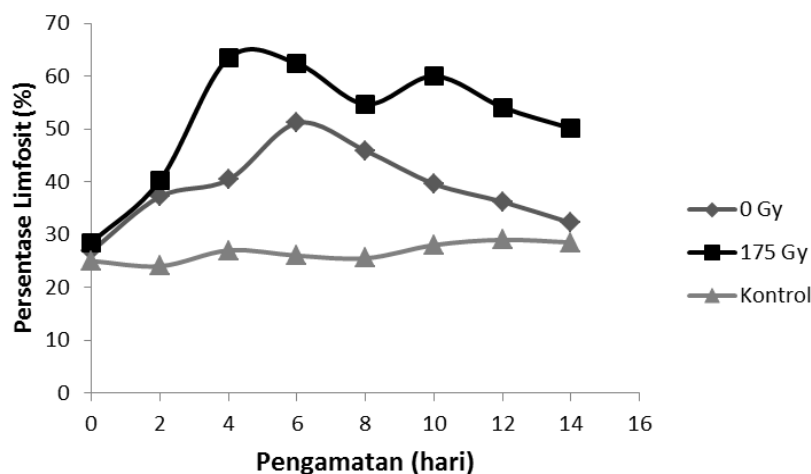
### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara garis besar, sistem imun menurut sel tubuh dibagi menjadi sistem imun humoral dan sistem imun seluler. Sistem imun humoral terdiri atas antibodi (Imunoglobulin) dan sekret tubuh

(saliva, air mata, serumen, keringat, asam lambung, pepsin, dll). Sedangkan sistem imun dalam bentuk seluler berupa makrofag, limfosit, neutrofil beredar di dalam tubuh kita [ 5].

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan tubuh terhadap zat-zat asing dan bertugas melawan para antigen. Dalam usaha mengidentifikasi mekanisme kekebalan bersifat protektif yang dipacu dalam tindakan imunisasi dilakukan penelitian tentang perubahan jumlah sel leukosit. Populasi sel yang diteliti adalah jenis sel leukosit yang berada di dalam sirkulasi darah. Ada bermacam-macam leukosit dengan berbagai fungsi. Berdasarkan ada/tidaknya granula di dalam plasma, leukosit dibagi menjadi dua yaitu leukosit bergranula disebut granulosit dan leukosit tidak bergranulosit disebut agranulosit [9]. Aktivitas proliferasi sel leukosit diteliti dengan mengamati perubahan jumlah sel selama terjadinya infeksi. Perubahan sel yang diidentifikasi meliputi sel limfosit, monosit, dan granulosit.

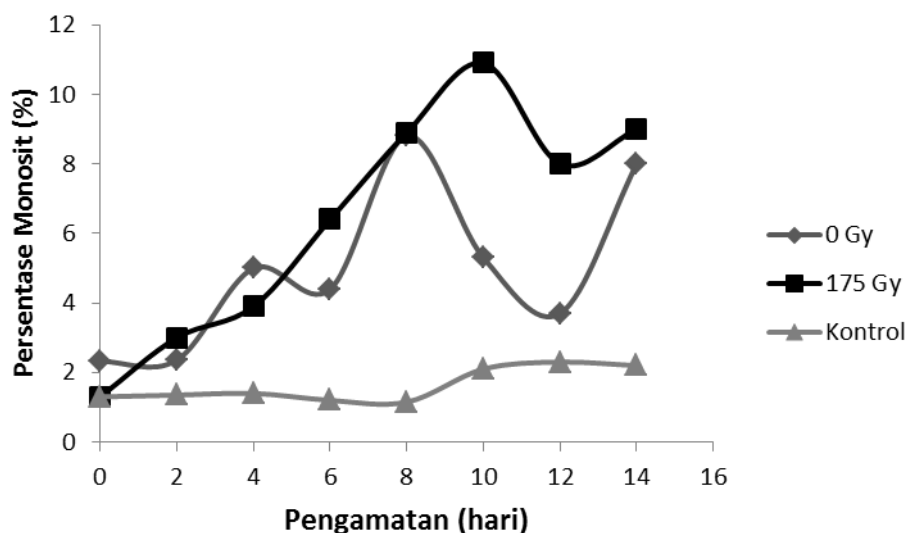
Sel limfosit merupakan jenis sel darah putih yang agranulosit. Didalam apusan darah sel limfosit mempunyai inti bulat yang kadang-kadang sedikit bertakik [10]. Hasil pengamatan perubahan jumlah sel limfosit disajikan pada Gambar 1. Pada mencit yang tidak diimunisasi atau mencit kontrol yaitu mencit yang diinfeksi dengan *P.berghei* yang tidak diradiasi (0 Gy) dalam sebelum diinfeksi persentase limfositnya 27 %. Terjadi kenaikan persentase sel limfosit hingga 1,5 kali pada hari ke-8, setelah itu jumlah sel limfosit terus menurun. Pada mencit yang diimunisasi persentase limfosit 28 % jumlah sel terus meningkat hingga lebih 2 kali dari jumlah awal pada hari ke-6. Setelah hari ke-6 sedikit menurun namun demikian tetap lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang tidak diimunisasi.



Gambar 1. Perubahan jumlah sel limfosit pada mencit yang diimunisasi dengan *P.berghei* yang diradiasi dengan dosis 175 Gy dan yang tidak diimunisasi.

Monosit (Jenis sel agranulosit dari leukosit), merupakan sel yang terbesar diantara sel leukosit. Didalam apusan darah sel monosit ini dapat berbentuk oval, sebagai tapal kuda atau tampak seakan-akan terlipat-lipat. Butir-butir khromatinnya lebih halus dan tersebar rata dari pada butir khromatin limfosit [10]. Hasil pengamatan perubahan jumlah sel monosit dalam aliran darah tepi disajikan pada Gambar 2. Jumlah sel monosit

pada mencit yang tidak diimunisasi pada keadaan normal 2,6% dan jumlahnya terus meningkat sampai hari ke-8 mencapai 4 kali. Setelah hari ke-8 jumlah sel monosit menurun. Pada mencit yang diimunisasi jumlah sel monosit pada keadaan normal 1,3 %, jumlahnya terus meningkat hingga mencapai 8 kalinya pada hari-10. Setelah itu terjadi sedikit penurunan namun demikian persentase sel monosit relatif stabil hingga hari ke-14.



Gambar 2. Perubahan jumlah sel monosit pada mencit yang diimunisasi dengan P.berghei yang diradiasi dengan dosis 175 Gy dan yang tidak diimunisasi

Granulosit (jenis sel leukosit yang mempunyai granula spesifik), dalam keadaan hidup berupa tetesan setengah cair, dalam sitoplasmanya dan mempunyai bentuk inti yang bervariasi. Di antara granulosit, netrofil merupakan jenis sel yang terbanyak, merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik, menfagosit partikel kecil dengan aktif [9,10]. Pada penelitian ini kami menghitung semua jenis sel granulosit tanpa membedakan jenisnya. Perubahan jumlah sel granulosit (Gambar 3) pada mencit yang diimunisasi maupun yang tidak diimunisasi paska infeksi cenderung menurun. Pada keadaan normal jumlah sel granulosit pada mencit yang tidak diimunisasi adalah 70 %. Jumlah sel granulosit cenderung menurun hingga hari ke-14 penurunan sel mencapai 22% dari jumlah normal. Pada mencit yang diimunisasi jumlah sel granulosit pada keadaan normal adalah 52%, Jumlah sel ini terus menurun dimana hingga hari ke-14 penurunan sel mencapai 12 % dari jumlah normal. Penurunan jumlah sel granulosit pada mencit yang diimunisasi lebih rendah dibandingkan yang tidak diimunisasi.

Leukosit adalah sel darah yang bertanggung jawab terhadap sistem imun tubuh dan bertugas untuk memusnahkan benda-benda yang dianggap asing

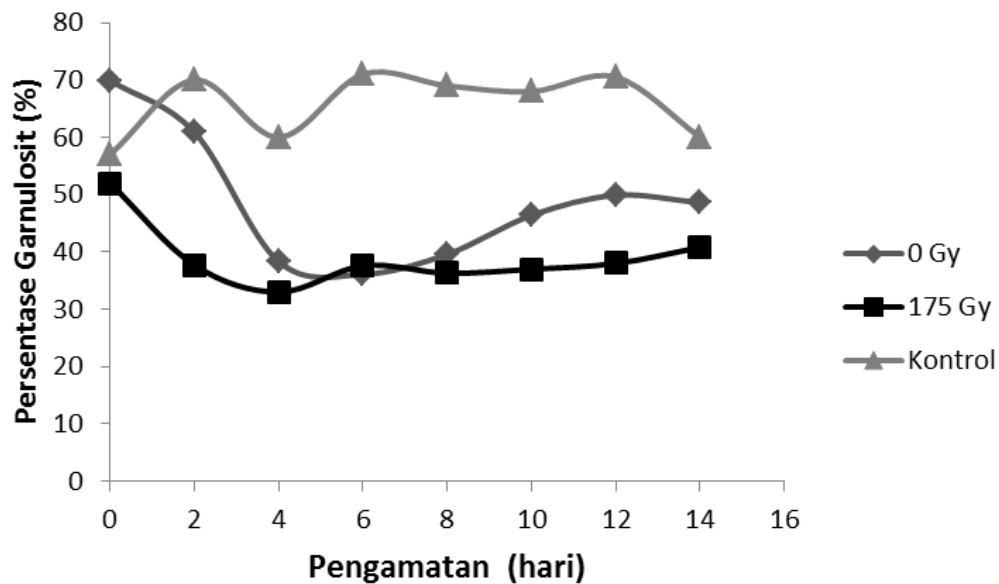
dan berbahaya oleh tubuh, Leukosit yang berperan penting terhadap kekebalan tubuh ada 2, yaitu sel limfosit dan fagosit. Sel fagosit akan menghancurkan antigen yang dengan cara menelannya (fagositosis). Ada 2 macam sel fagosit, yaitu neutrofil, dan monosit. Sel monosit dapat keluar dari dalam peredaran darah untuk masuk ke dalam jaringan tubuh. Kemampuan ini disebut diapedesis, dan berguna untuk melacak/mencari lokasi dimana antigen atau kuman berada. Jika antigen ditemukan maka sel makrofag juga akan melakukan fagositosis. Sedangkan limfosit bertugas mengingat dan mengenali benda yang masuk ke dalam tubuh serta membantu tubuh menghancurkan mereka. Sedangkan sel lainnya yakni netrofil, bertugas melawan bakteri [10].

Sel limfosit merupakan sel leukosit mempunyai kedudukan yang penting dalam sistem imunitas tubuh, sehingga sel-sel tersebut tidak saja terdapat dalam darah, melainkan dalam jaringan khusus yang dinamakan jaringan limfoid. Berbeda dengan sel-sel leukosit yang lain, limfosit setelah dilepaskan dari sumsum tulang belum dapat berfungsi secara penuh karena harus mengalami differensiasi lebih lanjut. Apabila sudah masak sehingga mampu berperan dalam respon imunologik, maka sel-sel tersebut dinamakan

sebagai sel imunokompeten. Sel limfosit imunokompeten dibedakan menjadi limfosit B dan limfosit T. Limfosit T sebelumnya mengalami diferensiasi di dalam kelenjar thymus, sedangkan limfosit B dalam jaringan yang dinamakan Bursa ekivalen yang diduga keras jaringan sumsum tulang sendiri. Kedua jenis limfosit ini berbeda dalam fungsi imunologiknya [9,10].

Pada mencit yang diinfeksi dengan parasit terlihat jumlah sel limfositnya meningkat dari jumlah awal. Meningkatnya persentase limfosit dalam darah menunjukkan terjadinya mekanisme pertahanan tubuh terhadap *P.berghei*.

Mencit yang diinfeksi dengan parasit yang diradiasi kadar limfositnya meningkat 2 kali dari kadar normal pada hari ke-6 bahkan 20% lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang tidak diimunisasi. Hal ini menunjukkan pada mencit yang diinfeksi dengan *P.berghei* yang diradiasi terjadi respon imun. Respon imunologi ini selanjutnya akan menghasilkan sel sel imunokompeten yaitu sel limfosit B dan limfosit T, walaupun dalam sediaan apus tidak dapat membedakannya



Gambar 3. Perubahan jumlah sel granulosit pada mencit yang diimunisasi dengan *P.berghei* yang diradiasi dengan dosis 175 Gy dan yang tidak diimunisasi

Monosit merupakan jenis sel fagosit yang akan menghancurkan antigen dengan cara menelannya. Monosit mampu mengadakan gerakan dengan jalan membentuk pseudopodia sehingga dapat bermigrasi menembus kapiler untuk masuk ke dalam jaringan pengikat. Dalam jaringan pengikat monosit berubah menjadi sel makrofag atau sel-sel lain yang diklasifikasikan sebagai sel fagositik. Didalam jaringan mereka masih membelah diri. Selain berfungsi fagositosis makrofag dapat berperan menyampaikan antigen kepada limfosit. Meningkatnya jumlah sel monosit yang cukup tinggi pada mencit yang diinfeksi menunjukkan terjadinya fagosit parasit sebagai mekanisme pertahanan tubuh [11]. Dalam penelitian ini kenaikan jumlah monosit yang tinggi hingga mencapai 8 kalinya pada *P.berghei* yang diinfeksi dengan parasit yang diradiasi, menunjukkan terjadinya respon imun dimana sel makrofag berperan menyampaikan antigen kepada limfosit untuk bekerjasama dalam sistem imun.

Neutrofil merupakan jenis sel Granulosit yang dominan yang berperan dalam fagosit antigen. Persentase neutrofil pada penelitian ini tidak mengalami peningkatan bahkan terjadi sedikit penurunan dari jumlah awal. Dari hasil ini terlihat neutrofil kurang berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap *P.berghei*. Hal ini kemungkinan karena neutrofil lebih berperan dalam melawan bakteri.

Villeval et al telah melakukan penelitian faktor yang mengendalikan perubahan jumlah lekosit selama infeksi malaria dengan *P.berghei* yang fatal dan *P.chabaudii* yang tidak fatal. Dilaporkan bahwa baik pada infeksi yang fatal maupun yang tidak fatal terjadi kenaikan kadar *hemopoietic stimulin factor* dalam serum yang setara tetapi kenaikan jumlah lekositnya lebih tinggi pada infeksi yang tidak fatal. Kenaikan jumlah sel lekosit pada mencit yang diinfeksi dengan malaria yang tidak fatal tersebut nampaknya berkaitan dengan kemampuan sistem imunitas tubuh untuk

mengeliminasi parasit yang ada. Kenaikan kadar *hemopoietic stimulin factor* dalam serum selama infeksi malaria kemungkinan juga menunjukkan adanya kenaikan jumlah atau aktivitas limfosit selama infeksi [11].

#### 4. KESIMPULAN.

Hasil penelitian jenis sel leukosit yang berperan dalam respon imun menunjukkan bahwa mencit yang diinfeksi dengan parasit yang diradiasi kadar limfositnya meningkat 2 kali dari kadar normal bahkan 20% lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang tidak diimunisasi. Pada mencit yang diimunisasi jumlah sel monosit meningkat hingga mencapai 8 kalinya. Persentase neutrofil tidak mengalami peningkatan bahkan terjadi sedikit penurunan dari jumlah awal. Sehingga mengesankan jenis leukosit yang berperan dalam mekanisme imunitas protektif selama infeksi malaria adalah limfosit dan monosit.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. ANONIM, Rencana Kerja (Renja) Program Pengendalian Malaria 2005-2009, Subdit Malaria, Direktorat PPBB, Direktorat Jenderal PP&PL, Departemen Kesehatan RI, (2006).
2. ANONIM, Malaria pada manusia, Info Penyakit Menular; Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan, DepKes RI, 2 Desember (2004).
3. LAIHAD F.J., SURIADI GUNAWAN, Malaria di Indonesia, In; Harijanto (ed); Epidemiologi, patogenesis dan manifestasi klinis, Penerbit Buku Kedokteran EGC, (2000) 17-25
4. BALLOU W.R., Malaria Vaccines in Development., *Expert Opin Emerg Drugs* 10, (2005) 489-503
5. ENGERS HD, GODAL T, Malaria vaccines development: current status, *Parasitologi Today* 14 (1998), 56 – 63
6. BIELLO, D., Irradiated pathogens used to create potent vaccine, *Science News*, July 26, (2006)
7. LANDAU, I, GAUTRET P., Animal models rodents In: Malaria, Parasite biology, pathogenesis, and protection, Ed: Sherman, I.W. ASM Press, Washington, DC, (1998). 401-417
8. LJUNGSTROM I., PERLAMMAN, H., SCHILCHTHERLE, M., SHERE, A., and WAHLGREEN, M., Methods In Malaria Research, MR4/ATCC, Manassas Virginia, 2004
9. WYLER DJ: Peripheral lymphocyte subpopulation in human falciparum malaria, *Clin exp Immunol* 23:471, 1976
10. ARIFA FAIGANI I., Jenis sel leukosit, <http://www.scribd.com/doc/55620042/16/jenis-leukosit>, hal 20-26
11. MAGGIO-PRICE, L, BROOKOFF, D., AND WEISS, L., 1985, Changes in hematopoietic stem cells in bone marrow of mice with *Plasmodium berghei* malaria *Blood* 66:1080-1084