



PEMBUATAN KULTUR IN VITRO STADIUM ERITROSIT PLASMODIUM KNOWLESI A1-H.1

Fauzi Muh^{1*}, Eun-Taek Han²

¹ Department of Epidemiology and Tropical Diseases, Faculty of Public Health, Universitas Diponegoro

² Department of Environmental Biology and Tropical Medicine, College of Medicine, Kangwon National University

*Corresponding author : fauzimuh010@lecturer.undip.ac.id

Info Artikel : Diterima 13 September 2023 ; Disetujui 5 November 2023 ; Publikasi 1 Desember 2023

ABSTRAK

Latar belakang: *Plasmodium knowlesi* adalah spesies *Plasmodium* yang terkenal mampu menyebabkan malaria zoonosis pada manusia. Infeksi *P knowlesi* dapat menyebabkan penyakit yang bersifat parah hingga kematian. Parasit malaria ini dapat menginfeksi darah manusia dan juga kera. Kultur in vitro parasit stadium eritrosit (*blood stage*) jangka panjang sangat memungkinkan untuk *P falciparum* dan *P knowlesi*. *P knowlesi* saat ini digunakan sebagai model eksperimental untuk penelitian in vivo, ex vivo dan in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk mengkultur *P knowlesi* yang dilakukan secara kontinu dalam kondisi laboratorium.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan rancangan eksperimental dengan pendekatan observasional. Kami menggunakan strain *P knowlesi* A1-H.1 (PkA1-H.1) dengan beberapa kondisi laboratorium, seperti optimasi serum dan konsentrasi glukosa yang digunakan. *P knowlesi* di kultur selama 10 hari dan morfologi parasit dikonfirmasi dengan pewarnaan giemsa 10%.

Hasil: Strain PkA1-H.1 mampu mempertahankan kemampuannya untuk menginfeksi 100% sel darah merah manusia dalam kondisi laboratorium. Serum AB manusia dan serum kuda (10%, v/v) merupakan kondisi optimal untuk pertumbuhan PkA1-H.1. Total 2-4 gram dekstrosa anhidrat merupakan glukosa optimal yang dibutuhkan parasit untuk tumbuh. Parasit tumbuh perlahan pada 5 hari pertama setelah proses kultur dilakukan (*thawing*), namun pertumbuhan bisa meningkat pesat setelah hari ke 6 kultur. Parasit nampak sehat dari hari pertama hingga hari kesepuluh, yang dibuktikan dengan penampakan morfologi ring, trophozoit dan schizont.

Simpulan: Hasil ini menunjukkan pentingnya faktor pertumbuhan yang optimal seperti konsentrasi serum dan dekstrosa untuk mendukung pertumbuhan PkA1-H.1. Keberhasilan kultur in vitro bisa membantu penelitian tentang biologi invasi, vaksin dan skrining obat baru.

Kata kunci: malaria; zoonosis; *P knowlesi*, kultur in-vitro

ABSTRACT

Title: *Re-setting-up the Continous in-vitro Culture of Plasmodium knowlesi Blood Stages*

Background: *Plasmodium knowlesi* is well-known *Plasmodium* species causing zoonotic malaria in humans. The infection of *P knowlesi* cause severe illness to death. This simian malaria parasite infects both macaque and human bloods. Long-term in vitro cultures of blood-stage parasites are feasible for *Plasmodium falciparum* and *P knowlesi*. However, *P knowlesi* is recently used as experimental model for in vivo, ex vivo and in vitro studies. This study aimed to culture continuously the *P knowlesi* in laboratory condition with human red blood cells.

Method: This study used an experimental study design with observational approach. We used *P knowlesi* A1-H.1 strain (PkA1-H.1) under several laboratory conditions, such as serum and glucose concentration. The culture was conducted for 10 days. The morphology of parasites was confirmed using 10% Giemsa staining.

Result: PkA1-H.1 human-adapted strain was successfully maintained ability to grow under the 100% human red blood cells. Pooled-human AB serum and horse serum (10%, v/v) was optimal condition for PkA1-H.1 to grow. Total 2-4 gram of dextrose anhydrous was optimal glucose required for parasite to grow. The parasites grew slowly in the first 5 days after thawing, but the growth increased rapidly after day 6 of culture. The morphology of parasites was normally observed as seen healthy rings, trophozoites and schizonts.

Conclusion: This result showed the importance of optimal growth factors (serum and dextrose) to support the PkA1-H.1 under the laboratory condition. Its successful of continuous culture highlighted the use of culture for understanding of the invasion biology, vaccine or drug discoveries.

Keywords: malaria; zoonosis; *P knowlesi*, in vitro culture

PENDAHULUAN

Plasmodium knowlesi adalah salah satu spesies penyebab penyakit malaria zoonosis yang banyak ditemukan di Wilayah Asia Tenggara, terutama di Malaysia seperti yang banyak ditemukan di tahun 2004.¹ Saat ini *P knowlesi* telah banyak ditemukan di wilayah-wilayah di kawasan Asia Tenggara, seperti Indonesia, Thailand, Vietnam, Myanmar, Singapura, India dan Brunei Darussalam.²⁻⁵

Infeksi yang disebabkan oleh *P knowlesi* bisa berdampak secara serius. Pasien yang terinfeksi malaria *P knowlesi* bisa berkembang menjadi malaria berat dan kematian.⁶ Di negara endemis dan berkembang, diagnosis *P knowlesi* ditegakkan dengan menggunakan mikroskopi. Diagnosis penyakit malaria *P knowlesi* sering tidak tepat, banyak terjadi mis-diagnosis yang mengakibatkan pada keterlambatan penanganan ataupun ketidaktepatan pengobatan yang diberikan.⁷ Sumber penularan *P knowlesi* berkaitan erat dengan aktivitas berisiko yang dilakukan di kawasan hutan dimana manusia memasuki habitat monyet dan nyamuk. Untuk mendiagnosis *P knowlesi* diperlukan teknik identifikasi morfologi yang tepat yang mampu membedakan dengan spesies *Plasmodium* yang lain. Selain itu, diperlukan pula riset untuk mengetahui biologi proses invasi dari *P knowlesi* yang akan bermanfaat dalam perancangan vaksin dan atau obat.⁸

Pengembangan sistem kultur di laboratorium dari *P knowlesi* sangat bermanfaat dalam riset pengembangan vaksin dan/atau obat. Seperti yang sudah dilakukan dengan *P falciparum*, malaria yang paling mematikan, terbukti kultur in vitro membantu pengembangan riset untuk modifikasi genetik, skrining kandidat obat dan bahkan pengembangan vaksin. Kultur in vitro dari *Plasmodium* merupakan salah satu teknik yang tidak bisa dengan mudah dilakukan di semua laboratorium yang ada. Ada banyak hal yang mempengaruhi tingkat kesuksesan/kegagalan dalam melakukan kultur in vitro *Plasmodium*. *P knowlesi* yang sebelumnya diketahui sebagai parasit yang menyerang monyet, kini diketahui bisa hidup di dalam tubuh manusia dengan sangat baik. Hal ini telah menjadikan bahwa kultur in vitro terhadap *P knowlesi* bisa sangat dilakukan di laboratorium, seperti halnya yang dilakukan pada *P falciparum*.⁹

P knowlesi mempunyai karakteristik biologi yang berbeda dengan *P falciparum*. Dimana salah satunya adalah mempunyai siklus perkembangan

dalam darah berkisar 24 jam untuk 1 siklusnya (dari ring hingga schizont). *P knowlesi* juga mempunyai merozoit dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan *P falciparum* tapi mempunyai ukuran merozoit yang lebih besar. Lebih dari itu, *P falciparum* mempunyai tingkat kesuksesan modifikasi genetik yang lebih rendah dibandingkan dengan *P knowlesi*. Banyak riset yang tidak bisa berjalan lancar untuk melakukan modifikasi genetik dengan *P falciparum*, sehingga kultur in vitro dengan *P knowlesi* mempunyai pengaruh yang sangat besar dalam pengembangan riset untuk pengembangan vaksin dan skrining kandidat obat.^{8,9} Kesuksesan kultur in vitro ini diharapkan dapat mempermudah peneliti untuk menemukan kandidat vaksin dan obat malaria. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kultur in vitro dari *P knowlesi* pada kondisi laboratorium yang kami miliki.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif eksperimental yang seluruhnya dilakukan dengan pendekatan observasional di laboratorium.

Darah Manusia

Darah manusia untuk kultur in vitro rutin diperoleh dari donatur yang bergolongan darah O setelah mendapatkan persetujuan dengan *informed consent*. Darah vena sebanyak kurang lebih 10 mL diambil dengan tabung EDTA. Sel darah merah dicuci sebanyak tiga kali dengan menggunakan media RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) yang disentrifugasi 3,000 rpm selama 5 menit, diulang selama 3 kali. Sel darah putih akan dibuang. Pelet dari sel darah merah akan di resuspensi dengan media RPMI 1640 (pencampuran 1:1, v/v). Kode etik penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik Kangwon National University Hospital (IRB No. KWNUIRB-2017-05-009-001).

Media kultur

Media kultur in vitro yang digunakan adalah RPMI 1640 (Invitrogen) tidak lengkap dengan penambahan komponen sebagai berikut: 2,3 g/L natrium bikarbonat, 4 g/L dekstrosa, 5,957 g/L Hepes, 0,05 g/L hipoksantin, 5 g /L Albumax II, 0,025 g/L gentamisin sulfat, 0,292 g/LL-glutamin. Media RPMI 1640 lengkap dibuatkan dengan menambahkan 10% (v/v) serum manusia AB positif

atau dengan menggunakan serum dari kuda (Gibco) ke dalam media RPMI 1640 tidak lengkap.

Kultur In vitro

Kultur in vitro dilakukan dengan menggunakan strain parasit *Plasmodium knowlesi* A1-H.1 donasi dari Robert W. Moon.⁹ Parasit beku diambil dari nitrogen cair dan dicairkan beberapa saat. Parasit yang sudah mencair kemudian ditambahkan tetes demi tetes dengan 100 uL 12% NaCl, kemudian disentrifugasi 1,500 rpm selama 3 menit, supernatan dibuang. Ulangi dengan menambahkan 1,6% NaCl, sentrifugasi dan buang supernatan. Ulangi yang ketiga kalinya dengan 0,9% NaCl dan 0,2% glukosa, sentrifugasi, dan buang supernatan. Parasit di resuspensi dengan menambahkan media lengkap RPMI 1640 dengan 2% hematokrit eritrosit manusia. Parasit dikultur pada suhu 37°C dalam *flask* T25 (Thermofisher) dan diberi tambahan campuran gas 90% N₂, 5% O₂, dan 5% CO₂. Parasit kemudian dipisahkan menjadi 2 *flask* F1 dan F2 pada hari kelima (D5) dan kesembilan (D9). Perumbuhan kultur in vitro parasit di monitor setiap hari dengan menggunakan sediaan darah tipis yang diwarnai dengan 10% Giemsa. Morfologi parasit dan parasitemia dihitung dengan menggunakan mikroskop. *Flask* dengan parasitemia lebih dari 4%, parasitemia akan diturunkan ke angka kurang 1% dengan cara menambahkan dengan media lengkap dan darah baru 2% hematokrit.

Analisis Data

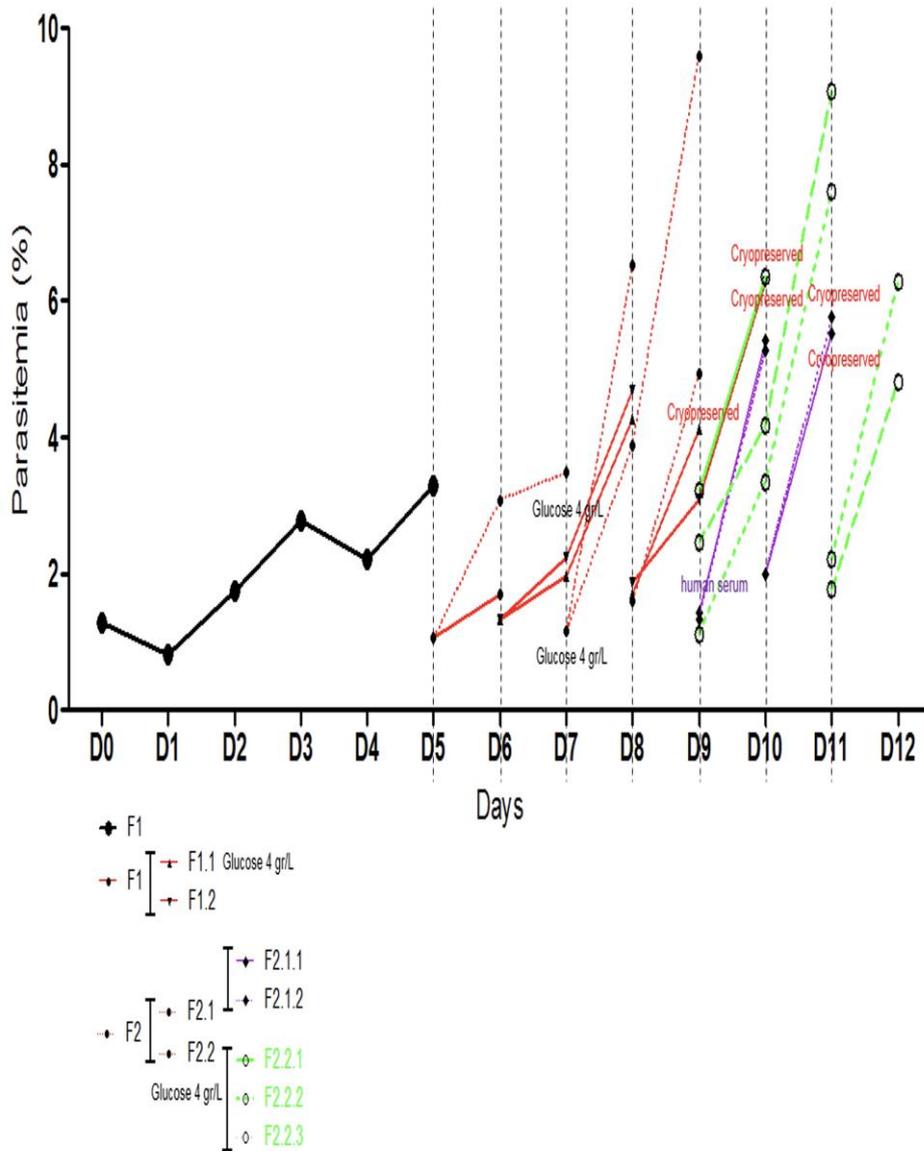
Data dianalisis dan divisualisasikan dengan menggunakan GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Hasil pengamatan mikroskop dilakukan dengan perbesaran objektif 100x dan divisualisasikan dalam bentuk gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Parasitemia harian PkA1-H.1

Parasit dikultur secara in vitro selama lebih dari tujuh hari. Pada 24 jam kultur, parasitemia mengalami penurunan dari 1.5% menjadi 1% (D1).

Tahapan ini sangat wajar terjadi, dimana parasit masih mengalami syok dan mulai beradaptasi dengan lingkungan baru, dimana kematian beberapa parasit terjadi. Parasitemia kembali naik secara terus menerus hingga hari kelima, parasitemia mencapai hampir 4% (Gambar 1). Pada hari kelima *flask* dipisahkan menjadi 2, yaitu F1 dan F2 dengan parasitemia di masing-masing *flask* berkisar 1%. Parasitemia di kedua *flask* (F1 dan F2) terus mengalami kenaikan hingga hari kesembilan (D9). Pada hari keenam (D6) *flask* F1 dipisahkan menjadi 2 *flask* (F1.1 dan F1.2) yang tumbuh terus menerus secara baik hingga hari kedelapan (D8). Sedangkan F2, pada hari kedelapan (D8), *flask* dipisahkan menjadi 2 (F2.1 dan F2.2). F2.2 tumbuh sangat baik hingga parasitemia mencapai hampir 10% di hari kesembilan (D9). Sedangkan F2.1 pada hari kedelapan (D8) ditambahkan volume media dan hematokrit darah untuk di simpan sebagai kryopreservasi sampel. F1.2 juga mengalami pertumbuhan hingga D10 dan disimpan sebagai sampel kryopreservasi. Pada hari kesembilan F2.1 dipisahkan menjadi 2 *flask* F2.1.1 dan F2.1.2 (garis berwarna ungu) yang kemudian dilakukan penyimpanan untuk kryopreservasi. Sedangkan F2.2 dipisahkan menjadi 3 *flask* baru F2.2.1, F2.2.2 dan F2.2.3. Kesemua *flask* menunjukkan pertumbuhan parasit yang sangat baik dan sehat. Tujuan dilakukannya pemisahan beberapa *flask* ini untuk melihat tingkat kemampuan parasit tumbuh dan berkembang dengan media dan darah yang segar atau baru. Sekaligus untuk melihat efisiensi parasit untuk menginfeksi sel darah merah yang baru. Ini sejalan dengan penelitian dari Robert W. Moon dimana klon parasit ini berasal, mampu mempertahankan efisiensi infeksi pada sel darah merah manusia dan tumbuh dengan baik pada media yang sudah dibuat.⁹ Dapat disimpulkan bahwa, parasit PkA1-H.1 yang dikultur di lab kami juga bisa tumbuh dengan sangat baik. Jumlah parasit yang sangat tinggi, didalam kultur in vitro ini bisa tercapai, ini bisa disebabkan oleh siklus hidup parasit yang cepat yaitu selama 24 jam.⁷



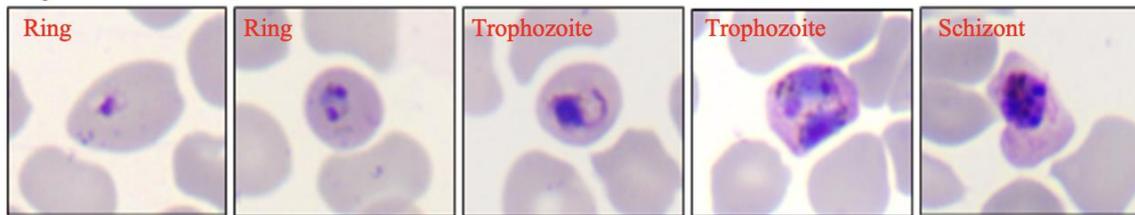
Gambar 1. Grafik Pertumbuhan Kultur in vitro PkA1-H.1. Grafik ini menunjukkan pertumbuhan dari generasi pertama F1 yang kemudian dipisahkan menjadi F1 dan F2. Kultur in vitro ini dilakukan selama 12 hari hingga pertumbuhan parasit sudah sangat stabil.

Morfologi parasit hari ke-0 sampai 3

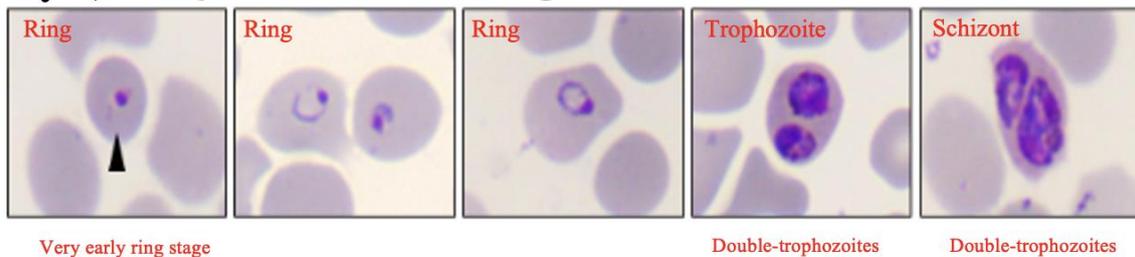
Untuk memastikan kondisi dari parasit yang dikultur secara in vitro, sediaan darah tipis dengan pewarnaan Giemsa dilakukan pada hari ke 0 dan ketiga (Gambar 2). Pada hari kedua, parasit terlihat mempunyai morfologi yang terlihat normal dari bentuk ring atau cincin, trophozoit hingga schizont. Setelah 12 jam dikultur, parasit bentuk cincin terlihat dengan titik kromatin dan sitoplasma yang sangat sehat (titik kromatin warna pink kebiru-biruan; sitoplasma berwarna biru). Infeksi ganda

juga terlihat pada hari pertama atau 12 jam setelah dikultur, dimana satu sel darah merah dihuni oleh dua trophozoit dan dua skizon muda. Hasil ini sesuai dengan hasil temuan sebelumnya, bahwa bentuk dari cincin dan trophozoit yang sehat terlihat dengan adanya titik kromatin, dan sitoplasma.⁹ Selain itu, morfologi yang tampak dari kultur in vitro ini juga terlihat sama dengan hasil yang ditemukan pada kondisi klinis infeksi malaria pada pasien yang ditemukan di Malaysia and Japan.^{1,10,11}

Day 0



Day 1; 12 hours culture



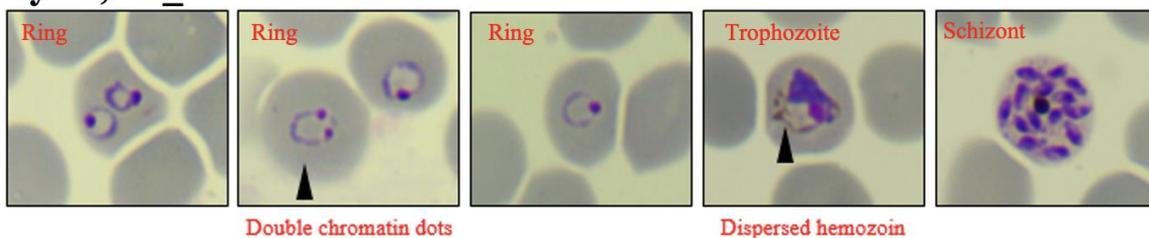
Gambar 2. Hasil pewarnaan Giemsa sediaan darah tipis. Hasil mikroskopi ini menunjukkan tahapan perkembangan beberapa parasit dari fase cincin, trophozoit dan skizon setelah 12 jam kultur dilakukan.

Morfologi parasit hari ke-10

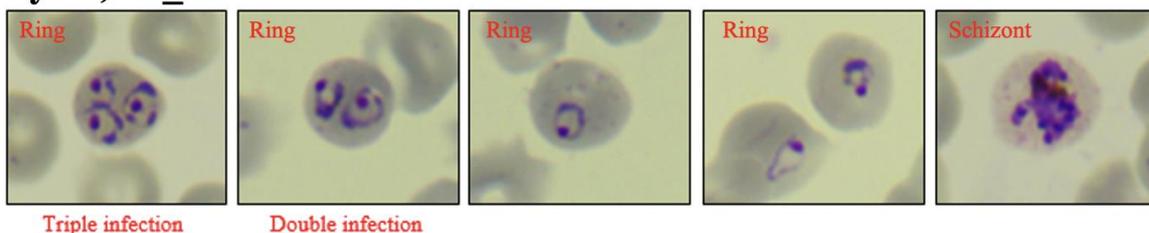
Pada hari kesepuluh, kondisi parasit yang mengalami peningkatan parasitemia diikuti juga oleh kondisi morfologi parasit yang terlihat normal. Pada hari kesepuluh ini terlihat pula infeksi ganda (F2_1.1) dan triplel (F2_1.2) dalam satu sel darah merah (Gambar 3). Infeksi ganda ini bisa juga terlihat dari hasil penelitian sebelumnya⁹ dan juga terlihat bentuk hemozoin yang tersebar pada sampel darah pasien yang terinfeksi.^{1,10} Terlihat pula bentuk cincin yang mempunyai 2 titik kromatin dan 1 sitoplasma, dimana ini ada tipikal dari *P knowlesi* yang teramati pula pada kondisi di lab dan pada pasien yang terinfeksi.^{9,11-12} Pada hari kesepuluh juga terlihat morfologi trophozoit yang mempunyai

bentuk hemozoin yang tersebar (*dispersed hemozoin*). Temuan ini sama dengan apa yang ditemukan oleh Robert W. Moon.⁹ Bentuk trophozoit PkA1-H.1 juga sangat mirip dengan bentuk trophozoit pada *P malariae*.¹² Bentuk skizon yang sudah sangat tua dan disiap dikeluarkan dari sel darah merah juga terlihat di hari kesepuluh pada penelitian ini (F2_1.1). Kesuksesan kultur in vitro di lab ini membuktikan juga bahwa parasit PkA1-H.1 ini stabil dari stok awalnya dari Robert W. Moon⁹ untuk bisa dikultur diberbagai tempat atau laboratorium diseluruh dunia. Kultur in vitro ini bisa mendukung berbagai riset untuk memahami interaksi host dan parasit.¹³

Day 10; F2_1.1



Day 10; F2_1.2



Gambar 3. Hasil pewarnaan Giemsa sediaan darah tipis. Hasil mikroskopi ini menunjukkan tahapan perkembangan beberapa parasit dari fase cincin, trophozoit dan skizon setelah hari ke-10.

SIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil menumbuhkan parasit *P knowlesi* A1-H.1 di laboratorium diluar dari laboratorium dimana PkA1-H.1 pertama kali dikultur. Parasit ini tumbuh dengan level parasitemia atau tingkat infeksi sel darah merah yang sangat baik per 24 jam sesuai dengan siklus hidup parasit. Morfologi yang tampak dari *P knowlesi* ini juga terlihat sangat normal dan sehat yang ditandai dengan bentuk normal dari ring, trophozoit dan skizon. Titik kromatin, sitoplasma dan hemozoin juga terlihat normal seperti pada infeksi yang ditemukan pada sampel darah pasien.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Singh, B. *et al.* A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* 363, 1017-1024, doi:10.1016/s0140-6736(04)15836-4 (2004).
- 2 Zaw, M. T. & Lin, Z. Human Plasmodium knowlesi infections in South-East Asian countries. *J Microbiol Immunol Infect* 52, 679-684, doi:10.1016/j.jmii.2019.05.012 (2019).
- 3 Ngerenna, S. *et al.* Case Report: Case Series of Human Plasmodium knowlesi Infection on the Southern Border of Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 1397-1401, doi:10.4269/ajtmh.19-0063 (2019).
- 4 Lubis, I. N. D. *et al.* Contribution of Plasmodium knowlesi to Multispecies Human Malaria Infections in North Sumatera, Indonesia. *J Infect Dis* 215, 1148-1155, doi:10.1093/infdis/jix091 (2017).
- 5 Jeslyn, W. P. *et al.* Molecular epidemiological investigation of Plasmodium knowlesi in humans and macaques in Singapore. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 131-135, doi:10.1089/vbz.2010.0024 (2011).
- 6 Daneshvar, C. *et al.* Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. *Clin Infect Dis* 49, 852-860, doi:10.1086/605439 (2009).
- 7 Grigg, M. J. *et al.* Plasmodium knowlesi detection methods for human infections-Diagnosis and surveillance. *Adv Parasitol* 113, 77-130, doi:10.1016/bs.apar.2021.08.002 (2021).
- 8 Muh, F. *et al.* Cross-species reactivity of antibodies against Plasmodium vivax blood-stage antigens to Plasmodium knowlesi. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008323, doi:10.1371/journal.pntd.0008323 (2020).
- 9 Moon, R. W. *et al.* Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 531-536, doi:10.1073/pnas.1216457110 (2013).
- 10 Tanizaki, R. *et al.* First case of Plasmodium knowlesi infection in a Japanese traveller returning from Malaysia. *Malaria Journal* 12, 128, doi:10.1186/1475-2875-12-128 (2013).
- 11 Lee, K. S., Cox-Singh, J., Brooke, G., Matusop, A. & Singh, B. Plasmodium knowlesi from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *Int J Parasitol* 39, 1125-1128, doi:10.1016/j.ijpara.2009.03.003 (2009).
- 12 Lee, K. S., Cox-Singh, J. & Singh, B. Morphological features and differential counts of Plasmodium knowlesi parasites in naturally acquired human infections. *Malar J* 8, 73, doi:10.1186/1475-2875-8-73 (2009).
- 13 Kocken, C. H. *et al.* Plasmodium knowlesi provides a rapid in vitro and in vivo transfection system that enables double-crossover gene knockout studies. *Infect Immun* 70, 655-660, doi:10.1128/iai.70.2.655-660.2002 (2002).