



**DETERMINASI DOSIS OPTIMAL PROTEIN REKOMBINAN
DBL2 β -PfEMP1 DALAM MENGINDUKSI RESPONS IMUN TIKUS
(*Rattus norvegicus*) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA**

SKRIPSI

Oleh :

Dwi Ari Santi Putri

NIM 182010101036

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2022



**DETERMINASI DOSIS OPTIMAL PROTEIN REKOMBINAN
DBL2 β -PfEMP1 DALAM MENGINDUKSI RESPONS IMUN TIKUS
(*Rattus norvegicus*) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :

Dwi Ari Santi Putri

NIM 182010101036

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2022

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan untuk:

1. Ayahanda Sapuriyanto dan ibunda Hidayatin Ningsih yang tercinta;
2. Guru-guru penulis sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Barang siapa yang menempuh jalan untuk mencari ilmu, maka Allah akan mudahkan baginya jalan menuju surga. (HR. Muslim, no. 2699)^{*)}



*) Alfiah. 2015. *Hadis Tarbawi*. Pekanbaru: Kreasi Edukasi.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwi Ari Santi Putri

NIM : 182010101036

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai Kandidat Vaksin Malaria” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan referensinya, belum pernah diajukan kepada institusi mana pun, dan bukan hasil jiplakan/duplikasi dari karya orang lain. Saya bertanggung jawab atas keabsahan, keorisinalitas, dan kebenaran isi dari skripsi saya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan maupun paksaan dari pihak mana pun serta saya bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 16 Februari 2022

Yang menyatakan,



Dwi Ari Santi Putri

182010101036

SKRIPSI

**DETERMINASI DOSIS OPTIMAL PROTEIN REKOMBINAN
DBL2 β -PfEMP1 DALAM MENGINDUKSI RESPONS IMUN TIKUS
(*Rattus norvegicus*) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA**

Oleh

Dwi Ari Santi Putri

NIM 182010101036

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Irawan Fajar Kusuma, M. Sc.,Sp. PD

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Rosita Dewi, M. Biotech.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai Kandidat Vaksin Malaria” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih,
M.Si., Gcert.AgHealthMed.
NIP. 197702222002122001

dr. Pulong Wijang Pralampita, Ph.D.
NIP. 760018009

Anggota II,

Anggota III,

dr. Irawan Fajar Kusuma, M.Sc, Sp. Pd
NIP. 198103032006041003

dr. Rosita Dewi, M.Biotek.
NIP. 198404282009122003

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA
NIP. 197304241999031002

RINGKASAN

Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai Kandidat Vaksin Malaria; **Dwi Ari Santi Putri; 182010101036; 2022; 92 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.**

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* dan ditransmisikan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Jumlah kasus malaria di dunia menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2019 mencapai 229 juta dengan estimasi kematian sebanyak 409.000 kasus. Pada tahun 2017, 63% dari keseluruhan kasus malaria di Indonesia disebabkan oleh *P. falciparum* (WHO, 2021). Malaria berat akibat *P. falciparum* dimediasi oleh antigen *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) yang diekspresikan di permukaan *infected red blood cell* (iRBC). Antigen PfEMP1 memiliki domain DBL2 β yang bersifat spesifik mengikat reseptor *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), reseptor yang terlibat dalam kejadian malaria berat. Peningkatan antibodi karena protein rekombinan DBL2 β dapat memblokir pengikatan antara DBL2 β dan reseptor ICAM-1. Karena peran penting dalam patogenesis malaria berat, DBL2 β -PfEMP1 menjadi kandidat vaksin malaria berbasis peptida. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 telah terbukti bersifat imunogenik dalam suatu penelitian *in vivo*. Namun, belum ada data mengenai dosis optimal protein rekombinan tersebut. Penelitian ini menguji respons imun yang direpresentasikan oleh kenaikan jumlah leukosit dan IgG. Nilai IgG akan menjadi dasar penentuan dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1.

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan tikus berusia 2-3 bulan dengan berat 150-350 g. Protein DBL2 β -PfEMP1 diproduksi, diekstraksi, dipurifikasi, divisualisasi dengan SDS-PAGE, kemudian dianalisis konsentrasinya dengan menggunakan *Bradford protein assay*. Dosis protein rekombinan yang diberikan yaitu, 100 μ g, 150 μ g, dan 200 μ g. Injeksi dilakukan sebanyak tiga kali dengan jeda waktu tiga minggu. Leukosit dihitung menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer* dan diamati di bawah mikroskop, sedangkan konsentrasi IgG diukur menggunakan uji ELISA. Hasil hitung jumlah leukosit dianalisis dengan uji *Friedman* dan *Kruskal Wallis*. Konsentrasi IgG memenuhi syarat uji parametrik, sehingga hasilnya dianalisis dengan *Mixed ANOVA*. Untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan, dilakukan uji *post hoc Bonferroni*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata leukosit terendah adalah pada saat pre-injeksi dan rata-rata leukosit tertinggi adalah pada saat 8 hari pasca injeksi injeksi sekunder II. Leukosit meningkat secara signifikan pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok kontrol tidak terjadi peningkatan leukosit. Pada data IgG, terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok tikus ($p < 0,05$). Perbedaan yang signifikan terjadi antara kelompok kontrol dan kelompok dosis 150 μ g. Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Dengan demikian, dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang dapat menginduksi respons imun tikus adalah 150 μ g.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan berkahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai Kandidat Vaksin Malaria”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M. Kes., Ph. D., Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Irawan Fajar Kusuma, M. Sc., Sp. PD selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Rosita Dewi, M. Biotek selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah berkenan untuk meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing selama pengerjaan skripsi ini;
3. Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyarningsih, M.Si., Gcert.AgHealthMed. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Pulong Wijang Pralampita, Ph.D. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah berkenan menguji, membimbing, dan memberikan ilmu serta saran selama pengerjaan skripsi ini;
4. dr. Sheilla Rachmania, M. Biotek selaku dosen anggota kelompok riset malaria yang telah memberikan semangat dan bimbingan selama penelitian di laboratorium;
5. Orang tua tercinta, Ayahanda Sapuriyanto dan Ibunda Hidayatin Ningsih yang tak hentinya mengirimkan doa, semangat, dan kasih sayang;
6. Kakak dan adik penulis, dr. Farihatun Nisak dan Sandi Riyanto Putra yang selalu memberi dukungan;
7. Intan Ria Neliana, S.Pd, M.Biotek. dan seluruh analis di laboratorium CDAST Universitas Jember yang telah mengajarkan keterampilan atau *skill* di laboratorium;

8. Putri Daffa S., Nadiyya D. M., dan Annisa Nadya A., yang selalu memotivasi, mengingatkan tentang kebaikan, dan mendekatkan penulis dengan Sang Pencipta,
9. Sahabat penulis, Segara Bhagas Dagsapurwa, Tsabita Ershiazky Fahma, Aghnia Hasya, Aisyah Virgina Putri, Faradiba Ratih P., dan Manescha Priyangka;
10. Rekan riset dan penelitian, yakni Izza Amalia Putri, Iqbal Irsyad, dan Renaldi Wibisono;
11. Diri saya sendiri, Dwi Ari Santi Putri, yang telah berjuang tanpa henti untuk mencapai titik ini;
12. Keluarga besar angkatan 2018 dan organisasi IMSAC Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

Jember, 16 Februari 2022

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat bagi Institusi	4
1.4.2 Manfaat bagi Peneliti.....	4
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Malaria	5
2.1.1 Etiologi Malaria	5
2.1.2 Epidemiologi Malaria.....	7
2.1.3 Patofisiologi Malaria Berat	8
2.1.4 Gejala Malaria Berat	10
2.1.5 Terapi Malaria	15
2.2 Protein DBL2β-PfEMP1	16
2.3 Respons Imun	17
2.3.1 Imunitas Humoral dan Seluler	19
2.3.2 Peran Immunoglobulin G (IgG)	20
2.4 Respons Tubuh terhadap Malaria	22
2.5 Leukosit	23
2.5.1 Jenis Leukosit	23
2.5.2 Hitung Jumlah Leukosit	25
2.6 Vaksin	27
2.6.1 Jenis Vaksin	27
2.6.2 Vaksin Malaria.....	29

2.7 Protein Rekombinan	31
2.7.1 Produksi Protein	31
2.7.2 Ekstraksi Protein.....	33
2.7.3 Purifikasi Protein.....	34
2.6.4 Visualisasi Protein dengan SDS-PAGE	35
2.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.9 Kerangka Konsep	40
2.10 Hipotesis Penelitian	42
BAB 3. METODE PENELITIAN	43
3.1 Rancangan Penelitian	43
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	44
3.3 Populasi dan Besar Sampel	44
3.4 Jenis dan Sumber Data	45
3.5 Variabel Penelitian	45
3.6 Definisi Operasional	46
3.7 Prosedur Penelitian	47
3.7.1 Uji Kelayakan Etik.....	47
3.7.2 Produksi Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1	47
3.7.3 Purifikasi Protein melalui Kromatografi Afinitas	48
3.7.4 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE.....	49
3.7.5 Analisis Konsentrasi Protein	50
3.7.6 Injeksi Hewan Coba	51
3.7.7 Ekstraksi Darah dan Terminasi Hewan Coba.....	51
3.7.8 Hitung Jumlah Leukosit	52
3.7.9 Pengukuran IgG melalui ELISA	52
3.8 Metode Analisis Data	53
3.9 Alur Penelitian	54
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	55
4.1 Hasil Penelitian	55
4.1.1 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE	55
4.1.2 Analisis <i>Bradford Protein Assay</i>	56
4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Leukosit	57
4.1.4 Analisis Hasil Konsentrasi IgG	60
4.2 Pembahasan	63
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	68
5.1 Kesimpulan	68
5.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	77

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Antibiotik yang dapat digunakan pada proses produksi protein.....	32
3.1 Definisi operasional variabel	46
4.1 Visualisasi protein DBL2 β -PfEMP1 pada SDS-PAGE.....	55
4.2 Jumlah leukosit (sel/mm ³) pada pre-injeksi dan pasca injeksi	57
4.3 Signifikansi dan rata-rata leukosit dalam bentuk peringkat	59
4.4 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi primer	59
4.5 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi sekunder I.....	59
4.6 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi sekunder II.....	60
4.7 Konsentrasi IgG yang didapatkan melalui uji ELISA	60
4.8 <i>Mixed Method ANOVA</i> pada uji antar kelompok	62
4.9 Uji <i>post hoc multiple comparisons</i> dengan metode <i>Bonferroni</i>	62
4.10 <i>Mixed Method ANOVA</i> pada uji berdasarkan waktu perlakuan.....	63

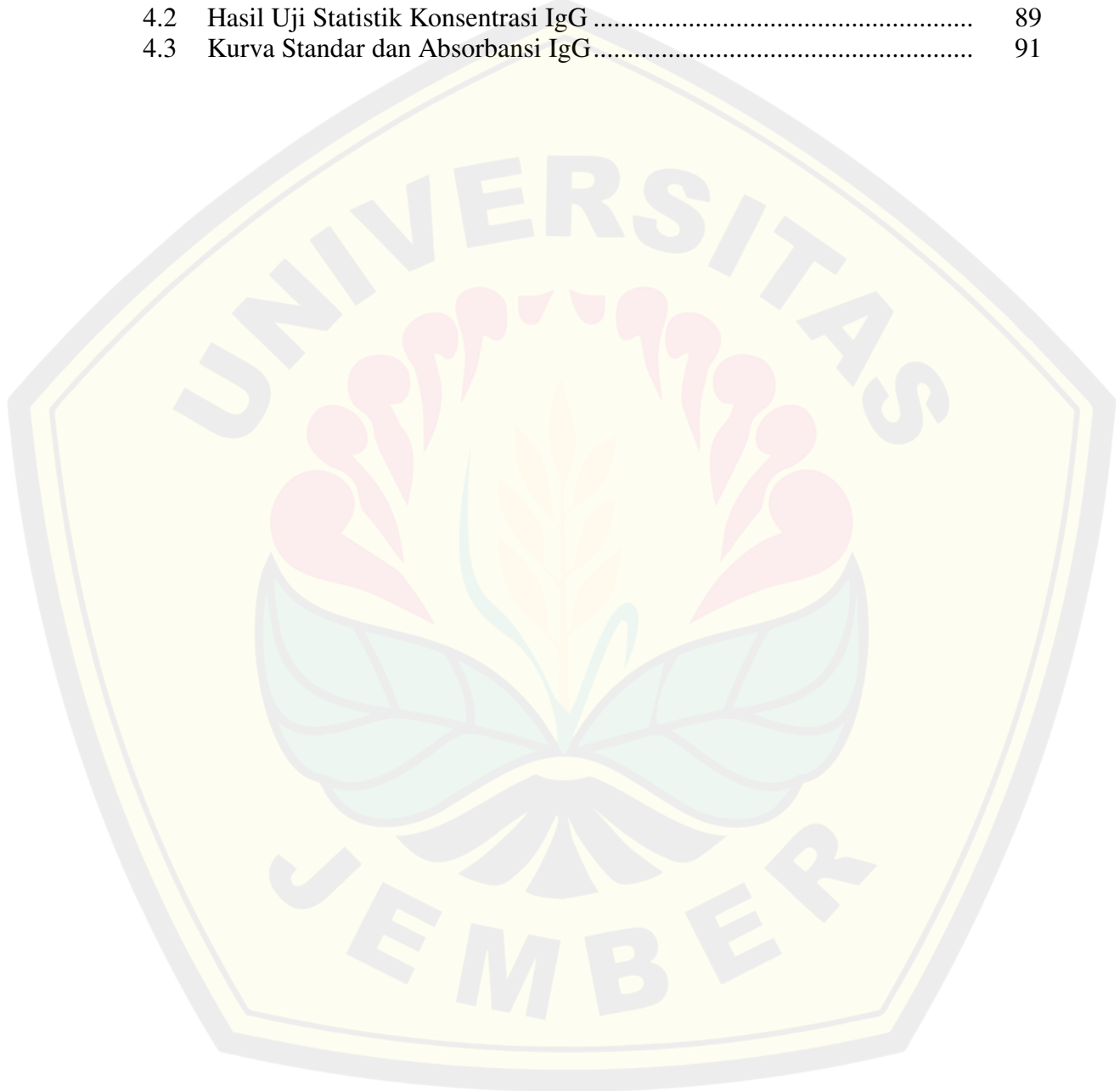


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup <i>Plasmodium</i>	6
2.2 Prevalensi malaria di Indonesia	7
2.3 Jenis <i>Plasmodium</i> menurut hasil pemeriksaan RDT	8
2.4 Sitoadherensi dan <i>rosetting</i>	9
2.5 Peningkatan TNF pada malaria serebral.....	13
2.6 Mekanisme demam pada pasien malaria	14
2.7 Gejala malaria berat.....	15
2.8 Antigen PfEMP1 pada <i>knobs</i> di permukaan eritrosit	16
2.9 Respons imun bawaan dan adaptif	18
2.10 Imunitas humoral dan imunitas seluler.....	20
2.11 Struktur IgG secara skematik.....	21
2.15 Gel poliakrilamid.....	37
2.16 Jenis-jenis ELISA	38
2.17 Kerangka konsep penelitian.....	41
3.1 Rancangan penelitian.....	44
3.2 Alur Penelitian	54
4.1 Kurva standar yang dibuat menggunakan BSA	56
4.2 Rata-rata leukosit tikus pada pre-injeksi, hari ke-8, 29, 50..	58
4.3 Rata-rata konsentrasi IgG yang didapatkan melalui ELISA.....	60

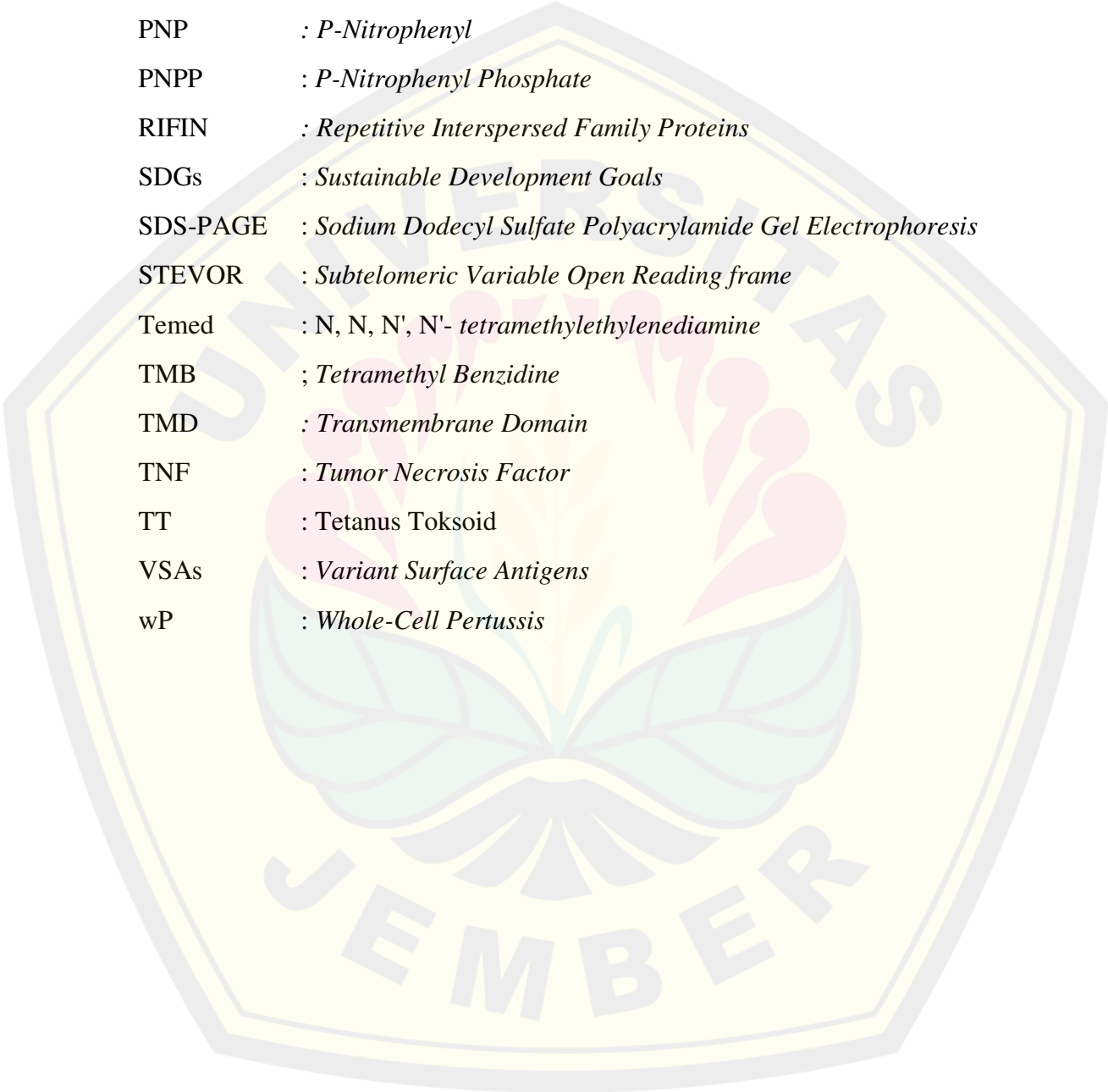
DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Keterangan Persetujuan Etik.....	77
3.2 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba	79
3.3 Perhitungan Dosis.....	79
3.4 Dokumentasi Penelitian.....	81
4.1 Hasil Uji Statistik Leukosit	86
4.2 Hasil Uji Statistik Konsentrasi IgG	89
4.3 Kurva Standar dan Absorbansi IgG.....	91



DAFTAR SINGKATAN

ACT	: <i>Artemisinin-based Combination Therapies</i>
ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
APCs	: <i>Antigen-Presenting Cells</i>
APS	: <i>Amonium Persulfat</i>
ATN	: <i>Acute Tubular Necrosis</i>
ATS	: <i>Acidic Terminal Segment</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CIDR	: <i>Cysteine-Rich Interdomain Region</i>
CSA	: <i>Chondroitin Sulfate A</i>
DBL	: <i>Duffy Binding Like</i>
DMSO	: <i>Dimethylsulfoxide</i>
ECD	: <i>Extracellular Domain</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fc	: <i>Fragment crystallizable</i>
G6PD	: <i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>
gC1qR	: <i>Globular C1q Receptor</i>
HRP	: <i>Horse-radish Peroxidase</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IES	: <i>Inter-Endothelial Slits</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IPV	: <i>Inactivated Polio Virus</i>
iRBC	: <i>infected Red Blood Cell</i>
KAHRP	: <i>Knob-Associated Histidine-Rich Protein</i>
LILRB1	: <i>Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor B1</i>
mRNA	: <i>messenger RNA</i>
NCAM	: <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NETs	: <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>



NK	: <i>Natural Killer</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
ompT	: <i>Outer Membrane Protease</i>
PCV	: <i>Pneumococcal Conjugate Vaccine</i>
PfEMP1	: <i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
PNP	: <i>P-Nitrophenyl</i>
PNPP	: <i>P-Nitrophenyl Phosphate</i>
RIFIN	: <i>Repetitive Interspersed Family Proteins</i>
SDGs	: <i>Sustainable Development Goals</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
STEVOR	: <i>Subtelomeric Variable Open Reading frame</i>
Temed	: <i>N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine</i>
TMB	: <i>Tetramethyl Benzidine</i>
TMD	: <i>Transmembrane Domain</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TT	: <i>Tetanus Toksoid</i>
VSAs	: <i>Variant Surface Antigens</i>
wP	: <i>Whole-Cell Pertussis</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan yang menyebabkan tingginya morbiditas dan mortalitas di daerah tropis dan subtropis seperti di Afrika, Asia Tenggara, dan Amerika Selatan (CDC, 2021). Jumlah kasus malaria menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2019 mencapai 229 juta kasus dengan estimasi kematian sebanyak 409.000 kasus (WHO, 2021). Indonesia sendiri menempati posisi kedua untuk prevalensi malaria tertinggi di Asia Tenggara (WHO, 2020). Tingginya morbiditas malaria membuat pemerintah terus menggalakkan upaya untuk melakukan eliminasi malaria.

Plasmodium falciparum menjadi penyebab tersering kasus malaria di Indonesia. Pada tahun 2017, 63% dari keseluruhan kasus malaria di Indonesia disebabkan oleh *P. falciparum* (WHO, 2021). *Plasmodium falciparum* menyebabkan malaria berat dan lebih dari 90% kematian akibat malaria disebabkan oleh *P. falciparum*. Malaria berat akibat *P. falciparum* dimediasi oleh protein antigen *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) yang diekspresikan di permukaan *infected red blood cell* (iRBC). Adanya adhesi antara iRBC dan reseptor sel endotel pembuluh darah yang disebut sebagai mekanisme sitoadheren dapat terjadi pada mikrosirkulasi organ vital. Hal tersebut akan menyebabkan kerusakan organ terkait (Jensen dkk., 2020). Terdapat pula mekanisme *rosetting*, yakni perlekatan antara iRBC dengan eritrosit yang normal. Selain menghambat sirkulasi atau aliran darah di organ vital yang terinfeksi, mekanisme sitoadheren dan *rosetting* ini akan membuat iRBC terhindar dari destruksi oleh limpa (Wassmer dkk., 2017).

Protein antigen PfEMP1 memiliki beberapa domain, seperti domain *cysteine-rich interdomain region* (CIDR) dan *duffy binding like* (DBL). Setiap domain bersifat spesifik mengikat reseptor tertentu. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa reseptor yang berhubungan dengan kejadian malaria berat adalah *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Adukpo dkk., 2013; Ndam dan Moussiliou, 2017). Domain dari PfEMP1 yang menjadi ligand dari reseptor ICAM-

1 adalah DBL, namun tidak semua domain DBL dapat berikatan spesifik dengan reseptor ICAM-1. Domain DBL yang dapat berikatan secara spesifik dengan reseptor ICAM-1 adalah domain DBL2 β . Peningkatan antibodi karena protein rekombinan DBL2 β dapat memblokir pengikatan antara DBL2 β dan reseptor ICAM-1 (Hasanah dkk., 2020). Karena peran pentingnya dalam patogenesis malaria berat, protein DBL2 β -PfEMP1 dapat menjadi kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

Pengembangan vaksin malaria berbasis peptida terus dilakukan, salah satunya adalah menggunakan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang telah terbukti bersifat imunogenik dalam suatu penelitian *in vivo*. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menginduksi produksi antibodi IgG spesifik dan sel limfosit T CD4⁺ (Rachmania dkk., 2020). Adanya antibodi terhadap protein antigen DBL β -PfEMP1 yang berikatan dengan ICAM-1 merupakan biomarker imunitas protektif terhadap malaria (Tessema dkk., 2018).

Uji imunogenisitas protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada hewan coba sudah dilakukan. Namun, belum ada penelitian mengenai dosis optimal dari protein rekombinan tersebut. Dosis optimal adalah dosis yang mampu menimbulkan respons tubuh atau efek yang diinginkan dan bersifat tidak toksik (Liu dkk., 2016). Respons tubuh yang menjadi tujuan dalam vaksinasi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 adalah respons imun dalam melawan antigen penyebab malaria berat.

Respons imun pasca injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat diketahui melalui kenaikan antibodi IgG dan jumlah leukosit yang muncul. Leukosit merupakan unit proteksi yang berperan penting dalam sistem imun untuk memunculkan suatu respons imun. Leukosit dapat menggambarkan respons imun yang menjadi pertahanan dalam melawan zat asing (Sherwood, 2014). Akan tetapi, peningkatan leukosit bersifat sementara dan tidak spesifik. Oleh karena itu, dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 ditentukan melalui nilai IgG yang mampu merepresentasikan respons imun secara spesifik. Banyak penelitian yang sudah mengungkapkan peran IgG sebagai faktor penting dalam imunitas melawan berbagai antigen, termasuk antigen *P. falciparum* (Thomson, 2016; Mayor dan

Dobaño, 2018; Gonzales dkk., 2020). Semakin tinggi antibodi IgG, maka semakin rendah tingkat keparahan penyakit akibat malaria (Gonzales dkk., 2020).

Sampai saat ini, belum ada penelitian yang menentukan dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam menginduksi respons imun pada hewan coba. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian yang mengkaji dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Apakah protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 mampu meningkatkan respons imun yang ditandai dengan peningkatan jumlah leukosit dan konsentrasi IgG?
- b. Apakah perbedaan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menyebabkan perbedaan efektivitas dalam menginduksi konsentrasi IgG tikus?
- c. berapakah dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang mampu menginduksi respons imun pada hewan coba?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah menentukan dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada hewan coba sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui kenaikan jumlah leukosit setelah injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan tiga variasi dosis.
- b. Mengetahui konsentrasi IgG pada hewan coba setelah injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan tiga variasi dosis untuk menentukan dosis optimal.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Institusi

Manfaat bagi institusi adalah sebagai bahan pengetahuan dan referensi. Penelitian ini juga menjadi kajian ilmiah serta sumber data untuk penelitian lainnya yang berkaitan dengan kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

1.4.2 Manfaat bagi Peneliti

Manfaat bagi peneliti adalah untuk menambah pengetahuan dan keterampilan dalam melakukan produksi dan purifikasi serta cara pengujian dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1. Selain itu, penelitian ini merupakan suatu kesempatan bagi peneliti untuk memberikan kontribusi dalam meningkatkan derajat kesehatan masyarakat melalui pengembangan vaksin malaria.

1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat mempercepat upaya pengembangan vaksin malaria sehingga bisa menurunkan angka kejadian malaria berat, khususnya di Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

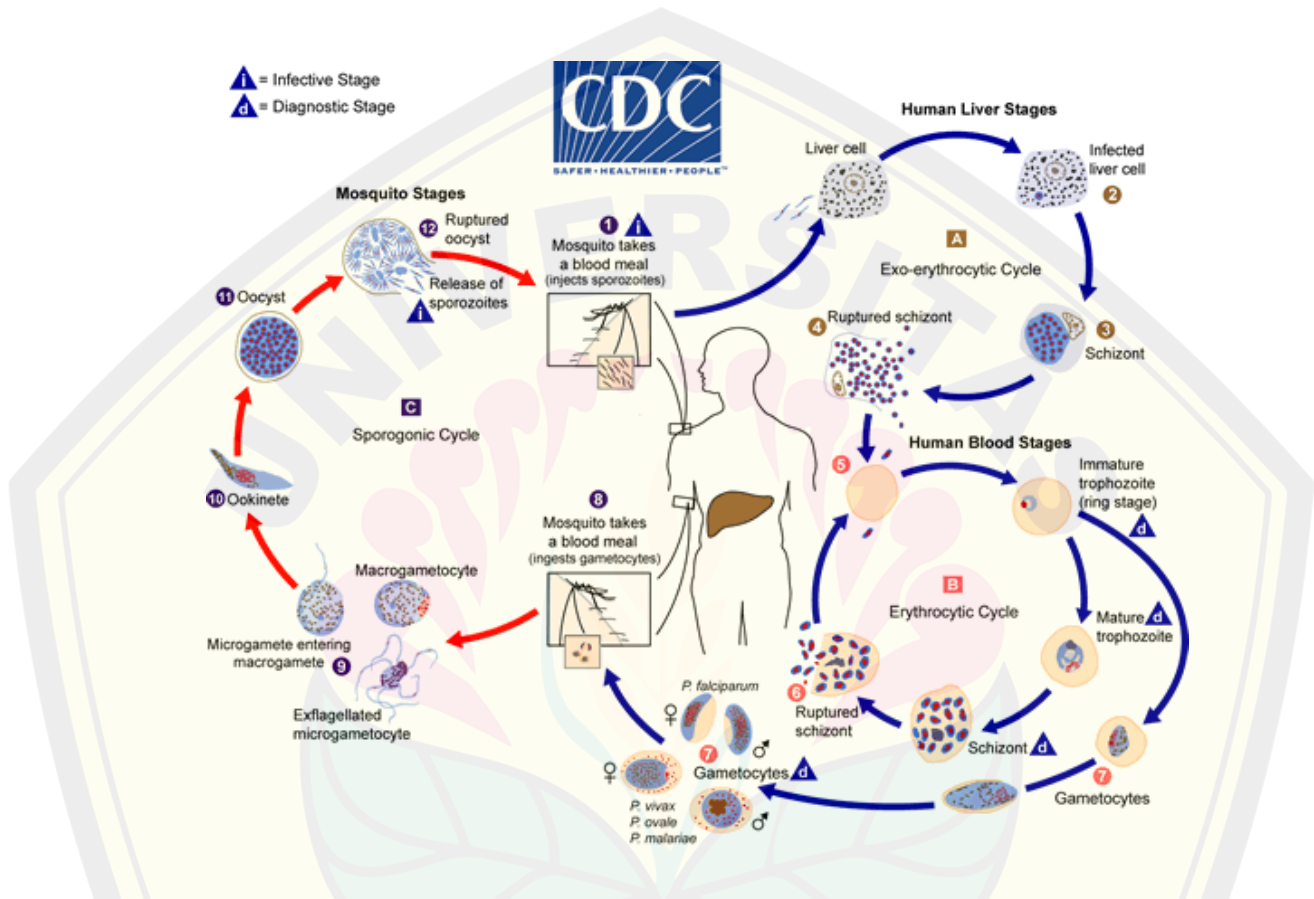
2.1.1 Etiologi Malaria

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi parasit jenis protozoa genus *Plasmodium*. Ada sekitar 156 spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi berbagai jenis vertebrata (CDC, 2021). *Plasmodium* penyebab malaria pada manusia terdiri dari *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi*. Spesies yang berkaitan dengan morbiditas dan mortalitas malaria berat adalah *P. falciparum* (Membo dkk., 2018).

Infeksi malaria berkaitan erat dengan siklus hidup *Plasmodium*. Siklus hidup malaria melibatkan dua inang, yakni manusia dan nyamuk (Gambar 2.1). Saat menghisap darah manusia, nyamuk *Anopheles* betina juga menginokulasikan sporozoit ke dalam tubuh manusia (CDC, 2021). Setelah nyamuk menginjeksikan sporozoit ke dalam tubuh manusia, sporozoit akan menuju hepar dan menginfeksi sel-sel hepar. Selanjutnya, sporozoit akan berubah menjadi skizon, lalu skizon tersebut akan ruptur dan melepaskan merozoit. Fase dari sporozoit dalam tubuh manusia sampai dilepasnya merozoit ke sirkulasi disebut dengan siklus ekso-eritrositik. Di dalam tubuh manusia, parasit ini mengalami dua siklus, yakni siklus eritrositik dan siklus ekso-eritrositik. Siklus ekso-eritrositik berlangsung selama 6 hari, sedangkan fase eritrositik berlangsung selama 34-48 jam (Adah dkk., 2016).

Setelah mengalami replikasi awal di hepar (siklus ekso-eritrositik), tahapan selanjutnya adalah multiplikasi aseksual di dalam eritrosit (siklus eritrositik). Merozoit yang telah dilepas di tahap sebelumnya akan menginfeksi eritrosit. Pada infeksi *P. falciparum*, eritrosit berukuran normal. Di dalam eritrosit, terbentuk trofozoit immatur yang akan menjadi matur seiring berjalannya waktu. Trofozoit berbentuk seperti cincin dan sitoplasma trofozoit matur lebih padat dibandingkan dengan trofozoit immatur. Setelah beberapa kali mengalami pembelahan mitosis, trofozoit akan memasuki fase skizon yang memiliki 8-24 merozoit dan berpigmen gelap. Skizon tersebut akan ruptur dan mengeluarkan merozoit. Merozoit akan kembali menginfeksi eritrosit lainnya dan kembali mengulang siklus eritrositik.

Selain itu, beberapa parasit akan berdiferensiasi menjadi gametosit (fase seksual eritrositik). Gametosit *P. falciparum* berbentuk seperti bulan sabit atau sosis dengan kromatin yang menyebar (mikrogamet) atau kromatin yang memadat (makrogamet). Gametosit dapat masuk ke dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina ketika nyamuk tersebut menghisap darah (CDC, 2020).



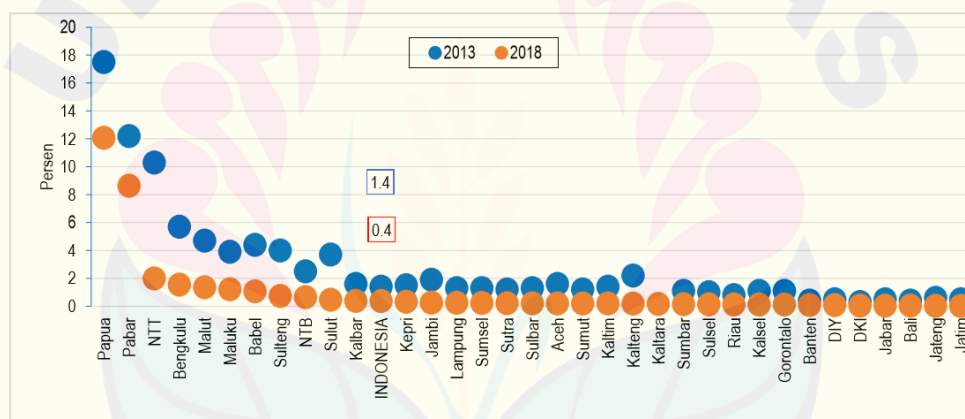
Gambar 2.1 Siklus hidup *Plasmodium* (Sumber : CDC, 2020)

Multiplikasi parasit di dalam tubuh hospes definitifnya (nyamuk) disebut dengan siklus sporogonik. Di dalam lambung nyamuk, mikrogametosit melakukan penetrasi ke dalam makrogametosit, membentuk suatu zigot. Zigot akan berubah bentuk dan menjadi motil, disebut dengan ookinet. Ookinet menyerang dinding usus nyamuk dan berkembang menjadi ookista. Ookista akan terus tumbuh kemudian ruptur dan mengeluarkan sporozoit. Setelah itu, sporozoit bergerak dan masuk ke dalam kelenjar ludah nyamuk. Sporozoit inilah yang menjadi stadium infeksi penyakit malaria (CDC, 2020).

2.1.2 Epidemiologi Malaria

Pada tahun 2019, terdapat 229 juta kasus malaria yang terjadi di 87 negara endemis malaria. Pada tahun yang sama, kematian sejumlah 274.000 (67%) dari 409.000 kematian akibat malaria dialami oleh anak berusia kurang dari 5 tahun (WHO, 2020). Anak berusia dibawah 5 tahun merupakan kelompok paling rentan terkena malaria berat yang dapat menyebabkan kematian karena belum memiliki perkembangan imun yang kuat untuk melawan malaria. Di area dengan tingkat penularan malaria yang tinggi, kelompok yang rentan selain anak-anak adalah wanita hamil karena menurunnya imunitas tubuh dan juga pendatang baru yang belum memiliki kekebalan (CDC, 2021).

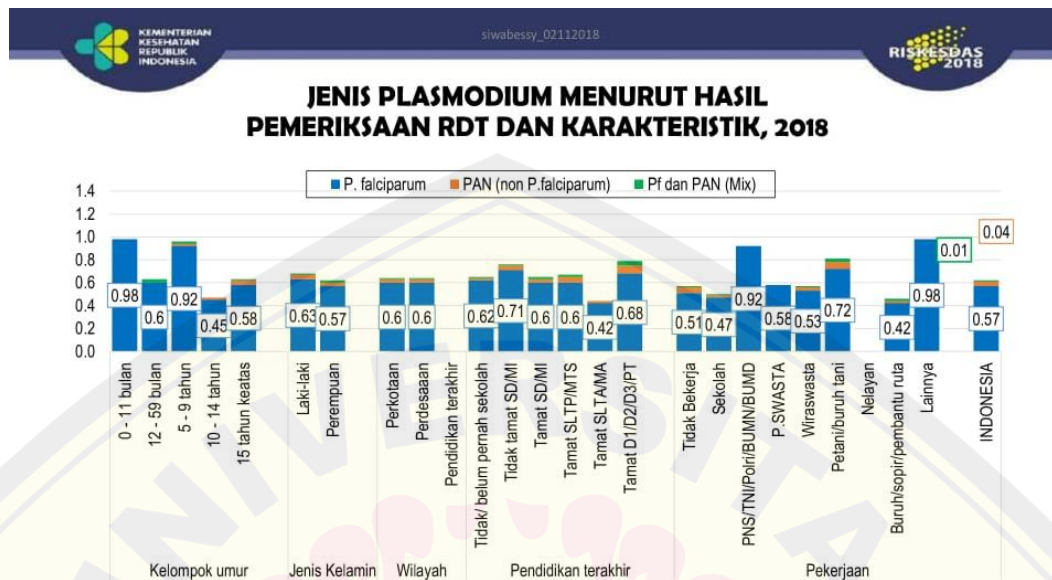
PREVALENSI MALARIA BERDASARKAN RIWAYAT PEMERIKSAAN DARAH MENURUT PROVINSI, 2013 - 2018



Gambar 2.2 Prevalensi malaria di Indonesia (Sumber : Riskesdas, 2018)

Faktor transmisi malaria di daerah endemis dipengaruhi oleh keberadaan dan jumlah nyamuk *Anopheles*, kondisi cuaca, keadaan sosial ekonomi, dan jenis *Plasmodium*. Sekitar 94% kasus malaria terjadi di benua Afrika dan 3% terjadi di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Di Indonesia, prevalensi tertinggi berada di Provinsi Papua (12,07%) diikuti Provinsi Papua Barat (8,64%). Menurut data dari Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), prevalensi malaria di Indonesia menunjukkan penurunan, yakni dari 1,4% pada tahun 2013 menjadi 0,4% pada tahun 2018 (Gambar 2.2). Selanjutnya, jenis *Plasmodium* tersering yang menyebabkan infeksi

malaria di Indonesia berdasarkan *Rapid Diagnostic Test* tahun 2018 adalah *P. falciparum* (Gambar 2.3) (Riskesdas, 2018).

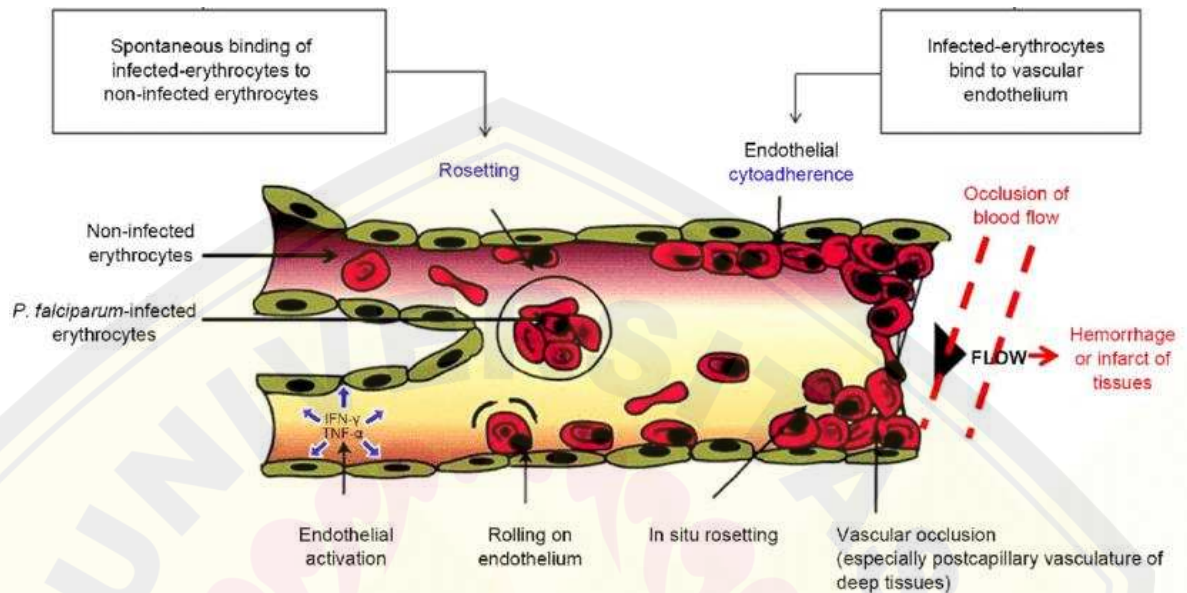


Gambar 2.3 Jenis *Plasmodium* menurut hasil pemeriksaan RDT dan karakteristik (Sumber: Riskesdas, 2018)

2.1.3 Patofisiologi Malaria Berat

Plasmodium falciparum menyebabkan malaria berat dan fatal pada manusia yang mengakibatkan kematian hampir setengah juta jiwa tiap tahunnya. *P. falciparum* memiliki kemampuan untuk melakukan sitoaderensi atau perlekatan antara eritrosit yang terinfeksi dengan endotel pembuluh darah (Gambar 2.4). Di membran sel darah merah yang terinfeksi, terdapat ligan kunci untuk melakukan sitoaderensi, yakni *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) (Plewes dkk., 2018). Mekanisme sitoaderensi yang kompleks, tidak hanya melibatkan PfEMP1, namun juga melibatkan *variant surface antigens* (VSAs) lain yakni *subtelomeric variable open reading frame* (STEVAR) dan *repetitive interspersed family proteins* (RIFIN). Peran RIFIN dan STEVAR dalam sitoaderensi adalah pada pembentukan *roset* (perlekatan antara iRBC dengan eritrosit normal yang tidak terinfeksi). Selain itu, RIFIN dapat berinteraksi dengan *leukocyte immunoglobulin-like receptor B1* (LILRB1) yang berakibat pada penghambatan aktivasi sel B dan *natural killer* (NK). Meski demikian, VSA yang

dianggap paling penting dalam patogenesis malaria berat adalah PfEMP1 karena PfEMP1 dapat berikatan dengan beragam reseptor sel inang sehingga dapat menghindari sistem imun tubuh (Lee dkk., 2019).



Gambar 2.4 Sitoadherensi dan *rosetting* (Sumber : Li dan Cheung, 2016)

Protein antigen PfEMP1 yang berada di permukaan iRBC berikatan dengan reseptor spesifik yang ada di endotel, seperti *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), CD36, E-selectin, *neural cell adhesion molecule* (NCAM), CD31 (PECAM-1), dan *chondroitin sulfate A* (CSA) (Wassmer dkk., 2017). Sitoadherensi menyebabkan sekuestrasi eritrosit di kapiler dan venula yang menghasilkan sumbatan di mikrosirkulasi, hipoksia jaringan, dan kerusakan organ terkait. Apabila sekuestrasi ini terjadi di otak, maka dapat menyebabkan malaria serebral (Milner, 2018). Sitoadherensi atau perlekatan tidak hanya terjadi antara iRBC dengan reseptor endotel, dapat juga terjadi perlekatan dengan sinsitiotrofoblas plasenta, leukosit (monosit, makrofag, dan sel dendritik), trombosit, dan eritrosit yang tidak terinfeksi (Lee dkk., 2019).

Perlekatan antara iRBC dengan eritrosit yang tidak terinfeksi membentuk bentukan seperti bunga hingga disebut dengan *rosetting*. Terdapat beberapa hipotesis mengenai tujuan dari dibentuknya *roset* oleh *P. falciparum*. Hipotesis yang pertama adalah memfasilitasi merozoit untuk melakukan invasi pada eritrosit

yang belum terinfeksi. Hipotesis kedua adalah untuk menghindari antibodi karena eritrosit yang sehat dapat menutupi antigen yang diekspresikan di permukaan iRBC. *Rosetting* membutuhkan keberadaan beberapa faktor, seperti IgM yang berguna untuk memperkuat ikatan antara iRBC dengan eritrosit di sekitarnya. Selain itu, terjadinya ikatan silang beberapa molekul PfEMP1 meningkatkan aviditas pada eritrosit sekitarnya dan menginduksi pembentukan *Roset*. Eritrosit yang terinfeksi (iRBC) juga dapat membentuk gumpalan dengan cara berikatan dengan reseptor trombosit yakni *CD36*, *P-selectin*, dan *Globular C1q Receptor (gC1qR)*. Penghambatan sitoadherensi antara iRBC dengan reseptor endotel, eritrosit lain, dan trombosit telah terbukti dapat mengurangi terjadinya malaria berat (Wassmer dkk., 2017).

Plasmodium falciparum melakukan sitoadherensi dan sekuestrasi bertujuan untuk memberikan lingkungan yang baik untuk perkembangan dan replikasi parasit (Indiastari dkk., 2018). Beberapa jam setelah merozoit *P. falciparum* menginvasi eritrosit, viskositas intra-eritrositik yang relatif rendah berubah menjadi lebih kental. Parasit ini juga merombak susunan eritrosit dengan membentuk suatu *network* yang berguna untuk membawa nutrisi penting bagi kelangsungan hidup *P. falciparum*. Perubahan-perubahan tersebut membuat iRBC sangat rentan untuk dihancurkan oleh limpa. Di dalam limpa, terdapat sistem penyaringan. Eritrosit yang beredar harus dapat melewati *inter-endothelial slits (IES)* yang sempit. Eritrosit yang tidak terinfeksi dengan morfologi yang normal akan melewati IES dengan mudah, sedangkan eritrosit yang abnormal akan tertahan lalu difagosit oleh makrofag. Parasit malaria akan mengembangkan suatu mekanisme agar dapat terhindar dari sistem filtrasi limpa, yakni dengan cara sitoadherensi dan sekuestrasi (Lee dkk., 2019).

2.1.4 Gejala Malaria Berat

Sebelum menimbulkan suatu gejala, terdapat masa inkubasi yang bervariasi tergantung dari spesies *Plasmodium* yang menginfeksi. Masa inkubasi dari *P. falciparum* yang seringkali menyebabkan malaria berat adalah 9-14 hari. Secara klinis, gejala malaria infeksi tunggal terdiri atas beberapa kali serangan

demam diselingi dengan periode bebas demam. Biasanya demam ini juga disertai dengan gejala yang tidak khas seperti mual, muntah, nyeri kepala, dan berkurangnya nafsu makan. Gejala klasik penanda malaria atau biasa disebut dengan trias malaria terdiri dari menggigil, lalu setelah menggigil terjadi demam tinggi, dan yang terakhir adalah berkeringat. Saat berkeringat, suhu tubuh kembali turun, bahkan terkadang sampai di bawah normal. Pada pemeriksaan fisik dapat ditemukan hepatomegali, splenomegali, dan anemia (Boushab dkk., 2021). Malaria dapat disebut malaria berat apabila di dalam darahnya ditemukan parasit malaria dengan disertai satu atau lebih gejala berikut ini (Fitriany dan Sabiq, 2018).

a. Hiperparasitemia

Dapat disebut hiperparasitemia apabila terdapat lebih dari 5% eritrosit yang terinfeksi oleh parasit atau ditemukan lebih dari 250.000 parasit/ μ l darah. Hiperparasitemia lebih dari 10% eritrosit yang terinfeksi atau lebih dari 500.000 parasit/ μ l darah menunjukkan prognosis buruk yakni dengan kemungkinan mortalitas yang tinggi (Wilairatana dkk., 2013). Oleh karena itu, diperlukan deteksi secepatnya karena meski derajat parasitemia pasien kurang dari 5%, tetap memerlukan manajemen terapi dan observasi yang baik (Wiley, 2014).

b. Anemia berat

Pada anemia berat, kadar hemoglobin dalam tubuh kurang dari 7 g/dl. Anemia pada malaria terjadi akibat banyaknya eritrosit yang lisis (hemolisis) karena siklus hidup parasit serta hancurnya eritrosit dalam limpa dan sistem imun. Hemolitik anemia pasien malaria juga diperparah oleh diseritropoiesis sumsum tulang. Hemoglobin dalam tubuh akan segera meningkat setelah dimulainya pengobatan dengan antimalaria yang efektif (White, 2018).

c. Ikterus

Kadar bilirubin serum pasien malaria berat dapat lebih dari 50 mmol/liter. Ikterus ini disebabkan oleh hemolisis yang berlebihan pada eritrosit pasien malaria. Saat proses hemolisis atau pemecahan eritrosit di hepar dan limpa, hemoglobin akan diuraikan menjadi besi, globulin, dan heme. Besi akan disimpan di hepar dan limpa, sedangkan globulin akan diubah menjadi asam amino. Heme inilah yang akan diubah menjadi bilirubin. Peningkatan hemolisis

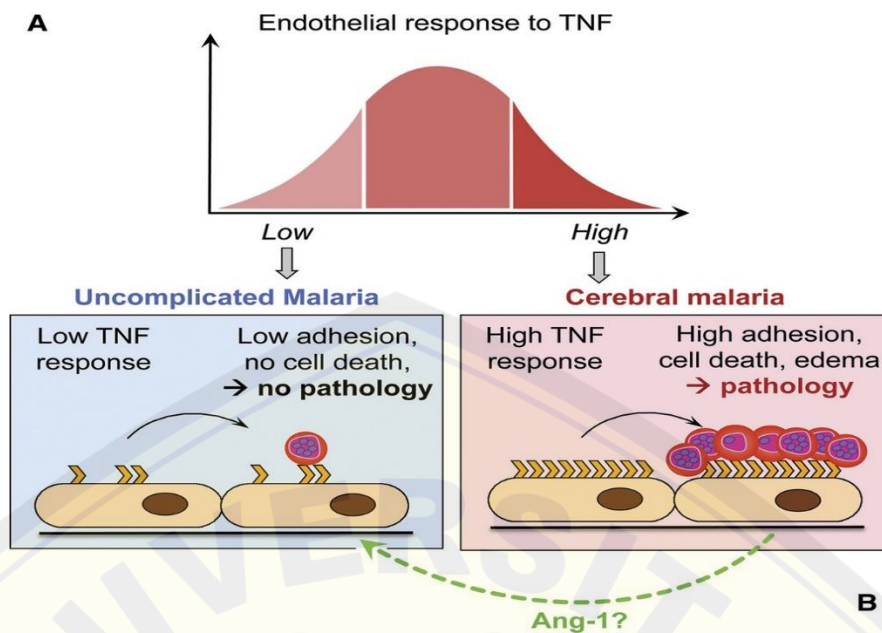
yang akan meningkatkan heme secara otomatis akan meningkatkan bilirubin juga (Putra, 2011).

d. Hipoglikemia

Hipoglikemia (gula darah kurang dari 40 mg/dl) akibat *P. falciparum* disebabkan oleh peningkatan penggunaan glukosa oleh host dan parasit serta gangguan produksi glukosa akibat penghambatan proses glukoneogenesis di hepar. Pada malaria berat, kebutuhan glukosa meningkat sekitar 50% akibat metabolisme yang dilakukan oleh *P. falciparum*. Hal ini diperparah dengan kurangnya asupan atau suplementasi yang memadai pada pasien. Selain itu, hipoglikemia pasien malaria kadang-kadang berhubungan dengan pengobatan kuinin. Kuinin menstimulasi pankreas untuk menyekresikan insulin sehingga dapat terjadi hiperinsulinemia yang menyebabkan hipoglikemia (Madrid dkk., 2014).

e. Malaria serebral

Infeksi malaria dapat menyebabkan ensefalopati akut, yaitu terjadinya kelainan pada struktur atau fungsi otak. Untuk dapat menegakkan diagnosis malaria serebral, penyebab lain dari ensefalopati akut harus disingkirkan. Pada hapusan darah pasien malaria serebral, seringkali didapatkan morfologi dari *P. falciparum*. Malaria serebral dapat disertai dengan penurunan kesadaran (delirium, stupor, koma) dan juga kejang. Bisa didapatkan juga kelainan neurologis lain seperti spastik, meningismus, tremor, mioklonus, dan sebagainya (Husna dan Prasetyo, 2016). Pada malaria serebral, respons endotel yang tinggi terhadap *Tumor Necrosis Factor* (TNF) juga menyebabkan tingginya sitoadherensi, aktivasi sinyal pro-apoptosis yang kuat hingga menimbulkan banyak kematian sel, dan edema akibat kerusakan sawar otak (Gambar 2.5). TNF yang merupakan sitokin termogenik dikeluarkan oleh tubuh untuk menghancurkan parasit di dalam otak. Parasit yang dihancurkan juga akan menginduksi TNF dalam kadar tinggi. Produksi TNF yang berlebihan ini juga ikut berkontribusi dalam terjadinya malaria serebral (Wassmer dkk., 2015).



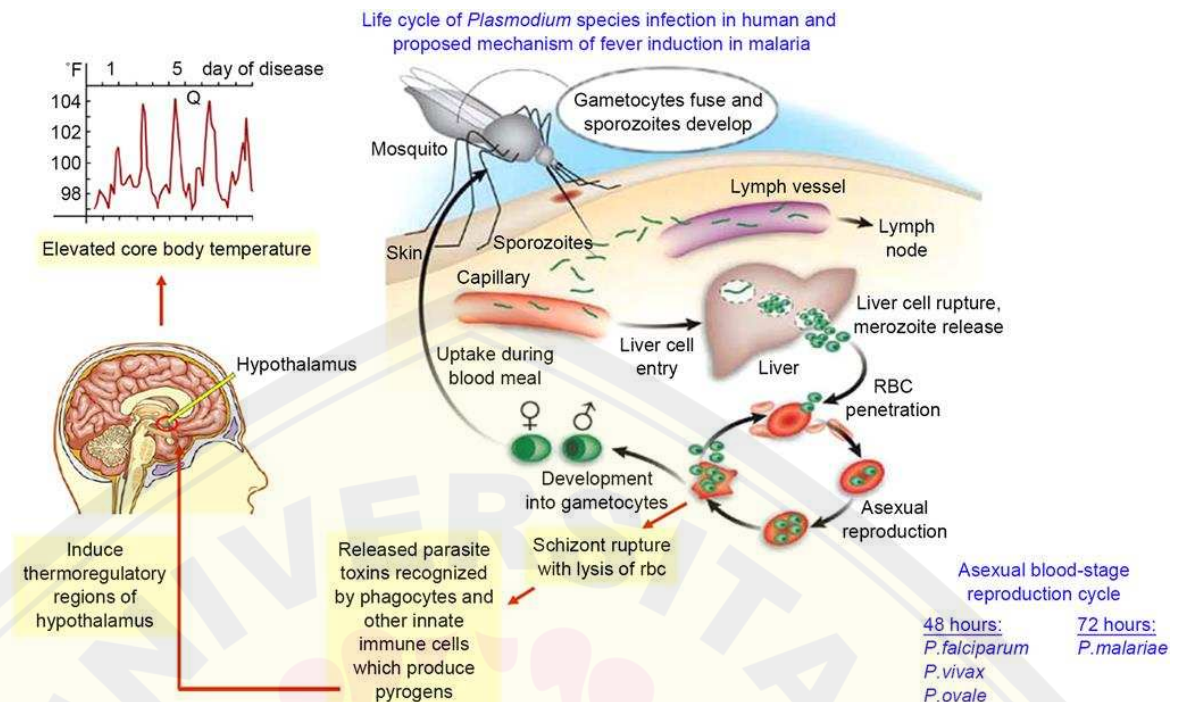
Gambar 2.5 Peningkatan TNF pada malaria serebral (Sumber : Wassmer dkk., 2015)

f. Asidosis

Asidosis terjadi karena hiperlaktatemia akibat peningkatan produksi laktat dan penurunan dari pengeluaran laktat. Peningkatan produksi laktat terjadi akibat *P. falciparum* yang memenuhi kebutuhannya dengan cara glikolisis dan menghasilkan asam laktat. Glikolisis dapat menghasilkan asam laktat apabila terjadi secara anaerob. Glikolisis terjadi secara anaerob karena adanya hemolisis serta sekuestrasi yang menyebabkan obstruksi pembuluh darah dan hipoksia. Pada glikolisis anaerob, glukosa diubah menjadi piruvat lalu kemudian menjadi asam laktat. Laktat tersebut kemudian masuk ke dalam sirkulasi dan meningkatkan kadar laktat dalam darah hingga menyebabkan hiperlaktatemia dan asidosis (Possemiers dkk., 2021).

g. Hipertermia (Suhu tubuh > 39°C)

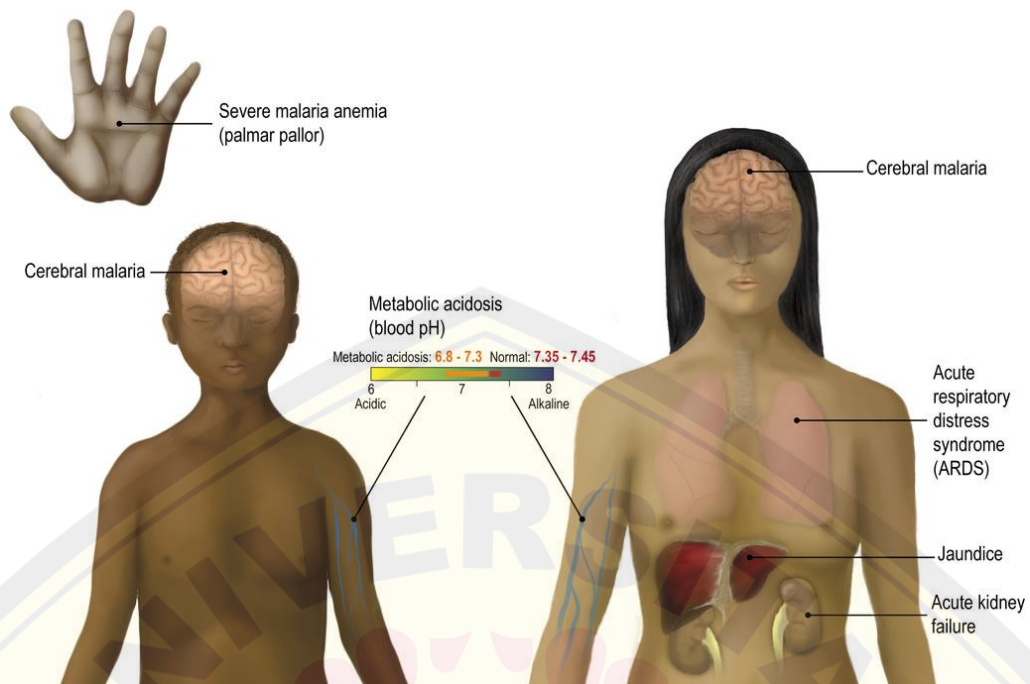
Demam muncul akibat lisisnya sel darah merah yang terinfeksi atau skizon yang ruptur (Gambar 2.6). Skizon yang ruptur tidak hanya mengeluarkan merozoit, namun juga mengeluarkan zat toksin yang merangsang sel imun untuk mengeluarkan berbagai sitokin, termasuk TNF (suatu sitokin termogenik). Sitokin termogenik tersebut akan menstimulasi hipotalamus sebagai termoregulator untuk meningkatkan suhu tubuh (Li dan Cheung, 2016).



Gambar 2.6 Mekanisme demam pada pasien malaria (Sumber : Li dan Cheung, 2016)

h. Gagal ginjal

Gagal ginjal akut pada pasien malaria berat ditandai dengan kadar kreatinin serum lebih dari 3,0 g/dl dan diuresis < 400ml/24 jam. Adanya hemolisis dan obstruksi mikrosirkulasi di ginjal akibat sekuestrasi atau rosetting dapat menyebabkan hipoperfusi renal. Hipoperfusi renal menyebabkan *Acute Tubular Necrosis* (ATN) yang akan berlanjut pada gagal ginjal akut. Selain itu, kompleks imun akibat pembentukan autoantibodi dan sitokin inflamasi karena parasit juga dapat menyebabkan ATN. Kerusakan ginjal pada pasien malaria berat juga berkaitan dengan *blackwater fever*. *Blackwater fever* adalah kondisi demam disertai dengan terjadinya hemolisis masif yang menyebabkan hemoglobin masuk ke dalam pembuluh darah dan urin, sehingga dapat berakibat buruk bagi ginjal. Adanya hemoglobin dalam urin membuat urin berwarna gelap (Brown dkk., 2020).



Gambar 2.7 Gejala malaria berat (Sumber : Wassmer dkk., 2015)

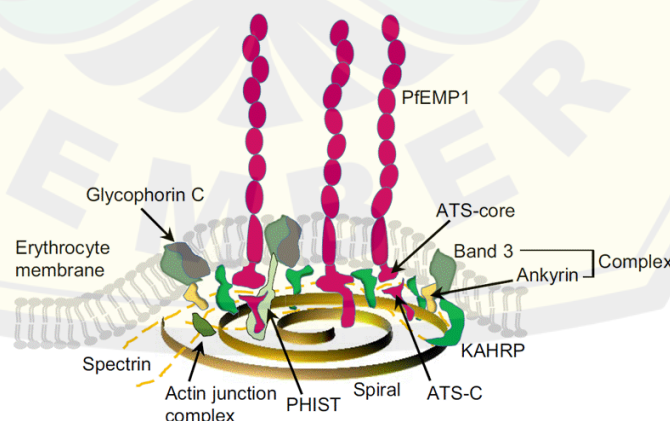
2.1.5 Terapi Malaria

Tujuan utama terapi malaria berat adalah untuk mencegah kematian dan disabilitas pada pasien. Terapi juga diharapkan dapat mencegah *recrudescence*, yakni kembalinya gejala setelah periode bebas gejala akibat parasit yang masih tersisa di eritrosit. Terapi malaria terdiri dari obat antimalaria spesifik, obat tambahan lain, dan terapi suportif (Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit, 2017). Terapi awal pada pasien adalah memastikan jalan napas aman dan tidak ada permasalahan sirkulasi. Setelah itu, cairan dimasukkan melalui intravena dan dilakukan pemeriksaan GCS, glukosa, darah lengkap, hematokrit, hemoglobin, parasitemia, dan fungsi ginjal. Menurut WHO, pilihan terapi awal obat antimalaria pada pasien dengan malaria berat adalah artesunate parenteral. Dua kelas obat yang bisa diberikan secara parenteral pada malaria berat adalah golongan derivat artemisinin (artesunate atau artemether) dan golongan alkaloid cinchona (quinine atau quinidine). Setelah terapi awal, pengobatan bisa dilanjutkan melalui terapi oral dengan menggunakan *Artemisinin-based Combination Therapies* atau ACT (artesunate + amodiaquine, artemether + lumefantrine, atau dihydroartemisinin + piperaquine) (WHO, 2021).

Terapi menggunakan obat lainnya disesuaikan dengan keadaan klinis pasien. Apabila pasien kejang, dapat diberikan obat antikonvulsi seperti diazepam, lorazepam, atau midazolam. Apabila terdapat hipoglikemia dan demam, juga harus segera diatasi. Pasien dengan klinis anemia berat perlu dipertimbangkan untuk transfusi darah. Pasien dengan pendarahan spontan juga memerlukan tranfusi yang disertai dengan injeksi vitamin K. Apabila pasien mengalami gagal ginjal akut, pemberian terapi cairan harus lebih diperhatikan dan disesuaikan dengan kemampuan ginjal (WHO, 2021).

2.2 Protein DBL2 β -PfEMP1

Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) adalah rantai spesifik yang memiliki peran penting dalam patogenesis malaria berat. Protein antigen PfEMP1 dikode oleh lebih dari 60 *var genes* yang menyebabkan variasi antigenik. Variasi antigenik tersebut menyebabkan eritrosit yang terinfeksi dapat terhindar dari sistem imun. Protein antigen PfEMP1 yang ada di permukaan iRBC membentuk tonjolan yang disebut *knobs*. Rata-rata terdapat tiga molekul PfEMP1 yang menempati ujung 1 *knobs*. Formasi *knobs* tersebut melibatkan beberapa molekul milik host dan parasit, seperti *knob associated histidine rich protein* (KAHRP) yang berikatan dengan sitoskeleton eritrosit, yakni *spectrin-ankyrin complexes* (Gambar 2.8). Selain merupakan dasar dari kompleks *knobs*, KAHRP juga berikatan dengan *spectrin* untuk membentuk struktur spiral pada *knobs* (Jensen dkk., 2020).



Gambar 2.8 Antigen PfEMP1 pada *knobs* di permukaan eritrosit (Sumber: Jensen, 2019)

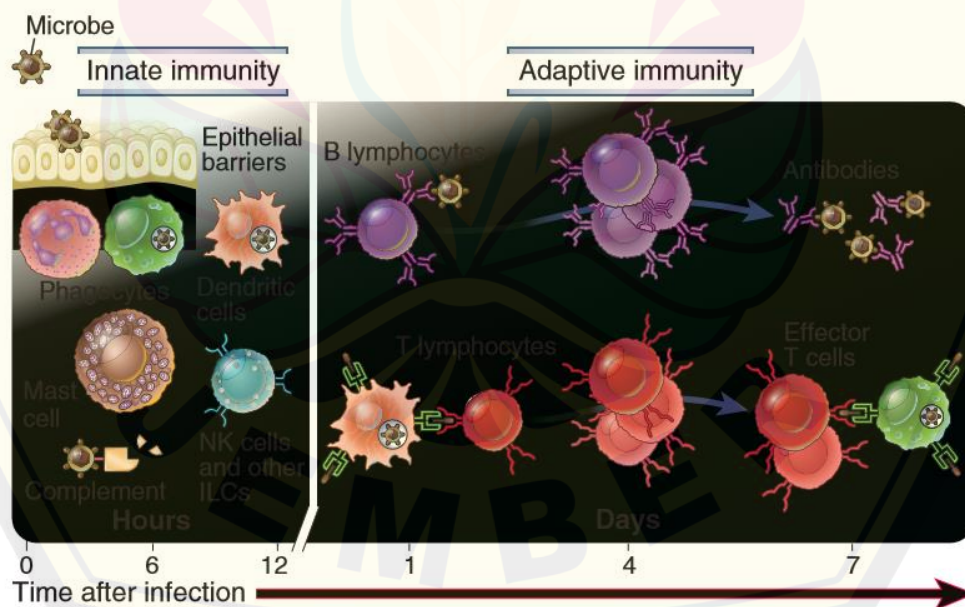
Protein antigen PfEMP1 memiliki 3 struktur, yakni *extracellular domain* (ECD), *transmembrane domain* (TMD), dan *acidic terminal segment* (ATS). Bagian ekstraseluler dari PfEMP1 terdiri dari dua domain, yaitu domain *Cysteine rich Interdomain Regions* (CIDRs) dan domain *Duffy Binding Like* (DBL). Domain CIDR dapat diklasifikasikan menjadi subkelas α , β , γ , dan δ , sedangkan domain DBL diklasifikasikan menjadi subkelas α , β , γ , δ , ϵ , dan χ (Rachmania dkk., 2020). Tiap domain PfEMP1 memiliki peranan tersendiri dalam proses sitoaderensi untuk mengikat reseptor spesifik tertentu. Domain CIDR dan DBL memiliki pengaruh yang besar bagi PfEMP1 untuk melakukan sitoaderensi dan sekuesterasi iRBC pada endotel otak yang menyebabkan malaria berat (Lee dkk., 2019).

Selama fase awal infeksi malaria, stimulasi makrofag menyebabkan produksi TNF, peningkatan tersebut dapat menstimulasi reseptor adhesi di endotel otak, seperti *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Milner, 2018). *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) merupakan reseptor kunci untuk sitoaderensi iRBC di vaskuler serebral yang dapat menyebabkan malaria berat. Diketahui bahwa domain yang menjadi ligan dari reseptor ICAM-1 adalah domain DBL β (Jensen dkk., 2020). Namun, tidak semua DBL β spesifik mengikat ICAM-1, yang spesifik mengikat reseptor ICAM-1 adalah domain DBL2 β . Antibodi yang dibentuk oleh protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat memblokir ikatan antara domain DBL2 β dengan reseptor ICAM-1, sehingga dapat mencegah terjadinya malaria berat (Hasanah dkk., 2020). Hal inilah yang mendasari pembuatan vaksin berbasis peptida menggunakan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1.

2.3 Respons Imun

Respons imun adalah respons kolektif dan terkoordinasi antara sel dan molekul yang membentuk sistem kekebalan terhadap zat asing. Respons imun dapat melindungi individu dari infeksi dan menghilangkan zat asing yang menyebabkan kerusakan jaringan serta penyakit tertentu. Imun bereaksi terhadap mikroba serta molekul yang dikenali sebagai zat asing, reaksi tersebut dapat menyebabkan perubahan fisiologis dan patologis (Abbas dkk., 2014).

Dalam melawan zat asing, respons imun dibagi menjadi dua, yaitu respons imun bawaan (*innate* atau *natural immunity*) dan respons imun adaptif (Gambar 2.9). Respons imun bawaan (*innate*) sangat penting untuk pertahanan melawan mikroba dalam beberapa jam atau hari pertama setelah infeksi, sebelum respons imun adaptif berkembang. Imunitas bawaan dimediasi oleh mekanisme yang ada, bahkan sebelum infeksi terjadi dan merespons cepat terhadap mikroba yang menyerang (Abbas dkk., 2014). Makrofag dan neutrofil adalah bagian dari sistem imun bawaan yang merupakan pertahanan pertama dalam melawan banyak mikroorganisme asing dan sangat penting untuk pengendalian infeksi. Komponen lain dari sistem imun bawaan adalah barrier fisik dan kimia, sel dendritik, sel mast, sel *natural killer*, dan protein darah seperti sistem komplemen dan mediator inflamasi lainnya. Sistem imun bawaan melakukan pertahanan dengan cara merekrut fagosit dan leukosit untuk menghancurkan zat asing (proses inflamasi) serta mengeliminasi sel yang terinfeksi zat asing. Namun, sistem imun bawaan tidak selalu berhasil dalam mengeliminasi zat asing dan ada beberapa patogen yang tidak dikenali (Roitt dkk., 2017).



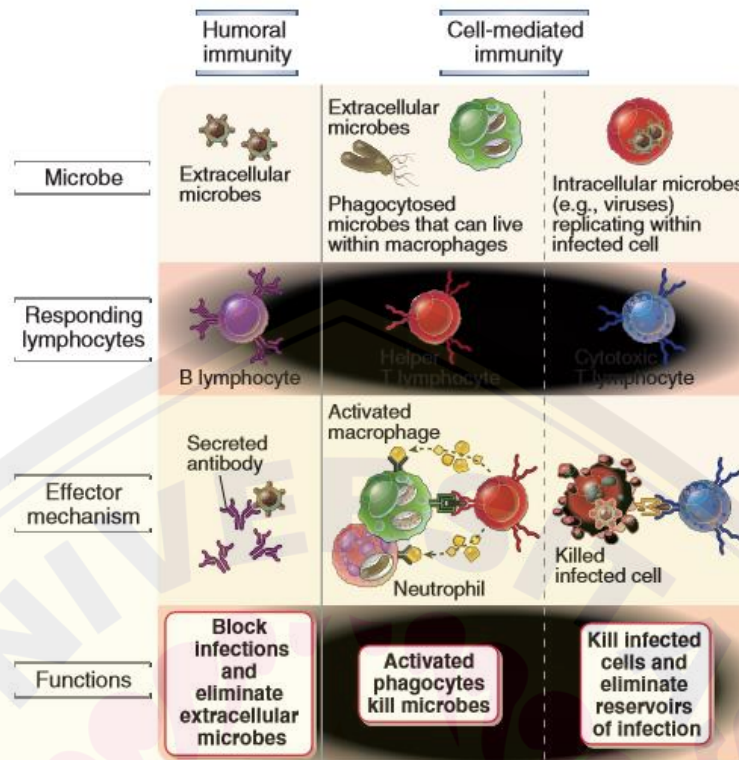
Gambar 2.9 Respons imun bawaan dan adaptif (Sumber: Abbas dkk., 2014)

2.3.1 Imunitas Humoral dan Seluler

Respons imun adaptif berkembang sebagai respons terhadap infeksi dan beradaptasi dengan infeksi, oleh karena itu disebut sebagai imunitas adaptif (imunitas spesifik atau kekebalan yang didapat). Respons imun adaptif mengenali dan bereaksi terhadap sejumlah besar antigen. Respons imun adaptif berkembang setelah respons imun bawaan serta bersifat lebih kuat dan spesifik. Langkah pertama dari respons imun adaptif adalah pengenalan antigen yang dilakukan oleh *antigen-presenting cells* (APCs) yang bertugas untuk mengangkut antigen ke organ limfoid dan menyajikannya ke limfosit T *naive* untuk memulai respons imun. Setelah itu, akan terjadi aktivasi limfosit yang ditandai dengan proliferasi dan penambahan ukuran sel limfosit yang sering disebut dengan *clonal expansion*. Kemudian, terjadi eliminasi antigen (fase efektor) oleh antibodi dan sel T efektor yang sebelumnya telah melalui fase diferensiasi. Setelah infeksi dapat teratasi, respons tersebut menurun karena limfosit mati melalui apoptosis. Sel yang bertahan disebut dengan sel memori bertugas untuk melawan reinfeksi (Roitt dkk., 2017).

Respons imun adaptif membutuhkan aktivasi limfosit yang terdiri dari limfosit B dan limfosit T. Terdapat dua jenis respons imun adaptif, yaitu imunitas humoral dan imunitas yang diperantarai sel (imunitas seluler). Imunitas humoral adalah mekanisme pertahanan utama terhadap mikroba dan toksin yang terletak di luar sel. Imunitas humoral dimediasi oleh antibodi yang diproduksi oleh limfosit B. Antibodi (immunoglobulin) dapat menetralkan dan mengeliminasi mikroba melalui fagosit dan aktivasi sistem komplemen (Sherwood, 2014). Protein (antigen) dapat menginduksi produksi beragam immunoglobulin (IgM, IgG, IgA, IgE).

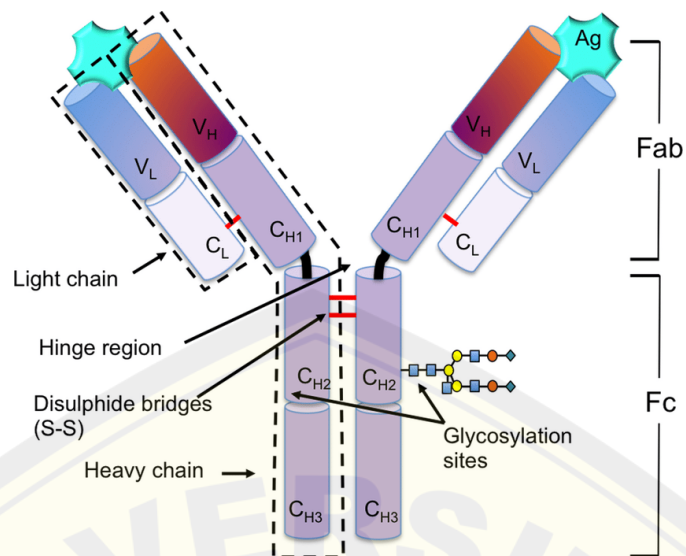
Imunitas seluler diperantarai oleh sel limfosit T *helper* yang mengaktifkan makrofag dan neutrofil untuk membunuh (memfagosit) mikroba ekstraseluler. Imunitas seluler juga diperantarai oleh sel limfosit T sitotoksik yang langsung merusak sel yang terinfeksi (Gambar 2.10). Limfosit T helper CD4+ bertugas untuk membantu makrofag mengeliminasi mikroba dan membantu sel B untuk memproduksi antibodi. Beberapa sel T helper CD4+ mensekresi sitokin yang merekrut leukosit. Sedangkan sel limfosit T sitotoksik CD8+ membunuh sel-sel yang terinfeksi atau sel yang menyimpan patogen intraseluler (Abbas dkk., 2014).



Gambar 2.10 Imunitas humoral yang diperantarai oleh sel limfosit B dan imunitas seluler yang diperantarai oleh sel limfosit T (Sumber : Abbas dkk., 2014)

2.3.2 Peran Immunoglobulin G (IgG)

Immunoglobulin G (IgG) adalah salah satu jenis antibodi yang ditemukan dalam serum dan merupakan tulang punggung dari sistem imunitas humoral. Antibodi IgG mencapai puncak pada minggu kedua sampai minggu ketiga setelah terpapar antigen. Immunoglobulin G (IgG) adalah glikoprotein dengan berat molekul 150 kDa yang terdiri dari dua rantai (*heavy chain* dan *light chain*) dan dua domain (variabel dan konstan). Domain variabel berperan dalam pengikatan antigen, sedangkan domain konstan berperan dalam interaksi dengan molekul efektor. Struktur IgG berbentuk seperti huruf Y disertai dengan ikatan disulfida yang menghubungkan dua *heavy chain* (Gambar 2.11). Akibat adanya protease, terjadi pembelahan molekul IgG menjadi tiga bagian, yaitu dua fragmen Fab yang identik (tempat ikatan dengan epitop antigen) dan satu fragmen Fc (*fragment crystallizable*) yang strukturnya konstan (O’Kennedy dkk., 2016).



Gambar 2.11 Struktur IgG secara skematik (Sumber : O'Kennedy dkk., 2016)

Antibodi IgG memiliki kemampuan untuk melakukan perlindungan terhadap antigen. IgG dapat menetralkan patogen seperti virus dan bakteri dengan mengikat epitop atau protein permukaan patogen dan mencegah interaksi antara patogen dengan sel inang. Glikoprotein ini bisa mengikat toksin dan menghalangi kemampuan patogen untuk memasuki sel dan melakukan replikasi. Melalui opsonisasi, IgG memberikan perlindungan dengan cara menghancurkan patogen yang bereplikasi di luar sel. Antibodi IgG mengikat dan melapisi permukaan patogen, kemudian reseptor IgG-Fc dari sel fagosit (misalnya makrofag dan neutrofil) memediasi pencernaan oleh sel fagosit dan penghancuran patogen. Mekanisme perlindungan IgG selanjutnya adalah melalui aktivasi sistem komplemen yang mengakibatkan fagositosis dan lisis patogen (Thomson, 2016).

Orang dengan antibodi rendah atau tidak memiliki antibodi lebih rentan terinfeksi dibandingkan dengan orang yang sudah memiliki antibodi sebelumnya (Ndiabamoh dkk., 2020). Antibodi dapat menghambat sekuestrasi iRBC pada sel endotel, menghambat *rosetting*, dan meningkatkan aktivitas fagositosis serta melakukan mekanisme netralisasi, opsonisasi, dan aktivasi komplemen. Antibodi dapat melindungi dari malaria berat dengan cara mencegah ikatan antara domain rekombinan PfEMP1 dengan ICAM-1, menghambat proses adhesi, dan merusak roset yang sudah terbentuk (Rachmania dkk., 2020).

2.4 Respons Tubuh terhadap Malaria

Respons terhadap malaria adalah hasil dari kombinasi resistensi genetik, kekebalan non-adaptif, dan imunitas adaptif. Di daerah endemik malaria, dapat terjadi mutasi pada tubuh yang berguna untuk melawan infeksi malaria. Orang dengan mutasi pada eritrosit dan defisiensi *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* (G6PD) dapat terlindung dari infeksi berat *P. falciparum*. Eritrosit abnormal yang terinfeksi menunjukkan penurunan sitoadherensi dan *rosetting* (sitoadherensi dan *rosetting* berperan dalam patogenesis malaria serebral). Penurunan invasi parasit malaria tersebut mungkin terjadi karena perubahan pada membran dan fisiologi dari eritrosit yang abnormal. Pada defisiensi G6PD, terjadi kelainan reaksi biokimia di dalam eritrosit yang dapat mengganggu proses multiplikasi parasit akibat terhambatnya proses produksi DNA dan RNA merozoit. Selain polimorfisme eritrosit, beberapa polimorfisme genetik lainnya juga terlibat dalam resistensi alami terhadap malaria (Kinyanjui, 2012).

Imunitas terhadap malaria melibatkan imunitas humoral dan seluler yang timbul secara alami maupun adaptif. Seperti infeksi lain pada umumnya, eritrosit yang telah terinfeksi *Plasmodium* akan ditangkap oleh *antigen presenting cells* (APC) yang kemudian akan mengaktifkan limfosit T dan B serta interleukin 12 (IL-12). Interleukin 12 (IL-12) akan menyebabkan proliferasi sel T yang merupakan komponen imunitas seluler. Sel T akan memicu sel B yang merupakan komponen imunitas humoral untuk mengeluarkan antibodi melawan parasit tersebut. Pada fase sporozoit (stadium eksoeritositer ekstrahepatal), limfosit T sitotoksik (CD8+) menghambat masuknya sporozoit ke hepatosit dan antibodi melawan sporozoit melalui opsonisasi. Pada fase aseksual eritrosit, antibodi bertugas untuk mengaglutinasi merozoit, menghambat sitoadherensi, dan menghambat pelepasan toksin serta menetralkan toksin *Plasmodium*. Pada fase seksual, antibodi bertujuan untuk membunuh gametosit dan menghambat fertilisasi (Mading dan Yunarko, 2014).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mau dan Mulatsih (2017), terjadi peningkatan jumlah limfosit pada penderita malaria *falciparum*. Peningkatan jumlah limfosit ini berkaitan dengan respons imun tubuh terhadap malaria (Mau

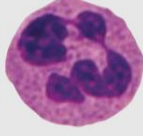

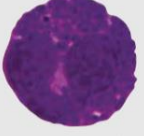


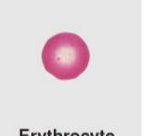

dan Mulatsih, 2017). Sedangkan menurut penelitian lain, terjadi limfositopenia pada pasien malaria (Van Wolfswinkel dan Langenberg, 2017). Penelitian lain menyatakan bahwa jumlah leukosit pada pasien malaria adalah normal (Salsabila dkk., 2020). Umumnya, jumlah total leukosit pada pasien malaria tanpa komplikasi berada dalam rentang normal atau menurun (leukopenia). Leukopenia diduga terjadi karena sekuestrasi leukosit yang menyebabkan penurunan produksi dan percepatan penghancuran leukosit. Sedangkan pada beberapa kasus malaria dapat terjadi leukositosis yang dikaitkan dengan infeksi lain dan prognosis yang buruk (Kotepui dkk., 2015).

2.5 Leukosit

Leukosit yang juga disebut sel darah putih adalah unit dari sistem proteksi tubuh yang berguna untuk menghancurkan sel abnormal, bakteri, virus, dan patogen lain serta membentuk antibodi yang dapat menghancurkan antigen yang masuk ke dalam tubuh. Berbeda dengan eritrosit, leukosit tidak memiliki banyak hemoglobin (sehingga tidak berwarna kecuali bila diberi pewarnaan khusus), oleh karena itu disebut dengan sel darah putih. Leukosit dibentuk di sumsum tulang (granulosit dan monosit dan beberapa limfosit) dan di jaringan limfa (limfosit dan sel plasma). Setelah terbentuk dan melalui proses maturasi, leukosit diangkut ke berbagai bagian tubuh yang membutuhkan. Leukosit berada dalam sirkulasi darah hanya untuk sementara, sebagian besar leukosit akan menuju jaringan untuk melakukan fungsinya masing-masing (Hall, 2016).

2.5.1 Jenis Leukosit

Leukosit memiliki struktur, fungsi, dan jumlah yang bervariasi. Lima jenis leukosit yang bersirkulasi dalam darah yaitu neutrofil, eosinofil, basofil, monosit, dan limfosit. Masing-masing memiliki struktur dan fungsi yang berbeda (Gambar 2.12). Neutrofil, eosinofil, dan basofil dikategorikan sebagai granulosit (sel yang memiliki granula) polimorfonuklear (nukleus tersegmentasi menjadi beberapa lobus dengan berbagai bentuk), sedangkan monosit dan limfosit masuk dalam kelompok agranulosit mononuklear. Jumlah normal leukosit manusia adalah 3.200-10.000 mm³ (Giyartika dan Keman, 2020).

Leukocytes						
Polymorphonuclear granulocytes			Mononuclear agranulocytes		Erythrocyte	Platelets
Neutrophil	Eosinophil	Basophil	Monocyte	Lymphocyte		
						
60%–70%	1%–4%	0.25%–0.5%	2%–6%	25%–33%	Erythrocyte concentration = 5 billion/ml blood	Platelet concentration = 250 million/ml blood
Differential WBC count (percentage distribution of types of leukocytes)						
Leukocyte concentration = 7 million/ml blood						
WBC count = 7000/mm ³					RBC count = 5,000,000/mm ³	Platelet count = 250,000/mm ³

Gambar 2.12 Struktur dan jumlah normal sel darah (Sumber : Sherwood, 2014)

Neutrofil adalah jenis leukosit paling banyak dengan ciri granula berwarna ungu dan sitoplasma berwarna merah muda. Neutrofil merupakan sel pertama yang mendatangi area luka dan berfungsi untuk memfagosit patogen dan sel abnormal. Pada saat terjadi inflamasi, jumlah neutrofil meningkat dan neutrofil juga mengawali terjadinya proses penyembuhan (DeLeo dan Allen, 2020). Neutrofil sering disebut sebagai *suicide bombers* karena mengalami kematian terprogram saat melawan infeksi. Neutrofil dapat membunuh bakteri melalui fagositosis dan NETs (*neutrophil extracellular traps*) (Manfredi dkk., 2018). Peningkatan neutrofil dalam sirkulasi biasanya menandakan adanya infeksi bakteri akut.

Selain neutrofil, leukosit bergranula lainnya adalah eosinofil dan basofil. Masa hidup eosinofil adalah 8-12 jam dengan warna kemerahan dan biasanya memiliki dua lobus. Peningkatan jumlah eosinofil didapatkan pada infeksi parasit (khususnya cacing) dan kondisi alergi (asma dan *hay fever*). Jumlah eosinofil sekitar 1% sampai 4% dibanding sel leukosit lainnya, sedangkan jumlah basofil hanya sekitar 0,25%-0.5% (Sherwood, 2014). Oleh karena itu, basofil sangat jarang dijumpai dalam sel darah. Basofil dan sel mast (basofil dalam jaringan) berfungsi untuk mensintesis dan menyimpan histamin serta heparin. Histamin berperan penting dalam reaksi alergi dan inflamasi, vasodilatasi lokal, serta peningkatan permeabilitas kapiler, sedangkan heparin berperan dalam mencegah pembekuan darah (Krystel dkk., 2016).

Kerja leukosit dalam melakukan fagosit tidak lepas dari peran monosit. Monosit dapat berubah menjadi makrofag (monosit dalam jaringan) yang berguna untuk menghancurkan antigen dan menyajikannya kepada limfosit T. Monosit yang merupakan sel darah terbesar beredar dalam waktu satu atau dua hari sebelum menetap di berbagai jaringan tubuh. Makrofag dapat bertahan sekitar beberapa bulan hingga tahun, kecuali jika dihancurkan lebih cepat saat melakukan aktivitas fagositosis. Peningkatan jumlah monosit mengindikasikan terjadinya inflamasi, infeksi, atau penyakit tertentu (kanker dan penyakit autoimun) (Guyton dan Hall, 2016).

Leukosit terkecil adalah limfosit yang memiliki inti bulat besar yang menempati sebagian besar sel. Rentang hidup limfosit berkisar sekitar 100 hingga 300 hari. Selama periode ini, sebagian besar limfosit terus didaur ulang di jaringan limfoid, getah bening, dan darah. Limfosit menghabiskan waktu beberapa jam di dalam darah dan hanya sebagian kecil dari limfosit yang berada dalam darah pada saat tertentu. Limfosit terdiri dari dua jenis, yaitu limfosit B (sel B) dan limfosit T (sel T). Limfosit B dapat berubah menjadi sel plasma, yaitu sel yang mensekresikan antibodi yang berguna untuk menghancurkan benda asing yang dianggap berbahaya oleh tubuh (imunitas yang diperantarai antibodi). Limfosit T (sel T) secara langsung menghancurkan sel abnormal dan sel yang diserang oleh virus dengan melepaskan substansi kimia yang membuat lubang mematikan di sel target (*cell-mediated immunity*) (Sherwood, 2014).

2.5.2 Hitung Jumlah Leukosit

Jumlah leukosit normal tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Smith dan Mangkoewidjojo (1988) dalam Widyastuti (2019) adalah $5-13 \times 10^3/\text{mm}^3$. Leukosit berperan dalam respons imun tubuh, termasuk merespons vaksin yang merupakan bahan asing yang masuk ke dalam tubuh. Jumlah leukosit total akan meningkat apabila terdapat benda asing yang dianggap berbahaya masuk ke dalam tubuh. Peningkatan leukosit merupakan respons untuk mengatasi benda asing yang mungkin dapat mengganggu fungsi tubuh atau untuk membentuk suatu imun adaptif yang dapat mengatasi infeksi yang sama di masa mendatang. Apabila

leukosit tidak meningkat setelah pemberian suatu benda asing, maka benda asing yang masuk masih dapat ditoleransi oleh tubuh (Widyastuti, 2013).

Pemeriksaan hitung jumlah leukosit dilakukan menggunakan darah kapiler atau darah vena yang diambil melalui sinus orbitalis tikus sebanyak ± 1 ml kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah berisi anti koagulan EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) (Widyastuti, 2013). Setelah tercampur dengan EDTA, darah harus segera dianalisis karena EDTA dapat merusak bentuk leukosit. Darah diencerkan menggunakan larutan yang akan menyebabkan eritrosit mengalami hemolisis serta darah menjadi lebih encer, sehingga leukosit lebih mudah dihitung. Meski larutan ini dapat melisiskan eritrosit dan trombosit, larutan ini tidak dapat melisiskan leukosit.

Larutan pengencer yang dimaksud adalah larutan HCl 1%, Asam asetat 2%, atau larutan turk. Larutan *turk* terdiri dari asam asetat glasial, gentian violet 1%, dan aquades. Tujuan penambahan gentian violet dalam larutan turk adalah untuk memberi warna pada leukosit. HCl 1% dianggap sebagai larutan pengencer yang bagus karena dapat bekerja dengan cepat. Prosedur pengenceran dapat dilakukan dengan pipet leukosit atau dengan cara tabung. Bila jumlah leukosit sangat banyak, maka faktor pengencer boleh ditingkatkan (Mansyur, 2009). Darah yang telah melalui proses pengenceran dimasukkan ke dalam kamar hitung dan dihitung dengan bantuan mikroskop. Pengisian darah ke dalam kamar hitung harus diulang bila terdapat gelembung udara dalam kamar hitung, kamar hitung tidak sepenuhnya terisi, atau terlalu banyak cairan yang masuk sehingga mengisi parit kamar hitung (Mansyur, 2009).

Kamar hitung *Improved Neubauer* terdiri dari 9 kotak besar yang tiap kotaknya terdiri dari 16 kotak sedang. Namun, kotak besar yang berada paling tengah terdiri dari 25 kotak sedang. Masing-masing kotak sedang terdiri dari 16 kotak kecil. Kotak besar yang berada di tengah (terdiri dari 25 kotak sedang) digunakan dalam hitung jumlah eritrosit. Hitung jumlah leukosit menggunakan 4 bidang atau 4 kotak besar (terdiri dari 16 kotak sedang) yang berada di sudut-sudut dengan ukuran 1 mm. Terkadang ada sel leukosit yang letaknya menyinggung garis batas kotak besar. Sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah

tidak boleh dihitung, sedangkan sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas harus dihitung (Mohan, 2013).

2.6 Vaksin

2.6.1 Jenis Vaksin

Vaksin merupakan sarana efektif untuk mencegah penyakit spesifik dengan cara mengaktifkan imunitas adaptif. Vaksin terdiri dari beberapa jenis, jenis tersebut akan menentukan cara penggunaan, cara penyimpanan, dan cara pemberiannya. Secara global, vaksin dibagi menjadi empat jenis sebagai berikut (WHO, 2013).

a. Vaksin Hidup (*Live Attenuated*)

Vaksin ini berisi virus atau bakteri hidup yang sudah dilemahkan. Virus atau bakteri yang dilemahkan tersebut bereplikasi dalam tubuh dan dapat menimbulkan respons imun yang kuat untuk mencegah infeksi di masa yang akan datang. Meski bereplikasi dalam tubuh, vaksin ini tidak menyebabkan penyakit pada orang yang sehat karena isi dari vaksin tersebut sudah dilemahkan. Contoh dari vaksin hidup yang berisi virus adalah vaksin polio oral, campak (*measles*), rotavirus, demam kuning (*yellow fever*), sedangkan yang berisi bakteri adalah vaksin tuberkulosis (BCG). Kekurangan dari vaksin ini adalah kurang aman apabila diberikan pada orang dengan imunitas rendah atau imunitas terganggu, tidak bisa diberikan pada ibu hamil, dan meski sangat jarang terjadi, patogen yang dilemahkan dapat kembali ke bentuk aslinya lalu menyebabkan penyakit (WHO, 2013).

b. Vaksin Inaktif

Vaksin inaktif berisi virus atau bakteri utuh yang sudah diinaktivasi melalui proses kimia dan fisik, sehingga tidak menyebabkan penyakit. Apabila dibandingkan dengan vaksin hidup, vaksin inaktif relatif lebih aman dan stabil, namun respons imun yang ditimbulkan juga lebih lemah. Untuk membuat respons imun yang kuat menggunakan vaksin ini, diperlukan beberapa kali vaksinasi (*booster*). Contoh dari vaksin ini adalah vaksin COVID-19 (*sinovac*),

inactivated polio virus (IPV), dan *whole-cell pertussis (wP)* (Pollard dan Bijker, 2021).

c. Vaksin Toksoid

Vaksin toksoid berisi toksin yang sudah diinaktivasi, contohnya adalah vaksin tetanus toksoid (TT), dan difteri toksoid. Kelebihan dari vaksin ini adalah profil keamanan dan stabilitas yang tinggi (tidak rentan terhadap perubahan suhu, cahaya, dan kelembapan). Kekurangannya adalah tidak terlalu imunogenik, sehingga membutuhkan beberapa dosis tambahan (*booster*) dan juga adjuvan untuk meningkatkan respons imun (WHO, 2013).

d. Vaksin Subunit

Vaksin subunit merupakan generasi lanjutan dari vaksin hidup dan vaksin inaktif. Tidak seperti vaksin inaktif yang memasukkan bakteri atau virus utuh (*whole-cell*), vaksin ini berisi unit antigenik atau fragmen dari patogen yang bisa memicu respons imun. Kelebihan vaksin ini adalah lebih stabil dan aman karena tidak mengandung virus hidup. Kekurangannya adalah respons imun yang dihasilkan tidak sekuat virus hidup, sehingga membutuhkan suatu *booster* (WHO, 2013). Vaksin subunit dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu vaksin subunit berbasis protein rekombinan, polisakarida, konjugat, RNA, dan DNA.

1) Vaksin protein rekombinan

Vaksin ini dapat dibuat melalui rekayasa genetik yang bertujuan untuk memasukkan antigen yang bisa memicu respons imun. Antigen yang digunakan dalam vaksin protein rekombinan ini adalah protein spesifik yang diisolasi dari patogen terkait. Dalam prosesnya, vaksin ini memerlukan suatu vektor berupa virus atau bakteri yang sudah disisipi dengan gen pengkode antigen (protein) target yang akan bereplikasi dan mengekspresikan produk gen yang diinginkan. Contoh dari vaksin jenis ini adalah vaksin hepatitis B (Bill, 2015).

2) Vaksin polisakarida

Seperti namanya, vaksin ini berisi polisakarida yang bisa menimbulkan respons imun. Kekurangan dari vaksin ini adalah hanya mengaktivasi imunitas jangka pendek dan tidak efektif digunakan pada anak berusia di

bawah dua tahun. Contoh vaksin polisakarida adalah vaksin meningitis (WHO, 2013).

3) Vaksin konjugat

Vaksin konjugat berisi polisakarida yang berikatan dengan pembawa protein (*protein carrier*). Kelebihan vaksin ini apabila dibandingkan dengan vaksin polisakarida adalah bisa memicu respons imun jangka panjang dan bisa digunakan pada anak usia di bawah dua tahun. Contoh vaksin jenis ini adalah PCV (*pneumococcal conjugate vaccin*) (Ngocho dkk., 2019).

4) Vaksin DNA

Vaksin DNA berisi DNA plasmid yang diinjeksikan langsung secara intramuskular. Di dalam tubuh, DNA plasmid tersebut dapat menimbulkan protein antigenik yang memicu respons imun. Kelebihan dari vaksin jenis ini adalah protein antigenik yang langsung dihasilkan oleh host dan protein yang dihasilkan di dalam tubuh tidak mungkin mengalami denaturasi (Susmiarsih, 2019).

5) Vaksin RNA

Vaksin jenis ini berisi potongan mRNA (*messenger RNA*) yang dapat memproduksi protein antigenik pemicu respons imun spesifik di dalam tubuh host. Protein antigenik yang dihasilkan di dalam tubuh akan ditangkap oleh *antigen presenting cells* (APC) yang juga akan menghasilkan antibodi dan memori spesifik terhadap protein tersebut. Contoh dari vaksin RNA adalah vaksin moderna dan pfizer yang digunakan untuk mencegah COVID-19 (Rahman dkk., 2021).

2.6.2 Vaksin Malaria

Pemerintah telah banyak melakukan upaya untuk menekan angka morbiditas dan mortalitas akibat malaria, seperti melakukan sosialisasi untuk pencegahan malaria, mengalokasikan anggaran untuk program eliminasi malaria, melakukan pemetaan daerah endemik, melakukan monitoring dan evaluasi program eliminasi malaria, dan lainnya (Juliawan, 2019). Beberapa strategi untuk mengontrol malaria yaitu mengembangkan obat antimalaria untuk pencegahan dan pengobatan,

mengontrol vektor malaria, dan mengembangkan vaksin. Akan tetapi, di beberapa wilayah terjadi resistensi terhadap obat anti malaria dan vektor malaria yang tahan terhadap insektisida sehingga menyulitkan langkah eliminasi malaria. Karena itulah, perlu metode pencegahan dengan menggunakan vaksin malaria untuk mencegah terjadinya mortalitas akibat malaria berat (WHO, 2021).

Protein DBL2 β -PfEMP1 sebagai salah satu kandidat vaksin malaria dibuat melalui teknik DNA rekombinan. Rekayasa genetika ini dapat memproduksi protein dalam jumlah besar dengan bantuan bakteri. Bakteri yang digunakan sebagai sel inang adalah bakteri *E. coli strain* BL21 (DE3). *Escherichia coli* BL21 (DE3) dipilih karena tidak dapat mendegradasi protein-protein asing yang telah disisipkan. Hal ini terjadi karena bakteri tersebut tidak memiliki *long undivided filament* protease dan ompT (*outer membrane protease*) sehingga tidak akan merusak protein target. Tahap selanjutnya adalah bakteri dibiakkan di media produksi kemudian dilakukan proses ekstraksi dan isolasi protein rekombinan. Protein target dapat dipisahkan dengan protein asli bakteri dengan cara purifikasi (Setyoadji dkk., 2021). Setelah purifikasi, protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat diuji imunogenisitas serta dosis optimalnya sebagai kandidat vaksin malaria.

Vaksin dapat mengaktivasi sistem imun atau kekebalan tubuh karena kandungannya yang terdiri dari antigen dan adjuvan. Mirip dengan infeksi yang terjadi secara alami, pemberian vaksin menghasilkan peradangan yang disertai dengan pelepasan berbagai sitokin proinflamasi dan juga menimbulkan respons imun. Aktivasi sistem imun ini meliputi ekspresi dari berbagai sitokin inflamasi, peningkatan sementara dari jumlah leukosit, dan produksi antibodi. Sitokin inflamasi ini akan memasuki pembuluh darah dan menimbulkan beberapa efek pada tubuh seperti demam dan peradangan (Green dan Humadi, 2017). Sementara itu, peningkatan sementara leukosit disebabkan oleh respons imun bawaan (*innate*) yang dapat memicu respons adaptif yang diperlukan untuk kekebalan terhadap infeksi malaria (Cawlfeld dkk., 2019).

2.7 Protein Rekombinan

Protein rekombinan adalah protein yang disandi oleh DNA rekombinan dan merupakan hasil dari teknologi DNA rekombinan. DNA yang mengkode protein rekombinan yang diinginkan akan dimasukkan ke dalam vektor yang dapat menghasilkan protein tersebut dalam jumlah besar (*overexpression*). Prosedur produksi protein rekombinan terdiri dari tahap isolasi gen yang dibutuhkan, insersi gen ke dalam vektor, transformasi sel, dan ekspresi gen (El-Gayar, 2015).

2.7.1 Produksi Protein

Untuk memproduksi protein yang dibutuhkan, diperlukan suatu proses kultur bakteri yang telah disisipkan gen untuk menghasilkan protein target yang diinginkan. Bakteri tersebut dibiakkan dalam suatu medium yang diberi nutrisi untuk menunjang kehidupan bakteri yang terdiri dari empat siklus atau fase. Fase pertama adalah fase *lag* atau fase adaptasi yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri dalam medium. Fase kedua adalah fase *log* yang merupakan fase pertumbuhan bakteri dengan banyak pembelahan sehingga bakteri bertambah banyak. Pada fase aktif ini, bakteri membutuhkan nutrisi yang banyak. Fase ketiga yaitu fase *stationary* yang menandakan media pertumbuhan mulai kehabisan nutrisi sehingga perbandingan antara jumlah bakteri yang hidup dengan bakteri yang mati adalah sama. Fase ini digambarkan dengan kurva datar atau *plateau*. Fase terakhir adalah fase *death*, yaitu saat sebagian besar bakteri mati akibat nutrisi yang habis dan akumulasi produk metabolik yang bersifat toksik (Pletnev dkk., 2015).

Bakteri yang sering digunakan dalam proses produksi dan ekspresi protein rekombinan adalah *Escherichia coli* (*E. coli*) karena *E. coli* dapat tumbuh dengan cepat pada suhu ruangan dan dalam PH normal. *Escherichia coli* sering dipilih dalam proses produksi protein dikarenakan kelebihan yang dimiliki, diantaranya yaitu mampu menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah banyak dengan harga murah dan cenderung mudah dikerjakan dengan menggunakan alat-alat laboratorium sederhana. Selain itu, *E.coli* memiliki banyak strain dan telah banyak tersedia informasi mengenai genetika dari *E. coli* (Setyoadji dkk., 2021).

Untuk mempertahankan sel yang hanya membawa plasmid, antibiotik harus dimasukkan dalam media yang mengandung bakteri penghasil protein agar terhindar dari kontaminan. Apabila menggunakan *E. coli* sebagai vektor dalam ekspresi protein, maka antibiotik yang dapat digunakan tertera dalam Tabel 2.1 (Qiagen, 2013). Antibiotik yang umum digunakan dalam tahap produksi adalah kanamisin. Kanamisin bekerja dengan cara menghambat sintesis protein pada tingkat mRNA. Antibiotik akan rusak apabila dibiarkan dalam suhu ruangan selama beberapa hari. Oleh karena itu, antibiotik disimpan dalam suhu tertentu untuk menghindari kerusakan (Qiagen, 2013).

Tabel 2.1 Antibiotik yang dapat digunakan pada proses produksi protein

Antibiotik	Konsentrasi Stok	Penyimpanan	Konsentrasi yang Dipakai (Pengenceran)
Ampisilin	50 mg/ml (dalam aquadest)	-20° C	100 µg/ml (1/500)
Kloramfenikol	34 mg/ml (dalam etanol)	-20° C	170 µg/ml (1/200)
Kanamisin	10 mg/ml (dalam aquadest)	-20° C	50 µg/ml (1/200)
Streptomisin	10 mg/ml (dalam aquadest)	-20° C	50 µg/ml (1/200)
<i>Tetracycline HCl</i>	5 mg/ml (dalam etanol)	-20° C	50 µg/ml (1/100)

Cara untuk menginduksi ekspresi protein pada kultur *E. coli* yakni dengan menggunakan *Isoprophyl-β-D-Thiogalactosidase* (IPTG). *Isoprophyl-β-D-Thiogalactosidase* (IPTG) adalah penginduksi yang tidak dimetabolisme oleh sel dan strukturnya mirip dengan laktosa. Apabila tidak ada penginduksi atau laktosa, *lac represor* akan berikatan dengan *lac operon* dan menekan transkripsi gen (Nayak dan Arur, 2018). Penginduksian IPTG digunakan untuk memicu terjadinya transkripsi yang akan menghasilkan ekspresi protein target (Gomes dkk., 2020).

Pada kultur bakteri *E. coli*, pertumbuhan bakteri fase *log* berada pada OD₆₀₀. Saat OD (*optical density*) kultur mencapai OD₆₀₀, IPTG dapat dimasukkan ke dalam kultur (Setyoadji dkk., 2021). Saat ini, proses induksi dengan IPTG masih dalam tahap penelitian, sehingga masih sulit untuk menentukan konsentrasi dan lama

inkubasi yang optimal untuk produksi protein. Setelah itu, hasil dari produksi protein ada dalam bentuk pellet setelah melalui proses sentrifus.

2.7.2 Ekstraksi Protein

Terdapat beberapa metode untuk melakukan ekstraksi protein. Metode yang digunakan dapat berupa metode mekanik (sonikasi, *bead mill*, homogenisasi), kimiawi (detergent, EDTA), dan enzimatik (lisozim). Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada letak protein yang dihasilkan oleh bakteri (ekstraseluler atau intraseluler). Untuk mengekstraksi protein rekombinan yang dihasilkan oleh *E. coli*, perlu dilakukan proses lisis sel karena protein rekombinan yang dihasilkan merupakan protein intraseluler (Hermana dkk., 2015). Metode yang bisa digunakan untuk ekstraksi protein intraseluler *E. coli* yaitu metode lisis enzimatik (lisozim), dan mekanik (sonikasi). Kombinasi metode tersebut dapat menghasilkan protein yang lebih tinggi (El-Gayar, 2015).

Lisis enzimatik dengan menggunakan lisozim dapat memecahkan dinding sel bakteri dan mengekstrak protein rekombinan dalam jumlah banyak (Hermana dkk., 2015). Lisozim yang dimurnikan dari putih telur ayam ini dapat memutus ikatan antara *N-acetylmuramic acid* dan *N-acetyl glucosamine* yang membentuk lapisan peptidoglikan bakteri dengan cara hidrolisis. Setelah itu, membran sitoplasma bagian dalam dapat dengan mudah dirusak oleh metode ekstraksi mekanik, seperti sonikasi. Untuk bakteri gram positif, mudah dilisiskan dengan menggunakan lisozim karena tidak memiliki membran yang mengelilingi peptidoglikan. Sedangkan untuk bakteri gram negatif seperti *E. coli*, memerlukan metode ekstraksi tambahan karena memiliki membran sel yang membungkus lapisan peptidoglikan (Reilly, 2016). Selain itu, kekurangan lain dari lisozim ini adalah lisisnya membutuhkan waktu yang lama dan harganya mahal (Hermana dkk., 2015).

Metode selanjutnya yang bisa digunakan dalam ekstraksi protein rekombinan intraseluler adalah sonikasi. Sonikasi adalah metode yang menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi lebih dari 20 kHz. Dinding sel dari sampel dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah. Gelombang ultrasonik menyebabkan bergetarnya dinding sel

dan membantu melepaskan komponen yang dapat diekstrak, termasuk protein rekombinan (Reilly, 2016). Gelombang ultrasonik dari sonikator dapat mengubah permeabilitas dinding sel dan menyebabkan rusaknya dinding sel. Gelombang ini juga menghasilkan energi mekanik yang akan membentuk suatu gelembung mikroskopik yang kemudian pecah dan mengakibatkan gelombang tersebut dapat meradiasi sampel. Pembentukan dan pemecahan gelembung gas tersebut menghasilkan tekanan tinggi dan panas, sehingga perlu adanya pendinginan untuk mencegah kerusakan pada bahan yang sedang diekstrak. Sonikasi yang berkepanjangan dapat menyebabkan peningkatan suhu dan pembentukan radikal bebas yang bisa menyebabkan kerusakan atau denaturasi protein. Oleh karena itu, sonikasi harus dilakukan di atas atau di dalam es dengan periode istirahat tertentu untuk membatasi denaturasi protein yang disebabkan oleh peningkatan suhu (El-Gayar, 2015).

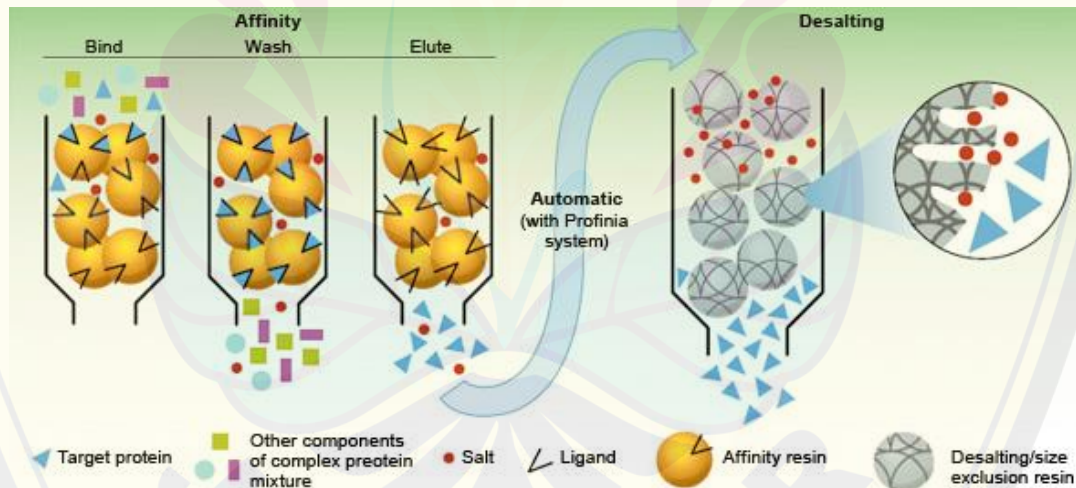
2.7.3 Purifikasi Protein

Prinsip purifikasi protein adalah untuk menghilangkan semua kontaminan atau protein pengotor sambil mempertahankan sebanyak mungkin protein rekombinan yang dibutuhkan. Kontaminan yang dimaksud dapat berupa berbagai makromolekul dan mikromolekul seperti polisakarida, asam nukleat, lipid, dan banyak protein lainnya yang bukan protein rekombinan target (El-Gayar, 2015). Purifikasi protein dapat dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran, muatan, *binding specificity* (afinitas), kelarutan, dan sifat kepolarannya (hidrofobik atau hidrofilik). Oleh karena itu, terdapat beberapa metode yang bisa digunakan dalam purifikasi protein, beberapa diantaranya adalah *ion exchange*, dialisis, ultrafiltrasi, kromatografi filtrasi, ultrasentrifugasi, kromatografi interaksi hidrofobik, dan kromatografi afinitas (Pandey dkk., 2016).

Salah satu metode purifikasi adalah dengan menggunakan kromatografi afinitas. Kromatografi afinitas adalah metode pemisahan komponen-komponen berdasarkan interaksi spesifiknya. Molekul yang akan dimurnikan secara spesifik diserap oleh zat pengikat (ligan) yang diimobilisasi pada matriks (Sedelnikova, 2018). Matriks yang dapat digunakan dalam prosedur purifikasi protein rekombinan

dengan metode kromatografi afinitas adalah *Ni-NTA Agarose*. Dalam prosesnya, metode ini membutuhkan suatu *buffer* yang berguna untuk mengikat dan melulusi protein. Bahan dasar *buffer* yang berguna untuk mengikat protein adalah NaCl, sedangkan yang berguna untuk melulusi protein rekombinan adalah imidazol (Insyirah, 2014).

Tiga tahapan penting dalam purifikasi dengan kromatografi afinitas adalah pengikatan (*binding*), pencucian (*washing*), dan elusi (*elute*) (Gambar 2.13). Ikatan yang terjadi pada tahap awal adalah ikatan antara protein target dengan ligan, lalu protein lain yang bukan sebagai protein target dikeluarkan melalui proses *washing* atau pencucian. Hasil akhir yang didapat adalah suatu elusi yang mengandung protein rekombinan tanpa kontaminan. Keuntungan dari kromatografi afinitas adalah selektivitas dan kapasitas tinggi, tidak memakan waktu lama, dan tidak rumit untuk dikerjakan. Dengan memanfaatkan struktur dan fungsi biologis protein untuk purifikasi, dapat dengan mudah dicapai dengan kromatografi afinitas (Bio Rad, 2021).

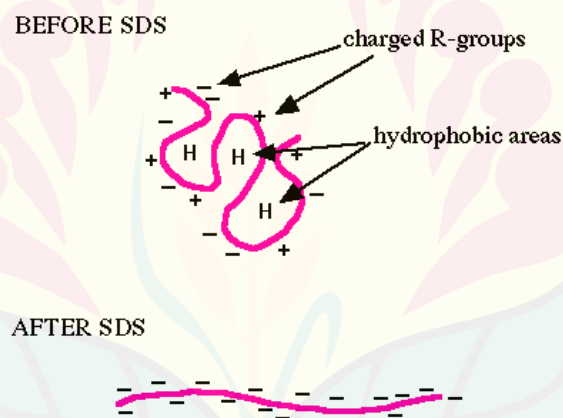


Gambar 2.13 Tahapan purifikasi dengan menggunakan kromatografi afinitas (*bind, wash, elute*) (Sumber : Bio Rad, 2021)

2.6.4 Visualisasi Protein dengan SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) adalah teknik untuk visualisasi dan pemisahan protein berdasarkan kemampuan protein untuk bergerak dalam arus listrik. Kemampuan bergerak protein tersebut bergantung dari besar dan berat molekul serta panjang rantai polipeptidanya (Roy

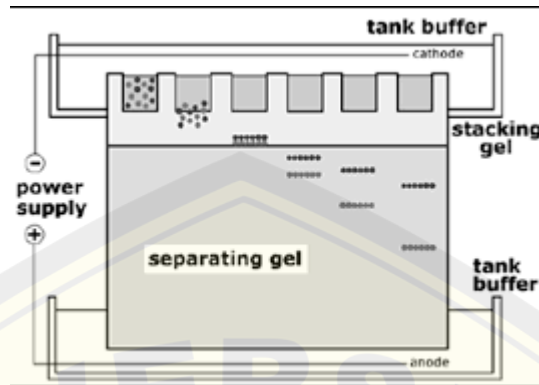
dkk., 2012). Metode ini memiliki banyak kelebihan seperti harganya yang murah, proses pengerjaannya yang cepat, protein yang dipakai dalam jumlah sedikit, mudah, dan efisien (Jan dkk., 2016). Ketika protein bergerak dalam arus listrik, protein yang berukuran kecil akan bergerak (turun) lebih cepat dibandingkan dengan protein yang ukurannya lebih besar (Garca-Descalzo dkk., 2012). Protein dapat bergerak dalam alat SDS-PAGE karena memiliki muatan negatif akibat pemberian *Sodium dodecyl sulfate* (SDS). *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) adalah suatu deterjen anionik atau senyawa organik $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ yang memiliki muatan negatif (Roy dan Kumar, 2014). Selain berfungsi untuk membuat protein memiliki muatan negatif yang menyebabkan pergerakan ke kutub positif, SDS yang ditambah dengan prosedur pemanasan (denaturasi) akan membuat protein kembali ke struktur primernya atau struktur linear (Gambar 2.14).



Gambar 2.14 Struktur dan muatan protein sebelum dan sesudah pemberian SDS (Sumber : Roy dan Kumar, 2014)

Selain SDS, komponen lain dalam SDS-PAGE adalah gel poliakrilamid yang terdiri dari *stacking gel* (gel bagian atas) dan *resolving gel* atau *separating gel* (gel bagian bawah) (Gambar 2.15) (Roy dkk., 2012). Struktur gel poliakrilamid ini adalah jalinan serat yang berfungsi seperti saringan untuk berat protein tertentu. Senyawa utama yang menyusun gel poliakrilamid sehingga bisa berfungsi seperti saringan adalah akrilamida yang dicampur dengan bis akrilamida. Sedangkan, bahan yang berguna sebagai inisiator untuk mengaktifkan akrilamida sehingga

dapat membentuk suatu gel adalah APS (Amonium Persulfat) (Roy dan Kumar, 2014).



Gambar 2.15 Gel poliakrilamid yang terdiri dari *stacking gel* dan *separating gel* (Sumber : Roy dkk., 2012)

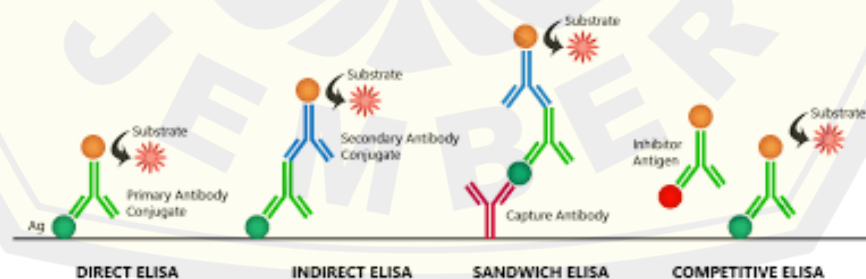
Untuk mempercepat terbentuknya gel SDS, ditambahkan suatu katalisator yang bernama temed (N, N, N', N'- *tetramethylethylenediamine*). APS dan temed selalu ditambahkan terakhir agar gel bisa terbentuk dengan baik (Roy dkk., 2012). Protein pada gel poliakrilamid dapat dideteksi setelah melalui proses pewarnaan (*staining* dan *destaining*). Metode yang dapat digunakan yaitu *silver staining* dan *coomassie blue staining*. Metode *silver staining* membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan metode *coomassie blue staining*, namun sifatnya lebih sensitif (Brunelle dan Green, 2014; Welsh dkk., 2020).

2.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu uji biokimia yang menggunakan perubahan warna (dimediasi oleh enzim) untuk mendeteksi keberadaan antigen atau antibodi dalam suatu sampel. Uji ELISA banyak digunakan sebagai alat penunjang diagnostik dan analisis dalam kegiatan penelitian biomedis untuk mendeteksi dan kuantifikasi antigen (protein, peptida, hormon, dan lainnya) atau antibodi spesifik (contohnya seperti IgM dan IgG). Dikenal dengan sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi, ELISA mampu mendeteksi antigen atau antibodi dalam jumlah dan konsentrasi yang sangat rendah. Prinsip dari ELISA adalah mendeteksi ikatan yang terjadi antara antigen dengan antibodi spesifik.

Ikatan tersebut kemudian dideteksi oleh antibodi yang berlabel enzim. Setelah itu, akan ada pemberian substrat (*chromogen*) yang akan bereaksi dengan enzim dan menyebabkan perubahan warna yang bisa dideteksi serta menunjukkan adanya antigen yang bisa diukur secara kuantitatif dan kualitatif (Gan dan Patel, 2013).

Pengujian sampel menggunakan ELISA terdiri dari beberapa macam metode, yaitu metode *direct*, *indirect*, *sandwich*, dan *competitive* ELISA (Gambar 2.16). Pada metode *direct* ELISA, antigen dideteksi langsung oleh antibodi primer yang telah terkonjugasi dengan enzim. Sedangkan pada metode *indirect* ELISA, antigen dideteksi oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim. Metode ELISA yang paling umum dilakukan adalah *sandwich* ELISA. Perbedaan metode *sandwich* ELISA dibanding metode lain adalah sumuran dari plat ELISA yang dilapisi dengan *capture antibody* atau antibodi penangkap. Setelah itu, antigen ditambahkan dan diikuti dengan pemberian antibodi pendeteksi. Apabila antibodi pendeteksi langsung berkonjugasi dengan enzim, maka metodenya disebut dengan *direct sandwich* ELISA. Namun apabila antibodi pendeteksi tidak langsung terkonjugasi dengan enzim dan masih memerlukan antibodi sekunder, maka metode ini disebut sebagai *indirect sandwich* ELISA (Boster, 2020). Metode terakhir adalah *competitive* ELISA yang merupakan proses reaksi kompetitif antara sampel antibodi dan antibodi berlabel enzim. Antibodi tersebut berkompetisi untuk berikatan dengan antigen yang terikat pada sumuran mikrotiter (Gan dan Patel, 2013). Semakin sedikit jumlah antibodi dalam sampel, maka semakin banyak antibodi berlabel enzim yang akan berikatan dengan antigen yang terikat pada sumuran, sehingga sinyal akan semakin kuat (Abcam, 2018).



Gambar 2.16 Jenis-jenis ELISA (Sumber : Boster, 2020)

Sampel yang dapat digunakan untuk pemeriksaan ELISA tidak hanya serum atau plasma darah, namun juga bisa menggunakan saliva, urin, feses, *cell lysates*, dan lainnya. Sebelum pengujian, sampel boleh disentrifugasi lagi untuk menghilangkan endapan atau presipitat yang mungkin muncul saat penyimpanan. Pada pemeriksaan ELISA dengan serum darah, sampel dibiarkan menggumpal selama 2 jam pada suhu kamar sebelum disentrifugasi selama 15 menit. Setelah proses sentrifugasi, dilakukan pengujian pada bagian supernatan. Sedangkan pada pemeriksaan ELISA dengan plasma darah, perlu antikoagulan seperti EDTA atau heparin (Abcam, 2018).

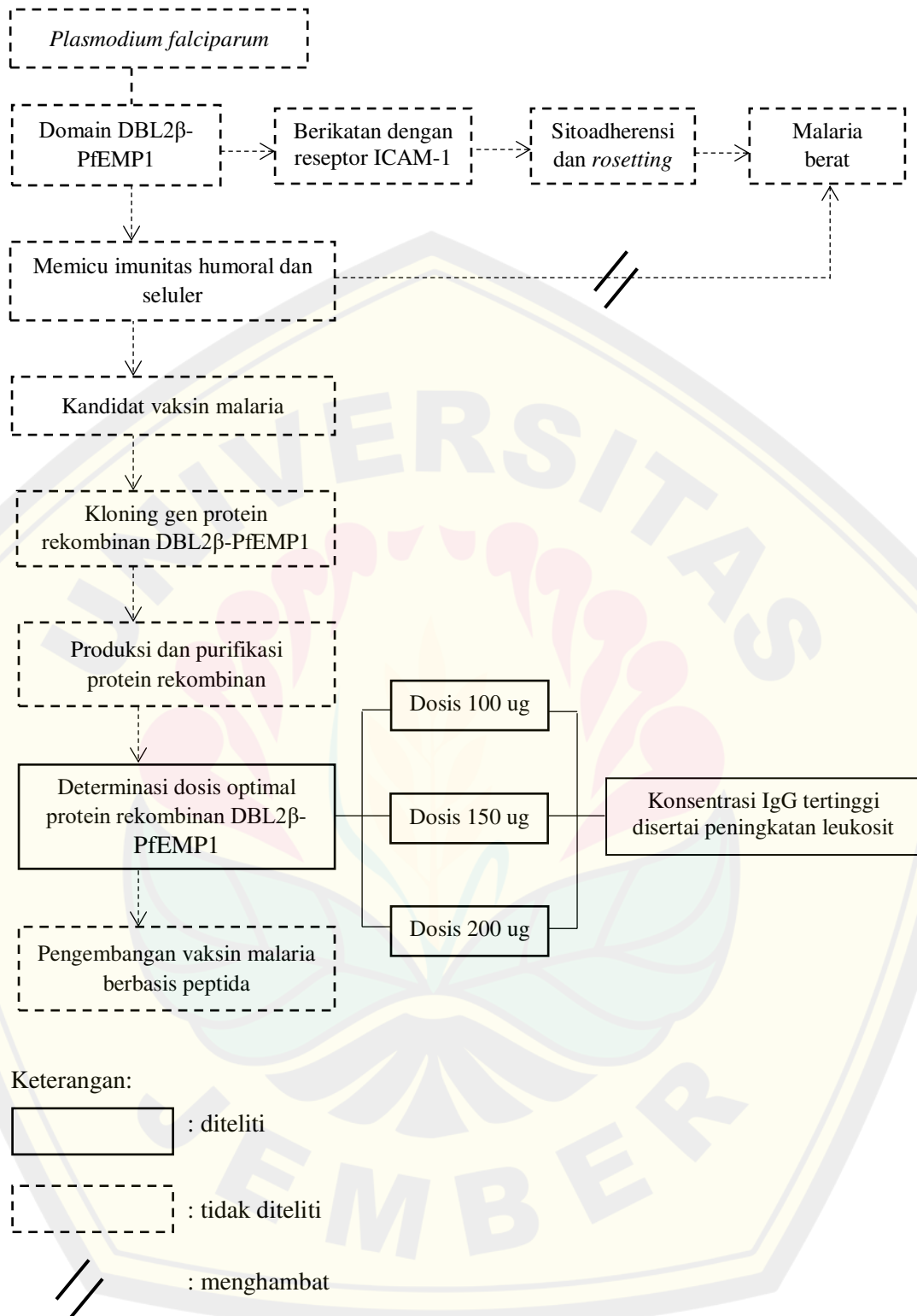
Enzim yang umum digunakan sebagai konjugat dalam prosedur ELISA adalah *Horse-radish Peroxidase* (HRP) dan *Alkaline Phosphatase* (ALP). Enzim yang paling banyak digunakan adalah HRP karena relatif lebih murah, stabil, dan tahan terhadap panas serta pelarut organik. Enzim yang dipilih akan menentukan substrat yang akan dipakai. Substrat yang dipakai oleh *Alkaline Phosphatase* adalah *p-nitrophenyl phosphate* (PNPP) yang dilarutkan dalam *diethanolamine* 10%. Substrat PNPP akan dihidrolisis menjadi *p-nitrophenyl* (PNP) yang berwarna kuning. Sedangkan substrat yang digunakan untuk enzim *Horse-radish Peroxidase* (HRP) adalah *tetramethyl benzidine* (TMB) yang dilarutkan dalam *dimethylsulfoxide* (DMSO). Substrat TMB paling sering digunakan dalam prosedur ELISA karena memiliki stabilitas yang baik. Substrat tersebut kemudian dihidrolisis menjadi produk yang berwarna biru (Suryadi dkk., 2016). Reaksi antara enzim dan substrat diakhiri dengan penambahan larutan asam sulfat yang menyebabkan warna menjadi kuning. Perubahan warna dari keseluruhan proses dapat terlihat oleh mata manusia dan *optical density* (OD) dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm (Abcam, 2018).

Untuk membuat teknik pelabelan imun yang lebih sensitif dalam prosedur ELISA, terdapat sistem biotin-strept(avidin). Biotin dikonjugasikan dengan immunoglobulin yang selanjutnya akan berikatan dengan avidin yang terkonjugasi dengan enzim HRP (Gambar 2.17). Afinitas antara biotin dan avidin dikenal sangat kuat, 10.000 kali lebih kuat daripada ikatan antara antigen dan antibodi. Selain memiliki keunggulan spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, biotin dapat mengikat

avidin dengan cepat dan efisien. Ikatan biotin dan avidin juga sangat stabil karena prosesnya yang *irreversible* dan bebas dari pengaruh enzim proteolitik, pelarut organik, zat asam, dan alkali (Nimse dkk., 2016).

2.9 Kerangka Konsep

Plasmodium falciparum memiliki protein antigenik PfEMP1 domain DBL2 β yang dapat menimbulkan malaria berat melalui ikatan dengan reseptor ICAM-1. Antibodi terhadap DBL2 β -PfEMP1 terbukti dapat menimbulkan proteksi terhadap malaria berat, sehingga DBL2 β -PfEMP1 ini menjadi kandidat vaksin malaria berbasis peptida. Untuk menimbulkan antibodi tanpa menyebabkan morbiditas, dilakukan rekayasa genetik berupa kloning gen protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1. Penelitian mengenai isolasi gen dan karakterisasi protein DBL2 β -PfEMP1, serta uji imunogenisitas protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 telah selesai dilakukan pada penelitian sebelumnya (Hasanah dkk., 2020). Pada suatu uji imunogenisitas, protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 terbukti bersifat imunogenik dan mampu merangsang respons imun seluler dan humoral (Rachmania dkk., 2020). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan determinasi dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada hewan coba. Dosis yang optimal ini diharapkan akan menghambat ikatan antara domain DBL2 β -PfEMP1 dengan reseptor ICAM-1, sehingga akan mencegah terjadinya sitoaderensi dan *rosetting* yang menjadi patogenesis malaria berat.



Gambar 2.17 Kerangka konsep penelitian

2.10 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

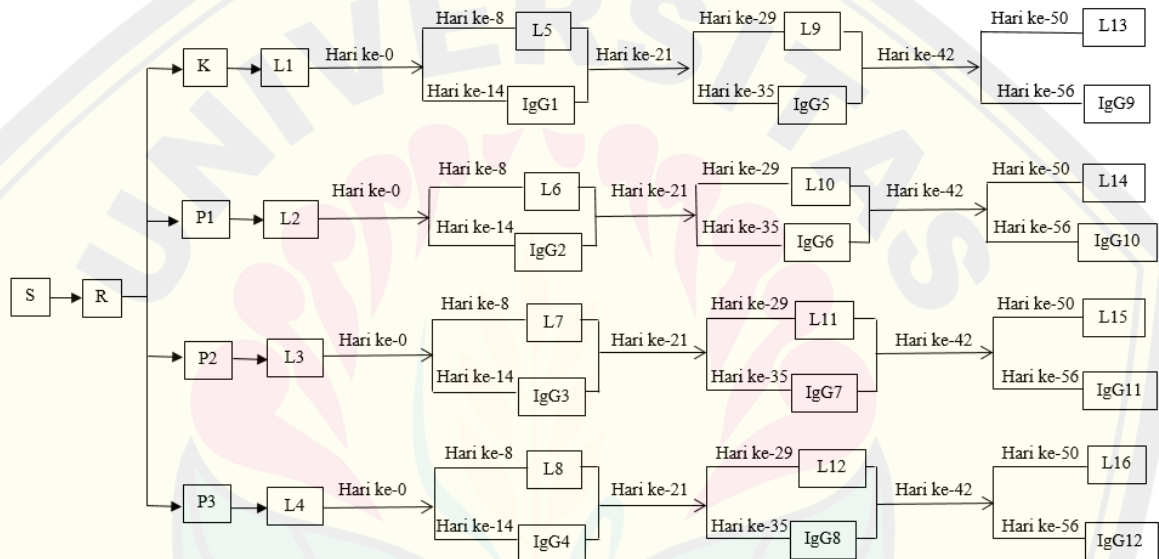
- a. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat meningkatkan respons imun tikus yang ditandai dengan peningkatan jumlah leukosit dan IgG.
- b. Perbedaan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menyebabkan perbedaan efektivitas dalam menginduksi IgG tikus.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) dengan membandingkan 3 dosis antigen sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida serta membandingkan dengan kelompok kontrol. Pada pemeriksaan konsentrasi IgG menggunakan *posttest only control group design*, sedangkan pada hitung jumlah leukosit menggunakan *randomized pre and posttest control group design*.



Keterangan :

- S : Sampel
- R : Randomisasi
- K : Kelompok kontrol yang diberi NaCl 0,9% (injeksi pada hari ke-0, 21, dan 42)
- P1 : Kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100 µg (injeksi pada hari ke-0, 21, dan 42)
- P2 : Kelompok perlakuan 2 dengan dosis 150 µg (injeksi pada hari ke-0, 21, dan 42)
- P3 : Kelompok perlakuan 3 dengan dosis 200 µg (injeksi pada hari ke-0, 21, dan 42)
- L1, L2, L3, dan L4 : Pre-test hitung jumlah leukosit
- L5, L6, L7, dan L8 : Hitung jumlah leukosit pada hari ke-8
- L9, L10, L11, dan L12 : Hitung jumlah leukosit pada hari ke-29
- L13, L14, L15, dan L16 : Hitung jumlah leukosit pada hari ke-50
- IgG1, IgG2, IgG3, dan IgG4 : Konsentrasi IgG pada 14 hari pasca imunisasi primer

IgG5, IgG6, IgG7, dan IgG8 : Konsentrasi IgG pada 14 hari pasca imunisasi sekunder I
IgG9, IgG10, IgG11, dan IgG12 : Konsentrasi IgG 14 hari pasca imunisasi sekunder II

Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Injeksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dilakukan pada hari yang sama. Injeksi primer atau injeksi pertama dilakukan pada hari ke-0, injeksi sekunder I atau injeksi kedua dilakukan pada 3 minggu kemudian, yakni hari ke-21. Injeksi sekunder II atau injeksi ketiga dilakukan pada hari ke-42. Hitung jumlah leukosit selalu dilakukan pada hari yang sama dengan hari pengambilan darah. Hitung jumlah leukosit dilakukan pada hari ke-8, 29, dan 50, yakni pada 8 hari pasca injeksi primer, sekunder I, dan sekunder II. Pengambilan darah untuk pemeriksaan IgG dilakukan pada 14 hari pasca injeksi primer, sekunder I, dan sekunder II, yakni pada hari ke-14, 35, dan 56. Meski pengambilan darah dilakukan pada hari yang berbeda, uji ELISA dilakukan pada hari yang sama, yakni pada hari ke-57 atau 1 hari pasca terminasi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta di Laboratorium UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (CDAST). Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2021 hingga Februari 2022.

3.3 Populasi dan Besar Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*. Kriteria inklusinya adalah tikus jantan sehat yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-350 gram. Tikus yang termasuk dalam kriteria eksklusi adalah yang mati pada saat perlakuan dan mengalami penurunan berat badan lebih dari 10 gram sebelum perlakuan. Sampel penelitian ini ditentukan jumlahnya melalui metode *resource equation*. Berdasarkan metode ini, nilai E (*E-value*) penelitian harus berada di antara 10-20 (Charan dan Kantharia, 2013). Apabila nilai E kurang dari 10, maka jumlah sampel harus ditambah, sedangkan apabila nilai E

lebih dari 20, maka jumlah sampel harus dikurangi. Penghitungan nilai E didapatkan dari:

$$E = \text{Total jumlah model binatang yang digunakan} - \text{total kelompok}$$

$$E = (\text{Jumlah hewan tiap kelompok} \times \text{kelompok}) - \text{total kelompok}$$

Sehingga pada penelitian ini:

$$E = (4 \times 4) - 4$$

$$E = 16 - 4$$

$$E = 12$$

Nilai E dalam penelitian ini yaitu 12 yang berarti menunjukkan kisaran E -value yang adekuat, sehingga digunakan 16 ekor tikus yang dipilih secara acak. 16 ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok, sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. 4 kelompok tersebut terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Tiga kelompok perlakuan tersebut dibedakan berdasarkan dosis antigen protein rekombinan yang diberikan, yaitu 100 μg , 150 μg , dan 200 μg . Untuk menerapkan prinsip *reduction* pada hewan coba, kelompok kontrol dikurangi jumlahnya hingga terdiri dari 3 ekor tikus.

3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data penelitian ini adalah data primer yang berasal langsung dari sumber data yang didapat melalui percobaan di laboratorium. Data yang didapat berupa data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif berupa konsentrasi antibodi (IgG) dan jumlah leukosit, sedangkan data kualitatif berupa visualisasi band protein rekombinan pada *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1. Dosis protein yang digunakan dalam penelitian yaitu 100 μg , 150 μg , 200 μg . Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah leukosit dan respons imun humoral yang diukur melalui konsentrasi IgG. Dalam penelitian ini, terdapat

variabel pengganggu yang tidak bisa dikendalikan, yakni kondisi psikologis dan variasi genetik masing-masing hewan coba.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional, cara ukur, dan skala pengukuran pada penelitian ini dijelaskan pada tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala
1.	Dosis Optimal	Dosis yang mampu menimbulkan respons imun yang diinginkan.	Dosis terbaik ditentukan melalui nilai antibodi IgG tertinggi. Hasil dinyatakan dalam 100 µg, 150 µg, atau 200 µg.	Rasio
2.	Protein rekombinan domain DBL2β-PfEMP1	Protein yang diekspresikan dari DNA rekombinan DBL2β-PfEMP1 <i>P. falciparum</i> melalui inang (<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)). DNA rekombinan didapatkan melalui kloning gen. Protein rekombinan diproduksi, diekstraksi, dipurifikasi, divisualisasi, kemudian diinjeksikan pada hewan coba.	Dosis Protein rekombinan domain DBL2β-PfEMP1 diukur berdasarkan konsentrasi protein yang diketahui melalui <i>Bradford protein assay</i> . Hasil dinyatakan dalam satuan µg/µl.	Rasio
3.	Immunoglobulin G (IgG)	IgG adalah glikoprotein dengan berat molekul 150 kDa yang mampu mengikat antigen secara spesifik dan dapat dideteksi dalam serum hewan coba serta mampu menggambarkan respons imun humoral.	Konsentrasi IgG diukur dengan menggunakan <i>ELISA</i> .	Rasio
4.	Leukosit	Sel darah yang diproduksi oleh sumsum tulang dan diedarkan ke seluruh tubuh melalui aliran darah serta memiliki peran penting dalam respons imun tubuh.	Leukosit dihitung jumlahnya dengan menggunakan kamar hitung <i>Improved Neubauer</i> dan diamati di bawah mikroskop. Hasil dinyatakan dalam jumlah leukosit/mm ³ .	Rasio

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Kelayakan Etik

Uji kelayakan penelitian ini dilakukan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Peneliti mengajukan permohonan persetujuan untuk melakukan penelitian kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Setelah mendapatkan persetujuan, peneliti mendapat suatu *ethical clearance*.

3.7.2 Produksi Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1

Produksi protein dilakukan menggunakan kombinasi metode produksi protein yang sudah dioptimasi dan dilakukan oleh Rachmania dkk (2020) dan Setyoadji dkk (2021). Proses ini diawali dengan peremajaan sel DBL2 β -PfEMP1 dengan cara *streaking* bakteri *E. coli* BL21 (DE3) yang mengandung DNA rekombinan pada media LB padat yang sudah diberi kanamisin. Setelah LB padat diinkubasi selama 16 jam dengan suhu 37°C di dalam inkubator, koloni bakteri di cawan petri dapat terlihat. Koloni tersebut kemudian dimasukkan pada tabung ulir yang berisi 2 ml LB cair dan 2 μ g kanamisin. Tabung ulir dimasukkan pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 150 RPM selama 16 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu, LB cair 2 ml yang sudah berisi koloni bakteri dimasukkan dalam media LB cair 50 ml yang sudah diberi kanamisin 50 μ l, lalu di *shaker* dengan kecepatan 150 RPM dan suhu 37°C selama 4 jam. Setelah 4 jam, dilakukan pengukuran nilai *optical density* (OD) atau absorbansi sampel dan *blanko* menggunakan panjang gelombang 600 nm. Apabila absorbansi mencapai 0,6 sampai 0,8, maka kultur tersebut bisa dibagi-bagi ke dalam tabung *ependorf*. Satu tabung *ependorf* berisi 350 μ l Gliserol 40% dan kultur bakteri 650 μ l. Tabung *ependorf* ditutup kemudian disiram dengan nitrogen cair dan disimpan dalam kulkas -80°C. Hasil dari proses peremajaan sel ini digunakan untuk produksi protein rekombinan berkali-kali.

Prosedur produksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 adalah sebagai berikut.

- a. Sebanyak 50 μ l hasil kloning dan transformasi berupa stok gliserol *E. coli* BL21(DE3) ditumbuhkan dalam 5 ml LB cair mengandung kanamisin 50 μ g/ml pada *shaker* inkubator kecepatan 150 RPM suhu 37°C selama 16 jam.

- b. Hasil kultur diinokulasi ke medium LB cair 250 ml yang mengandung kanamisin 50 µg/ml.
- c. Kultur diinkubasi dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 190 RPM hingga OD kultur mencapai 600. Induksi IPTG 0,5 mM sebanyak 50 µl ke dalam kultur, kemudian kultur dimasukkan kembali ke *shaker* inkubator selama 8 jam.
- d. Sentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 6.000 RPM.
- e. *Pellet* yang dihasilkan diekstraksi *buffer* (NaCl 500 mM dan Tris HCl 50 mM dalam pH 8) dengan perbandingan pellet : *buffer* ekstraksi 1:2. Tambahkan lisozim 1 mg/ml dan ditunggu selama 30 menit pada suhu kurang dari 4°C.
- f. Sonikasi sebanyak 18-20 siklus (proses lisis) hingga konsistensi cair dan warna cairan terlihat lebih bening.
- g. Sentrifugasi sampel protein hasil lisis dengan kecepatan 12.000 RPM pada suhu 4°C selama 30 menit. Apabila tidak segera dipurifikasi, hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas -80°C.

3.7.3 Purifikasi Protein melalui Kromatografi Afinitas

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi afinitas resin Ni-NTA dengan prosedur sebagai berikut.

- a. Sebelum kolom digunakan, kolom dicuci dengan menggunakan NaOH 0,1M dan etanol 30%.
- b. Dilakukan pemberian resin *Ni-NTA* pada kolom dan dibiarkan selama 30 detik, lalu ditambahkan aquades sebanyak 3x5 ml.
- c. Pemberian *buffer* lisis (5 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, dan 500 mM NaCl) sebanyak 3x5 ml. Saat pemberian *buffer* lisis ketiga, bagian atas dan bawah kolom harus ditutup dan dibiarkan selama 1 jam. Setelah 1 jam, buka penutup atas dan bawah, lalu tunggu *buffer* lisis tersebut menetes hingga habis. Bila tersisa sedikit, maka gunakan *sprit* berisi udara untuk mendorong tetesan yang tersisa dalam kolom.

- d. Bagian atas dan bawah kolom ditutup kembali dan ditambahkan 4 ml *crude* yang telah diproduksi pada tahap sebelumnya. Kemudian kolom diletakkan dalam *orbital shaker* selama 60 menit pada suhu kurang dari 4°C.
- e. Bagian atas dan bawah kolom dibuka dan dilakukan pemberian *wash buffer* I (50 mM Na-phosphate, 500 Mm NaCl, 10 Mm imidazol, pH 8) sebanyak 2 kali dan *wash buffer* II (50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8) sebanyak 2 kali.
- f. *Buffer* elusi pH 8 ditambahkan sebanyak 2x0,5 ml pada masing masing konsentrasi dimulai dari yang terkecil. *Buffer* elusi I terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 30 mM imidazol. *Buffer* elusi II terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 60 mM imidazol. *Buffer* elusi III terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 100 mM imidazol.

3.7.4 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE

Setelah melalui proses purifikasi, protein divisualisasi melalui SDS-PAGE mengikuti prosedur kombinasi dari Bio-Rad (2012) dan Rachmania dkk (2020).

- a. *Lower gel* SDS-PAGE (*acrylamide* 12,5%) dibuat dengan komposisi:

ddH ₂ O	6,6 ml
<i>acrylamide/bis</i> 30%	8,3 ml
<i>lower gel buffer</i> 4X pH 8,8	5 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Bahan tersebut dicampur dan segera dituang ke dalam kaca SDS sampai batas yang ditentukan untuk *lower gel* dan ditunggu hingga gel memadat.

- b. Protein rekombinan yang akan divisualisasi dicampur dengan *buffer* denaturasi atau *buffer* sampel (SDS 10%, gliserol 10%, *bromophenol blue* 0,5%, *β-mercaptoethanol* 5%, tris HCl 0,5 M, dan pH 6,8) dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan pemanasan dengan *dry heat block* pada suhu 95°C selama 5 menit.
- c. *Upper gel* dibuat dengan konsentrasi *acrylamide* 4,5% dengan komposisi sebagai berikut:

ddH ₂ O	7 ml
<i>acrylamide/bis</i> 30%	1,8 ml
<i>upper gel buffer</i> 4X pH 6,8	3 ml
APS 10%	150 µl
TEMED	15 µl

Dilakukan homogenisasi dengan cepat dan cairan tersebut segera dimasukkan di atas *lower gel*. Sebelum memadat, sisir dimasukkan untuk membentuk sumuran.

- d. Setelah *upper gel* memadat, kaca SDS-PAGE dipasang dalam perangkat. Selanjutnya, 500 ml *running buffer* (Tris base 0,025 M, SDS 0,1%, dan glisin 0,192 M) dituang ke dalam *chamber* SDS-PAGE.
- e. Siapkan proses elektroforesis dengan memasang kabel hitam sebagai kutub negatif dan merah sebagai kutub positif.
- f. Sebanyak 15 µl sampel protein yang sudah terdenaturasi dan 4 µl *prestained protein marker dual color* (BioRad) dimasukkan ke sumuran *upper gel* yang sudah dibentuk dengan menggunakan sisir.
- g. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 50 V selama 45 menit untuk *upper gel* dan 80 V selama 2,5 jam untuk *lower gel*.
- h. Setelah elektroforesis selesai, kaca dilepas dari perangkat dan gel dapat diambil. Kemudian bagian *upper gel* dibuang.
- i. Pewarnaan pada gel menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* dan diletakkan dalam *shaker* selama 30 menit.
- j. Destaining dilakukan dengan cara merendam gel dalam *destaining solution* selama 1 jam dan kemudian hasilnya dapat dianalisa.

3.7.5 Analisis Konsentrasi Protein

Sebelum melakukan pengukuran konsentrasi protein dengan *Bradford protein assay*, dilakukan pembuatan kurva standar dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA). Pembuatan kurva ini membutuhkan *microplate* dan *microplate reader*. Sebanyak 1 ml reagen *bradford* dimasukkan ke dalam tabung *microtube*. Masing-masing tabung ditambahkan cairan BSA dengan jumlah yang

berbeda-beda, dari jumlah kecil hingga besar, serta dilakukan 2-3 kali replikasi. Kemudian, diinkubasi selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader*. Absorbansi dan konsentrasi BSA tersebut membentuk suatu kurva standar yang digunakan dalam penentuan konsentrasi protein. Untuk menghitung konsentrasi protein, reagen *bradford* sebanyak 995 μL dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian sampel protein ditambahkan dengan volume 5 μL . Sampel diinkubasi di suhu ruangan selama 10 menit. Sampel dipindahkan ke *cuvettes* dan diukur nilai absorbansinya menggunakan panjang gelombang 595 nm. Untuk menentukan jumlah protein yang diinjeksikan (dalam satuan μl), maka dosis protein target (dalam satuan μg) dibagi dengan konsentrasi protein ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) yang didapat dari hasil *Bradford protein assay*.

3.7.6 Injeksi Hewan Coba

Setelah aklimatisasi selama 2 minggu dan hewan coba sudah memenuhi kriteria inklusi, maka perlakuan berupa injeksi protein rekombinan dapat dilakukan. Injeksi dilakukan pada hari ke-0, hari ke-21, dan hari ke-42. Injeksi dibagi menjadi tahap primer dan sekunder. Injeksi primer dilakukan 1 kali, sedangkan injeksi sekunder dilakukan 2 kali dengan periode interval 3 minggu. Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 dengan dosis yang telah ditentukan dicampur dengan *freund's complete adjuvant* (pada injeksi pertama) atau *freund's incomplete adjuvant* (pada injeksi kedua dan ketiga). Perbandingan antara protein rekombinan dan adjuvan yang digunakan adalah 1:1. Injeksi dilakukan secara subkutan pada area tengkuk. Pada kelompok kontrol dilakukan injeksi cairan NaCl 0,9% secara subkutan pada tempat yang sama.

3.7.7 Ekstraksi Darah dan Terminasi Hewan Coba

Darah untuk pemeriksaan IgG diambil pada hari ke-14, 35, dan 56 (14 hari setelah injeksi primer dan sekunder). Darah yang digunakan dalam hitung jumlah leukosit diambil sebelum hewan coba diberi perlakuan dan delapan hari pasca injeksi primer dan sekunder. Darah sebanyak 500 μl diambil dari sinus orbita dengan menggunakan tabung kapiler steril. Pada hitung jumlah leukosit, darah

ditampung dalam tabung EDTA dan langsung dilakukan penghitungan jumlah leukosit pada hari yang sama dengan ekstraksi darah. Pada pemeriksaan IgG, darah disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3.000 RPM. Kemudian, serum dapat dipindahkan ke *microtube* dan disimpan pada suhu -80°C . Terminasi dilakukan dengan cara menginjeksikan ketamin dan *xylazine* secara intraperitoneal pada hewan coba (The Humane Society of the United States, 2013).

3.7.8 Hitung Jumlah Leukosit

Hitung jumlah leukosit dalam penelitian ini dilakukan pada hari ke-8, hari ke-29, dan hari ke-50 dengan menggunakan cara tabung. Larutan pengencer yang digunakan adalah *turk* yang merupakan campuran dari 3 ml asam asetat glasial, 1 ml *gentian violet* 1%, dan 100 ml aquades. Sebanyak 0,38 ml larutan *turk* dimasukkan dengan menggunakan pipet ke dalam tabung berukuran 75 x 10 mm. Setelah itu, 20 μl darah dalam tabung EDTA ditambahkan ke tabung yang sudah berisi larutan *turk*. Homogenisasi darah perlu dilakukan dengan baik agar leukosit terdistribusi rata. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer* yang dapat diamati melalui mikroskop. Total sel yang dihitung dibagi dengan volume kotak ($0,4 \text{ mm}^3$) dan dikali dengan jumlah pengenceran. Pengenceran yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 kali.

3.7.9 Pengukuran IgG melalui ELISA

Pengukuran absorbansi dan konsentrasi IgG dilakukan sesuai protokol *sandwich* dari *BT LAB Rat Immunoglobulin G, IgG ELISA Kit* dengan prosedur sebagai berikut.

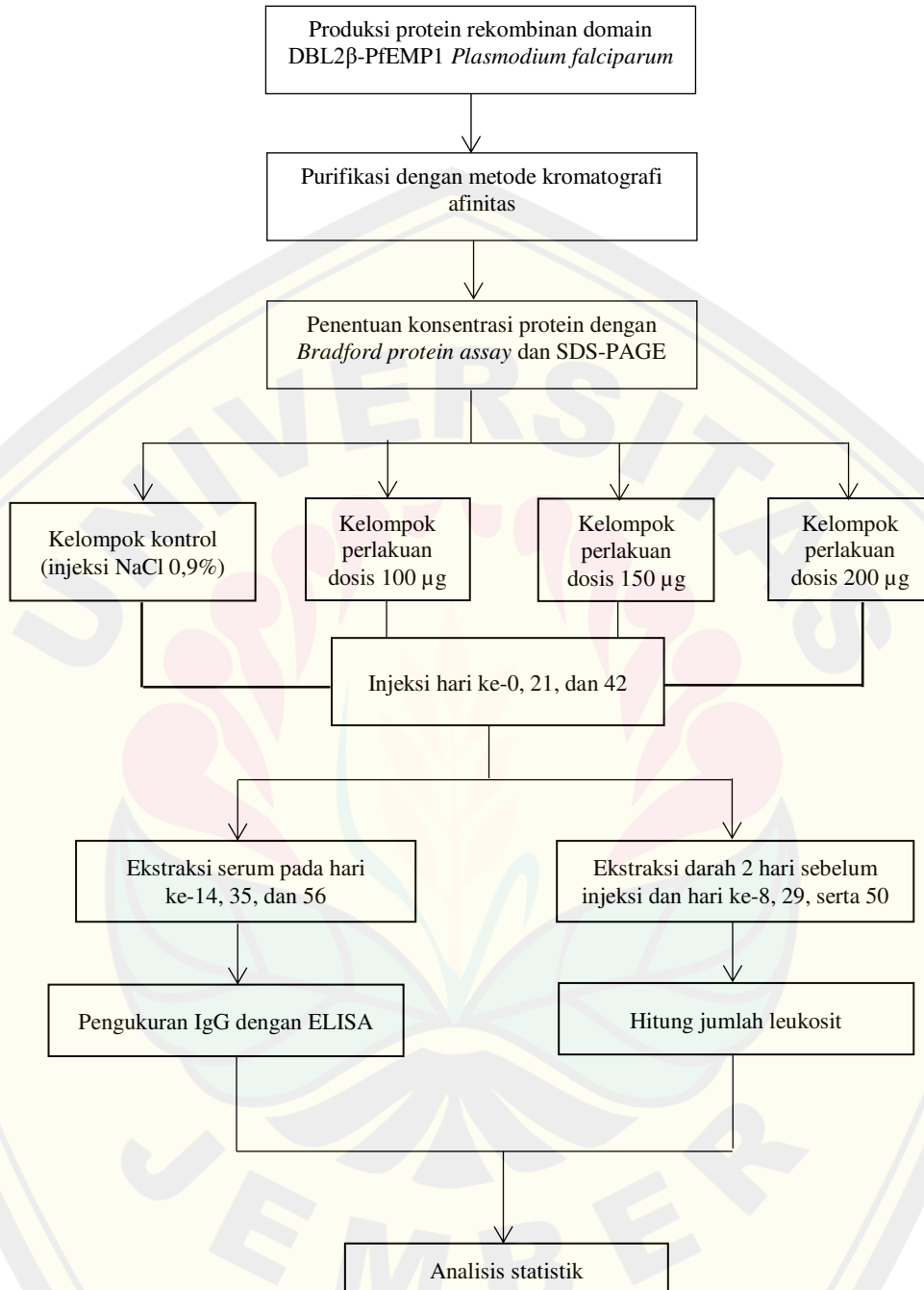
- a. Seluruh reagen, larutan standar, dan sampel disiapkan pada suhu yang sesuai. Reagen disimpan pada suhu kamar sebelum digunakan, sedangkan sampel harus disimpan pada suhu dingin, dan pengujian dilakukan pada suhu ruang.
- b. Melakukan pengenceran berulang untuk membuat larutan standar yang akan menjadi kurva standar. Standar yang dibuat terdiri dari konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, dan 400 $\mu\text{g/ml}$.
- c. Larutan standar sebanyak 50 μl dari masing-masing konsentrasi ditambahkan ke sumuran standar, kemudian ditandai.

- d. Sampel sejumlah 40 μl ditambahkan ke masing-masing sumuran ELISA yang sudah berisi antibodi penangkap (*capture antibody*). Setelah itu, 10 μl anti IgG ditambahkan ke sumuran sampel. Selanjutnya, 50 μl streptavidin HRP dimasukkan ke dalam sumuran sampel dan standar. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.
- g. *Sealer* dilepas dan dicuci sebanyak 5 kali dengan *washing buffer*.
- h. Sebanyak 50 μL *substrate solution A* yang diikuti 50 μL *substrate solution B* diteteskan ke dalam *plate*, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C.
- i. Setelah itu ditambahkan 50 μL *stop solution* (H_2SO_4).
- j. Hasil dibaca dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.

3.8 Metode Analisis Data

Untuk menilai sebaran data dalam penelitian ini, dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas. Analisis data pada penelitian ini termasuk dalam uji komparatif. Hasil konsentrasi IgG yang didapatkan dalam penelitian ini memenuhi syarat uji parametrik, sehingga hasilnya dianalisis dengan uji *Mixed Method ANOVA*. Uji lanjut yang digunakan untuk melihat kelompok yang berbeda signifikan adalah *post hoc Bonferroni*. Data hitung jumlah leukosit tidak memenuhi syarat uji parametrik, sehingga uji yang dilakukan adalah uji *Friedman* dan *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk mengetahui signifikansi antar kelompok perlakuan, sedangkan uji *Friedman* digunakan untuk mengetahui signifikansi antar waktu penelitian (pre-injeksi, injeksi primer, sekunder I, dan sekunder II). Derajat kemaknaan (α) yang digunakan adalah 0,05.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE

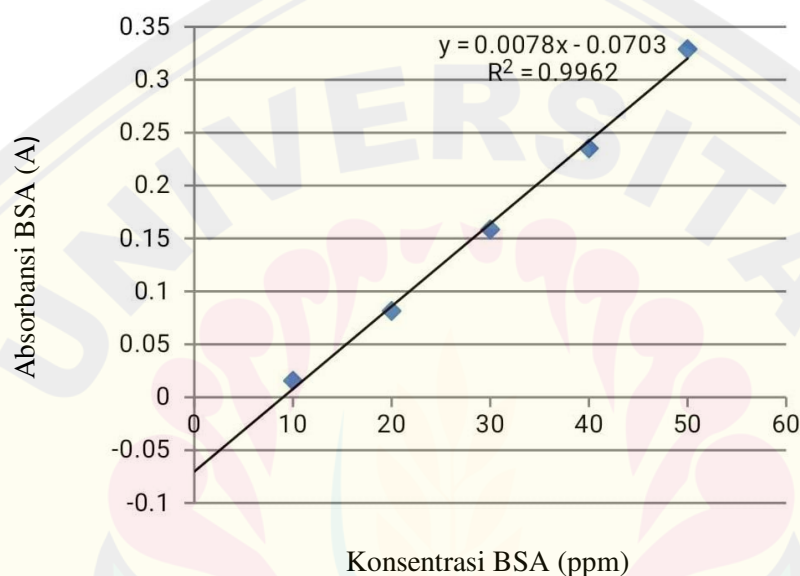
Visualisasi yang dilakukan melalui *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dilakukan untuk mengonfirmasi keberadaan protein target pada hasil purifikasi yang akan diinjeksikan pada hewan coba. Protein DBL2 β -PfEMP1 divisualisasikan sebagai pita berukuran ~72 kDa yang selalu terlihat tebal pada E2.2 (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Visualisasi hasil purifikasi protein DBL2 β -PfEMP1 pada SDS-PAGE

Visualisasi						Keterangan
<p>Marker (kDa): 225, 150, 100, 75, 50, 35</p> <p>Imidazole 60mM: E2.1, E2.2</p> <p>Imidazole 100 mM: E3.1, E3.2</p>						<p>E2.1 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 60 mM pertama</p> <p>E2.2 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 60 mM kedua</p> <p>E3.1 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 100 mM pertama</p> <p>E3.2 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 100 mM kedua</p>
<p>Marker (kDa): 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35</p> <p>Wash 1</p> <p>Imidazole 60 mM: E2.1, E2.2</p> <p>Imidazole 100 mM: E3.1, E3.2</p>						<p>E2.1 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 60 mM pertama</p> <p>E2.2 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 60 mM kedua</p> <p>E3.1 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 100 mM pertama</p> <p>E3.2 = elusi protein pada konsentrasi imidazole 100 mM kedua</p>

4.1.2 Analisis *Bradford Protein Assay*

Analisis *Bradford protein assay* digunakan untuk mengetahui konsentrasi protein DBL2 β -PfEMP1 sebelum diinjeksikan pada hewan coba. Konsentrasi tersebut penting diketahui karena digunakan dalam penentuan dosis dan jumlah protein yang diinjeksikan. Sebelum melakukan pengukuran konsentrasi protein, dilakukan pembuatan kurva standar menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) dengan hasil sebagai berikut (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Kurva standar yang dibuat menggunakan BSA. Persamaan yang didapatkan yaitu $y = 0,0078x - 0,0703$ dengan R^2 mencapai 0,9962.

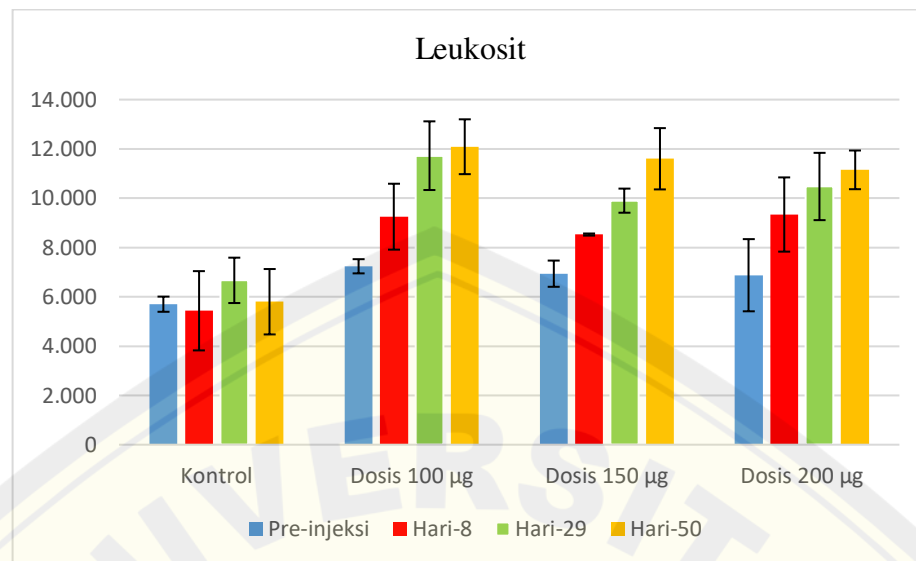
Hasil purifikasi protein yang mengandung protein DBL2 β -PfEMP1 terbanyak berada pada elusi 60 mM ulangan kedua. Hasil purifikasi tersebut kemudian dianalisis absorbansinya. Dengan replikasi sebanyak tiga kali, rata-rata absorbansi protein DBL2 β -PfEMP1 adalah 0,166. Absorbansi protein tersebut (0,166) kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva sebagai variabel y . Nilai x atau konsentrasi protein DBL2 β -PfEMP1 yang didapatkan adalah 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Leukosit

Hitung jumlah leukosit dilakukan pada pre-injeksi, hari ke-8 pasca injeksi primer, hari ke-29 (8 hari pasca injeksi sekunder), dan hari ke-50 (8 hari pasca injeksi sekunder II). Hasil hitung jumlah leukosit dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.2.

Tabel 4.2 Jumlah leukosit (sel/mm³) pada pre-injeksi dan pasca injeksi

Kelompok	Hewan	Leukosit pre-injeksi	Leukosit hari ke-8	Leukosit hari ke-29	Leukosit hari ke-50
Kelompok Kontrol	1	5.650	4.950	7.750	5.750
	2	6.100	7.600	6.750	4.200
	3	5.350	3.750	5.500	7.450
	Rata-rata ± SD	5.700 ± 308	5.433 ± 1.608	6.667 ± 920	5.800 ± 1.327
Kelompok Perlakuan I (Dosis 100 µg)	1	7.250	7.600	11.250	12.750
	2	7.050	8.450	10.050	13.300
	3	7.700	11.100	11.700	10.350
	4	6.950	9.850	13.900	11.950
	Rata-rata ± SD	7.238 ± 288	9.250 ± 1.337	11.725 ± 1.393	12.088 ± 1.112
Kelompok Perlakuan II (Dosis 150 µg)	1	7.650	8.550	9.350	9.600
	2	6.200	8.550	10.600	12.900
	3	7.150	8.450	10.100	12.300
	4	6.750	8.550	9.550	11.600
	Rata-rata ± SD	6.938 ± 532	8.525 ± 43	9.900 ± 489	11.600 ± 1.243
Kelompok Perlakuan III (Dosis 200 µg)	1	7.850	9.050	10.850	12.150
	2	5.300	7.600	9.250	11.200
	3	5.600	11.750	9.250	9.950
	4	8.750	8.950	12.550	11.300
	Rata-rata ± SD	6.875 ± 1.464	9.338 ± 1.506	10.475 ± 1.365	11.150 ± 785



Gambar 4.2 Rata-rata leukosit tikus dan standar deviasinya pada kelompok kontrol dan perlakuan saat pre-injeksi, hari ke-8 pasca injeksi primer, hari ke-29 (8 hari pasca injeksi sekunder), dan hari ke-50 (8 hari pasca injeksi sekunder II).

Pada Gambar 4.2 terlihat bahwa pada kelompok kontrol tidak terjadi peningkatan jumlah leukosit, sedangkan pada kelompok perlakuan yang diinjeksi protein DBL2 β -PfEMP1, terjadi peningkatan leukosit dari waktu ke waktu. Pada kelompok perlakuan, rata-rata leukosit yang paling tinggi terjadi pada 8 hari pasca injeksi sekunder II, yakni pada hari ke-50. Selain itu, rata-rata leukosit tertinggi pasca injeksi sekunder I dan II terlihat pada kelompok perlakuan dosis 100 μ g. Namun, pada kelompok perlakuan dosis 100 μ g ini memiliki standar deviasi yang tinggi. Untuk memastikan kelompok perlakuan yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol, dilakukan analisis dengan menggunakan SPSS.

Analisis data leukosit dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara pre-injeksi dan setelah injeksi protein DBL2 β -PfEMP1. Pada hasil analisis, data terdistribusi normal ($p > 0,05$) pada uji *Shapiro Wilk* (Lampiran 4.1). Akan tetapi, signifikansi pada uji homogenitas menunjukkan $p < 0,05$, sehingga data tidak dapat dianalisis dengan uji *Mixed Method ANOVA*. Data dianalisis dengan menggunakan uji *Friedman* dengan hasil yang terlihat pada tabel 4.3. Hasil uji *Friedman* menunjukkan $p < 0,05$ sehingga terdapat perbedaan jumlah leukosit yang signifikan antara pre-injeksi dan pasca

injeksi. Rata-rata leukosit pada pre-injeksi, pasca injeksi primer, injeksi sekunder I, dan injeksi sekunder II dalam bentuk peringkat (*rank*) melalui uji *friedman* juga terlihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Signifikansi dan rata-rata leukosit dalam bentuk peringkat

<i>Asymp. Sig.</i>	0,000
	<i>Mean Rank</i>
Pre-Injeksi	1,20
Primer	2,20
Sekunder I	3,20
Sekunder II	3,40

Selain menguji perbedaan antara pre-injeksi dan pasca injeksi, penelitian ini juga menguji perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Perbedaan atau signifikansi antar kelompok terdapat pada tabel 4.4, 4.5, dan 4.6. Pasca injeksi primer, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dosis 150 μg ($p=0,028$). Pasca injeksi sekunder I dan II, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan ($p<0,05$).

Tabel 4.4 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi primer

	Kontrol	Dosis 100	Dosis 150	Dosis 200
Kontrol		0,05	0,028*	0,05
Dosis 100	0,05		0,882	0,885
Dosis 150	0,028*	0,882		0,237
Dosis 200	0,05	0,885	0,237	

Keterangan: (*) terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

Tabel 4.5 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi sekunder I

	Kontrol	Dosis 100	Dosis 150	Dosis 200
Kontrol		0,034*	0,034*	0,032*
Dosis 100	0,034*		0,083	0,245
Dosis 150	0,034*	0,083		1
Dosis 200	0,032*	0,245	1	

Keterangan: (*) terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$)

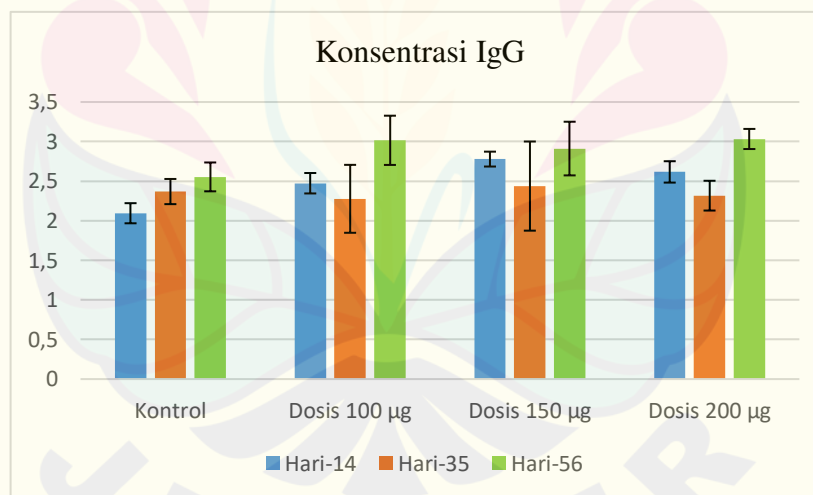
Tabel 4.6 Signifikansi leukosit antar kelompok pasca injeksi sekunder II

	Kontrol	Dosis 100	Dosis 150	Dosis 200
Kontrol		0,034*	0,034*	0,034*
Dosis 100	0,034*		0,564	0,248
Dosis 150	0,034*	0,564		0,386
Dosis 200	0,034*	0,248	0,386	

Keterangan: (*) terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

4.1.4 Analisis Hasil Konsentrasi IgG

Pengambilan darah dalam penentuan konsentrasi IgG diambil pada hari ke-14 pasca injeksi primer, hari ke-14 pasca injeksi sekunder I (hari ke-35), dan hari ke-14 pasca injeksi sekunder II (hari ke-56). Kurva standar dalam uji ELISA menghasilkan persamaan $y = 0,317x + 0,0163$ dengan $R^2 = 0,967$ (Lampiran 4.3). Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi IgG dengan cara memasukkan nilai absorbansi sebagai nilai y , sehingga didapatkan nilai x yang merupakan konsentrasi IgG. Hasil konsentrasi IgG dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.7.



Gambar 4.3 Rata-rata konsentrasi IgG dan standar deviasinya pada kelompok kontrol dan perlakuan saat hari ke-14 pasca injeksi primer, hari ke-35 (14 hari pasca injeksi sekunder), dan hari ke-56 (14 hari pasca injeksi sekunder II).

Gambar 4.3 memperlihatkan konsentrasi IgG pada seluruh kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol pada hari ke-14 pasca injeksi primer. Namun, pada 14 hari pasca injeksi sekunder I (hari ke-35), terlihat bahwa konsentrasi IgG pada kelompok perlakuan dosis 100 µg dan 200 µg

menurun dibandingkan dengan sebelumnya dan juga lebih rendah apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun, konsentrasi IgG pada kelompok dosis 150 µg masih lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada 14 hari pasca injeksi sekunder II (hari ke-56), konsentrasi IgG pada seluruh kelompok perlakuan mengalami peningkatan dan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 4.7 Konsentrasi IgG yang didapatkan melalui uji ELISA

Kelompok	Hewan	Konsentrasi IgG hari ke-14	Konsentrasi IgG hari ke-35	Konsentrasi IgG hari ke-56
Kelompok Kontrol	1	1,958	2,586	2,305
	2	2,062	2,207	2,737
	3	2,264	2,315	2,620
	Rata-rata ± SD	2,095 ± 0,127	2,369 ± 0,159	2,554 ± 0,182
Kelompok Perlakuan I (Dosis 100 µg)	1	2,646	2,393	2,649
	2	2,393	1,822	3,144
	3	2,545	2,926	2,813
	4	2,311	1,968	3,460
	Rata-rata ± SD	2,474 ± 0,129	2,277 ± 0,429	3,016 ± 0,312
Kelompok Perlakuan II (Dosis 150 µg)	1	2,639	1,892	3,649
	2	2,819	3,267	2,889
	3	2,759	2,646	2,579
	4	2,898	1,945	2,712
	Rata-rata ± SD	2,779 ± 0,094	2,438 ± 0,563	2,912 ± 0,339
Kelompok Perlakuan III (Dosis 200 µg)	1	2,668	2,097	3,128
	2	2,412	2,277	3,166
	3	2,788	2,617	2,996
	4	2,598	2,277	2,841
	Rata-rata ± SD	2,617 ± 0,136	2,317 ± 0,188	3,033 ± 0,127

Analisis data konsentrasi IgG dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok, khususnya kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada hasil analisis, data terdistribusi normal pada uji *Shapiro Wilk* dan homogen pada uji *Levene* yang ditunjukkan oleh $p > 0,05$ (Lampiran 4.2). Data dianalisis dengan menggunakan uji *Mixed Method ANOVA*. Hasil uji *Mixed Method ANOVA* pada uji antar kelompok (*tests of between subjects*) menunjukkan signifikansi kurang dari 0,05, sehingga terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok (Tabel 4.8). Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan (Tabel 4.9). Uji *post hoc* dengan metode *Bonferroni* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 150 μg ($p = 0,028$). Selain dapat mengetahui signifikansi antar kelompok perlakuan, uji *Mixed Method ANOVA* juga bertujuan untuk mengetahui signifikansi berdasarkan waktu (pasca injeksi primer, sekunder I, dan sekunder II). Melalui metode *tests of within subjects* dalam uji *Mixed Method ANOVA*, didapatkan signifikansi 0,007 (Tabel 4.10). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara IgG pada saat 14 hari pasca injeksi primer, sekunder I, dan sekunder II.

Tabel 4.8 *Mixed Method ANOVA* pada uji antar kelompok

	Signifikansi
<i>Intercept</i>	0,000
Perlakuan	0,024

Tabel 4.9 Uji *post hoc multiple comparisons* dengan metode *Bonferroni*

	Kontrol	Dosis 100	Dosis 150	Dosis 200
Kontrol		0,215	0,028*	0,069
Dosis 100	0,215		1	1
Dosis 150	0,028*	1		1
Dosis 200	0,069	1	1	

Keterangan: (*) terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 4.10 *Mixed Method ANOVA* pada uji berdasarkan waktu perlakuan

	Signifikansi
Waktu	0,007

4.2 Pembahasan

Peningkatan leukosit merupakan tanda adanya respons imun tubuh terhadap protein DBL2 β -PfEMP1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, terjadi kenaikan jumlah leukosit secara signifikan ($p=0,000$) (tabel 4.3). Melalui uji *Friedman*, terbukti bahwa rata-rata leukosit terendah adalah pada saat pre-injeksi (tabel 4.3). Urutan rata-rata leukosit tertinggi adalah pasca injeksi sekunder II, yang disusul oleh injeksi sekunder I, kemudian injeksi primer. Pada kelompok perlakuan yang diinjeksi protein DBL2 β -PfEMP1, terjadi peningkatan rata-rata leukosit dengan pola yang sama, yakni peningkatan dari waktu ke waktu.

Peningkatan jumlah leukosit terjadi pada seluruh kelompok perlakuan, namun tidak terjadi pada kelompok kontrol. Jumlah leukosit normal tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah 5.000-13.000 sel/mm³ (Widyastuti, 2013). Sebelum injeksi, leukosit tikus pada penelitian ini berkisar antara 5.000-8.000 sel/mm³, namun setelah injeksi sekunder II, jumlah leukosit tikus pada kelompok perlakuan berkisar antara 9.600-13.300 sel/mm³. Pada pre-injeksi, tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p=0,283$) (Lampiran 4.1). Perbedaan yang signifikan pasca injeksi primer hanya terjadi pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 150 μ g ($p=0,028$). Meski hanya signifikan pada kelompok dosis 150 μ g, namun peningkatan jumlah leukosit juga terjadi pada kelompok dosis 100 μ g dan 200 μ g. Pasca injeksi sekunder I dan II, seluruh kelompok perlakuan berbeda signifikan dengan kelompok kontrol ($p<0,05$). Peningkatan jumlah leukosit menunjukkan bahwa antigen tersebut bersifat imunogenik. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa protein DBL2 β -PfEMP1 dapat memicu respons imun dan dapat menjadi kandidat vaksin untuk melawan malaria berat (Oleinikov dkk., 2012; Gullingsrud dkk., 2013).

Setelah diinjeksikan ke dalam tubuh, protein DBL2 β -PfEMP1 dikenali sebagai antigen. Antigen ini kemudian dikenali oleh *Antigen Presenting Cells*

(APCs) (Rachmania dkk., 2020). Rekognisi antigen akan mengaktifkan leukosit, khususnya sel limfosit B dan limfosit T (Nothelfer dkk., 2015; Sanchez dkk., 2017). Fase aktivasi terdiri dari *clonal expansion* (proliferasi dan penambahan ukuran sel limfosit) dan diferensiasi. Puncak dari fase aktivasi ini adalah pada 7 hari pasca paparan antigen (Abbas dkk., 2014; Roitt dkk., 2017). Setelah fase aktivasi, terjadi fase efektor yang terdiri dari imunitas seluler dan humoral yang bertujuan mengeliminasi antigen. Imunitas seluler diperantarai oleh sel limfosit T *helper* dan limfosit T sitotoksik. Selain berperan dalam membantu makrofag mengeliminasi antigen dan membantu sel B memproduksi antibodi, sel T *helper* CD4+ juga mensekresi sitokin yang akan meningkatkan jumlah leukosit (Abbas dkk., 2014).

Penelitian sebelumnya yang menguji kandidat vaksin malaria berbasis *merozoite surface protein-3* (MSP3) pada anak-anak di Tanzania menunjukkan bahwa perbedaan dosis menyebabkan perbedaan dalam menginduksi jumlah leukosit (Lusingu dkk., 2009). Pada penelitian tersebut, terjadi peningkatan leukosit pada kelompok dosis 15 µg, sedangkan pada kelompok 30 µg, terjadi penurunan jumlah leukosit (Lusingu dkk., 2009). Penelitian lainnya yang menguji kandidat vaksin malaria berbasis *circumsporozoite protein* (CSP) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan leukosit yang signifikan pada 1 hari pasca injeksi protein (Cawlfeld dkk., 2019). Pasca vaksin malaria tersebut, terjadi peningkatan leukosit hingga melebihi batas normal nilai leukosit (Cawlfeld dkk., 2019). Pada penelitian ini, injeksi protein DBL2β-PfEMP1 dosis 150 µg dan 200 µg menyebabkan peningkatan leukosit. Namun, peningkatan tersebut tidak sampai melebihi batas normal nilai leukosit tikus. Pada dosis 100 µg, terjadi peningkatan leukosit hingga melebihi batas normal pada salah satu tikus pada hari ke-50. Penelitian lain yang dilakukan oleh Liu dkk. menyebutkan bahwa mulai terjadi kenaikan leukosit pada hari ke-7 pasca vaksinasi. Hal ini dikaitkan dengan sekresi sitokin oleh sel T *helper* CD4+ dan puncak fase aktivasi *clonal expansion* yang dapat meningkatkan jumlah leukosit (Liu dkk., 2021).

Dalam penelitian ini, protein DBL2β-PfEMP1 memicu respons imun humoral yang ditandai dengan meningkatnya nilai konsentrasi IgG pada salah satu kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan

($p=0,024$). Selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* dengan metode *Bonferroni* untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan. Berdasarkan uji tersebut, kelompok yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol adalah kelompok perlakuan dosis 150 μg . Konsentrasi IgG tertinggi dicapai pada dosis 150 μg pada hari ke-14 pasca injeksi sekunder II. Konsentrasi IgG yang didapatkan pada kelompok perlakuan dosis 100 μg dan 200 μg tidak setinggi dosis 150 μg . Dengan demikian, dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang dapat memicu respons imun spesifik pada hewan coba adalah dosis 150 μg . Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rachmania dkk. bahwa protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dosis 150 μg bersifat imunogenik dalam suatu penelitian *in vivo*.

Uji *within subjects effects* menunjukkan $p < 0,05$ (Tabel 4.10), yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar waktu perlakuan. Rata-rata konsentrasi IgG tertinggi adalah pada saat 14 hari pasca injeksi sekunder II. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 termasuk dalam kelompok vaksin subunit yang memerlukan injeksi berulang untuk merangsang respons imun dengan lebih baik. Vaksin jenis subunit ini tidak menghasilkan respons imun sekuat vaksin yang berisi virus atau patogen hidup yang dilemahkan, sehingga harus dilakukan injeksi berulang untuk memperkuat respons imun yang muncul (WHO, 2013). Oleh karena itu, konsentrasi IgG dan leukosit menjadi lebih tinggi pasca injeksi sekunder II. Hal ini sesuai dengan penelitian lainnya, yaitu penelitian Cawfield dkk. yang menyatakan bahwa respons imun tertinggi dicapai setelah injeksi sekunder II. Cawfield dkk. menguji imunogenisitas suatu kandidat vaksin malaria pada monyet (*Rhesus macaques*) dengan melakukan tiga kali injeksi, yaitu injeksi primer, injeksi sekunder I, dan injeksi sekunder II. Hasilnya, kadar antibodi IgG lebih tinggi pada 14 hari pasca injeksi sekunder II dibandingkan dengan 14 hari pasca injeksi primer dan sekunder I (Cawfield dkk., 2019). Penelitian yang melibatkan IgG sering mengambil darah pada 14 hari setelah paparan antigen (Cawfield dkk., 2019; Rachmania dkk., 2020). Hal ini disebabkan karena kadar IgG yang meningkat pada hari ke-14 pasca injeksi atau paparan antigen (Sherwood, 2014).

Respons antibodi didapatkan dari sel limfosit B dalam mekanisme imunitas adaptif. Protein DBL2 β -PfEMP1 dikenali sebagai antigen oleh APCs pada fase rekognisi. Protein ini kemudian didegradasi menjadi peptida yang lebih pendek oleh *cathepsin*, suatu enzim proteolitik (Rachmania dkk., 2020). Degradasi ini berguna agar MHC (*Major Histocompatibility Complex*) mampu untuk mengenali antigen. Molekul MHC dibagi menjadi dua, yakni MHC-I dan MHC-II. MHC-I yang celah pengenalannya hanya memuat 8-11 asam amino berguna untuk menginduksi sel T CD8+ (sel T sitotoksik). MHC-II yang mampu memuat 30 asam amino pada celah pengenalannya berguna untuk menginduksi sel T CD4+ (sel T *helper*) yang akan mensekresikan sitokin untuk diferensiasi sel limfosit B menjadi sel plasma penghasil antibodi (Roitt dkk., 2017). Namun, pada mekanisme yang lain, protein dapat langsung dikenali oleh sel limfosit B. Melalui mekanisme ini, *native* protein bisa memunculkan respons imun tanpa harus melalui proses degradasi (Leitner dkk., 2013). Limfosit B dapat mengenali protein alami atau *native* protein melalui *B cell receptors* (BCRs) yang ada di permukaan sel limfosit B matur (Otipoby dkk., 2015; Adler dkk., 2017). Kemudian, sel limfosit B matur tersebut akan teraktivasi menjadi sel penghasil antibodi (Adler dkk., 2017).

Antigen bersifat spesifik dalam merangsang proliferasi dan diferensiasi dari limfosit B. Limfosit yang teraktivasi secara spesifik akan memasuki fase efektor yang bertujuan mengeliminasi antigen (Sherwood, 2014). Limfosit B memproduksi antibodi, termasuk IgG yang melawan antigen spesifik melalui tiga mekanisme. Mekanisme IgG melawan antigen yang pertama adalah dengan cara mengikat epitop dan mencegah interaksi antara antigen dengan sel inang. Apabila antigen DBL2 β -PfEMP1 tidak berikatan dengan reseptor ICAM-1, maka tidak akan terjadi *rosetting* dan sitoadherensi yang menyebabkan malaria berat (Jensen dkk., 2020). Mekanisme perlindungan kedua yang dilakukan oleh IgG adalah melalui opsonisasi. Pada mekanisme tersebut, IgG mengikat dan melapisi permukaan antigen, kemudian reseptor IgG-Fc dari sel fagosit akan memediasi penghancuran antigen. Mekanisme perlindungan ketiga adalah melalui aktivasi sistem komplemen yang mengakibatkan fagositosis (Thomson, 2016).

Adanya antibodi, khususnya IgG penting untuk melawan infeksi malaria, terutama pada fase infeksi akut. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa antibodi terhadap antigen PfEMP1 dapat menghambat invasi merozoit dan sitoaderensi, serta merusak formasi *roset* yang sudah terbentuk (Ghumra dkk., 2011; Chan dkk., 2014). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ghumra dkk. yang melakukan imunisasi pada kelinci menggunakan antigen PfEMP1 domain DBL juga menyebutkan bahwa antibodi tersebut dapat melakukan opsonisasi dan fagositosis terhadap eritrosit yang terinfeksi. Vaksin yang mengandung protein DBL2 β -PfEMP1 berfokus pada pembentukan antibodi yang dikaitkan dengan imunitas protektif terhadap malaria berat. Antibodi tersebut dapat mencegah adhesi dengan reseptor ICAM-1, sehingga bisa mencegah terjadinya obstruksi mikrovaskular (Chan dkk., 2014).

Fase efektor atau fase eliminasi akan berakhir pada sekitar hari ke-14 pasca paparan antigen. Setelah itu, respons imun termasuk leukosit akan menurun karena limfosit dan sel yang terlibat mati melalui apoptosis. Sel limfosit yang bertahan akan disebut sebagai sel memori, secara spesifik bertugas mengingat antigen dan teraktivasi dengan cepat ketika terjadi reinfeksi (Abbas dkk., 2014; Palm dan Henry, 2019). Sel memori yang bersifat spesifik adalah salah satu tujuan vaksinasi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1. Kemampuan suatu antigen dalam mengaktivasi sel memori akan menghasilkan imunitas humoral yang bersifat protektif dalam jangka waktu yang lama, terutama di daerah endemis malaria (Hviid dkk., 2015).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 mampu meningkatkan respons imun yang ditandai dengan peningkatan jumlah leukosit tikus. Perbedaan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menyebabkan perbedaan efektivitas dalam menginduksi konsentrasi IgG tikus. Dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 adalah 150 μ g.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian mengenai keamanan farmakologis (indeks terapeutik dan efek samping) protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan menggunakan dosis 150 μ g. Selain itu, peneliti menyarankan adanya uji toksisitas protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan dosis yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, dan S. Pillai. 2014. *Cellular and Molecular Immunology*. Edisi 8. Philadelphia: Elsevier.
- Abcam. 2018. ELISA Guide. <https://docs.abcam.com/pdf/kits/elisa-guide.pdf> [Diakses pada October 11, 2021].
- Adah, D., Y. J. Yang, Q. Liu, Limei Qin, Li Qin, dan X. Chen. 2016. Pre-erythrocytic stage of malaria infection and the molecular targets available for interventions. *The Journal of Advances in Parasitology*. 3(4):132–141.
- Adler, L. N., W. Jiang, K. Bhamidipati, M. Millican, C. Macaubas, S. chen Hung, dan E. D. Mellins. 2017. The other function: class II-restricted antigen presentation by b cells. *Frontiers in Immunology*. 8(319):1–14.
- Adukpo, S., K. A. Kusi, dan M. F. Ofori. 2013. High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. *PLOS ONE*. 8(12):e84181.
- Bill, R. M. 2015. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 67(3):319–328.
- Bio Rad. 2012. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf [Diakses pada November 2, 2021].
- Bio Rad. 2021. Mechanism of Affinity Binding. <https://www.bio-rad.com/en-id/applications-technologies/affinity-chromatography?ID=LUSMJIDN> [Diakses pada October 13, 2021].
- Boster. 2020. *ELISA Handbook : Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*
- Boushab, M., M. Salem, dan A. Boukhary. 2021. Clinical features and mortality associated with severe malaria in adults in southern Mauritania. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 6(1):1–10.
- Brown, D. D., S. Solomon, D. Lerner, dan M. Del Rio. 2020. Malaria and acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*. 35(4):603–608.
- Brunelle, J. L. dan R. Green. 2014. *Coomassie Blue Staining*. Edisi 1. Baltimore: Elsevier. *Methods in Enzymology*.
- Cawlfild, A., C. Genito, dan Z. Beck. 2019. Safety, toxicity and immunogenicity of a malaria vaccine based on the circumsporozoite protein (FMP013) with the adjuvant army liposome formulation containing QS21 (ALFQ). *Vaccine*. 37(29):3793–3803.
- CDC. 2020. About Malaria. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> [Diakses pada July 16, 2021].

- CDC. 2021. Frequently Asked Questions (FAQs) About Malaria. <https://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html> [Diakses pada July 6, 2021].
- Chan, A., F. J. I. Fowkes, dan J. G. Beeson. 2014. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 71(19):3633–3657.
- Charan, J. dan N. Kantharia. 2013. How to calculate sample size in animal studies. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 4(4):303–306.
- DeLeo, F. dan L. Allen. 2020. Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Faculty Reviews*. 9(25)
- Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. 2017. *Buku Saku Penatalaksanaan Kasus Malaria*. Edisi 2. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- El-Gayar, K. E. 2015. Principles of recombinant protein production, extraction and purification from bacterial strains. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences*. 2(2):18–33.
- Fitriany, J. dan A. Sabiq. 2018. Malaria. *Averrous*. 4(2):287–297.
- Gan, S. D. dan K. R. Patel. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(9):1–3.
- Garca-Descalzo, L., F. Baquero, dan C. Cid. 2012. Gel Electrophoresis of Proteins. *Gel Electrophoresis Principles and Basics*. 2012.
- Ghumra, A., P. Khunrae, dan R. Ataide. 2011. Immunisation with recombinant PfEMP1 domains elicits functional rosette-inhibiting and phagocytosis-inducing antibodies to *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*. 6(1):e16414.
- Giyartika, F. dan S. Keman. 2020. The differences of improving leukosit in radiographers at Islamic hospital Jemursari Surabaya. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. 12(2):97–106.
- Gomes, L., G. Monteiro, dan F. Mergulhão. 2020. The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by *Escherichia coli* biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(576):2–14.
- Gonzales, S. J., R. A. Reyes, dan A. E. Braddom. 2020. Naturally acquired humoral immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *Frontiers in Immunology*. 11(15):594653.
- Green, M. D. dan N. H. Humadi. 2017. *Preclinical Toxicology of Vaccines*. Dalam A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development. Elsevier.
- Gullingsrud, J., T. Saveria, dan E. Amos. 2013. Structure-function-immunogenicity studies of PfEMP1 domain db12βpf11_0521, a malaria parasite ligand for ICAM-1. *PLoS ONE*. 8(4):1–8.

- Guyton, A. C. dan J. E. Hall. 2016. *Medical Physiology*. Edisi 13. Philadelphia: Elsevier.
- Hall, J. E. 2016. *Guyton and Hall Physiology Review*. Edisi 3. Philadelphia: Elsevier.
- Hasanah, F. H., E. Sulistyaningsih, dan W. D. Sawitri. 2020. The expression of the PfEMP1-dbl2 β recombinant protein of *Plasmodium falciparum* isolated from Indonesia. *Jurnal Ilmu Dasar*. 21(1):67.
- Hermana, N. S. P., E. Kusdiyantini, A. Suprihadi, dan N. Nuraini. 2015. Ekstraksi protein dari *Escherichia coli* bl21 rekombinan gen *Mycobacterium tuberculosis* dengan variasi waktu inkubasi induksi isoprophyl- β -d-thiogalactosidase (IPTG) dan metode lisis sel. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 4(2):60–68.
- Husna, M. dan B. H. Prasetyo. 2016. Aspek biomolekuler dan update terapi malaria serebral. *Jurnal MNJ*. 2(2):79–88.
- Hviid, L., L. Barfod, dan F. Fowkes. 2015. Trying to remember: immunological b cell memory to malaria. *Trends in Parasitology*. 31(3):89–94.
- Indiastari, D., S. Winarsih, dan L. E. Fitri. 2018. Deteksi protein 270 kda *Plasmodium falciparum* isolat Malang pada membran eritrosit penderita malaria dengan komplikasi. *Pustaka Kesehatan*. 6(2):331–337.
- Insyirah, S. 2014. Effect of Imidazole Concentration and Type of Metal Ion on the Purification of Recombinant Green Fluorescent Protein Using an Affinity Chromatography. 2014.
- Jan, S. A., Z. K. Shinwari, M. A. Rabbani, S. H. Shah, M. I. Ibrahim, dan M. Ilyas. 2016. Optimization of an efficient sds-page protocol for rapid protein analysis of brassica rapa. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 9(2):17–24.
- Jensen, A. R., Y. Adams, dan L. Hviid. 2020. Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: the role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunological Reviews*. 293(1):230–252.
- Juliawan, K. D. 2019. RTS, s/as01 sebagai vaksin malaria generasi pertama metode hasil dan pembahasan. *Jurnal Ilmu Kesehatan Sandi Husada*. 10(2):275–280.
- Kinyanjui, S. 2012. Immunity to malaria. *Current Opinion in Immunology*. 12(4):437–441.
- Kotepui, M., D. Piwkham, B. PhunPhuech, N. Phiwklam, C. Chupeerach, dan S. Duangmano. 2015. Effects of malaria parasite density on blood cell parameters. *PLoS ONE*. 10(3):1–11.
- Krystel, M., K. Dileepan, dan J. Wood. 2016. Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*. 6(620):1–12.

- Lee, W. C., B. Russell, dan L. Rénia. 2019. Sticking for a cause: the falciparum malaria parasites cytoadherence paradigm. *Frontiers in Immunology*. 10(1444):1–15.
- Leitner, E. S., S. Chaudhury, N. J. Steers, M. Sabato, V. Delvecchio, A. S. Wallqvist, C. F. Ockenhouse, dan E. Angov. 2013. Computational and experimental validation of b and t-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen. *PLoS ONE*. 8(8):e71610.
- Li, I. W. S. dan L. C. P. Cheung. 2016. How not to miss a case of malaria in emergency department in malaria non-endemic areas? practical approach & experiences in Hong Kong. *Open Journal of Emergency Medicine*. 4(4):93–109.
- Liu, J., J. Wang, J. Xu, H. Xia, Y. Wang, C. Zhang, W. Chen, H. Zhang, Q. Liu, R. Zhu, Y. Shi, Z. Shen, Z. Xing, W. Gao, L. Zhou, J. Shao, J. Shi, X. Yang, Y. Deng, L. Wu, Q. Lin, C. Zheng, W. Zhu, C. Wang, Y. E. Sun, dan Z. Liu. 2021. Comprehensive investigations revealed consistent pathophysiological alterations after vaccination with covid-19 vaccines. *Cell Discovery*. 7(99)
- Liu, T., T. Oprea, dan O. Ursu. 2016. Estimation of maximum recommended therapeutic dose using predicted promiscuity and potency. *Clinical and Translational Science*. 9(6):311–320.
- Lusingu, J. P., S. Gesase, S. Msham, F. Francis, M. Lemnge, M. Seth, S. Sembuche, A. Rutta, D. Minja, M. D. Segeja, S. Bosomprah, S. Cousens, R. Noor, R. Chilengi, dan P. Druilhe. 2009. Satisfactory safety and immunogenicity of msp3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months. *Malaria Journal*. 8(163):2–13.
- Mading, M. dan R. Yunarko. 2014. Respon imun terhadap infeksi parasit malaria. *Jurnal Vektor Penyakit*. 8(2):45–52.
- Madrid, L., M. Lanaspá, S. Maculuvé, dan Q. Bassat. 2014. Malaria-associated hypoglycaemia in children. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 13(2):267–277.
- Manfredi, A., G. Ramirez, P. Rovere, dan N. Maugeri. 2018. The neutrophil's choice: phagocytose vs make neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*. 9(288):1–10.
- Mansyur, A. 2009. *Penuntun Hematologi*. Edisi 1. Makassar: Fakultas Kedokteran UNHAS.
- Mau, F. dan Mulatsih. 2017. Perubahan jumlah limfosit pada penderita malaria falciparum dan vivax. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 45(2):97–102.
- Mayor, A. dan C. Dobaño. 2018. IgM and IgG against *Plasmodium falciparum* lysate as surrogates of malaria exposure and protection during pregnancy. *Malaria Journal*. 17(182):1–10.

- Membo, H., G. Ilombe, dan J. Masumu. 2018. Molecular identification of *Plasmodium* species in symptomatic children of Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal*. 17(1):1–7.
- Milner, D. A. 2018. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 8(1):1–11.
- Mohan, H. 2013. *Pathology Practical Book*. Edisi 7. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Nayak dan Arur. 2018. *IPTG Induction and Extraction of Proteins*. Washington: Goldbio.
- Ndam, N. dan A. Moussiliou. 2017. Parasites causing cerebral falciparum malaria bind multiple endothelial receptors and express epcr and icam-1-binding pfemp1. *Journal of Infectious Diseases*. 215(12):1918–1925.
- Ndiabamoh, C., G. Ekali, dan L. Esemu. 2020. The immunoglobulin G antibody response to malaria merozoite antigens in asymptomatic children co-infected with malaria and intestinal parasites. *PLoS ONE*. 15(11):e0242012.
- Ngocho, J. S., B. Magoma, dan G. A. Olomi. 2019. Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines against invasive pneumococcal disease among children under five years of age in africa: a systematic review. *PLoS ONE*. 14(2):1–14.
- Nimse, S. B., M. D. Sonawane, K. S. Song, dan T. Kim. 2016. Biomarker detection technologies and future directions. *Analyst*. 141(3):740–755.
- Nothelfer, K., P. J. Sansonetti, dan A. Phalipon. 2015. Pathogen manipulation of b cells: the best defence is a good offence. *Nature Reviews Microbiology*. 13(3):173–184.
- O’Kennedy, R., C. Murphy, dan T. Devine. 2016. Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technology Journal*. Volume 6(September):17–32.
- Oleinikov, A. V., V. V. Voronkova, dan I. T. Frye. 2012. A plasma survey using 38 PfEMP1 domains reveals frequent recognition of the *Plasmodium falciparum* antigen var2csa among young Tanzanian children. *PLoS ONE*. 7(1):1–8.
- Otipoby, K. L., A. Waisman, E. Derudder, L. Srinivasan, A. Franklin, dan K. Rajewsky. 2015. The b-cell antigen receptor integrates adaptive and innate immune signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(39):12145–12150.
- Palm, A. K. E. dan C. Henry. 2019. Remembrance of things past: long-term b cell memory after infection and vaccination. *Frontiers in Immunology*. 10:1787.
- Pandey, A., K. Shin, R. E. Patterson, X. Q. Liu, dan J. K. Rainey. 2016. Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology. *Biochemistry and Cell Biology*. 94(6):507–527.

- Pletnev, P., I. Osterman, P. Sergiev, A. Bogdanov, dan O. Dontsova. 2015. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. *Acta Naturae*. 7(4):22–33.
- Plewes, K., G. D. H. Turner, dan A. M. Dondorp. 2018. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating falciparum malaria. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 31(1):69–77.
- Pollard, A. J. dan E. M. Bijker. 2021. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. 21(2):83–100.
- Possemiers, H., L. Vandermosten, dan P. E. Van Den Steen. 2021. Etiology of lactic acidosis in malaria. *PLoS Pathogens*. 17(1):e1009122.
- Putra, T. R. I. 2011. Malaria dan permasalahannya. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 11(2):103–114.
- Qiagen. 2013. Concentrations of Commonly Used Antibiotics. <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/plasmid-resource-center/growth-of-bacterial-cultures/> [Diakses pada October 12, 2021].
- Rachmania, S., E. Sulistyaningsih, dan R. I. Dewi. 2020. Recombinant dbp2b-PfEMP1 of the Indonesian *Plasmodium falciparum* induces immune responses in Wistar rats. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 16(3):422–430.
- Rahman, M. M., N. Zhou, dan J. Huang. 2021. An overview on the development of mRNA-based vaccines and their formulation strategies for improved antigen expression in vivo. *Vaccines*. 9(3):1–20.
- Reilly, J. O. 2016. Lysis of *Escherichia coli* for the Recovery of Pentamerised Single-Domain Antibody Used for the Gender Specific Separation of Bovine Sperm. 2016.
- Riskesdas. 2018. Riset Kesehatan Dasar Tahun 2018. https://kesmas.kemkes.go.id/assets/upload/dir_519d41d8cd98f00/files/Hasil-riskesdas-2018_1274.pdf [Diakses pada July 11, 2021].
- Roitt, I. M., P. J. Delves, S. J. Martin, dan D. R. Burton. 2017. *Roitt's Essential Immunology*. Edisi 13. West Sussex: Wiley Blackwell.
- Roy, S. dan V. Kumar. 2014. A practical approach on SDS-Page for separation of protein. *International Journal of Science and Research*. 3(8):955–960.
- Roy, V. K., N. S. Kumar, dan G. Gurusubramanian. 2012. Proteins structure, properties and their separation by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science Vision*. 12(4):170–181.
- Salsabila, A., C. A. Gunawan, dan H. Irawiraman. 2020. Profil hematologi pasien malaria rawat inap di RSUD Panglima Sebaya Kabupaten Paser periode Januari 2015-Maret 2018. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*. 3(4):551–556.
- Sanchez, J. L., M. Gomez, dan P. A. Reche. 2017. Fundamentals and methods for

- t- and b-cell epitope prediction. *Journal of Immunology Research*. 17(2680160)
- Sedelnikova, S. 2018. *Protocols and Tips in Protein Purification or How To Purify Protein in One Day*. Edisi 2. Sheffield: The University Of Sheffield. *BMC Medical Genomics*.
- Setyoaji, W. A., E. Sulistyarningsih, dan I. F. Kusuma. 2021. Optimized expression condition of cidr α -pfemp1 recombinant protein in *Escherichia coli* bl21(de3): a step to develop malaria vaccine candidate. *Research Journal of Life Science*. 8(1):15–24.
- Sherwood, L. 2014. *Human Physiology : From Cells to Systems*. Edisi 8. Jakarta: EGC.
- Suryadi, Y., I. Manzila, dan M. Machmud. 2016. Potensi pemanfaatan perangkat diagnostik elisa serta variannya untuk deteksi patogen tanaman. *Jurnal AgroBiogen*. 5(1):39–48.
- Susmiarsih, T. P. 2019. Kajian DNA rekombinan pada vaksin DNA dan vaksin subunit protein. *Majalah Kesehatan Pharmamedika*. 10(2):108–125.
- Tessema, S. K., D. Utama, O. Chesnokov, A. N. Hodder, C. S. Lin, G. L. A. Harrison, J. S. Jespersen, B. Petersen, L. Tavul, P. Siba, D. Kwiatkowski, dan T. Lavstsen. 2018. Antibodies to intercellular adhesion molecule 1-binding *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein DBL are biomarkers of protective immunity to malaria in a cohort of young children from Papua New Guinea. *Microbial Immunity and Vaccines*. 8(8):1–14.
- The Humane Society of the United States. 2013. Euthanasia Reference Manual. <https://humanepro.org/sites/default/files/documents/euthanasia-reference-manual.pdf> [Diakses pada October 25, 2021].
- Thomson, C. A. 2016. *IgG Structure and Function*. Elsevier. *Encyclopedia of Immunobiology*.
- Van Wolfswinkel, M. E. dan M. C. C. Langenberg. 2017. Changes in total and differential leukocyte counts during the clinically silent liver phase in a controlled human malaria infection in malaria-naïve dutch volunteers. *Malaria Journal*. 16(457)
- Wassmer, S. C., G. Emile, dan R. Grau. 2017. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol*. 47(3):145–152.
- Wassmer, S., T. Taylor, dan P. Rathod. 2015. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 93(3):42–56.
- Welsh, J. A., L. M. Jenkins, dan J. Kepley. 2020. High sensitivity protein gel electrophoresis label compatible with mass-spectrometry. *Biosensors*. 10(11):160–168.

- White, N. J. 2018. Anaemia and malaria. *Malaria Journal*. 17(371):1–17.
- WHO. 2013. *Module 2 : Types of Vaccine and Adverse Reactions*. Edisi 1. *WHO Vaccine Safety Basics*.
- WHO. 2020. World Malaria Report 2020. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020> [Diakses pada July 18, 2021].
- WHO. 2021. Malaria. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> [Diakses pada July 6, 2021].
- WHO. 2021. Guidelines for Malaria. <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria> [Diakses pada July 15, 2021].
- Widyastuti, D. A. 2013. Blood profile of wistar rats due to subchronic condition caused by sodium nitrite. *Indonesian Journal of Veterinary Science*. 31(2):201–215.
- Wilairatana, P., N. Tangpukdee, dan S. Krudsood. 2013. Definition of hyperparasitemia in severe falciparum malaria should be updated. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(7):586.
- Wiley, J. 2014. Severe malaria. *Tropical Medicine and International Health*. 19(1):7–31.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Keterangan Persetujuan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL

Nomor : ~~159~~/H25.1.11/KE/2022

Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

DETERMINASI DOSIS OPTIMAL PROTEIN REKOMBINAN DBL2 β -PfEMP1 DALAM MENGINDUKSI RESPONS IMUN TIKUS (*Rattus norvegicus*) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA

Peneliti Utama : Dwi Ari Santi Putri
Name of the principal investigator
NIM : 182010101036
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 7 Maret 2022
Ketua Komisi Etik Penelitian

Dr. dr. Kini Riyanti, Sp.PK

Jember, 15 Februari 2022

Tanggapan Anggota Komisi Etik untuk protokol penelitian:

Nama : Dwi Ari Santi Putri

NIM : 182010101036

Judul : Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai Kandidat Vaksin Malaria

Komentar Reviewer Etik:

Berdasarkan pertimbangan 3 prinsip etika, 7 standar, dan 25 butir pedoman etik penelitian pada manusia oleh CIOMS-WHO. Maka pertimbangan etik untuk penelitian dengan judul tersebut diatas adalah:

1. Penelitian dapat dilanjutkan dengan memastikan pengakhiran kehidupan hewan coba secara cepat dan sesuai prosedur baku.
2. Peneliti harus mengolah sampah sisa sampel/spesimen uji sesuai standar supaya tidak mencemari lingkungan sekitar laboratorium pengujian.
3. Harap diperhatikan keamanan terhadap peneliti selama melakukan penelitian pada lingkungan berisiko.
4. Peneliti wajib melakukan desimenasi hasil penelitian

Kesimpulan: Penelitian dapat dilanjutkan dengan syarat mematuhi pertimbangan etik tersebut diatas.

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



Dr. dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Reviewer Etik



dr. Angga Mardro Raharjo, Sp.P
NIP. 198003052008121002

Lampiran 3.2 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba

Kelompok	Hewan	Berat Badan Sebelum Aklimatisasi (g)	Berat Badan Sesudah Aklimatisasi (g)	Berat Badan Saat Injeksi Primer (g)	Berat Badan Saat Injeksi Sekunder I (g)	Berat Badan Saat Injeksi Sekunder II (g)
Kelompok Kontrol	1	128	121	150	167	208
	2	133	144	182	195	223
	3	127	126	177	177	205
Kelompok Perlakuan I (Dosis 100 µg)	1	113	148	178	228	253
	2	138	160	189	225	252
	3	143	195	222	247	282
	4	134	183	212	231	246
Kelompok Perlakuan II (Dosis 150 µg)	1	136	171	195	208	230
	2	132	155	182	217	236
	3	119	154	191	195	206
	4	139	183	200	213	236
Kelompok Perlakuan III (Dosis 200 µg)	1	128	173	200	226	252
	2	137	161	178	186	188
	3	158	210	234	260	265
	4	127	173	197	217	234

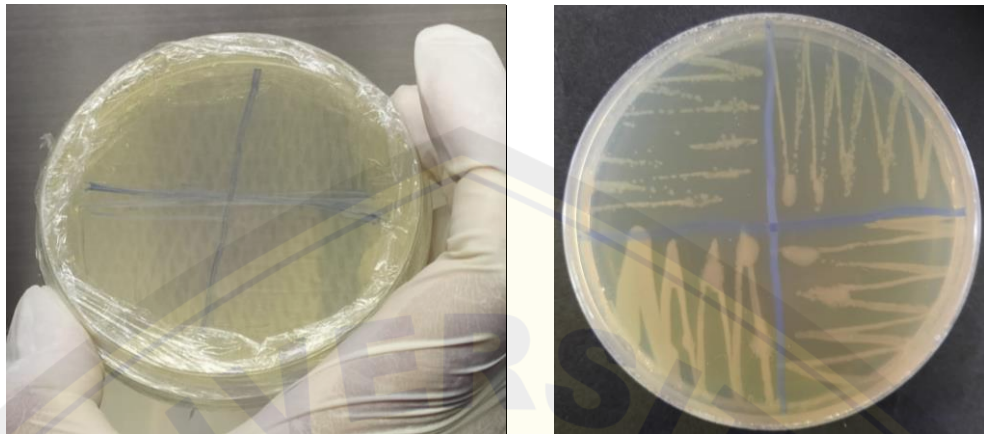
Lampiran 3.3 Perhitungan Dosis

Jumlah protein yang diinjeksikan pada tikus disesuaikan dengan kelompok dosis dan berat badan masing-masing tikus. Dosis protein target (dalam satuan µg) dibagi dengan konsentrasi protein (µg/µl) yang didapat dari hasil *Bradford protein assay*. Konsentrasi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 yang didapat melalui *Bradford protein assay* adalah 2 µg/µl. Sehingga jumlah protein yang diinjeksikan pada masing-masing tikus adalah sebagai berikut.

Kelompok	Hewan	Perhitungan Dosis	Dosis (μg)	Jumlah Protein yang Diinjeksikan (μl)
		$\frac{\text{Berat tikus}}{\text{BB ideal}} \times \text{dosis target}$	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
Kelompok Perlakuan I (Dosis 100 μg)	1	$\frac{178}{200} \times 100 = 89$	$\frac{89}{2}$	44,5
	2	$\frac{189}{200} \times 100 = 94,5$	$\frac{94,5}{2}$	47,25
	3	$\frac{222}{200} \times 100 = 111$	$\frac{111}{2}$	55,5
	4	$\frac{212}{200} \times 100 = 106$	$\frac{106}{2}$	53
Kelompok Perlakuan II (Dosis 150 μg)	1	$\frac{195}{200} \times 150 = 146,25$	$\frac{146,25}{2}$	73,125
	2	$\frac{182}{200} \times 150 = 136,5$	$\frac{136,5}{2}$	68,25
	3	$\frac{191}{200} \times 150 = 143,25$	$\frac{143,25}{2}$	71,625
	4	$\frac{200}{200} \times 150 = 150$	$\frac{150}{2}$	75
Kelompok Perlakuan III (Dosis 200 μg)	1	$\frac{200}{200} \times 200 = 200$	$\frac{200}{2}$	100
	2	$\frac{178}{200} \times 200 = 178$	$\frac{178}{2}$	89
	3	$\frac{234}{200} \times 200 = 234$	$\frac{234}{2}$	117
	4	$\frac{197}{200} \times 200 = 197$	$\frac{197}{2}$	98,5

Lampiran 3.4 Dokumentasi Penelitian

a. Pertumbuhan Bakteri



Pertumbuhan koloni bakteri transforman *E. coli strain* BL21 (DE3) dari stok gliserol pada media LB padat

b. Media LB cair



Media LB pada erlenmeyer sebagai media produksi untuk inkubasi bakteri

c. Proses pembuatan *starter* kultur



Inkubasi *starter* kultur selama 16 jam di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 155 RPM

d. Pemindahan *starter* kultur ke tabung erlenmeyer



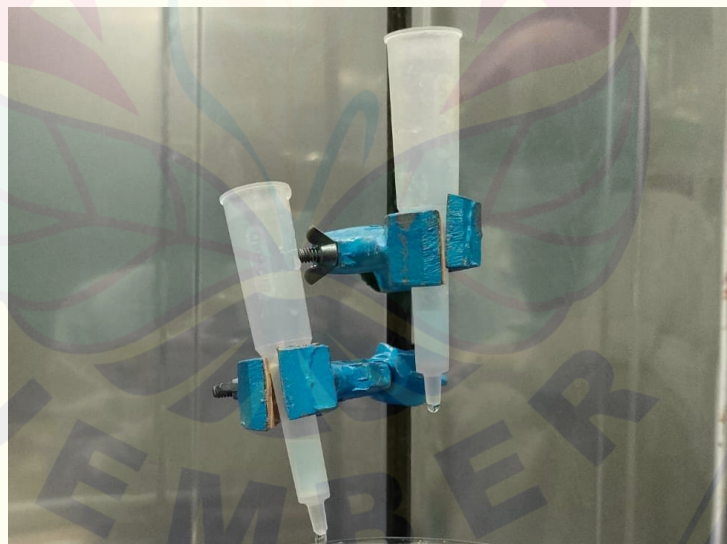
Starter kultur dipindahkan ke LB cair dalam tabung erlenmeyer lalu diinkubasi di *shaker incubator* dengan kecepatan 190 RPM selama 4 jam

e. *Sentrifuge*



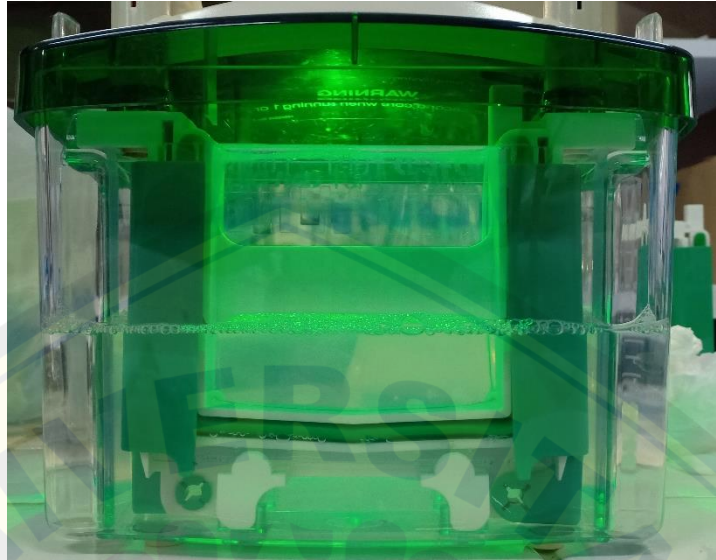
Sentrifuge 6.000 RPM selama 10 menit pada suhu 4°C

f. Purifikasi protein



Proses purifikasi dengan metode kromatografi afinitas

g. Elektroforesis dengan SDS-PAGE



Proses *running* SDS-PAGE selama 3-4 jam

h. Proses *staining* gel



Proses *staining* atau pewarnaan gel dengan menggunakan *coomassie brilliant blue*

i. Perlakuan pada hewan coba



Aklimatisasi hewan coba selama dua minggu



Proses injeksi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 pada hewan coba



Proses terminasi hewan coba

Lampiran 4.1 Hasil Uji Statistik Leukosit

a. Uji normalitas *Saphiro Wilk*

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Preinjeksi	,142	15	,200 [*]	,975	15	,922
Standardized Residual for Primer	,226	15	,038	,907	15	,122
Standardized Residual for Sekunder	,110	15	,200 [*]	,945	15	,444
Standardized Residual for Tersier	,186	15	,171	,926	15	,238

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji *Levene*

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Pre-injeksi	14,806	3	11	,000
Primer	2,878	3	11	,084
Sekunder	,971	3	11	,441
Sekunder II	,306	3	11	,820

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan
Within Subjects Design: waktu

c. Statistik deskriptif pada uji *Friedman*

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Pre-injeksi	15	6753,33	1027,561	5300	8750	5650,00	6950,00	7650,00
Primer	15	8316,67	2013,407	3750	11750	7600,00	8550,00	9050,00
Sekunder	15	9893,33	2149,989	5500	13900	9250,00	10050,00	11250,00
Sekunder II	15	10450,00	2695,499	4200	13300	9600,00	11300,00	12300,00

- d. Signifikansi leukosit pada uji *Friedman*

Test Statistics^a

N	15
Chi-Square	27,720
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Hasil uji *Friedman* yang menunjukkan signifikansi kurang dari 0,05

- e. *Mean Rank* pada hitung jumlah leukosit berdasarkan waktu

Ranks

	Mean Rank
Pre-injeksi	1,20
Primer	2,20
Sekunder	3,20
Sekunder II	3,40

Rata-rata jumlah leukosit pada pre-injeksi, pasca injeksi primer, pasca injeksi sekunder, dan pasca injeksi sekunder II dalam bentuk peringkat (*rank*).

- f. Signifikansi antar kelompok perlakuan menggunakan uji *Kruskal Wallis*

Test Statistics^{a,b}

	Pre-Injeksi	Primer	Sekunder I	Sekunder II
Chi-Square	3,954	6,579	8,665	7,825
df	3	3	3	3
Asymp. Sig.	,266	,087	,034	,050
Exact Sig.	,283	,072	,015	,030
Point Probability	,001	,000	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

- g. Signifikansi antara kelompok kontrol dan kelompok dosis 100 μg

Test Statistics^a

	Primer	Sekunder I	Sekunder II
Mann-Whitney U	,500	,000	,000
Wilcoxon W	6,500	6,000	6,000
Z	-1,962	-2,121	-2,121
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050	,034	,034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

- h. Signifikansi antara kelompok kontrol dan kelompok dosis 150 μg

Test Statistics^a

	Primer	Sekunder I	Sekunder II
Mann-Whitney U	,000	,000	,000
Wilcoxon W	6,000	6,000	6,000
Z	-2,201	-2,121	-2,121
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028	,034	,034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

- i. Signifikansi antara kelompok kontrol dan kelompok dosis 200 μg

Test Statistics^a

	Primer	Sekunder I	Sekunder II
Mann-Whitney U	,500	,000	,000
Wilcoxon W	6,500	6,000	6,000
Z	-1,962	-2,141	-2,121
Asymp. Sig. (2-tailed)	,050	,032	,034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 ^b	,057 ^b	,057 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Lampiran 4.2 Hasil Uji Statistik Konsentrasi IgGa. Uji normalitas *Saphiro Wilk*

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Primer	,148	15	,200 [*]	,945	15	,444
Sekunder I	,134	15	,200 [*]	,942	15	,411
Sekunder II	,115	15	,200 [*]	,964	15	,754

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji homogenitas *Levene*

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Primer	,273	3	11	,844
Sekunder I	3,377	3	11	,058
Sekunder II	1,255	3	11	,337

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan
Within Subjects Design: waktu

c. Uji *Between-Subjects*

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: IgG
Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	293,425	1	293,425	5225,688	,000
Perlakuan	,789	3	,263	4,682	,024
Error	,618	11	,056		

d. Uji *Within-Subjects*

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: IgG

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
waktu	Sphericity Assumed	2,214	2	1,107	8,542	,002
	Greenhouse-Geisser	2,214	1,357	1,631	8,542	,007
	Huynh-Feldt	2,214	1,904	1,163	8,542	,002
	Lower-bound	2,214	1,000	2,214	8,542	,014
waktu * Perlakuan	Sphericity Assumed	,610	6	,102	,785	,591
	Greenhouse-Geisser	,610	4,071	,150	,785	,555
	Huynh-Feldt	,610	5,711	,107	,785	,586
	Lower-bound	,610	3,000	,203	,785	,527
Error(waktu)	Sphericity Assumed	2,851	22	,130		
	Greenhouse-Geisser	2,851	14,927	,191		
	Huynh-Feldt	2,851	20,939	,136		
	Lower-bound	2,851	11,000	,259		

e. Uji *post hoc multiple comparisons* menggunakan metode *Bonferroni*

Multiple Comparisons

Measure: IgG

Bonferroni

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Dosis 100	-,24989	,104490	,215	-,58511	,08533
	Dosis 150	-,37029*	,104490	,028	-,70550	-,03507
	Dosis 200	-,31613	,104490	,069	-,65135	,01908
Dosis 100	Kontrol	,24989	,104490	,215	-,08533	,58511
	Dosis 150	-,12040	,096739	1,000	-,43075	,18995
	Dosis 200	-,06625	,096739	1,000	-,37660	,24410
Dosis 150	Kontrol	,37029*	,104490	,028	,03507	,70550
	Dosis 100	,12040	,096739	1,000	-,18995	,43075
	Dosis 200	,05415	,096739	1,000	-,25620	,36450
Dosis 200	Kontrol	,31613	,104490	,069	-,01908	,65135
	Dosis 100	,06625	,096739	1,000	-,24410	,37660
	Dosis 150	-,05415	,096739	1,000	-,36450	,25620

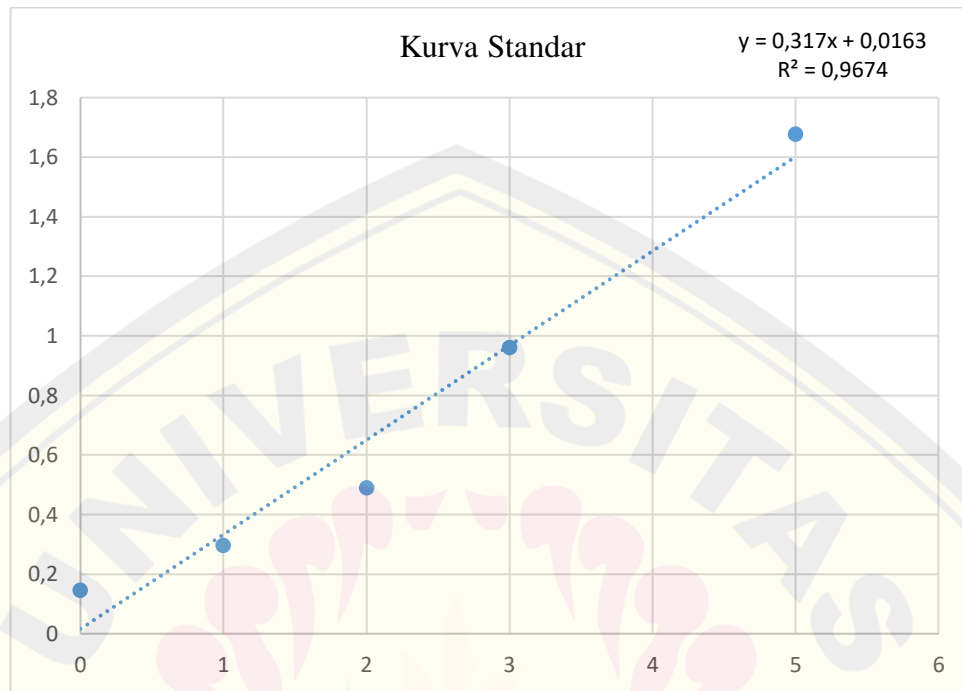
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,019.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Lampiran 4.3 Kurva Standar dan Absorbansi IgG

a. Kurva standar hasil uji ELISA



b. Absorbansi IgG yang didapatkan melalui uji ELISA

Kelompok	Hewan	Absorbansi IgG hari ke-14	Absorbansi IgG hari ke-35	Absorbansi IgG hari ke-56
Kelompok Kontrol	1	0,637	0,836	0,747
	2	0,67	0,716	0,884
	3	0,734	0,75	0,847
Rata-rata		0,680	0,767	0,826
Kelompok Perlakuan I (Dosis 100 µg)	1	0,855	0,775	0,856
	2	0,775	0,594	1,013
	3	0,823	0,944	0,908
	4	0,749	0,64	1,113
Rata-rata		0,801	0,738	0,973
Kelompok Perlakuan II (Dosis 150 µg)	1	0,853	0,616	1,116
	2	0,91	1,052	0,932
	3	0,891	0,855	0,834
	4	0,935	0,633	0,876
Rata-rata		0,897	0,789	0,940
Kelompok Perlakuan III (Dosis 200 µg)	1	0,862	0,681	1,008
	2	0,781	0,738	1,02
	3	0,9	0,846	0,966
	4	0,84	0,738	0,917
Rata-rata		0,846	0,751	0,978