



**GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS WISTAR
(*Rattus norvegicus*) PASCA INJEKSI VARIASI DOSIS
PROTEIN REKOMBINAN DBL2 β -PfEMP1:
PENGEMBANGAN VAKSIN MALARIA
BERBASIS PEPTIDA**

SKRIPSI

Oleh

**Dhia Amanda Intan Permata
202010101144**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
JEMBER
2024**



**GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL TIKUS WISTAR
(*Rattus norvegicus*) PASCA INJEKSI VARIASI DOSIS
PROTEIN REKOMBINAN DBL2 β -PfEMP1:
PENGEMBANGAN VAKSIN MALARIA
BERBASIS PEPTIDA**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada program studi Pendidikan Dokter (S1)*

SKRIPSI

Oleh

**Dhia Amanda Intan Permata
202010101144**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
JEMBER
2024**

PERSEMBAHAN

Sebagai bentuk penghormatan dan dedikasi, tugas akhir skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Keluarga saya, Papa Dr. Minan, S.H., M.H., Mama Siti Halimah, S.H., dan Kakak dr. M. Teguh Nurcahya O. P. yang senantiasa mendoakan dan mendukung saya hingga saat ini;
2. Bapak, ibu guru dan tenaga pendidikan lainnya sejak taman kanak-kanak hingga tingkat perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan wawasan yang bermanfaat kepada saya;
3. Sahabat dan teman-teman saya yang telah memberikan dukungan, doa, dan motivasi; serta
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

“If you've never done anything wrong it's probably because you have never tried anything new.”

–Albert Einstein



*) Albert Einstein, *Relativity: The Special and the General Theory* (German: Princeton University Press, 2015) 104-105.]

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dhia Amanda Intan Permata

NIM : 202010101144

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Pasca Injeksi Variasi Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1: Pengembangan Vaksin Malaria Berbasis Peptida* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 8 Januari 2024

Yang menyatakan,



Dhia Amanda Intan Permata

NIM 202010101144

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul *Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Pasca Injeksi Variasi Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1: Pengembangan Vaksin Malaria Berbasis Peptida* telah diuji dan disetujui oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

Hari : Selasa
Tanggal : 23 Januari 2024
Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Pembimbing

1. Pembimbing Utama

Nama : Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyarningsih,
M.Si., GCertAgHealthMed.

NIP : 197702222002122001

2. Pembimbing Anggota

Nama : dr. Rosita Dewi, M.Biotek.

NIP : 198404282009122003

Tanda Tangan

(.....)

(.....)

Penguji

1. Penguji Utama

Nama : Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., Sp.Par.K.(.....)

NIP : 197406042001122002

2. Penguji Anggota

Nama : dr. Azham Purwandhono, M.Si., Sp.N. (.....)

NIP : 198105182006041002

ABSTRACT

Malaria due to Plasmodium falciparum causes the highest morbidity and mortality, accounting for more than 90% of malaria deaths worldwide. This is because P. falciparum has PfEMP1 antigen that can specifically bind to the endothelial receptor, including ICAM-1, which is mediated by DBL2 β -PfEMP1. Therefore, DBL2 β -PfEMP1 is potentially a malaria vaccine candidate. Previous studies reported that the DBL2 β -PfEMP1 recombinant protein could induce humoral and cellular immune responses. The study aimed to conduct the safety test to ensure that the administration of the vaccine candidate does not cause undesirable impacts on the body's organs, including the kidneys. This is an experimental study using Wistar rats (Rattus norvegicus). The DBL2 β -PfEMP1 recombinant protein was produced, purified, and measured for its concentration using the Bradford protein assay. The recombinant protein is injected in varying doses of 100, 150, and 200 μ g three times at a three-week interval. On the 56th day, the rats were terminated, and the kidneys were prepared to examine the histopathological feature based on the necrosis of the proximal convoluted tubule cell nuclei. The statistical analysis using the Kruskal-Wallis test showed a significance value of $p=0.24$, indicating no significant difference between the control and the treatment group. In conclusion, there was no change in the kidney histopathological features based on necrosis of proximal convoluted tubule cell nuclei after injection of DBL2 β -PfEMP1 recombinant protein in Wistar rats (Rattus norvegicus) as a peptide-based malaria vaccine candidate.

Keywords: malaria, Plasmodium falciparum, PfEMP1, DBL2 β , kidney

RINGKASAN

Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Pasca Injeksi Variasi Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1: Pengembangan Vaksin Malaria Berbasis Peptida; Dhia Amanda Intan Permata; 202010101144; 80 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Malaria merupakan masalah kesehatan global yang menyebabkan tingginya angka kematian. Malaria disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium* dan ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi. Hampir separuh penduduk dunia tinggal di daerah dengan risiko tinggi penularan malaria. Malaria *Plasmodium falciparum* menyebabkan morbiditas dan mortalitas tertinggi, mencakup lebih dari 90% kematian akibat malaria di seluruh dunia. Malaria berat yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* dimediasi oleh *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP1), yang diekspresikan pada permukaan *Infected Red Blood Cells* (IRBCs). Antigen PfEMP1 memiliki domain DBL2 β yang secara spesifik dapat berikatan dengan reseptor *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel endotel vaskular.

Pada penelitian sebelumnya mengenai uji imunogenitas secara *in vivo* menunjukkan bahwa protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat menginduksi respons imun humoral dan seluler. Kemampuan tersebut menunjukkan potensinya dalam menghasilkan antibodi, sehingga diharapkan dengan adanya antibodi tersebut dapat menghambat ikatan antara domain DBL2 β dengan reseptor ICAM-1, dengan demikian protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan vaksin malaria berbasis peptida. Sebelum dilakukan uji klinis, kandidat vaksin harus melalui uji keamanan dosis yang bertujuan untuk memastikan bahwa efek farmakodinamik dan respons imun yang diinduksi pasca pemberian kandidat vaksin tidak menimbulkan dampak yang tidak diinginkan pada organ tubuh, salah satunya adalah organ ginjal.

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan tikus berusia 2-3 bulan dengan berat 150-350 gram. Protein DBL2 β -PfEMP1 diproduksi, diekstraksi, dipurifikasi, divisualisasi dengan SDS-PAGE, kemudian dianalisis konsentrasinya menggunakan *Bradford protein assay*. Protein rekombinan diberikan dalam dosis 100 μ g/KgBB, 150 μ g/KgBB, dan 200 μ g/KgBB. Injeksi dilakukan sebanyak tiga kali dengan jeda waktu tiga minggu. Pada hari ke-56 tikus diterminasi dan organ ginjalnya dibuat preparat untuk diamati gambaran histopatologinya berdasarkan jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal. Penghitungan jumlah nekrosis inti sel dilakukan dengan foto preparat yang diambil 5 lapang pandang metode *zig-zag* menggunakan kamera *Optilab*, setelah itu foto akan diolah dengan bantuan aplikasi Fiji *ImageJ*. Pengamatan dilakukan oleh 2 orang dengan teknik *double blind*. Hasil penghitungan ini menggunakan dua orang pengamat sehingga perlu dilakukan uji *Cronbach's Alpha* untuk menilai reabilitas hasil penghitungan dua pengamat. Hasil uji *Cronbach's Alpha* adalah *Sig*>0,7 sehingga data reliabel.

Rata-rata jumlah sel nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal berdasarkan hasil analisis statistik dengan aplikasi IBM *Statistic* 26, menggunakan uji *Saphiro-Wilk* menunjukkan bahwa data jumlah sel nekrosis pada setiap kelompok terdistribusi tidak normal ($Sig < 0,05$) namun hasil uji *Lavene* menunjukkan bahwa data homogen ($Sig > 0,05$). Hasil uji non parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p = 0,24$). Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kesimpulan penelitian ini adalah tidak terdapat gambaran histopatologi ginjal berupa nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal pasca injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) sehingga aman sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan berkahnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Pasca Injeksi Variasi Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1: Pengembangan Vaksin Malaria Berbasis Peptida”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. Kedua orangtua saya, Papa Minan dan Mama Siti Halimah yang tak henti memberikan semangat, doa, dukungan, dan kasih sayangnya;
2. Kakak saya M. Teguh Nurcahya O. P. yang selalu mendukung dan memotivasi saya;
3. dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE., Subsp.L.B.L.(K). selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
4. Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si., GCertAgHealthMed. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan dr. Rosita Dewi, M.Biotek. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah berkenan untuk meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing selama penyusunan skripsi ini;
5. Dr. dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., Sp.Par.K. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Azham Purwandhono, M.Si., Sp.N. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah berkenan menguji dan memberikan saran yang membangun selama penyusunan skripsi ini;
6. Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si., GCertAgHealthMed. selaku Ketua Kelompok Riset Malaria, dr. Rosita Dewi, M.Biotek., dr. Sheila Rachmania, M.Biotek., dan dr. Irawan Fajar Kusuma, M.Sc., Sp.PD. selaku dosen anggota kelompok riset malaria yang telah memberikan semangat dan bimbingan selama penelitian di laboratorium;

7. dr. Rosita Dewi, M.Biotek. selaku Dosen Pembimbing Akademik dan dosen anggota kelompok riset malaria yang telah membantu penulis dalam proses akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan dan penelitian di laboratorium;
8. Seluruh dosen pengajar dan civitas akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya dan membantu penulis selama menempuh pendidikan;
9. Teman seperjuangan dalam penelitian Nafisah, Hana, dan Nindya yang telah berjuang bersama melalui suka dan duka bersama dalam menyelesaikan penelitian;
10. Kakak tingkat peneliti sebelumnya di kelompok riset malaria yaitu Mas Udin, Mas Teguh, Mbak Khai, Mbak Nisya, Mbak Ufi, dan Mbak Risma yang telah membimbing, mendukung, memberikan ilmu, dan arahan kepada penulis selama penyusunan skripsi dan penelitian di laboratorium;
11. Teman seperjuangan sekaligus sahabat saya selama preklinik Shofie dan Tiffannie yang selalu mendukung membantu dan menghibur selama perkuliahan;
12. Teman “Kuliner Hokahoke” Nindya, Delia, Rica dan Nabilah yang selalu mengajak jalan-jalan dan kulineran selama preklinik;
13. Sahabat dan teman penulis sejak TK, SD, SMP, SMA, hingga perkuliahan Asha, Diayu, Tamimi, Shafa, Lutfia, Abib, Davy dan Arsyad yang telah memberikan semangat dan dukungannya kepada penulis;
14. Teman sejawat saya, Angkatan 2020 (Aorta) Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
15. Semua pihak yang telah membantu dalam pengerjaan skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 8 Januari 2024

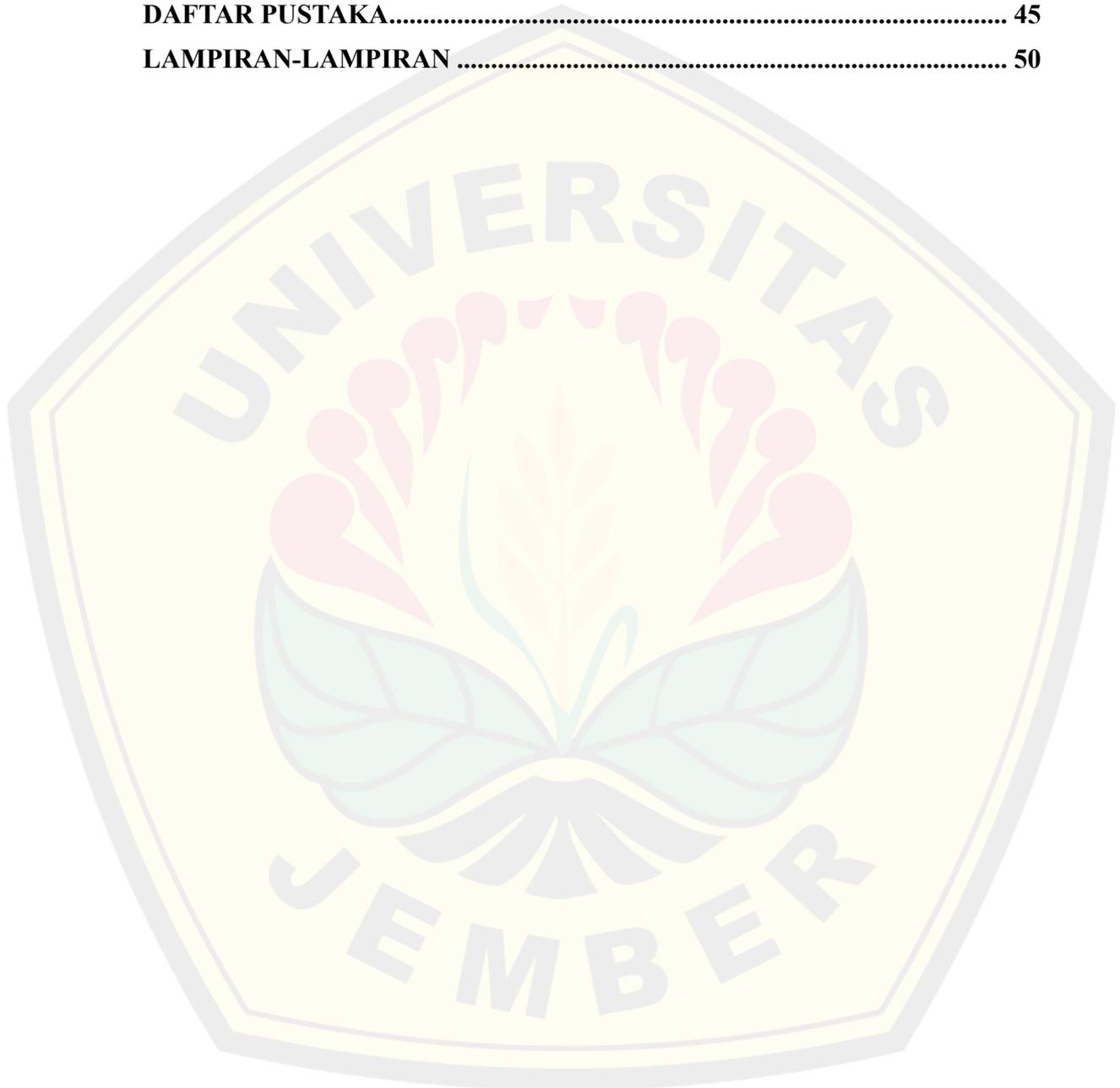
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPEL JUDUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	v
HALAMAN PERSETUJUAN.....	vi
ABSTRACT	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR ISTILAH SINGKATAN	xviii
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.....	3
1.4.1 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan	3
1.4.2 Manfaat bagi Peneliti.....	3
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Malaria.....	5
2.1.1 Epidemiologi.....	5
2.1.2 Etiologi.....	5
2.1.3 Manifestasi klinis	6
2.1.4 Diagnosis dan Terapi.....	6
2.2 <i>Plasmodium falciparum</i>.....	7
2.2.1 Siklus Hidup	7
2.2.2 Patogenesis Malaria akibat <i>Plasmodium falciparum</i>	9
2.3 Protein Rekombinan DBL2β-PfEMP1	10
2.4 Vaksin Malaria	12

2.5 Ginjal.....	14
2.5.1 Anatomi.....	14
2.5.2 Histologi.....	15
2.5.3 Fisiologi	17
2.5.4 Histopatologi Ginjal.....	18
2.6 Kerangka Teori.....	20
2.7 Kerangka Konsep.....	21
2.8 Hipotesis Penelitian.....	22
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	23
3.1.1 Jenis Penelitian	23
3.1.2 Rancangan Penelitian.....	23
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
3.2.1 Waktu Penelitian	23
3.2.2 Tempat Penelitian.....	23
3.3 Populasi dan Sampel.....	24
3.3.1 Populasi.....	24
3.3.2 Sampel	24
3.4 Jenis dan Sumber Data Penelitian.....	25
3.4.1 Jenis Data	25
3.4.2 Sumber Data	25
3.5 Variabel Penelitian	26
3.5.1 Variabel Bebas (<i>Independent</i>)	26
3.5.2 Variabel Terikat (<i>Dependent</i>)	26
3.6 Definisi Operasional Variabel	26
3.7 Prosedur Penelitian.....	27
3.7.1 Uji Kelayakan	27
3.7.2 Sterilisasi Alat.....	27
3.7.3 Produksi Protein Rekombinan	27
3.7.4 Ekstraksi Protein Rekombinan.....	28
3.7.5 Purifikasi Protein Rekombinan.....	29
3.7.6 Visualisasi Protein Rekombinan dengan SDS-PAGE	30
3.7.7 Analisis Konsentrasi Protein.....	31
3.7.8 Injeksi Hewan Coba.....	31
3.7.9 Terminasi dan Pengambilan Organ	32
3.7.10 Pembuatan Preparat Organ Ginjal	33
3.7.11 Visualisasi Preparat Organ	33
3.7.12 Penghitungan Jumlah Sel Nekrosis.....	34
3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data.....	34
3.9 Alur Penelitian.....	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil Penelitian.....	36
4.1.1 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE.....	36
4.1.2 Analisis <i>Bradford Protein Assay</i>	36

4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Sel Nekrosis	38
4.2 Pembahasan.....	40
BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Keterbatasan Penelitian	44
5.3 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN-LAMPIRAN	50



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Definisi operasional.....	26
Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBL β 2-PfEMP1.....	37
Tabel 4.2 Jumlah Sel Nekrosis	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Siklus hidup <i>P. Falciparum</i>	8
Gambar 2.2 Struktur ginjal.....	14
Gambar 2.3 Gambaran histologi ginjal	16
Gambar 2.4 Histologi ginjal tikus Wistar.....	17
Gambar 2.5 Kerangka teori.....	20
Gambar 2.6 Kerangka konsep.....	21
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	23
Gambar 3.2 Rumus penghitungan jumlah protein injeksi.....	31
Gambar 3.3 Alur penelitian.....	35
Gambar 4.1 Hasil Visualisasi Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1	36
Gambar 4.2 Kurva Standar <i>Bradford Protein Assay</i>	37
Gambar 4.3 Contoh gambaran histopatologi	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 3.1 <i>Ethical Clearance</i> Penelitian.....	50
Lampiran 3.2 Lampiran Surat Tugas Penelitian.....	51
Lampiran 3.3 Protokol Aklimatisasi Hewan Coba.....	52
Lampiran 3.4 Protokol <i>Handling</i> Hewan Coba.....	52
Lampiran 3.5 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba.....	53
Lampiran 3.6 Hasil Penghitungan Dosis.....	54
Lampiran 3.7 Protokol Injeksi Hewan Coba.....	55
Lampiran 3.8 Protokol Terminasi dan Pembedahan Ginjal Hewan Coba.....	55
Lampiran 3.9 Protokol Pemusnahan Hewan Coba	55
Lampiran 3.10 Protokol Penghitungan Jumlah Nekrosis Inti Sel.....	56
Lampiran 3.12 Hasil Uji Statistik Nekrosis	72
Lampiran 3.13 Dokumentasi Penelitian.....	73

DAFTAR ISTILAH SINGKATAN

Singkatan/Istilah	Arti dan Keterangan
ACT	: <i>Artemisin-based Combination Therapy</i>
AKI	: <i>Acute Kidney Injury</i>
AMA	: <i>Apical Membrane Antigen</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
APS	: <i>Ammonium Persulfate</i>
ARDS	: <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
ATS	: <i>Acidic Terminal Segment</i>
BNF	: <i>Buffered Neutral Formalin</i>
CBB	: <i>Comassive Brilliant Blue</i>
CD4+	: <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD36	: <i>Cluster of Differentiation 36</i>
CDC	: <i>Centers for Disease Control</i>
CIDR	: <i>Cysteine-rich Interdomain Regions</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
CSP	: <i>Circumsporozoit Protein</i>
DBL	: <i>Duffy Binding Like</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escheria coli</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPCR	: <i>Endothelial Protein C Receptor</i>
GPI	: <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
H&E	: <i>Hematoxylin dan Eosin</i>
ICAM-1	: <i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
iRBC	: <i>Infected Red Blood Cell</i>
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>

Singkatan/Istilah	Arti dan Keterangan
LB	: <i>Lactose Broth</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSP	: <i>Merozoite Surface Protein</i>
Ni-NTA	: <i>Nikel Nitrilotriacetic Acid</i>
NTS	: <i>N-terminal Segment</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	: <i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1</i>
PfSPZ	: <i>Sporozoit Plasmodium falciparum</i>
pH	: <i>Potential Hydrogen</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
RIVIN	: <i>Protein Repetitive Interspersed Family</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Deodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
STEVOR	: <i>Subtelomeric Variable Open Reading Frame</i>
TBV	: <i>Transmission-blocking Vaccine</i>
TEMED	: <i>Tetramethylethyldiamin</i>
uRBC	: <i>Uninfected blood cell</i>
VCAM	: <i>Vascular Cellulae Adhesion Molecule</i>
VSAs	: <i>Variant Surface Antigens</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan dalam skala global yang menyebabkan meningkatnya angka mortalitas dan morbiditas di wilayah tropis maupun subtropis seperti Afrika, Asia, dan Amerika Selatan (CDC, 2021). *World Malaria Report* pada tahun 2021 menyatakan bahwa terdapat 247 juta kasus malaria dengan estimasi kematian sebanyak 619.000 kasus di seluruh dunia. Indonesia menduduki peringkat kedua sebagai negara di Asia Tenggara dengan tingkat malaria tertinggi (WHO, 2021). Data Kementerian Kesehatan menyatakan bahwa terdapat 399.666 kasus malaria dengan estimasi kematian sebanyak 82 kasus di Indonesia pada tahun 2022 dengan tingkat endemisitas tinggi pada Indonesia bagian timur, diantaranya Provinsi Papua, Papua Barat, Nusa Tenggara Timur, dan Kalimantan Timur (Kementerian Kesehatan RI, 2022).

Kematian pada kasus malaria berat terbanyak disebabkan oleh parasit *Plasmodium falciparum* (Ali *et al.*, 2022). Spesies ini banyak ditemukan di Indonesia di antara lima jenis spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia (Sani *et al.*, 2022). Manifestasi klinis malaria berat akibat *P. falciparum* terjadi karena adanya mekanisme sitoadherensi, yaitu *Infected Red Blood Cells* (IRBCs) menempel pada reseptor yang berada pada permukaan endotel pembuluh darah hospes *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1). Selain mekanisme sitoadherensi, *Infected Red Blood Cells* (IRBCs) juga dapat membentuk *roset* dengan *Uninfected Red Blood Cells* (URBCs) yang dinamakan dengan mekanisme *rosetting* (Gullingsrud *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2021).

Mekanisme sitoadherensi dan *rosetting* terjadi karena diperantai oleh sebuah protein antigen parasit, yaitu *Plasmodium Erythrocyte Membran Protein-1* (PfEMP1). Antigen PfEMP1 pada *P. falciparum* memiliki bagian ekstraseluler dan intraseluler. Bagian ekstraseluler terdiri dari *N-Terminal Segment* (NTS) yang diikuti oleh dua domain, yaitu *Cysteine-Rich Interdomain Regions* (CIDR) dan *Duffy Binding Like* (DBL). *Duffy binding like* terdiri dari beberapa sub domain, salah satunya adalah domain DBL2 β . Domain tersebut merupakan salah satu

domain yang selalu ditemukan pada struktur kepala PfEMP1 dan secara spesifik juga berperan dalam pengikatan dengan reseptor ICAM-1. Mekanisme tersebut dapat menyebabkan penyumbatan mikro vaskular, iskemia, hipoksia, dan dapat terjadi kerusakan organ. Kondisi malaria berat tersebut dapat dicegah dengan pemberian vaksin (Gullingsrud *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2021).

Vaksin saat ini merupakan salah satu metode yang efektif sebagai upaya preventif untuk menurunkan angka kejadian penyakit. Pada penelitian sebelumnya mengenai uji imunogenitas secara *in vivo* protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menunjukkan bahwa dapat menginduksi respons imun humoral dan seluler. Kemampuan tersebut menunjukkan potensinya dalam menghasilkan antibodi, sehingga diharapkan dengan adanya antibodi tersebut dapat menghambat ikatan antara domain DBL2 β dengan reseptor ICAM-1. Dengan demikian protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan vaksin malaria berbasis peptida (Rachmania *et al.*, 2021). Sebelum dilakukan uji klinis, kandidat vaksin harus melalui uji keamanan dosis yang bertujuan untuk memastikan bahwa efek farmakodinamik dan respons imun yang diinduksi pasca pemberian kandidat vaksin tidak menimbulkan dampak yang tidak diinginkan pada organ tubuh, salah satunya adalah ginjal (Hamdam *et al.*, 2013).

Ginjal merupakan organ yang berperan penting dalam mengeliminasi zat toksik dan sisa-sisa metabolisme dalam tubuh menjadi urine. Ginjal merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh zat-zat asing, karena organ ini menerima 25-30% sirkulasi darah untuk difiltrasi, sehingga kemungkinan terjadinya perubahan patologi sangat tinggi. Perubahan struktur histologi pada ginjal dapat mempengaruhi fungsi ginjal (Suhita *et al.*, 2013). Studi penelitian sebelumnya mengenai uji imunogenitas pasca injeksi dosis 150 μ g protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 terbukti dapat menginduksi respons imun (Rachmania *et al.*, 2021). Akan tetapi, penelitian tersebut belum meneliti mengenai uji keamanan variasi dosis terhadap organ, salah satunya organ ginjal dengan mengamati gambaran histopatologi. Oleh karena itu, diperlukan suatu penelitian

mengenai uji keamanan dosis dengan mengamati gambaran histopatologi ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah “Apakah terdapat gambaran histopatologi ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida?”.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini untuk mengetahui jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada ginjal tikus Wistar (*Rattus novergicus*).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat memperluas ilmu pengetahuan dan menjadi referensi dalam pengembangan vaksin malaria berbasis peptida dalam upaya pengendalian malaria.

1.4.2 Manfaat bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan dan keterampilan dalam proses pembuatan vaksin malaria berbasis peptida, serta meningkatkan keterampilan menulis artikel ilmiah.

1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam mempercepat upaya pengembangan vaksin malaria berbasis peptida yang aman dan efektif, sehingga dapat mengurangi kejadian malaria berat.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Epidemiologi

Salah satu penyebab utama kematian tertinggi di seluruh dunia adalah malaria. Hampir separuh populasi dunia tinggal di daerah yang berisiko dalam penularan malaria di 87 negara (CDC, 2021). Menurut *World Malaria Report*, terdapat 247 juta kasus dan kematian akibat malaria diperkirakan mencapai 619.000 kasus pada tahun 2021 (*World Malaria Report*, 2021).

Indonesia menjadi salah satu dari sembilan negara endemis malaria di Asia Tenggara (CDC, 2022). Data Kementerian Kesehatan menunjukkan, terdapat 399.666 kasus dan kematian akibat malaria sebanyak 82 kasus di Indonesia pada tahun 2022. Indonesia bagian timur, merupakan daerah endemis malaria yang tinggi, berkontribusi terhadap lebih dari 90% kasus malaria yang dilaporkan secara nasional. Papua, Papua Barat, Nusa Tenggara Timur, dan Kalimantan Timur termasuk wilayah Indonesia dengan angka kasus malaria tertinggi (Kementerian Kesehatan RI, 2022).

2.1.2 Etiologi

Gigitan nyamuk *Anopheles* betina merupakan vektor penyakit malaria, penyakit parasit menular yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. Malaria pada manusia disebabkan oleh lima spesies *Plasmodium* yang berbeda, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium oval* dan *Plasmodium knowlesi*. Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* memiliki mortalitas dan morbiditas tertinggi yaitu lebih dari 90% di dunia dan juga merupakan penyebab malaria paling banyak ditemukan di Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2022).

Sebagian parasit pada fase hidup eritrositik dapat ditemukan di dalam eritrosit, sehingga infeksi malaria dapat ditransmisikan. Sejumlah kecil infeksi malaria dapat ditransmisikan melalui berbagi jarum suntik, menerima transfusi darah, atau menerima transplantasi organ yang telah terkontaminasi oleh darah yang

terinfeksi oleh parasit *Plasmodium*. Bayi yang baru lahir juga dapat terkena malaria kongenital baik sebelum ataupun selama persalinan (Nureye *et al.*, 2020).

2.1.3 Manifestasi klinis

Malaria berdasarkan gejalanya dapat dibedakan menjadi malaria bergejala tanpa komplikasi dan malaria bergejala berat. Di Indonesia yang menimbulkan malaria bergejala berat adalah *Plasmodium falciparum*. Malaria memiliki tiga gejala klasik yang dikenal sebagai trias/proxym malaria, yaitu menggigil, demam tinggi, dan berkeringat. Secara urut trias malaria diawali dengan menggigil (badan bergetar, diikuti peningkatan suhu), periode demam (suhu badan tinggi, wajah memerah, denyut nadi cepat), dan periode berkeringat (suhu turun, pasien banyak berkeringat) (Patriawati *et al.*, 2015; Arief *et al.*, 2020).

Malaria tanpa komplikasi terjadi apabila pasien menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan hapusan darah tepi atau *rapid diagnostic test* dan mengalami gejala malaria namun tidak mengalami gejala malaria berat. Gejala yang muncul umumnya tidak spesifik termasuk demam, menggigil, myalgia, sakit kepala, lemas, anoreksia, mual, muntah, dan batuk (Zekar *et al.*, 2023). Malaria bergejala berat terjadi apabila pasien yang pernah mengalami setidaknya satu kelainan klinis atau hasil laboratorium menunjukkan disfungsi organ yang berat dengan tanda-tanda infeksi *P. falciparum* (positif pada pemeriksaan hapusan darah tepi atau *rapid diagnostic test*) dan tidak ada penyebab lain yang dikonfirmasi dari gejala yang timbul. Pasien dengan malaria berat dapat mengalami *cerebral malarie*, anemia berat, *Acute Kidney Injury* (AKI), atau *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) (Zekar *et al.*, 2023).

2.1.4 Diagnosis dan Terapi

Pasien yang menunjukkan gejala dan memiliki riwayat diduga malaria akan dilakukan pemeriksaan mikroskopis untuk memastikan diagnosis dan menentukan jenis parasit yang menginfeksi. Pemeriksaan mikroskopis ialah pemeriksaan *gold standart* untuk mendiagnosis malaria. Namun untuk mengetahui jenis parasit yang menginfeksi pasien dapat menggunakan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction*

(PCR) karena lebih sensitif mendeteksi malaria pada derajat parasitemia yang rendah (CDC, 2021).

Artemisinin-based Combination Therapies (ACT) adalah rekomendasi oleh WHO yang merupakan kombinasi dari obat Artemeter dan Lumefantrin, Artesunat dan Amodiaquin, Artesunat dan Meflokuin, Dihidroartemisinin dan Piperakuin, Artesunat dan Sulfadoksin-Pirimetamin. Pemberian kombinasi ini untuk meningkatkan efektivitas dan pencegahan resistensi (Arya *et al.*, 2021). *Artemisinin-based Combination Therapies* (ACT) dapat diberikan secara oral untuk malaria tanpa komplikasi, namun injeksi Artesunat dan pengobatan ACT secara oral direkomendasikan untuk malaria berat. *Artemisinin-based Combination Therapies* (ACT) yang dipakai di Indonesia adalah Dihidroartemisinin-Piperakuin (DHP) (Kementerian Kesehatan RI, 2018).

2.2 *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum adalah spesies parasit protozoa yang merupakan salah satu penyebab malaria pada manusia. Dari total kasus dan kematian akibat malaria yang dilaporkan 90% disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (Zekar *et al.*, 2023). Berikut adalah taksonomi dan klasifikasi dari *P. falciparum* (Maier *et al.*, 2023):

Filum : *Apicomplexa*

Kelas : *Aconoidasida*

Ordo : *Heamosporida*

Famili : *Plasmodiidae*

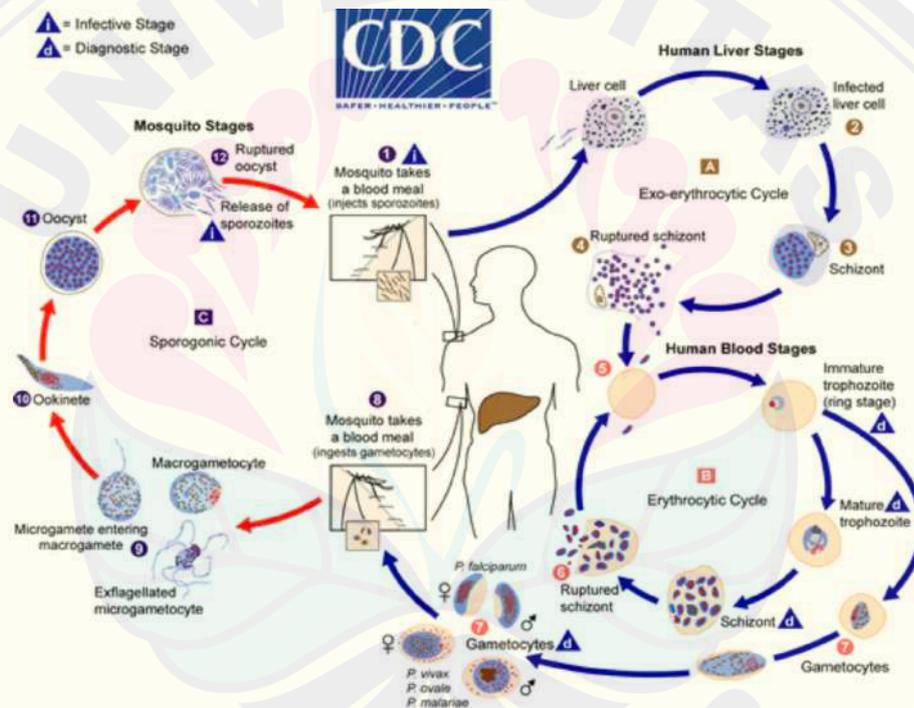
Genus : *Plasmodium* (*Laverania*)

Spesies: *Plasmodium falciparum*

2.2.1 Siklus Hidup

Plasmodium falciparum melibatkan dua hospes dalam siklus hidupnya, yaitu manusia (hospes definitif) di mana berperan dalam siklus skizogoni dan *Anopheles* betina (hospes intermediet) yang berperan dalam siklus sporogoni (CDC, 2021). Pada siklus skizogoni merupakan siklus aseksual dari *P. falciparum*

yang terjadi pada tubuh manusia. Terdapat dua siklus dalam siklus ini, yaitu siklus pre-eritrositik dan siklus eritrositik. Siklus pre-eritrositik terjadi saat sporozoit memasuki tubuh hospes. Sporozoit menuju hepar melakukan pematangan menjadi skizon dan berkembang menjadi banyak merozoit. Siklus eritrositik terjadi saat skizon pecah melepaskan merozoit, lalu beredar ke aliran darah, sehingga menginfeksi eritrosit dan berkembang menjadi trofozoit muda (*ring form*). Trofozoit muda berkembang menjadi trofozoit dewasa, dan berkembang menjadi skizon yang nantinya pecah melepaskan merozoit. Ada beberapa merozoit akan terdiferensiasi menjadi gametosit. Parasit pada siklus eritrositik menimbulkan manifestasi klinis malaria (Gambar 2.1) (CDC, 2021).



Gambar 2.1 Siklus hidup *P. falciparum* (Sumber: CDC, 2021)

Siklus sporogoni adalah siklus reproduksi seksual yang terjadi pada *P. falciparum* dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Siklus ini dimulai saat nyamuk *Anopheles* menghisap gametosit yang terbentuk dalam eritrosit manusia. Saat berada di perut nyamuk mikro gamet melakukan penetrasi pada makro gamet, sehingga menghasilkan zigot. Zigot mengalami perubahan menjadi bentuk aktif ookinet. Ookinet menembus epitel hingga di lambung nyamuk kemudian

berkembang menjadi ookista. Ookista yang matang akan mudah pecah dan melepaskan sporozoit. Sporozoit bergerak menuju kelenjar saliva nyamuk, dan dapat ditularkan kembali ke manusia (Gambar 2.1) (CDC, 2021).

2.2.2 Patogenesis Malaria akibat *Plasmodium falciparum*

Patogenesis malaria berat yang disebabkan oleh *P. falciparum* merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai mediator dari tubuh manusia dan parasit itu sendiri. Parasit ini memiliki kemampuan untuk mengubah sifat permukaan *Infected Red Blood Cells* (iRBCs), sehingga menghasilkan fenotipe yang lebih adhesif, adhesif dari iRBC disebut dengan sitoadherensi. *Infected Red Blood Cells* (iRBCs) memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sel endotel pembuluh darah dan menempel satu sama lain melalui jembatan trombosit, membentuk agregat iRBC. Proses ini memicu aktivasi dan peradangan pada endotel, yang menyebabkan peningkatan kadar sitokin di berbagai lokasi. Selain sitoadherensi, iRBC dapat mengikat endotel pembuluh yang lebih besar dan menyebabkan fenomena sekuestrasi. Hal tersebut dapat berdampak dalam penurunan aliran darah ke organ-organ vital seperti otak, limpa, hepar, ginjal dan berkontribusi pada gejala malaria berat seperti gangguan sirkulasi dan kerusakan organ. Terjadinya perubahan karakteristik lebih adhesif dapat membuat iRBC lebih cenderung berikatan dengan *Uninfected Red Blood Cells* (uRBC) dan menghasilkan struktur yang menyerupai bunga mawar, yang biasa disebut dengan mekanisme *rosetting*. Dalam proses *rosetting*, iRBC cenderung membentuk gumpalan (*Clumping*) saat berikatan satu sama lain (Lee *et al.*, 2019).

Sitoadherensi adalah kemampuan parasit untuk menempel pada endotelium vaskular (Hermand *et al.*, 2016). Proses sitoadherensi pada iRBC ke sel inang melibatkan tiga kategori berbeda dari *Variant Surface Antigens* (VSAs) *P. falciparum*, yaitu *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1), *Protein Repetitive Interspersed Family* (RIFIN), dan *Protein Subtelomeric Variable Open Reading Frame* (STEVOR). Di antara ketiga kelompok VSAs tersebut, Varian PfEMP1 dianggap sebagai yang paling penting dalam membentuk ikatan dengan berbagai reseptor inang seperti ICAM-1, VCAM-1,

PECAM-1, dan lainnya sehingga dapat menghindari dari sistem imun tubuh (Lee *et al.*, 2019). Tujuan utama sitoadherensi adalah untuk mencegah penghancuran sel darah merah dan eliminasi parasit oleh sistem kekebalan tubuh pada *Mononuclear Phagocytic System* (MPS), yang bertanggung jawab untuk menglisiskan eritrosit abnormal dari peredaran (Lee *et al.*, 2019; Sadighbayan *et al.*, 2020).

Rosetting adalah proses iRBCs berikatan dengan uRBCs melalui interaksi antara ligan parasit dan reseptor pada permukaan eritrosit. Proses ini memiliki tujuan, yaitu untuk melindungi parasit dari serangan sistem kekebalan tubuh dengan menjaga iRBCs dan merozoit yang baru dilepaskan agar tidak diserang oleh antibodi. Mekanisme *rosetting* melibatkan berbagai jenis VSAs, seperti PfEMP1 yang berinteraksi dengan berbagai reseptor pada permukaan uRBCs, termasuk *Heparin sulfate* (HS), *Complement Receptor 1* (CR1), CD36, dan antigen golongan darah ABO (McQuaid *et al.*, 2020).

2.3 Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1

Plasmodium falciparum Membrane Protein-1 (PfEMP1) adalah protein yang ditemukan pada permukaan eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*. Protein ini berperan dalam mekanisme sitoadherensi, yaitu sel eritrosit terinfeksi dapat menempel pada endotelium pembuluh darah. Mekanisme tersebut dapat mengakibatkan perfusi yang buruk pada jaringan hospes, hipoksia, dan disfungsi organ yang dapat menyebabkan *multiple organ failure* (Lee *et al.*, 2019).

Protein ini memiliki bagian ekstraseluler dan intraseluler. Bagian ekstraseluler terdiri dari *N-Terminal Segment* (NTS) yang diikuti oleh dua domain pengikat yang berbeda, yaitu *Cysteine-rich Interdomain Regions* (CIDR) dan *Duffy binding like* (DBL). Terdapat tiga subkelas pada domain CIDR yaitu α , β , dan γ , serta enam subkelas pada domain DBL yaitu α , β , γ , δ , ϵ , dan χ . Setiap domain dari protein PfEMP1 memiliki peranan penting dalam patogenesis malaria berat (Jensen *et al.*, 2020).

Setiap domain yang terikat PfEMP1 akan berikatan dengan reseptor sel hospes yang spesifik (Sulistyaningsih *et al.*, 2022). Protein PfEMP1 diketahui berikatan dengan berbagai reseptor hospes termasuk CD36, *chondroitin sulfate A*

(CSA), *endothelial protein C receptor* (EPCR), dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa domain DBL2 β secara spesifik berperan dalam pengikatan dengan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) pada sel hospes. ICAM-1 sendiri merupakan reseptor utama yang memediasi sitoadherensi IRBCs pada endotel vaskular yang dapat menyebabkan malaria berat (Jensen *et al.*, 2020).

Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 adalah protein yang dihasilkan melalui teknik rekayasa genetik. Uji imunogenisitas domain DBL2 β -PfEMP1 dalam menginduksi respons imun seluler dan humoral dilakukan dalam penelitian sebelumnya untuk memperoleh informasi sebagai dasar pengembangan vaksin berbasis peptida. Uji ini bertujuan untuk mengeksplorasi imunogenisitas protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dari isolat *P. falciparum* Indonesia. Uji imunogenisitas *in vivo* dilakukan dengan mengkombinasikan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada *E. coli* BL21(DE3) menggunakan induksi IPTG dan dipurifikasi menggunakan metode kromatografi afinitas. Protein yang telah terpurifikasi kemudian diinjeksikan secara subkutan pada tikus Wistar. Hasil elusi protein terpurifikasi dianalisa dengan menggunakan SDS-PAGE. Pada penelitian tersebut protein rekombinan target divisualisasikan *double band* dengan ukuran ~72 kDa pada SDS-PAGE. Kadar IgG dan sel T CD4⁺ pada serum tikus dianalisa dengan menggunakan *enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *Western Blot* (Rachmania *et al.*, 2021).

Analisis konsentrasi antibodi IgG dan sel CD4⁺ dalam serum tikus menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang menerima injeksi protein rekombinan. Peningkatan konsentrasi antibodi IgG dalam serum tikus setelah injeksi kedua dan ketiga dari protein rekombinan dikonfirmasi oleh uji *Western blot* yang menunjukkan adanya respon imun humoral spesifik dari tubuh inang. Kenaikan konsentrasi CD4⁺ dalam serum tikus pada kelompok perlakuan juga meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol, menunjukkan adanya respon imun seluler. Penelitian ini menunjukkan bahwa protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dari *Plasmodium falciparum* yang diisolasi dari Indonesia mempunyai sifat imunogenik. Oleh karena

itu protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan vaksin malaria berbasis peptida (Rachmania *et al.*, 2021; Sulistyaningsih *et al.*, 2020).

2.4 Vaksin Malaria

Vaksin malaria dalam pengembangannya menghadapi banyak tantangan, di antaranya karena kemampuannya dalam menghindari respons imun tubuh dan siklus hidup yang kompleks. Pada prinsipnya, pengembangan vaksin malaria bertujuan untuk menghentikan siklus hidup parasit. Maka berdasarkan patogenesisnya, vaksin malaria dapat dibagi menjadi (Sulistyaningsih *et al.*, 2020):

- a. Vaksin pre-eritrositik yaitu vaksin yang dirancang untuk menarget parasit saat berada di hepatosit sebelum menyerang sel eritrosit. Hal tersebut bertujuan untuk menginduksi antibodi spesifik yang dapat melawan sporozoit selama periode proliferasi di hepatosit dan merusak hepatosit yang terinfeksi, sehingga dapat menekan pelepasan merozoit yang infeksius dan tercapai efek anti-infeksinya. Beberapa yang sudah dikembangkan adalah vaksin RTS,S/AS01, R21, dan CSP sekuens lengkap.
- b. Vaksin eritrositik yaitu vaksin yang difokuskan pada penanganan parasit dengan menghalangi merozoit masuk ke dalam sel eritrosit. Strategi vaksinasi ini bertujuan untuk melibatkan mekanisme pertahanan tubuh untuk mencegah fase berikutnya dari siklus hidup parasit, yaitu perkembangan dalam sel eritrosit, dengan harapan dapat mengurangi atau mencegah terjadinya malaria berat. Beberapa yang sudah dikembangkan adalah vaksin AMA1, MSP1, dan DBL2 β -PfEMP1.
- c. Vaksin antitoksin yang vaksin yang mengandung *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) sintetik, sebuah glikolipid toksin dari *P. falciparum*. *Glycosylphosphatidylinositol* ini dirancang untuk merangsang sistem kekebalan tubuh agar melawan patogen. Oleh karena itu, vaksin antitoksin bertujuan untuk meningkatkan respons imun terhadap parasit malaria.

- d. *Transmission blocking vaccine* (TBV) yaitu vaksin yang fokusnya pada fase seksual dan sporogonik dari parasit *Plasmodium*, dengan tujuan mencegah perkembangan parasit di dalam tubuh vektor nyamuk *Anopheles* betina. Upaya ini diarahkan untuk memutus rantai transmisi parasit malaria dari manusia ke nyamuk, bertujuan untuk mengurangi penularan penyakit ini secara keseluruhan. Beberapa yang sudah dikembangkan adalah vaksin Pfs25, Pfs48/45, dan Pvs230.

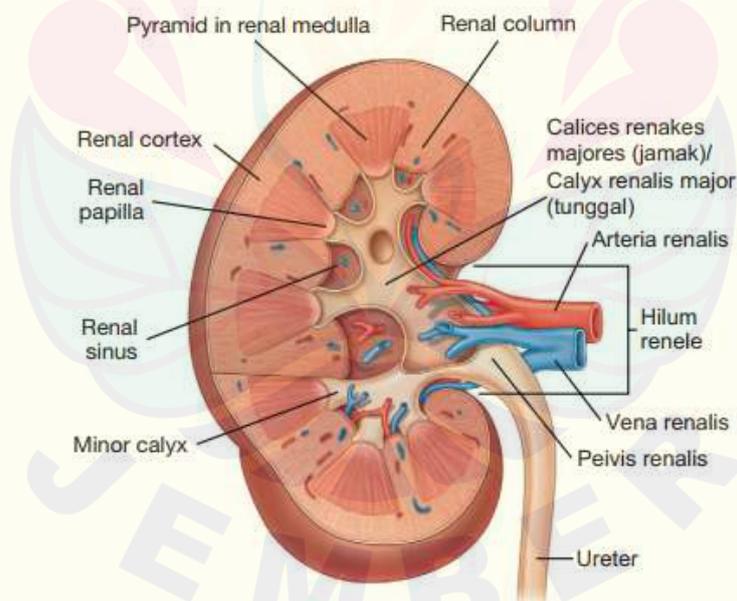
Vaksin pertama malaria berbasis protein rekombinan yang sudah dikembangkan oleh para ahli salah satunya adalah RTS,S/AS01. Vaksin ini merupakan vaksin yang menargetkan sporozoit pada fase pre-eritrositik sehingga proliferasi dan migrasi sporozoit di dalam hepatosit dapat dicegah. Penelitian sebelumnya mengenai vaksin malaria pre-eritrositik menunjukkan bahwa vaksin tersebut memiliki kelemahan, yakni masih ada kemungkinan terjadinya gejala klinis malaria. Oleh karena itu, disarankan untuk menginduksi imunitas terhadap fase eritrositik agar dapat mencegah munculnya gejala klinis malaria. Vaksin ini telah menjalani uji klinis fase III dan terbukti efektif mencegah malaria berat sebesar 34,8%. Keterbatasan efikasi dari vaksin RTS,S/AS01 yang dapat mendorong berkembangnya mekanisme molekuler lain untuk vaksin malaria (Sulistyaningsih *et al.*, 2018; Nadeem *et al.*, 2022).

Uji keamanan farmakologi (*safety pharmacology*) merupakan tahapan yang penting dalam proses pengembangan vaksin. Uji keamanan farmakologi bertujuan untuk mengevaluasi potensi efek dari suatu zat pada fungsi fisiologis menggunakan dosis yang berada di dalam dan di luar kisaran terapeutik. Sistem organ yang diperiksa dalam uji tersebut, yaitu sistem kardiovaskular, sistem saraf pusat, sistem pernapasan, dan sistem organ spesifik lainnya. Uji keamanan pra-klinis ini penting untuk mengidentifikasi dan mengatasi potensi risiko yang terkait dengan kandidat vaksin sebelum dapat diuji dalam uji klinis pada manusia (Cardenas *et al.*, 2021; Saleh *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2022).

2.5 Ginjal

2.5.1 Anatomi

Ginjal merupakan organ yang berbentuk seperti biji kacang terletak pada retroperitoneal di regio abdominal posterior. Bagian superior ginjal terletak sejajar dengan bagian superior vertebra thorakal 12, dan bagian inferiornya sejajar dengan vertebra lumbal 3. Ginjal memiliki berat rata-rata 135 gram pada wanita dan rata-rata 150 gram pada pria. Panjang ukuran ginjal umumnya 11 cm dan lebar 6 cm. Ginjal dextra terletak lebih rendah dibandingkan ginjal sinistra karena terdapat hepar. Ginjal dilapisi oleh tiga lapisan jaringan ikat. Lapisan terdalam, yang dikenal sebagai kapsula fibrosa, terhubung ke parenkim ginjal. Diluar kapsula fibrosa terdapat lapisan lemak perirenal yang dibatasi oleh fasia gerota, dan lapisan yang berada paling luar adalah fasia renalis. Kelenjar adrenal terhubung dengan bagian atas ginjal. Dinding medial ginjal yang cekung, dikenal sebagai hilum, terdiri dari vena ginjal, arteri ginjal, dan pavis ginjal. Jaringan ikat longgar dan rongga berisi lemak yang disebut dengan sinus renalis (Drake *et al.*, 2019).



Gambar 2.2 Struktur ginjal (Sumber: Drake *et al.*, 2012)

Ginjal secara anatomis terbagi menjadi dua, yaitu korteks di bagian luar dan medula di bagian dalam. Pada bagian korteks renalis terdapat 1-1,4 juta unit fungsional terkecil ginjal yang disebut nefron. Nefron terdiri atas korpuskulum

renalis, tubulus kontortus proksimal, ansa henle, dan tubulus kontortus distal. Sedangkan pada medula renalis terdiri 10-12 piramid dengan basis mengarah ke korteks renalis dan apeks mengarah ke pelvis renalis. Bagian terdalam dari medula adalah papila renalis yang akan berhubungan dengan calix minor dan beberapa calix minor akan membentuk calix mayor, 2-3 calix mayor akan bergabung membentuk pelvis renalis yang nantinya menjadi ujung superior dari ureter. Ginjal di vaskularisasi oleh arteri renalis. Ginjal dipersarafi oleh plexus renalis dari serabut simpatis dan parasimpatis (Gambar 2.2) (Schuenke *et al.*, 2017).

Ginjal tikus Wistar memiliki struktur dan fungsi yang mirip dengan ginjal manusia, sehingga hasil penelitian yang menggunakan ginjal tikus Wistar dapat memberikan wawasan yang relevan. Tikus Wistar memiliki jumlah nefron yang lebih sedikit, kira-kira hanya sekitar 30.000 – 35.000, sedangkan manusia memiliki lebih banyak. Selain itu, ginjal tikus Wistar hanya memiliki satu papila renalis, sementara manusia memiliki banyak papila. Struktur korteks ginjal tikus Wistar mengelilingi medula mirip dengan ginjal manusia (Samawy *et al.*, 2013).

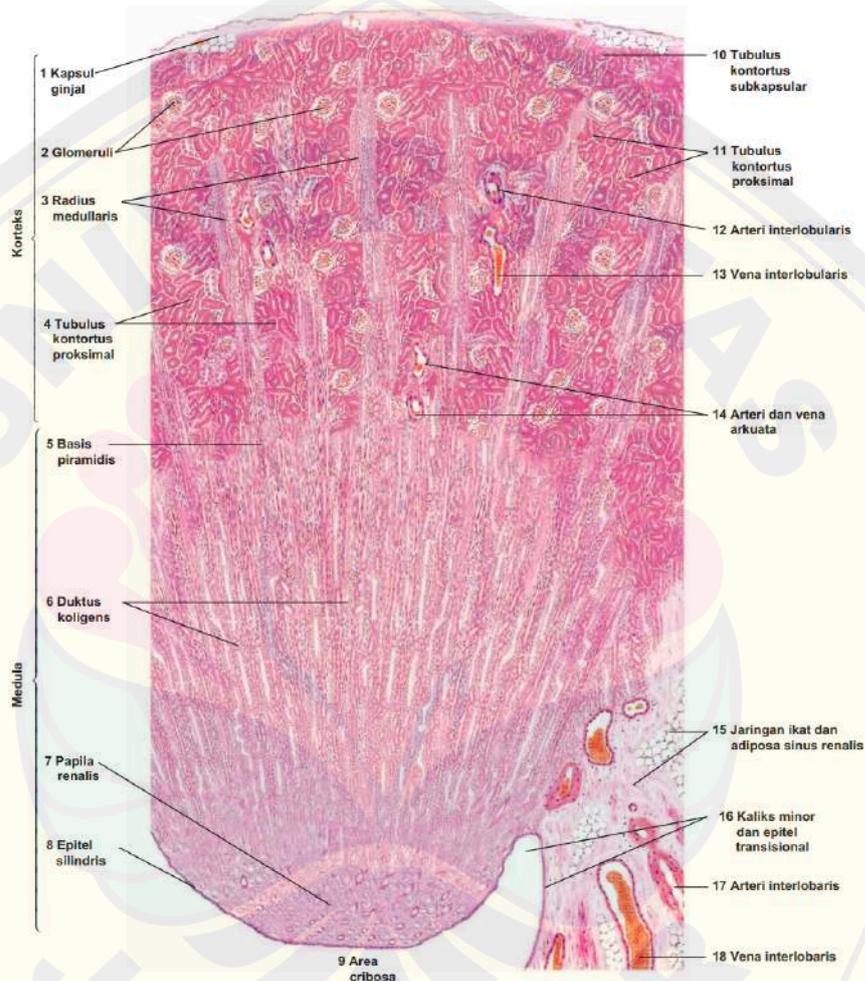
2.5.2 Histologi

Ginjal terdiri dari korteks yang berada di lapisan luar dan memiliki warna yang lebih gelap, serta medula yang berada di bagian dalam memiliki warna yang lebih terang saat diwarnai dengan *hematoxylin-eosin* (HE). Tubulus ginjal dan korpuskulum ginjal adalah dua struktur penting yang ditemukan di korteks ginjal. Korpuskulum ginjal bagian awal nefron terdiri dari glomerulus dan kapsula Bowman (Gambar 2.3) (Eroscheko *et al.*, 2016).

Glomerulus terbentuk oleh sekumpulan kapiler dan arteriola aferen glomerulus. Sementara itu, kapsula bowman memiliki dua lapisan, yaitu lapisan viseral dan lapisan parietal. Lapisan viseral terdiri dari sel epitel yang mengalami modifikasi dan dikenal sebagai podosit. Lapisan parietal dari kapsula bowman dilapisi oleh sel epitel skuamosa (Gambar 2.3) (Eroscheko *et al.*, 2016).

Tubulus ginjal memiliki dua segmen utama, yaitu tubulus kontortus proksimal dan distal. Tubulus kontortus proksimal, lebih panjang dan banyak terdapat di korteks ginjal memiliki karakteristik berupa sel kuboid eosinofilik yang

dilapisi oleh *brush border* dengan lumen kecil dan tidak rata. Sedangkan tubulus kontortus distal, lebih pendek dan lebih sedikit di korteks memiliki sel kuboid lebih kecil dan tidak dilapisi oleh *brush border* dengan lumen lebih besar. Di korteks ginjal juga terdapat struktur yang disebut *medullary rays*, terdiri dari bagian nefron yang lurus, tubulus koligens, dan pembuluh darah (Gambar 2.3) (Eroscheko *et al.*, 2016).

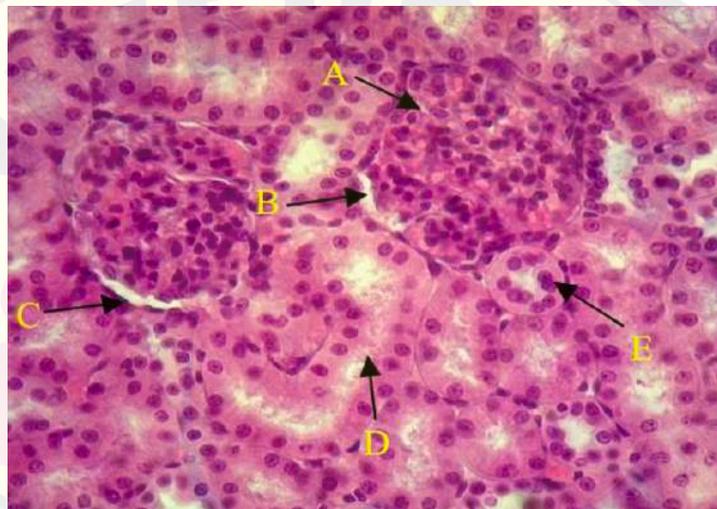


Gambar 2.3 Gambaran histologi ginjal (Sumber: Eroscheko *et al.*, 2016)

Medula ginjal terdiri dari struktur berbentuk kerucut yang dikenal sebagai piramidal renalis. Piramidal renalis dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian basis yang berdekatan dengan korteks dan bagian apeks yang membentuk papila renalis. Di dalam medula terdapat bagian lurus tubulus dan ansa henle. Ansa henle terbagi menjadi atas 3 bagian yaitu bagian tebal turun (*pars descendens*) memiliki

karakteristik sama seperti tubulus kontortus, bagian tipis (segmen tipis) hampir sama dengan kapiler dan bagian tebal naik hampir sama dengan tubulus kontortus distal (pars ascendens) (Gambar 2.3) (Eroscheko *et al.*, 2016).

Histologi ginjal tikus Wistar memiliki struktur dan fungsi yang mirip dengan ginjal manusia, sehingga hasil penelitian yang menggunakan ginjal tikus Wistar dapat memberikan wawasan yang relevan. Pada tikus Wistar, tubulus proksimal merupakan bagian terbesar dari parenkim kortikal. Panjangnya kira-kira 8 mm, lebih pendek dari panjang 14 mm yang ditemukan pada manusia (Gambar 2.4) (Samawy *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Histologi ginjal tikus Wistar. Glomerulus (A), lapisan viseral (B), lapisan parietal (C), tubulus kontortus proksimal (D), tubulus kontortus distal (E) (Sumber: Samawy *et al.*, 2013)

2.5.3 Fisiologi

Ginjal adalah organ yang memiliki struktur yang sangat kompleks dan memiliki beberapa fungsi penting seperti ekskresi produk sisa metabolisme, mengatur keseimbangan air dan garam, menjaga keseimbangan asam yang sesuai, dan sekresi berbagai hormon. Ginjal terdiri dari beberapa juta nefron yang berfungsi untuk melakukan proses ultrafiltrasi. Proses kerja ginjal dimulai ketika dinding glomerulus melakukan ultrafiltrasi untuk memisahkan plasma darah dari sebagian besar air, ion, dan molekul lainnya. Hasil ultrafiltrasi ini kemudian dialirkan ke tubulus proksimal untuk di reabsorpsi melalui *brush border* dengan mengambil kembali bahan-bahan yang masih diperlukan oleh tubuh, seperti gula, asam amino,

vitamin dan sebagainya. Sisa buangan yang tidak diperlukan akan diekskresikan dalam bentuk urine (Sherwood, 2018).

Jumlah cairan yang mengalami proses filtrasi oleh glomerulus dalam satu unit waktu dikenal sebagai laju filtrasi glomerulus atau *Glomerular Filtration Rate* (GFR). Setelah itu, cairan filtrat akan mengalami reabsorpsi, dan beberapa elektrolit akan diekskresi di dalam tubulus ginjal, yang akhirnya menghasilkan urine yang akan mengalir melalui duktus koligentes. Proses reabsorpsi filtrat berlangsung secara berkelanjutan di tubulus proksimal, ansa henle, dan proses sekresi di tubulus distal, sehingga membentuk filtrat tubuli yang kemudian dialirkan ke calix hingga pelvis ginjal (Sherwood, 2018).

2.5.4 Histopatologi Ginjal

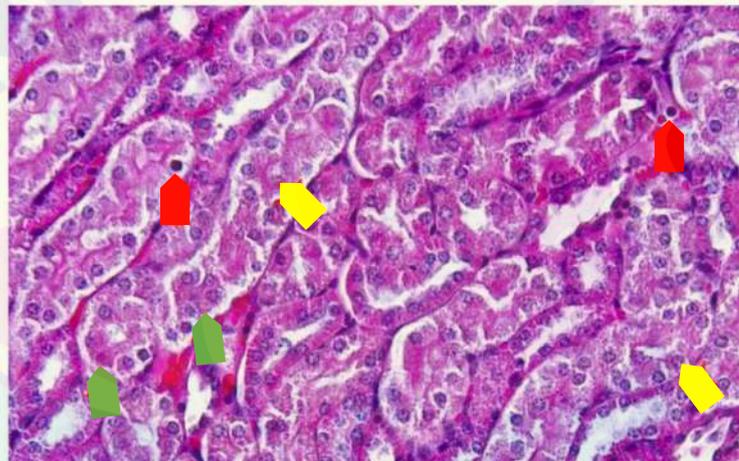
Histopatologi ginjal adalah sebuah studi yang mempelajari tentang perubahan struktural dan histologi pada ginjal yang terjadi akibat penyakit atau paparan faktor tertentu (Sarungallo *et al.*, 2022). Ginjal merupakan organ kedua setelah hepar, yang paling sering menjadi sasaran perusakan yang bisa ditandai dengan perubahan struktur organ oleh zat kimia maupun zat asing/*xinobiotik* yang masuk kedalam metabolisme ginjal. Hal ini disebabkan karena banyak zat tersebut yang diekskresikan melalui urine. Perubahan struktur histologi ginjal ini tentu dipengaruhi oleh jumlah senyawa yang masuk ke dalam tubuh (Suhita *et al.*, 2013).

Sel epitel tubulus proksimal merupakan bagian dari ginjal yang mudah terkena kerusakan akibat paparan zat kimia yang bersifat toksik. Hal ini disebabkan karena epitel tubulus proksimal yang rawan mengalami bocor karena memiliki sifat sel yang sangat permeabel. Faktor-faktor seperti permukaan bermuatan listrik yang luas untuk reabsorpsi tubulus, sistem transpor aktif ion dan asam organik, serta kemampuan sel epitel tubulus dalam melakukan pemekatan zat juga menjadi faktor yang memudahkan tubulus ginjal mengalami kerusakan (Suhita *et al.*, 2013).

Kerusakan sel tubulus dapat ditandai dengan terjadinya perubahan bentuk sel. Perubahan bentuk sel dibagi menjadi dua, yaitu *reversible* dan *irreversible*. Perubahan *reversible* memiliki dua nasib, jika perubahan bentuk tersebut terkompensasi dengan baik dan sumber penyebab dapat dihentikan, maka masih

bisa diperbaiki serta sel dapat normal kembali. Namun, apabila sel tidak lagi mampu mengompensasi kerusakan, mekanisme tersebut membuat sel jatuh pada kondisi *irreversible* berupa nekrosis (Suhita *et al.*, 2013; Rahmah *et al.*, 2021).

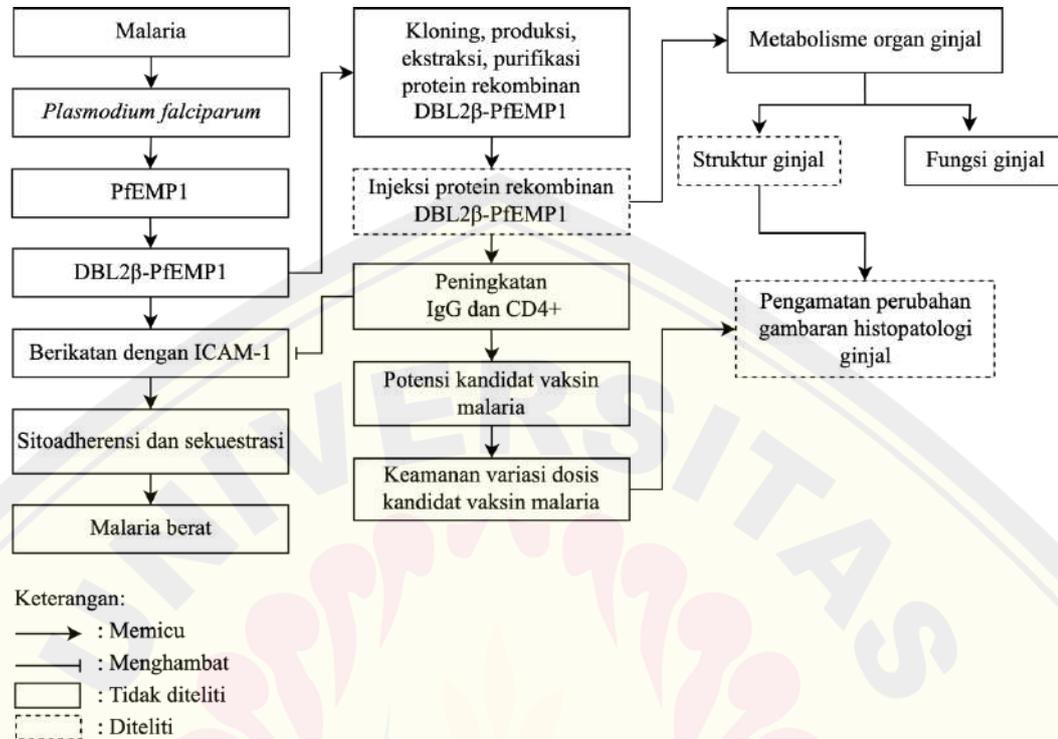
Perubahan *irreversible* adalah perubahan bentuk sel yang tidak dapat kembali dalam bentuk normal, salah satu contohnya adalah nekrosis. Tahap nekrosis sel dimulai dari piknosis (nukleus mengecil) ditandai dengan inti padat mengecil, warna gelap, homogen, dan cenderung membulat, lalu karioreksis (nukleus pecah) ditandai dengan kondisi inti mengalami fragmentasi menjadi kecil dan tersebar ke sitoplasma, dan yang terakhir kariolisis (nukleus menghilang) ditandai dengan inti yang sangat pudar, dan membentuk rongga (Gambar 2.5) (Suhita *et al.*, 2013; Rahmah *et al.*, 2021).



Gambar 2.5 Gambaran nekrosis sel inti tubulus ginjal. Inti piknosis (panah merah), Inti karioreksis (panah kuning), dan inti kariolisis (panah hijau) (Sumber: Rahmah *et al.*, 2021)

2.6 Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian ini disajikan pada Gambar 2.7



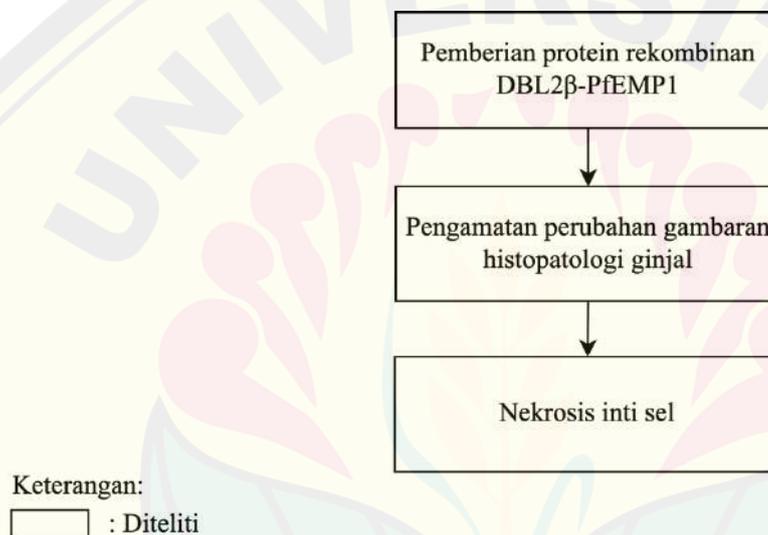
Gambar 2.6 Kerangka teori

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. Spesies *Plasmodium* penyebab malaria berat yaitu *P. falciparum*. Malaria berat akibat *P. falciparum* dimediasi oleh protein *Plasmodium Erythrocyte Membran Protein-1* (PfEMP1) yang ditemukan pada permukaan *Infected Red Blood Cells* (IRBCs). Protein ini memiliki subdomain di bagian ekstraseluler, yaitu domain DBL2β yang secara spesifik berperan dalam pengikatan dengan *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) pada sel endotel pembuluh darah hospes. Hal tersebut dapat menyebabkan risiko terjadinya mekanisme sitoadherensi dan sekuestrasi sehingga dapat bermanifestasi menjadi malaria berat dan dapat berisiko terjadi kerusakan organ vital salah satunya pada organ ginjal. Dalam penelitian sebelumnya didapatkan hasil kloning dari protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 dapat menginduksi respons imun humoral ditandai dengan antibodi immunoglobulin G (IgG) dan seluler ditandai dengan CD4+ yang terbentuk sehingga dapat menghambat ikatan DBL2β-PfEMP1 dengan ICAM-1. Inhibisi dari

ikatan DBL2 β -PfEMP1 dengan ICAM-1 berpotensi untuk mencegah kejadian malaria berat. Ginjal merupakan organ yang berperan penting dalam mengeliminasi zat toksik dan sisa-sisa metabolisme dalam tubuh menjadi urine. Pemberian protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan variasi dosis diharapkan tidak mempengaruhi struktur ginjal, namun untuk memastikan keamanannya perlu dilakukan pengamatan histopatologi ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 (Gambar 2.6).

2.7 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini disajikan pada Gambar 2.8



Gambar 2.7 Kerangka konsep

Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 mempunyai potensi sebagai kandidat vaksin malaria. Sebelum vaksin tersebut dapat digunakan, perlu dilakukan uji keamanan dosis untuk mengetahui apakah induksi respons imun pasca injeksi berpotensi menimbulkan dampak yang tidak diharapkan. Dalam penelitian ini, dilakukan pengamatan histopatologi pada ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 untuk melihat apakah terdapat perubahan struktur histopatologi ginjal nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal (Gambar 2.7).

2.8 Hipotesis Penelitian

Injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 sebagai kandidat vaksin malaria tidak menunjukkan perbedaan gambaran histopatologi organ ginjal.



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

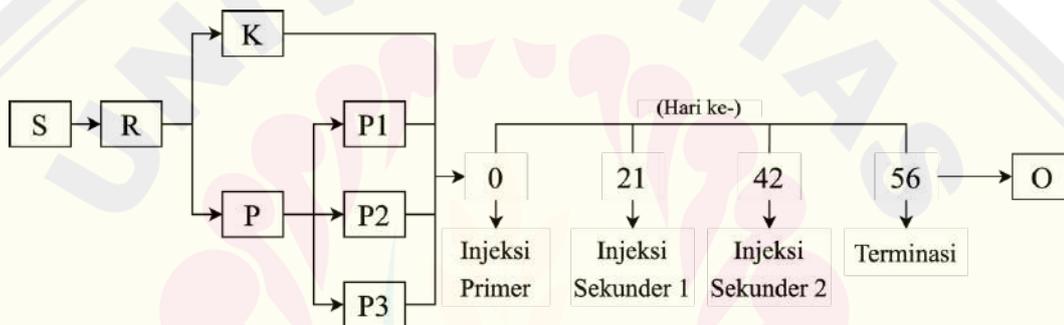
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian berjenis *true experimental design* dengan membandingkan tiga dosis antigen sebagai kandidat vaksin malaria. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *post-test only control group design* untuk menganalisis gambaran histopatologi pada ginjal.

3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Keterangan:

S : Sampel

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol (Larutan NaCL 0,9%)

P1 : Kelompok perlakuan 1 (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)

P2 : Kelompok perlakuan 2 (Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)

P3 : Kelompok perlakuan 3 (Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)

O : Observasi

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Biomaterial dan Bioproses Unit Penunjang Akademik (UPA) Pengelolaan Limbah dan Laboratorium Terpadu Universitas Jember, Laboratorium Biokimia Fakultas

Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini terdiri dari tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Jember, Jawa Timur. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi pada penelitian ini, yaitu:

- Berjenis kelamin jantan.
- Sehat secara fisik ditandai dengan nafsu makan yang baik dan aktif bergerak.
- Berat badan antara 150-300 gram.
- Usia 2-3 bulan.

Kriteria eksklusi pada penelitian ini, yaitu:

- Terdapat luka infeksi.
- Rambut rontok/ kusam.
- Mati sebelum diberi perlakuan.
- Berat badan turun >10% setelah periode aklimatisasi.

3.3.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini didapatkan melalui teknik randomisasi *simple random sampling*, kemudia dihitung berdasarkan rumus metode *resource equation* dengan *E-value* sebesar 10-20 sebagai nilai replikasi yang adekuat. Nilai *E-value* ditentukan melalui rumus sebagai berikut (Arifin & Zahiruddin, 2017):

$$E = \text{jumlah kelompok perlakuan} \times (\text{jumlah hewan coba per kelompok} - 1)$$

Untuk menentukan jumlah sampel dengan nilai *E-value* dalam rentang 10-20, maka:

- Jika $E = 10$, jumlah hewan per kelompok = y

$$10 = 4 \times (y-1)$$

$$10 = 4y - 4$$

$$y = 3,5 \approx 4 \text{ (pembulatan)}$$

b. Jika, E = 20, jumlah hewan per kelompok = y

$$20 = 4 \times (y-1)$$

$$20 = 4y - 4$$

$$y = 6$$

Berdasarkan perhitungan di atas, dapat disimpulkan bahwa jumlah sampel yang cukup untuk setiap kelompok adalah antara 4-6 ekor tikus. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan 4 tikus per kelompok, sehingga total terdapat 16 tikus yang dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan yang mendapat dosis berbeda yaitu 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ dan satu kelompok kontrol. Penerapan prinsip reduksi dilakukan pada kelompok kontrol, sehingga hanya digunakan tiga tikus dalam kelompok tersebut (Arifin & Zahiruddin, 2017; Charan & Kantharia, 2013).

3.4 Jenis dan Sumber Data Penelitian

3.4.1 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data kuantitatif dari konsentrasi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 dan hitung jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal.

3.4.2 Sumber Data

Data primer merupakan sumber informasi yang digunakan dalam penelitian ini. Peneliti mengumpulkan data tersebut, mulai dari produksi protein untuk injeksi hewan coba, awal perlakuan hewan coba, terminasi, pembuatan preparat organ hingga analisis preparat histopatologi. Pemeriksaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang telah disambungkan dengan kamera *optilab* untuk memudahkan pengambilan gambar jaringan organ ginjal. Sediaan yang digunakan untuk histopatologi ginjal diperiksa di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 \times untuk mendeteksi nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah dosis protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 sebagai kandidat vaksin malaria. Protein tersebut diproduksi, diekstraksi, dipurifikasi, dan divisualisasikan dengan SDS-PAGE.

3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat (*Dependent*) pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi organ ginjal pasca injeksi variasi dosis protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dan skala perhitungan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala
1.	Dosis Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1	Protein yang diekspresikan oleh DNA rekombinan DBL β 2-PfEMP1 <i>P. falciparum</i> dengan perantara hospes <i>E. coli</i> BL21 (DE3). DNA merupakan hasil kloning gen, produksi, ekstraksi, hingga purifikasi. Lalu, diinjeksikan pada tikus dengan dosis 100 μ g/kgBB, 150 μ g/kgBB, 200 μ g/kgBB.	Konsentrasi protein rekombinan diukur menggunakan <i>Bradford protein assay</i> dan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm sehingga didapatkan satuan μ g/ μ L.	Rasio
2.	Histopatologi Ginjal	Gambaran histopatologi ginjal diamati adalah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal, yaitu mulai dari proses nekrosis sel yang diawali dengan tahapan yang disebut piknosis, karioksis dan kariolisis.	Penghitungan jumlah nekrosis inti sel dilakukan dengan foto preparat yang diambil 5 lapang pandang metode <i>zig-zag</i> menggunakan kamera <i>Optilab</i> , setelah itu foto akan diolah dengan bantuan aplikasi <i>Fiji ImageJ</i> . Pengamatan dilakukan oleh 2 orang dengan teknik <i>double blind</i> .	Rasio

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Kelayakan

Penelitian ini telah mendapatkan izin kelayakan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomor surat No.4675/UN25.1.10.2/KE/2023. *Ethical clearance* menunjukkan bahwa penelitian ini terqualifikasi oleh standar uji kelayakan etik.

3.7.2 Sterilisasi Alat

Peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini telah menjalani proses sterilisasi dengan menggunakan mesin *autoclave* selama 60 menit pada suhu 121°C. Alat dan bahan yang disterilisasi meliputi:

- a. *Aquadest*
- b. Tip mikropipet (10 µL, 100 µL, 1000 µL)
- c. Tabung *ependorf* 1,5 mL
- d. Tabung *falcon* (15 mL dan 50 mL)

Setelah proses sterilisasi dilakukan pada semua alat dan bahan, maka alat dan bahan tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian.

3.7.3 Produksi Protein Rekombinan

Protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 diproduksi dengan mengikuti langkah-langkah dalam prosedur produksi sebagai berikut:

- a. Produksi dimulai dengan pembuatan media LB cair dalam 8 tabung erlenmeyer berukuran 500 mL yang masing-masing berisi 250 mL dan 9 tabung reaksi yang masing-masing berisi 5 mL, sehingga kebutuhan secara keseluruhan adalah sekitar 2500 mL.
- b. LB broth (Merck) dengan berat 0,02 gram dilarutkan dalam 1 mL aquadest steril kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 60 menit pada suhu 121°C. Setelah sterilisasi, larutan didinginkan hingga mencapai suhu ruangan.
- c. Media yang sudah steril dan dingin ditambahkan 50 µg/mL kanamisin dan 50 µL *E.coli* BL21 (DE3) ke dalam tabung reaksi untuk membuat *starter*

kultur. Kemudian LB cair tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 RPM suhu 37°C selama 16 jam.

- d. Setelah 16 jam, hasil kultur dicampurkan ke dalam tabung erlenmeyer, kemudian media diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 190 RPM selama 4 jam sampai *optical density* (OD_{600}) mencapai rentang target antara 0,6-0,8.
- e. Selanjutnya, media diinduksi dengan 50 μ l IPTG 0,5 mM, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 8 jam dengan kecepatan 190 RPM. Kemudian media disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 RPM pada suhu 4°C.
- f. *Pellet* bakteri yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung *falcon* berukuran 15 mL dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -80°C jika proses selanjutnya tidak dilakukan.

3.7.4 Ekstraksi Protein Rekombinan

Prosedur ekstraksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1, yaitu:

- a. Tabung *falcon* berisi *pellet* ditambahkan dengan 4 mL *buffer* ekstraksi (Tris HCL 50 mM pH 8,0, NaCL 500 μ M, imidazole 5 μ M serta NaH₂ PO₄ 50 μ M) dengan perbandingan 2:1 untuk *buffer* dan *pellet*. Setelah itu, ditambahkan lisozim 1 mg/mL dan diinkubasi selama 30 menit dalam *ice box* pada suhu 4°C.
- b. Setelah inkubasi selesai, *pellet* disonikasi menggunakan sonikator dengan pengaturan *output* 3, *duty cycle* 30 selama 40 detik, dan *resting time* 80 detik, selama sekitar 18-20 siklus. Setelah proses sonikasi, langkah selanjutnya adalah melakukan sentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 RPM.
- c. Lisat protein (*supernatant*) yang dihasilkan kemudian dialirkan ke dalam tabung *falcon* berukuran 15 mL untuk disimpan dalam *freezer* pada suhu -80°C, atau dapat langsung digunakan untuk tahap purifikasi protein.

3.7.5 Purifikasi Protein Rekombinan

Purifikasi protein rekombinan dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode kromatografi afinitas dengan menggunakan kit resin Ni-NTA QIAGEN *expressionist*. Berikut adalah langkah-langkah dalam proses purifikasi protein:

- a. Kolom purifikasi dicuci dengan menggunakan 5 mL larutan NaOH 0,1 M dan etanol 30%, proses pencucian ini diulang sebanyak tiga kali.
- b. Setelah itu, sebanyak 1 mL resin Ni-NTA *slurry* ditambahkan ke dalam kolom purifikasi dan dibiarkan selama 30 detik. Cairan resin dibiarkan menetes dengan membuka penutup bagian bawah kolom. Setelah selesai, tambahkan 5 mL *aquadest* dengan tiga kali pengulangan.
- c. Jika tidak ada lagi yang menetes dari kolom, kolom diisi dengan 5 mL *buffer* lisis (NaCL 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazole 5 mM dengan pH 8,0) diulang sebanyak tiga kali. Pada pengulangan ketiga, bagian bawah kolom purifikasi ditutup dan dibiarkan selama 1 jam. Kemudian, penutup atas dan bawah kolom dibuka, dan cairan dibiarkan menetes hingga habis, jika tersisa sedikit cairan bisa didorong dengan spuit yang berisi udara.
- d. Selanjutnya bagian atas dan bawah tabung ditutup, kemudian lisat protein sebanyak 4 mL ditambahkan ke dalam kolom. Lalu, sentrifugasi dengan menggunakan *orbital shaker* pada suhu 4°C selama 60 menit dengan kecepatan 100 RPM. Setelah itu, penutup dapat dibuka kembali dan cairan yang keluar dari lubang di bawah kolom ditampung dengan tabung *ependorf* dan diberi label “*Flow Trough*” (FT).
- e. Selanjutnya bagian atas dan bawah kolom dibuka kembali, lalu kolom dicuci dengan 2,5 mL larutan *buffer wash 1* (NaCL 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazole 10 mM dengan pH 8,0) sebanyak dua kali. Selanjutnya, dilakukan pencucian dengan 2,5 mL *buffer wash 2* (NaCL 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazole 20 mM dengan pH 8,0) sebanyak dua kali. Hasil dari pencucian ini dikumpulkan dalam tabung *ependorf* dan diberi label W1.1, W1.2, W2.1, W2.2.
- f. Kemudian, dilakukan penambahan 500 µL *buffer* elusi 1 (NaCL 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, imidazole 30 mM dengan pH 8,0) sebanyak dua kali

pengulangan. Selanjutnya ditambahkan 500 μL *buffer* elusi 2 (NaCL 500 mM, NaH_2PO_4 50 mM, imidazole 60 mM dengan pH 8,0) dua kali pengulangan, dan terakhir, *buffer* elusi 3 (NaCL 500 mM, NaH_2PO_4 50 mM, imidazole 100 mM dengan pH 8,0) dimasukkan dua kali pengulangan. Hasil dari pencucian ini dikumpulkan dalam tabung *eppendorf* dan diberi label E1.1, E1.2, E2.1, E2.2, E3.1, dan E3.2. Hasil dari proses purifikasi ini dapat disimpan dalam *freezer* pada suhu -80°C .

3.7.6 Visualisasi Protein Rekombinan dengan SDS-PAGE

Visualisasi protein dilakukan dengan teknik elektroforesis vertikal SDS-PAGE melalui tahapan berikut:

- a. Pembuatan *separating gel/lower gel* dengan konsentrasi 12,5% (*lower gel buffer* 4X pH 8,8 5 mL, ddH₂O 6,6 mL, akrilamid 30% 8,3 mL, TEMED 10 μL , dan APS 10% 100 μL) dimasukkan ke dalam kaca dan ditunggu sampai memadat. Lalu *stacking gel/upper gel* dengan konsentrasi 4,5% (*upper gel buffer* 4X pH 6,8 3 mL, ddh₂O 7 mL, akrilamid 30% 1,8 mL, TEMED 15 μL , dan APS 10% 150 μL) dimasukkan ke dalam kaca, dipasang *comb*, dan ditunggu hingga memadat.
- b. Setelah itu, kaca dipasang ke dalam *chamber*. Sebanyak 500 mL *running buffer* (SDS 0,1%, glisin 0,192 M, dan Tris base 0,025 M) dituang ke dalam *inner* dan *outer chamber* hingga kaca terendam.
- c. *Buffer sampel* (gliserol, *bromophenol blue* 0,5%, β -*mercaptoethanol* 5%, SDS 10%, Tris HCl 0,5 M pH 6,8) dicampurkan dengan protein hasil purifikasi sebanyak 20-50 μL dengan perbandingan 1:1. Lalu, sampel protein didenaturasi menggunakan *dry heat block* dengan suhu 95°C selama 5 menit. Kemudian, setiap sumuran *stacking gel* diisi dengan 4 μL *protein marker* dan 20 μL sampel.
- d. Selanjutnya, alat dipasangkan pada kutub masing-masing dan disambungkan ke sumber listrik. Elektroforesis *stacking gel* menggunakan tegangan 50 V selama 45 menit, sedangkan *separating gel* menggunakan

- tegangan 80 V selama 90 menit. Jika sudah selesai, gel dapat diambil dengan mengeluarkan kaca dari *chamber*, lalu bagian *stacking gel* dapat dipotong.
- e. Gel dimasukkan dalam larutan *Comassie Brilliant Blue* dan dimasukkan ke dalam *shaker* selama 30 menit untuk proses *staining*. Lalu, gel direndam dalam *destaining solution* (*aquadest*, metanol, dan asam asetat) selama 1 jam untuk kemudian dianalisis.

3.7.7 Analisis Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein menggunakan *Bradford protein assay*, langkah pertama dibuat kurva standar menggunakan *bovine serum albumin* (BSA). Sebanyak 1 mL reagen *Bradford* dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf*, kemudian BSA dengan konsentrasi yang berbeda-beda, dari yang terkecil hingga yang terbesar, ditambahkan ke dalam masing-masing tabung. Proses ini diulangi 2-3 kali. Setelah diinkubasi selama 10 menit, absorbansi diukur menggunakan *microplate reader*. Kurva standar kemudian dibentuk berdasarkan absorbansi dan konsentrasi BSA, yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein.

Selanjutnya, ditambahkan 995 μL reagen *Bradford* ke dalam tabung *eppendorf*, dilanjutkan dengan penambahan 5 μL sampel protein. Sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Kemudian sampel dipindahkan ke kuvet untuk diukur serapannya menggunakan panjang gelombang 595 nm. Jumlah protein yang ditambahkan ditentukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\text{BB Tikus (gram)}}{200 \text{ gram}} \times \text{Dosis target} = \text{Jumlah Protein } (\mu\text{g/KgBB})$$

$$\frac{\text{Jumlah Protein } (\mu\text{g/KgBB})}{\text{Konsentrasi protein } (\mu\text{g}/\mu\text{L})} = \text{Jumlah protein yang diinjeksi } (\mu\text{L/KgBB})$$

Gambar 3.2 Rumus penghitungan jumlah protein injeksi

3.7.8 Injeksi Hewan Coba

Lima belas ekor tikus yang menjalani proses pengambilan sampel diaklimatisasi selama dua minggu di Laboratorium Uji Hewan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember agar terbiasa dengan lingkungan baru. Tikus dipelihara

dalam kandang plastik berukuran 40×30×13 cm dengan alas serbuk kayu. Setiap kandang berisi 1-2 ekor tikus, diberi pakan standar ternak dan air minum secara *ad libitum* setiap hari.

Setelah masa aklimatisasi, tikus yang memenuhi kriteria inklusi penelitian diberi perlakuan. Tikus dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol dengan tiga ekor tikus dan tiga kelompok perlakuan dengan masing-masing empat ekor tikus. Kelompok kontrol diinjeksi NaCl 0,9%, sedangkan kelompok perlakuan diinjeksi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 dengan dosis 100 µg/kgBB, 150 µg/kgBB, dan 200 µg/kgBB setiap 200 gram tikus. Penyuntikan diberikan secara subkutan pada daerah leher menggunakan *glass syringe luer lock* dan *needle* 23G pada hari ke 0, 21, dan 42. Penyuntikan diberikan dalam dua tahap yaitu primer dan sekunder. Suntikan primer diberikan satu kali dengan menggunakan campuran protein rekombinan dan *freud's complete adjuvant* dengan perbandingan 1:1. Suntikan sekunder diberikan dua kali dengan interval 3 minggu menggunakan campuran protein rekombinan dan *freud's incomplete adjuvant* dengan perbandingan 1:1. Kelompok kontrol diinjeksi NaCl 0,9% dengan jumlah, waktu, dan lokasi yang sama dengan kelompok perlakuan. Penggunaan *freud's complete adjuvant* pada tahap awal penting untuk memicu respons imun yang kuat, meskipun lebih reaktif dan cenderung menimbulkan reaksi yang lebih kuat di tempat suntikan, selanjutnya dilanjutkan dengan penggunaan *freud's incomplete adjuvant* yang kurang kuat dalam merangsang reaksi imun, namun lebih aman dalam pengujian lanjutan untuk memastikan efektivitas tanpa menimbulkan efek samping berlebihan.

3.7.9 Terminasi dan Pengambilan Organ

Pada hari ke-56, hewan coba diterminasi dengan menginjeksikan 40-90 mg/kgBB *ketamine* ditambah 5-10 mg/kgBB *xylazine* secara intraperitoneal (Fang *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2019). Selanjutnya, dilakukan fiksasi menggunakan jarum pada papan bedah. Organ ginjal diambil melalui prosedur pembedahan, kemudian dicuci menggunakan NaCl dan direndam dalam BNF 10% (*aquadest* 900 mL, CH₂O 40% 100 mL, NaH₂PO₄ 4 gr, dan NaH₂PO₄ 6,5gr pH 7,0).

3.7.10 Pembuatan Preparat Organ Ginjal

Preparasi organ ginjal dilakukan dengan metode parafin dan pewarnaan HE. Organ yang telah direndam BNF 10% selama 24 jam akan dilakukan proses *trimming* organ agar dapat dimasukkan ke dalam *tissue castle*. Langkah selanjutnya meliputi dehidrasi, *clearing*, dan *embedding* menggunakan *Automatic Tissue Leica TP1020* dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 100%, *xylol*, *xylol*, *xylol*, parafin dan parafin. Perendaman setiap cairan dilakukan selama 1 jam. *Embedding* jaringan dilakukan dengan *HistoCore Arcadia H Paraffin Embedding Station* yang menghasilkan blok dari preparat padat. Hasil *embedding* dipotong pada ketebalan 4-6 μm menggunakan *microtom*. Potongan ditempatkan dalam *waterbath* kemudian ditangkap dengan *object glass* dan dikeringkan pada *slide dryer*.

Preparat kemudian dideparafinasi dengan cara direndam dalam *xylol 1* dan *2* masing-masing selama 10 dan 15 menit. Preparat kemudian didehidrasi dengan etanol absolut, alkohol 95%, alkohol 70%, dan *aquadest* selama 5 menit untuk setiap cairan. Preparat kemudian di-*staining* dengan hematoksilin selama 15 menit dan dibilas dengan air mengalir selama 5 menit. Preparat ditempatkan dalam larutan alkohol asam 1% sebanyak 3 kali selama 5-10 detik dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Untuk mempertegas warna, komposisi dicelupkan 3 kali ke dalam litium karbonat selama 5-10 detik. Sediaan kemudian diwarnai dengan eosin 1% selama 10 menit dan didehidrasi dengan alkohol 70%, 95%, dan etanol absolut selama 1-3 menit untuk setiap cairan. Preparat tersebut kemudian direndam dalam *xylol 1* dan *xylol 2* selama 3-5 menit. Preparat tersebut kemudian dikeringkan dan di-*mounting* dengan entelan kemudian ditutup dengan *cover glass*.

3.7.11 Visualisasi Preparat Organ

Dalam penelitian ini, preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX23LED* dan kamera *Optilab*. Setelah itu, mikroskop dihubungkan dengan aplikasi *Obtilab* pada laptop, atur perbesaran lensa objektif menjadi 400 kali lalu fokuskan pada lapang pandang mikroskop. Simpan gambar yang diambil dengan memonitor lapangan pandang melalui layar laptop. Ketika sudah mendapatkan lapang pandang yang akan diamati, maka klik “*Snap*” dan “*Save As*”.

Foto akan diberi nama dan disimpan dalam folder yang telah ditentukan sebagai tempat penyimpanan foto. Selanjutnya mencari lapang pandang berikutnya, maka klik “MU500” pada kolom “*Camera List*”. Proses yang sama dapat diulangi ketika ingin mengambil lapang pandang lainnya.

3.7.12 Penghitungan Jumlah Sel Nekrosis

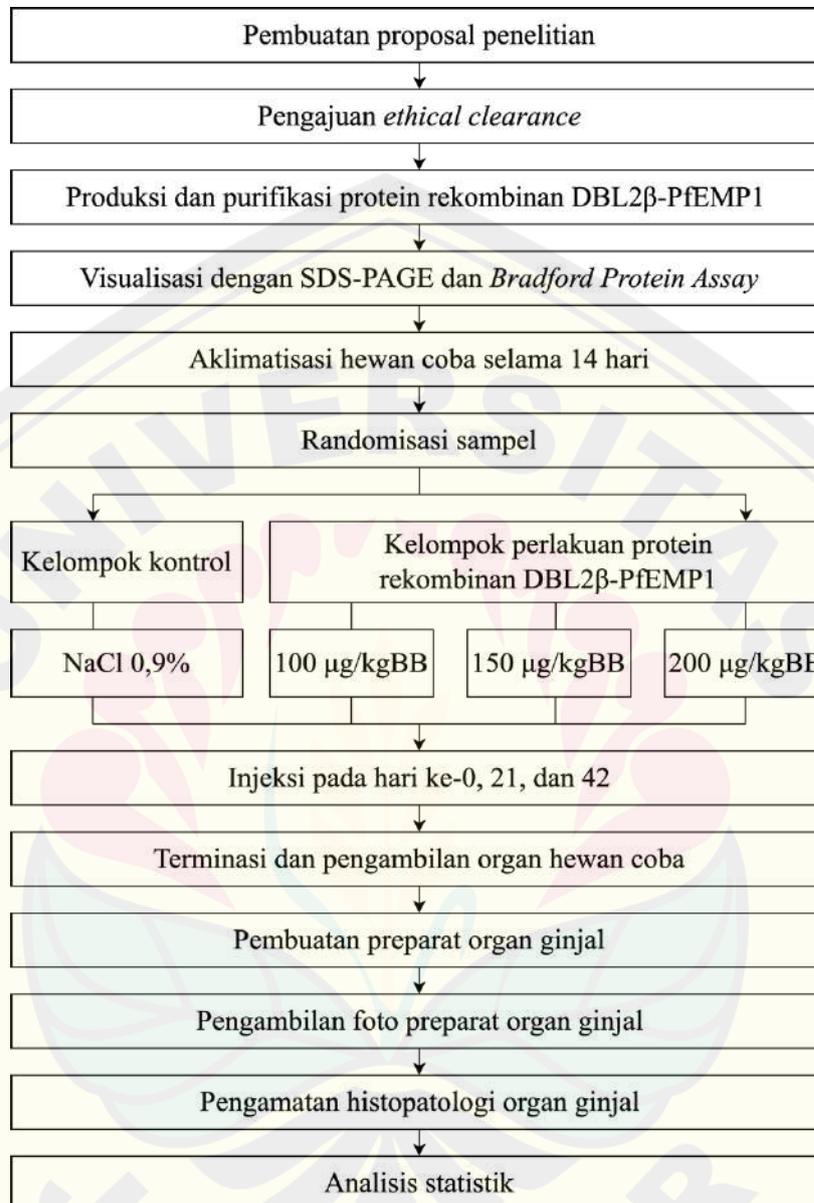
Apabila setiap preparat telah diambil 5 lapang pandang dengan metode *zig-zag* pada bagian korteks ginjal, maka langkah selanjutnya adalah melakukan penghitungan 100 jumlah sel tubulus kontortus proksimal ginjal. Pada penelitian ini yang diamati adalah nekrosis inti sel tubulus. Penghitungan ini dilakukan menggunakan aplikasi Fiji *ImageJ* untuk membentuk bilik hitung dan memberi label nomer pada 100 sel tubulus kontortus proksimal. Proses identifikasi nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Proses identifikasi dilakukan oleh dua pengamat dengan menerapkan teknik *double blind* untuk memastikan akurasi hasil pengamatan dan mencegah terjadinya bias.

3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data

Hasil data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistic 26*. Data akan diuji homogenitas dan normalitasnya. Uji homogenitas yang digunakan peneliti adalah uji *Lavene* dan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitasnya, jika nilai signifikansi $>0,05$ maka distribusi data homogen dan normal. Selanjutnya akan diuji reliabilitas data dengan menggunakan uji *Cronbach- α* , jika nilai *Cronbach- α* $>0,7$ maka data reliabel (Taber, 2018). Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji parametrik komparasi menggunakan uji *one way ANOVA*. Apabila data tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka dilakukan uji non-parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. *Confidence interval* penelitian ini adalah 95%.

3.9 Alur Penelitian

Alur penelitian ini diilustrasikan pada Gambar 3.3.



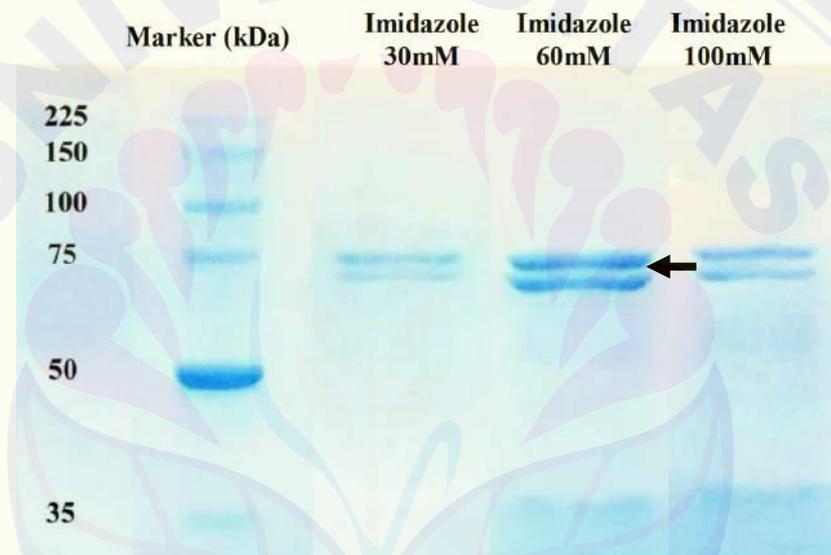
Gambar 3.3 Alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE

Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 divisualisasikan dengan SDS-PAGE untuk mengkonfirmasi keberadaan protein target yang telah dipurifikasi untuk diinjeksikan ke hewan coba. Protein target divisualisasikan sebagai pita/*band* dengan ukuran ~ 72 kDa dan selalu tampak lebih gelap pada hasil elusi 2.2 (E2.2) atau konsentrasi imidazole 60 mM. Hasil dari visualisasi protein target dapat dilihat pada Gambar 4.1.



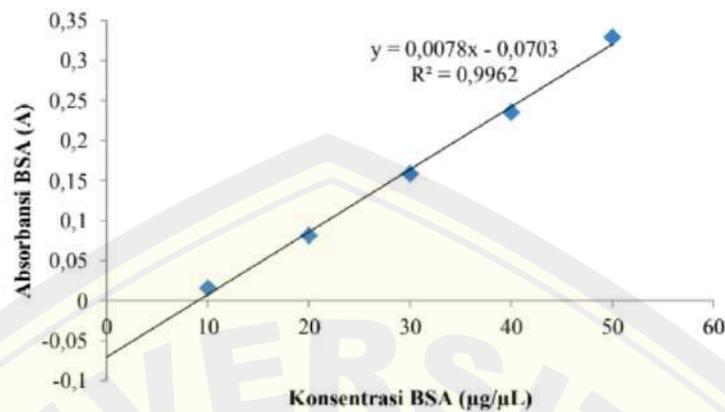
Keterangan: Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 tervisualisasi dengan *double band* paling tebal pada konsentrasi imidazol 60 mM.

Gambar 4.1 Hasil Visualisasi Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1`

4.1.2 Analisis *Bradford Protein Assay*

Analisis *Bradford protein assay* dilakukan untuk menghitung konsentrasi protein DBL2 β -PfEMP1 rekombinan yang kemudian diinjeksikan ke hewan coba. Konsentrasi ini digunakan untuk menentukan jumlah protein yang disuntikkan pada hewan coba sesuai dosis yang ditentukan, yaitu 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, dan 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$. Langkah pertama yang harus dilakukan sebelum mengukur

konsentrasi protein adalah membuat kurva standar menggunakan *bovine serum albumin* (BSA). Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kurva Standar *Bradford Protein Assay*

Persamaan yang didapat dari hasil kurva standar di atas adalah $y=0,0078x-0,0703$, dengan nilai R^2 mencapai 0,9962. Persamaan yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi protein rekombinan DBL β 2- PfEMP1 menggunakan hasil elusi konsentrasi *imidazol* 60mM. Konsentrasi DBL β 2- PfEMP1 yang diukur dari protein rekombinan tercantum sebagai pada Tabel di bawah.

Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBL β 2-PfEMP1

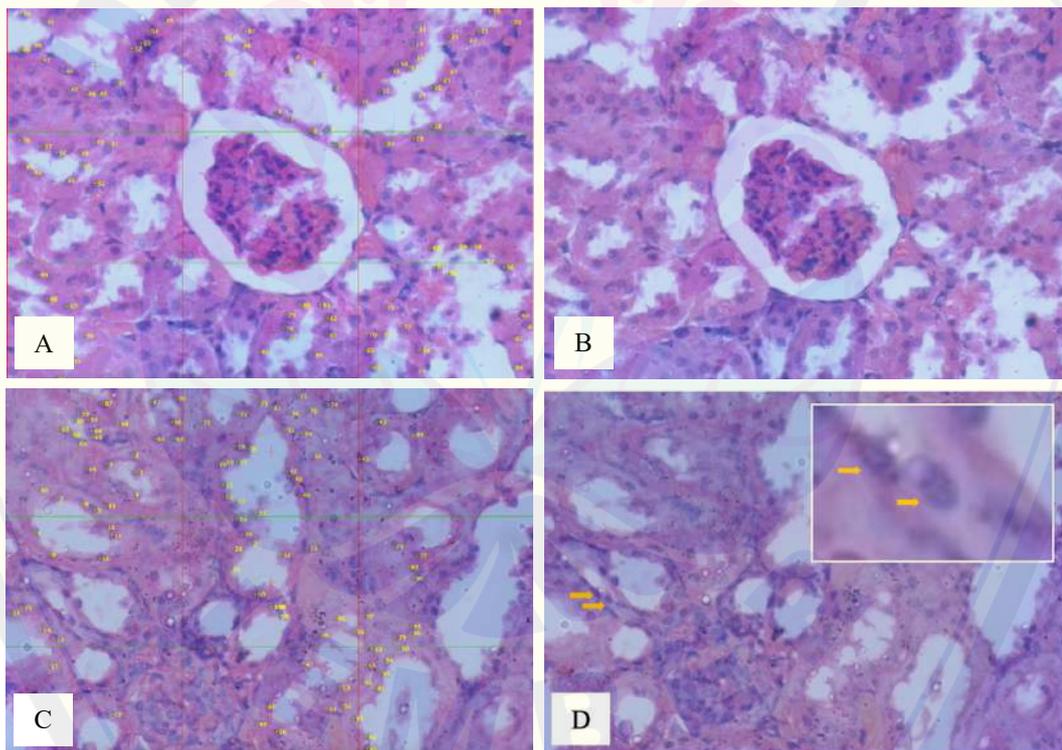
Jumlah Protein yang dimasukkan	Replikasi ke-1	Replikasi ke-2	Replikasi ke-3	Rata-rata
0 μ L (blanko)	0,46	0,463	0,47	0,464
15 μ L	0,636	0,63	0,625	0,630
15 μ L-blank (y)				0,166
	$y=0,0078x-0,0703$		$x=30,294$	
			$x/15=2,019=2\mu\text{g}/\mu\text{L}$	

Pengukuran absorbansi menggunakan reagen *Bradford* dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan diperoleh rata-rata, yaitu 0,166. Replikasi ini dimaksudkan untuk mengurangi bias dalam pengukuran absorbansi. Nilai mean yang dihasilkan dihitung sebagai variabel y pada persamaan hasil kurva standar $y=0,0078x-0,0703$. Nilai variabel x yang diperoleh dari persamaan selanjutnya digunakan sebagai

konsentrasi protein rekombinan DBL β 2- PfEMP1 yang diinjeksikan pada hewan coba, yaitu 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Sel Nekrosis

Penghitungan jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal dilakukan pasca terminasi menggunakan preparat histologi ginjal hewan coba yang diwarnai dengan *hematoxylin-eosin*. Penelitian ini menggunakan dua orang pengamat sehingga perlu dilakukan uji *Cronbach's Alpha* untuk menilai reabilitas hasil penghitungan dua pengamat. Hasil uji *Cronbach's Alpha* adalah $\text{Sig} > 0,7$ sehingga data reliabel. Hasil hitung jumlah nekrosis inti sel bisa dilihat pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.2. Pengamatan nekrosis inti sel dilakukan dengan cara menghitung 100 sel tubulus proksimal dari lima lapang pandang pada setiap preparat.



Keterangan: (A) Perhitungan sel tubulus kontortus proksimal, (B) Jaringan normal, (C) Perhitungan sel tubulus kontortus proksimal, (D) Nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal tahap karioreksis (Panah kuning)

Gambar 4.3 Gambaran histopatologi jaringan korteks ginjal hewan coba pada berbagai kelompok (Olympus CX23, 400 \times , HE).

Setelah dilakukan penghitungan jumlah nekrosis inti sel oleh pengamat satu dan dua, hasilnya akan dijumlah dan dihitung rata-ratanya. Berikut adalah tabel jumlah rata-rata nekrosis inti sel dari pengamat satu dan dua (Tabel 4.2) dan grafik rata-rata jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal perkelompok:

Tabel 4.2 Jumlah Sel Nekrosis

Kelompok	Tikus	Jumlah Nekrosis Inti Sel		
		Pengamat 1	Pengamat 2	Rata-rata
Kelompok Kontrol	1	1	0	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
Kelompok Perlakuan 1 (Dosis 100 µg)	1	1	1	1
	2	1	1	1
	3	2	2	2
	4	0	0	0
Kelompok Perlakuan 2 (Dosis 150 µg)	1	1	1	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
Kelompok Perlakuan 3 (Dosis 200 µg)	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	2	2	2
	4	2	2	2

Keterangan: Rata-rata jumlah sel nekrosis dilakukan pembulatan keatas.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan aplikasi IBM *Statistic 26*, hasil *Saphiro-Wilk* menunjukkan bahwa data jumlah nekrosis inti sel pada setiap kelompok terdistribusi tidak normal ($Sig < 0,05$) namun hasil uji *Lavene* menunjukkan bahwa data homogen ($Sig > 0,05$) (Lampiran). Hasil uji non parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p = 0,24$) (Lampiran). Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.2 Pembahasan

Hasil purifikasi menggunakan metode kromatografi afinitas pada penelitian ini, protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 ditemukan pada konsentrasi imidazol 60 mM. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dipurifikasi menggunakan metode kromatografi afinitas yang memanfaatkan *His tag protein* dan terdiri dari residu histidin. Residu histidin memiliki afinitas terhadap ion logam yang diimmobilisasi (*immobilized metal ion*), seperti nikel (Ni²⁺), dan digunakan untuk mengikat protein target rekombinan dan memisahkannya dari protein yang tidak diinginkan. Elusi *His-tagged protein* dilakukan dengan menggunakan imidazol konsentrasi tinggi. Imidazole mentransfer ikatan nikel ke protein *His tag* sehingga memungkinkan protein rekombinan keluar dari kolom purifikasi (Manns *et al.*, 2011; Rachmania *et al.*, 2021).

Hasil visualisasi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein target divisualisasikan *double band* dengan ukuran kurang lebih 72 kDa. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein hasil purifikasi pada penelitian ini merupakan protein target dari protein rekombinan DBL2 β - PfEMP1, karena berat molekulnya sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu ~72 kDa (Rachmania *et al.*, 2021). Semakin tinggi intensitas warna atau semakin gelap dan tebal *band*, maka semakin banyak pula protein yang dikandungnya. SDS-PAGE adalah metode yang menggunakan muatan listrik pada medium gel poliakrilamida dan SDS untuk mendenaturasi protein dan memisahkan makromolekul. Protein bermuatan negatif bermigrasi menuju muatan positif, dengan laju migrasi protein ditentukan oleh ukuran pori gel, tegangan, dan ukuran, muatan, dan bentuk protein. Protein yang lebih kecil berjarak lebih jauh dibandingkan protein yang lebih besar, yang lebih dekat ke titik awal. Setelah elektroforesis, gel diwarnai dengan CBB untuk memvisualisasikan protein yang terpisah dan berat molekul ditentukan dengan membandingkan jarak *band* protein target dengan protein *marker* (Manns *et al.*, 2011).

Hasil hitung konsentrasi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menggunakan metode *bradford protein assay*, yaitu sebesar 2 μ g/ μ l. Konsentrasi tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan jumlah protein yang diperlukan

untuk setiap dosis yang akan diinjeksikan pada hewan coba dengan berat badan masing-masing. Analisis *bradford protein assay* dilakukan setelah memastikan keberadaan band protein rekombinan menggunakan SDS-PAGE dan sebelum diinjeksikan pada hewan coba (Rachmania *et al.*, 2021).

Dosis protein rekombinan yang diinjeksikan pada penelitian ini adalah 100, 150, dan 200 µg/KgBB. Dosis tersebut ditentukan dari penelitian sebelumnya oleh Rachmania dkk. (2020) bahwa protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 pada dosis 150 µg bersifat imunogenik pada hewan coba karena mampu menginduksi produksi antibodi IgG spesifik dan sel limfosit T CD4+ pada hewan coba. Antibodi IgG mampu menghambat ikatan antara domain DBL2β dengan ICAM-1. Hambatan IgG pada ikatan DBL2β dengan ICAM-1 mencegah sekuestrasi dan sitoaderensi sehingga prognosis terjadinya kerusakan pada jaringan dapat dihindari. Dengan demikian protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan vaksin malaria berbasis peptida. Sebelum dilakukan uji klinis, kandidat vaksin harus melalui uji keamanan dosis yang bertujuan untuk memastikan bahwa efek farmakodinamik dan respons imun yang diinduksi pasca pemberian kandidat vaksin tidak menimbulkan dampak yang tidak diinginkan pada organ tubuh, salah satunya adalah ginjal (Gullingsrud *et al.*, 2013; Sulistyaningsih *et al.*, 2020). Pada penelitian ini dilakukan uji keamanan variasi dosis untuk mengetahui keamanan terhadap organ vital salah satunya adalah organ ginjal dengan melihat apakah terdapat gambaran histopatologi berupa nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal pasca injeksi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1.

Ginjal merupakan organ vital karena berfungsi untuk menyaring senyawa racun dari darah dan mengeluarkan sisa-sisa metabolisme melalui urin. Ginjal terdiri dari satu juta nefron yang berfungsi sebagai saringan darah yang sangat kecil. Kerusakan ginjal dapat disebabkan oleh zat toksik yang dapat diidentifikasi berdasarkan perubahan struktur histologi, salah satunya yaitu nekrosis inti sel tubular. Sel epitel tubulus proksimal pada ginjal peka terhadap anoksia dan rawan mengalami perubahan struktur akibat dari kontak langsung dengan bahan-bahan yang diekskresikan melalui ginjal. Perubahan struktur histologi ginjal ini

dipengaruhi oleh jumlah senyawa yang masuk ke dalam tubuh dan kemampuan ginjal untuk mengkonsentrasikan substansi xenobiotik di dalam sel. Jika suatu zat kimia disekresi secara aktif dari darah ke urin, zat kimia terlebih dahulu diakumulasi dalam tubulus proksimal atau jika substansi kimia ini direabsorpsi dari urin maka akan melalui sel epitel tubulus dengan konsentrasi tinggi. Sebagai akibat dari proses pemekatan tersebut, zat-zat toksik ini akan terakumulasi di ginjal dan menyebabkan kerusakan bagi ginjal (Suhita *et al.*, 2013).

Tubulus proksimal adalah bagian ginjal yang berfungsi untuk mereabsorpsi zat-zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh, seperti glukosa, asam amino, dan elektrolit. Tubulus kontortus proksimal merupakan bagian ginjal yang paling banyak dan paling mudah mengalami kerusakan pada kasus nefrotoksik. Hal ini dapat terjadi karena adanya akumulasi bahan-bahan toksik pada segmen ini dan karakter tubulus proksimal yang memiliki epitel yang rawan terjadi kerusakan akibat paparan bahan-bahan toksik, sehingga dapat disimpulkan bahwa kerusakan tubulus proksimal merupakan suatu hasil korelasi yang sangat penting antara transpor segmental tubulus dengan akumulasi, toksisitas, serta reaksi obat pada sel-sel target tubulus proksimal (Suhita *et al.*, 2013). Bentuk kerusakan sel yang terjadi pada tubulus adalah nekrosis atau kematian sel yang ditandai dengan inti piknosis, karioreksis dan kariolisis. Nekrosis adalah perubahan morfologi atau bentuk yang terjadi akibat degradasi secara progresif oleh enzim-enzim pada sel. Piknosis (nukleus mengecil) adalah kerusakan sel yang ditandai dengan inti padat mengecil, warna gelap, homogen, dan cenderung membulat. Karioreksis (nukleus pecah) adalah kondisi inti mengalami fragmentasi menjadi kecil dan tersebar ke sitoplasma. Kariolisis (nukleus menghilang) ditandai dengan inti yang sangat pudar, dan membentuk rongga. Perbedaan inti sel yang piknosis, karioreksis dan kariolisis dipengaruhi oleh seberapa lama sumbatan mikrosirkulasi terjadi. Nekrosis dapat disebabkan oleh bermacam-macam agen etiologi, di antara agen penyebabnya yaitu paparan bahan xenobiotik, gangguan metabolik, dan infeksi virus (Suhita *et al.*, 2016; Rahmah *et al.*, 2021).

Hasil hitung dari jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal pasca injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menunjukkan tidak ada

perbedaan antara pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($Sig > 0,05$). Hal tersebut mengindikasikan bahwa protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 tidak mempengaruhi jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal. Hasil yang serupa juga didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Rahmah, dkk. (2021) mengenai uji keamanan vaksin ekstrak supernatan kelenjar ludah nyamuk *An. Sundacicus* pada hewan coba yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* tidak ditemukan adanya peningkatan jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal ginjal (Rahmah *et al.*, 2021). Penelitian lain juga didapatkan hasil serupa, yaitu tidak ditemukan adanya peningkatan jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal yang diamati dalam studi keamanan vaksin SARS-Cov2 berbasis protein rekombinan (Kandeil *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian ini, pemberian protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan berbagai variasi dosis pada hewan coba yang diamati terhadap histopatologi ginjal mengindikasikan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa variasi dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada hewan coba yang diberikan aman pada organ ginjal sehingga dapat berpotensi dijadikan sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka didapatkan kesimpulan bahwa tidak terdapat gambaran histopatologi ginjal berupa nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal pasca injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) sehingga aman sebagai kandidat vaksin malaria berbasis peptida.

5.2 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini, antara lain pemeriksaan hanya dilakukan pada satu jaringan organ saja sehingga belum mempresentasikan keamanannya secara keseluruhan. Keterbatasan lainnya, yaitu pemberian variasi dosis bertingkat lain tidak dilakukan untuk mengetahui keamanan dari kandidat vaksin malaria berbasis peptida dan pewarnaan preparat histopatologi masih menggunakan *Hematoxylin-Eosin*, yang mengakibatkan sensitivitas dan spesifisitas terbatas dibandingkan dengan metode *immunohistochemistry* (IHC).

5.3 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, peneliti memberikan saran sebagai berikut:

- a. Perlu dilakukan pemeriksaan pada jaringan organ lain sehingga dapat mempresentasikan keamanannya secara keseluruhan.
- b. Perlu dilakukan uji keamanan variasi dosis bertingkat yang lain untuk mengetahui keamanan dari kandidat vaksin malaria berbasis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1.
- c. Pewarnaan preparate jaringan organ menggunakan teknik pewarnaan lain seperti *immunohistochemistry* (IHC) sehingga dapat mengidentifikasi lokasi atau letak dan jenis protein (antigen) yang berada di dalam sel-sel jaringan organ.

DAFTAR PUSTAKA

- Aji Patriawati, K., & Claudia Rambu Eda Ridja, C. (2015). *Profile of children with malaria in mambitul public health center, central sumba*. In *Certified Journal* (Vol. 6). www.ijmpronline.com
- Ali, A. H., Hassan, W. R. M., Dahari, D. E., Embi, N., Sidek, H. M., Basir, R., Agustar, H. K., & Latip, J. (2022). *Characterisation of Plasmodium berghei NK65 Infection in ICR Mice as a Severe Malarial Infection Model*. *Sains Malaysiana*, 51(10), 3481–3493. <https://doi.org/10.17576/jsm-2022-5110-29>
- Arief, Muh. I. A. E. (2020). Faktor yang berhubungan dengan kejadian penyakit malaria (studi literatur). *Jurnal sulolipu*, 20, 1–6
- Arifin, W. N., & Zahiruddin, W. M. (2017). *Sample size calculation in animal studies using resource equation approach*. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 24(5), 101–105. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>
- Arya, A., Kojom Foko, L. P., Chaudhry, S., Sharma, A., & Singh, V. (2021). *Artemisinin-based combination therapy (ACT) and drug resistance molecular markers: A systematic review of clinical studies from two malaria endemic regions-India and sub-Saharan Africa*. In *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* (Vol. 15, pp. 43–56). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.006>
- Cardenas, O., Fernandez-Zamora, F., Santana-Rodriguez, E (2021). *Safety and immunogenicity in piglets of two immunization schedules initiated at two or three weeks of age with Porvac, a classical swine fever subunit marker vaccine*. *Bionatura*, 6(3), 1896–1901. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.03.3>
- CDC. (2020, October 3). *Malaria*. *Centers for Disease Control and Prevention*. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- CDC. (2021, October 3). *Malaria's Impact Worldwide*. *Center for Disease Control and Prevention*. http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html
- Charan, J., & Kantharia, N. (2013). *How to calculate sample size in animal studies* In *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* (Vol. 4, Issue 4, pp. 303–306). <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>
- Drake, R. L., Vogl, W., Mitchell, A. W. M., & Gray, H. (2019). *Gray's Anatomy for Students*
- Eroschenko, V. P. dan M. S. H. Di Fiore (2013). *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins

- Fang, C. bo, D. xi Zhou, S. xiang Zhan, Y. He, Z. Lin, C. Huang, dan J. Li. (2013). *Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in lewis rats*. PLoS ONE. 8(4)
- Gullingsrud, J., Saveria, T., Amos, E., Duffy, P. E., & Oleinikov, A. V. (2013). *Structure-Function-Immunogenicity Studies of PfEMP1 domain DBL2 β , a Malaria Parasite Ligand for ICAM-1*. PLoS ONE, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061323>
- Hamdam, J., Sethu, S., Smith, T., Alfirevic, A., Alhaidari, M., Atkinson, J., Ayala, M., Box, H., Cross, M., Delaunois, A., Dermody (2013). *Safety pharmacology — Current and emerging concepts. Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.04.039>
- Hermard, P., Ciceron, L., Pionneau, C., Vaquero, C., Combadiere, C., & Deterre, P. (2016). *Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33786>
- Jensen, A. R., Adams, Y., & Hviid, L. (2020). *Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it*. In *Immunological Reviews* (Vol. 293, Issue 1, pp. 230–252). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12807>
- Kandeil, A., A. Mostafa, R. R. Hegazy, R. El-Shesheny, A. El Taweel, M. R. Gomaa, M. Shehata, M. A. Elbaset, A. E. Kayed, S. H. Mahmoud, (2021) *Immunogenicity and safety of an inactivated sars-cov-2 vaccine: preclinical studies*. *Vaccines*. 9(3):1–15
- Kementerian Kesehatan RI. (2019, September 3). Laporan Nasional RISKESDAS 2018 Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LBP)
- Kementerian Kesehatan RI. (2020, September 3). Tatalaksana Kasus Malaria. In Direktorat Jenderal P2P Kementerian Kesehatan. <http://www.malaria.id/p/buku-malaria.html>
- Kementerian Kesehatan RI. (2022, September 3). Profil Kesehatan Indonesia 2021. In F. Sibuea, B. Hardhana, & W. Widiyantini (Eds.), Pusdatin Kemenkes. Kementerian. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Kementerian Kesehatan RI. (2023). Informasi Malaria Tahun 2022. Web Page. <https://p2pm.kemkes.go.id/publikasi/infografis/informasi-malaria-tahun-2022>
- Ko, M. J., G. E. Mulia, dan R. M. van Rijn. (2019). *Commonly used anesthesia/euthanasia methods for brain collection differentially impact mapk*

activity in male and female c57bl/6 mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13:1–10

Maier, A. G., Matuschewski, K., Zhang, M., & Rug, M. (2019). *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 35(6), 481–482. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>

Manns, J. M. (2011). *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (sds-page) of proteins*. *Current Protocols in Microbiology*. (SUPPL. 22):1–13

Lee, W. C., Russell, B., & Renia, L. (2019). *Sticking for a cause: The falciparum malaria parasites cytoadherence paradigm*. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0144>

McQuaid, F., & Rowe, J. A. (2020). *Rosetting revisited: A critical look at the evidence for host erythrocyte receptors in Plasmodium falciparum rosetting*. In *Parasitology* (Vol. 147, Issue 1, pp. 1–11). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001288>

Nadeem, A. Y., Shehzad, A., Islam, S. U., Al-Suhaimi, E. A., & Lee, Y. S. (2022). *MosquirixTM RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy*. In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050713>

Nureye, D., & Assefa, S. (2020). *Old and Recent Advances in Life Cycle, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment of Malaria including Perspectives in Ethiopia*. In *Scientific World Journal* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/1295381>

Rachmania, S., Sulistyaningsih, E., & Ratna Dewi, A. A. I. (2021). *Recombinant DBL2 β -PfEMP1 of the Indonesian Plasmodium falciparum induces immune responses in Wistar rats*. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 16(3), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2020.12.007>

Rahmah, M. A., Adrial, A., & Yenita, Y. (2021). *Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit (Mus musculus Balb/C) yang Diinfeksi dengan Plasmodium berghei*. *Jurnal Ilmu Kesehatan Indonesia*, 2(1), 7–16. <https://doi.org/10.25077/jikesi.v2i1.301>

Sadighbayan, D., Hasanzadeh, M., & Ghafar-Zadeh, E. (2020). *Biosensing based on field-effect transistors (FET): Recent progress and challenges*. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 133). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116067>

Saleh, A. A., Saad, M. A., Ryan, I., Amin, M., Shindy, M. I., Hassan, W. A., Samir, M., Khattab, A. A., Abdelgayed, S. S., Seadawy, M. G., Fahmy, H. M., & Amer, K. (2021). *Safety and immunogenicity evaluation of inactivated whole-*

virus-SARS-COV-2 as emerging vaccine development in Egypt. Antibody Therapeutics, 4(3), 135–143. <https://doi.org/10.1093/abt/tbab012>

Samawy, E. R. M. (2013). *Morphological and Histological study of the kidneys on the Albino rats. J. Vet. Sci, 5(1).*

Sani Elbands, E., Fatriyadi, J., Fakultas Kedokteran, S., Lampung, U., Ir Sumantri Brojonegoro No, J., Meneng, G., Rajabasa, K., & Bandar Lampung, K. (2022). Faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian malaria vivax. [Http://jurnal.globalhealthsciencegroup.com/index.php/jppp](http://jurnal.globalhealthsciencegroup.com/index.php/jppp)

Sarungallo, Y. P. M., Berata, I. K., & Merdana, I. M. (2022). Pengaruh Ekstrak Kayu Secang Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit Jantan Pasca Paparan Asap Rokok Konvensional. *Buletin Veteriner Udayana, 444. <https://doi.org/10.24843/bulvet.2023.v15.i03.p13>*

Schuenke, M., E. Schulte, dan U. Schumacher. (2017). *PROMETHEUS Atlas Anatomi Manusia. Edisi 3. Buku Kedokteran EGC*

Sherwood, L. (2018). *Fisiologi Manusia: Dari Sel Ke Sistem. Edisi 9. Penerbit Buku Kedokteran EGC*

Sinha, A., Baumgarten, S., Distiller, A., McHugh, E., Chen, P., Singh, M., Bryant, J. M., Liang, J., Cecere, G., Dedon, P. C., Preiser, P. R., Ralph, S. A., (2021). *Functional Characterization of the m 6 A-Dependent Translational Modulator PfYTH.2 in the Human Malaria Parasite. <https://doi.org/10.1128/mBio>*

Sulistyaningsih, E. (2020). *Vaksin Malaria : Perkembangan generasi vaksin, kandidat protein untuk vaksin dan tantangannya (1st ed.)*. UPT Penerbitan Universitas Jember

Sulistyaningsih, E. (2022). *Protein Kandidat Vaksin Malaria (1st ed.)*. UPT Penerbitan dan Percetakan Universitas Jember

Suhita, Wayan Sudira, I., Bagus Oka Winaya, I., FKH Unud, M., farmakologi, L., & Patologi Fakultas Kedokteran, L. (2013). *Histopatologi Ginjal Tikus Putih Akibat Pemberian Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) Peroral*

Taber, K. S. (2018). *The Use of Cronbach's Alpha When Developing and Reporting Research Instruments in Science Education. Research in Science Education, 48(6), 1273–1296. <https://doi.org/10.1007/s11165-016-9602-2>*

WHO (2022, October 1). *World malaria report 2022. In World Health Organization. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/worldmalaria-report-2021>*

WHO. (2023, October 1). *WHO recommends R21/Matrix-M vaccine for malaria prevention in updated advice on immunization.*

<https://www.who.int/news/item/02-102023-who-recommends-r21-matrix-m-vaccine-for-malaria-prevention-inupdated-advice-on-immunization>

Yue, M., Taguchi, T., Bansal, M., & Chen, X. (2022). *Safety of the Salmonella enterica serotype Dublin strain Sdu189-derived live attenuated vaccine-A pilot study*

Zekar, L., & Sharman, T. (2023). *Plasmodium falciparum* Malaria. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555962/>



LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 3.1 *Ethical Clearance* Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
Jalan Kalimantan 37, Kampus TegalBoto, Jember 68121
Telepon: (0331) 324446,337877, Faksimile: (0331) 324446
Laman: fk.unej.ac.id, Email: fk@unej.ac.id, Email : kepk.fk@unej.ac.id

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL

Nomor : **4.6.7.5**./UN25.1.10.2/KE/2023

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 :

Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Pasca Injeksi Variasi Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1: Pengembangan Vaksin Malaria Berbasis Peptida

Peneliti Utama : Dhia Amanda Intan Permata
Name of the principal investigator

NIM/NIP : 202010101144

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Masa berlaku persetujuan etik ini 1 tahun

Jember, 29 November 2023

Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan



dr. Ayu Munawaroh Aziz, M.Biomed
NIP. 198903132014042002

Lampiran 3.2 Lampiran Surat Tugas Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl Kalimantan 37 Kampus Tegal Boto Jember 68121
Telepon : (0331) 324446,337877, Faksimile : (0331) 324446
Laman : fk.unej.ac.id, Email : fk@unej.ac.id

Nomor : **4543** /UN25.1.10/LT/2023
Hal : Permohonan Surat Tugas Penelitian

21 NOV 2023

Yth. Kepala LP2M
Universitas Jember
JEMBER

Menindaklanjuti permohonan surat tugas penelitian Hibah Penelitian Fundamental Reguler (PFR) dosen dan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dengan Judul : " Uji pre-klinis Keamanan Kandidat Vaksin Malaria Berbasis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Isolat Indonesia ", maka bersama ini kami mohon dengan hormat dapatnya diterbitkan surat tugas bagi kelompok penelitian tersebut, atas nama :

No	Nama/NIP/NIM	Keterangan
1.	Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyarningsih, M.Si., GCertAgHealthMed. 197702222002122001	Ketua
2.	Prof. Susan A. Brumby	Anggota
3.	Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes. 196902031999031001	Anggota
4.	dr. Rosita Dewi, M.Biotek. 198404282009122003	Anggota
5.	dr. Sheilla Rachmania, M.Biotek. 199010122015042001	Anggota
6.	dr. Irawan Fajar Kusuma, M.Sc., Sp.PD. 198103032006041003	Anggota
9.	Nisrina Hana Aziza 202010101056	Anggota
10.	Dhia Amanda Intan Permata 202010101144	Anggota
11.	Nindya Audatus Sa'diyah 202010101145	Anggota
12.	Nafisah Hani Asyifah Rahma 202010101155	Anggota

Demikian, atas perhatian dan kerja sama yang baik kami ucapkan terima kasih.

Dekan



dr. Ulfa Elifah, M.Kes., Sp.BP-RE., Subsp.L.B.L.(K)
NIP 197607192001122001

Lampiran 3.3 Protokol Aklimatisasi Hewan Coba

Hewan coba dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama 14 hari sebelum dilakukan perlakuan. Aklimatisasi ini dilakukan agar hewan coba dapat beradaptasi terlebih dahulu pada lingkungan barunya. Protokol aklimisasinya adalah sebagai berikut:

1. Hewan coba diletakkan di dalam kandang, 1 kandang berisi 2 ekor tikus.
2. Kandang berupa bak plastik dengan ukuran 40 cm x 30 cm x 15 cm dengan penutup kandang berupa anyaman kawat dan alas bak dilapisi serabut kayu untuk menyerap urin tikus dan menjaga kelembapan.
3. Serabut kayu diganti setiap hari agar kondisi kandang tidak bau dan tetap terjaga kebersihannya.
4. Ruangan aklimatisasi dilengkapi dengan AC untuk menjaga suhu ruangan 24°C - 28°C, kelembapan 50% - 70%, dan *exhausted fan* untuk mengeluarkan udara di dalam ruangan dan mengurangi bau amoniak.
5. Hewan coba diberikan pakan berupa pelet dengan takaran 30-35 gram per hari atau 10% dari BB hewan coba dan minum dengan takaran 30-35 mL per hari.
6. Minuman hewan coba menggunakan air mineral yang dimasukkan dalam tempat minum tikus 250 mL dan selalu diisi ulang saat air mineral habis.
7. Setelah 14 hari tikus diaklimatisasi maka tikus siap untuk diberikan perlakuan oleh peneliti.

Lampiran 3.4 Protokol *Handling* Hewan Coba

Selama proses penelitian, hewan coba harus diperlakukan dengan tepat salah satunya adalah teknik *handling* yang baik. Langkah *handling* hewan coba adalah sebagai berikut:

1. Tikus dikeluarkan dari kandang dengan mengangkat tikus di pangkal ekor menggunakan tangan kanan lalu biarkan tikus mencengkeram kawat penutup kandang.
2. Luncurkan tangan kiri dari daerah punggung ke arah kepala tikus.
3. Letakkan tengkuk tikus di antara jari telunjuk dan jari tengah tangan kiri.

4. Letakkan ibu jari, jari manis, dan kelingking tangan kiri di sekitar perut tikus.

Lampiran 3.5 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba

Kelompok	Hewan Coba	Sebelum Aklimatisasi (g)	Sesudah Aklimatisasi (g)	Saat Injeksi Primer (g)	Saat Injeksi Sekunder 1 (g)	Saat Injeksi Sekunder 2 (g)
Kelompok Kontrol	1	128	121	150	167	208
	2	133	144	182	195	223
	3	127	126	177	177	205
Kelompok Perlakuan 1 (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$)	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 2 (Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$)	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 3 (Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$)	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 3.6 Hasil Penghitungan Dosis Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1

Kelompok	Hewan Coba	Penghitungan Dosis $\frac{\text{Berat tikus}}{\text{BB ideal}} \times \text{Dosis target}$	Dosis (μg)	Jumlah Protein yang Diinjeksikan (μl)
			Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
Kelompok Perlakuan 1 (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	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 2 (Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	5	$\frac{195}{200} \times 150 = 146,25$	$\frac{146,25}{2}$	73,125
	6	$\frac{182}{200} \times 150 = 136,5$	$\frac{136,5}{2}$	68,25
	7	$\frac{191}{200} \times 150 = 143,25$	$\frac{143,25}{2}$	71,625
	8	$\frac{200}{200} \times 150 = 150$	$\frac{150}{2}$	75
Kelompok Perlakuan 3 (Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	9	$\frac{200}{200} \times 200 = 200$	$\frac{200}{2}$	100
	10	$\frac{178}{200} \times 200 = 178$	$\frac{178}{2}$	89
	9	$\frac{234}{200} \times 200 = 134$	$\frac{134}{2}$	117
	10	$\frac{197}{200} \times 200 = 197$	$\frac{197}{2}$	98,5

Lampiran 3.7 Protokol Injeksi Hewan Coba

Injeksi pada tikus dilakukan secara subkutan menggunakan *glass syringe luer lock* dengan jarum berukuran 21G. Langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Protein rekombinan dicampur dengan *Complete Freund's Adjuvant* dengan perbandingan 1:1
2. Letakkan tikus di atas meja tindakan.
3. Telapak tangan kiri memegang daerah punggung tikus dengan ibu jari dan jari telunjuk mencubit kulit daerah tengkuk tikus.
4. Tangan kanan memegang *glass syringe luer lock* dan jarum disuntikkan ke bagian lipatan kulit tengkuk tikus secara cepat.
5. Lepas/ tarik jarum dari kulit tengkuk tikus secara perlahan.

Lampiran 3.8 Protokol Terminasi dan Pembedahan Ginjal Hewan Coba

Terminasi hewan coba dilakukan pada hari ke-14 setelah injeksi protein rekombinan. Terminasi dilakukan menggunakan *ketamine-xylazine*. Langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Letakkan tikus di meja tindakan.
2. *Ketamine* (75-90 mg/KgBB) dan *xylazine* (5-10 mg/KgBB) diambil menggunakan *glass syringe luer lock* lalu disuntikkan secara intraperitoneal pada tikus.
3. Tunggu hingga tikus sudah tidak bergerak lalu letakkan tikus di atas papan fiksasi dengan posisi telentang. Pastikan tikus telah mati dengan diamati selama 15 detik dan lakukan tes nyeri menggunakan pinset.
4. Ginjal tikus diambil dan direndam di larutan BNF 10%.

Lampiran 3.9 Protokol Pemusnahan Hewan Coba

1. Pastikan hewan coba tidak mengalami *recovery* setelah dieuthanasia.
2. Pakailah sarung tangan, pakaian yang menutupi kulit, dan gunakan sekop untuk mengumpulkan hewan coba yang telah mati.
3. Lakukan pembakaran dan penguburan hewan coba di sekitar area penelitian.

4. Lokasi penguburan hewan coba harus memenuhi syarat sebagai berikut:
 - a. Jarak lokasi penguburan minimal 300 meter dari bangunan atau tempat umum (jauh dari masyarakat umum).
 - b. Pemakaman dangkal dengan kedalaman 30-45 cm.
 - c. Lokasi penguburan pada lahan yang ditinggikan dengan kemiringan <math>< 5\%</math>.
 - d. Jika lokasi penguburan tidak memiliki karakteristik di atas, maka lubang pemakaman harus dilapisi untuk mengurangi kemungkinan mencemari air.
5. Setelah selesai proses pemusnahan hewan coba, peneliti cuci tangan dan peralatan yang telah digunakan.

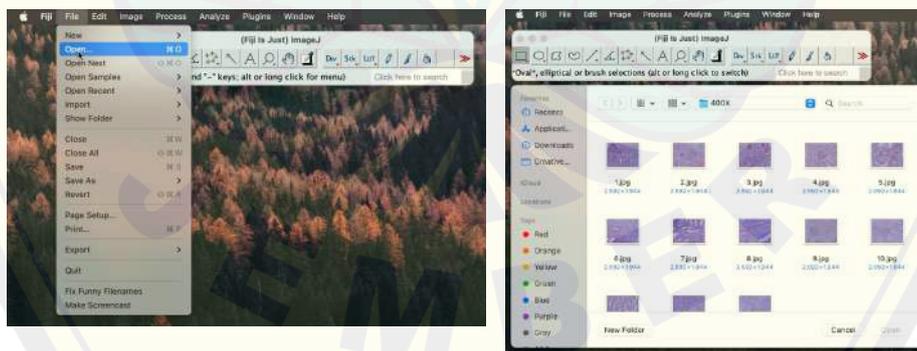
Lampiran 3.10 Protokol Penghitungan Jumlah Nekrosis Inti Sel

a. Prosedur Kalibrasi

- 1) Buka aplikasi Fiji ImageJ, hingga keluar seperti dibawah ini.

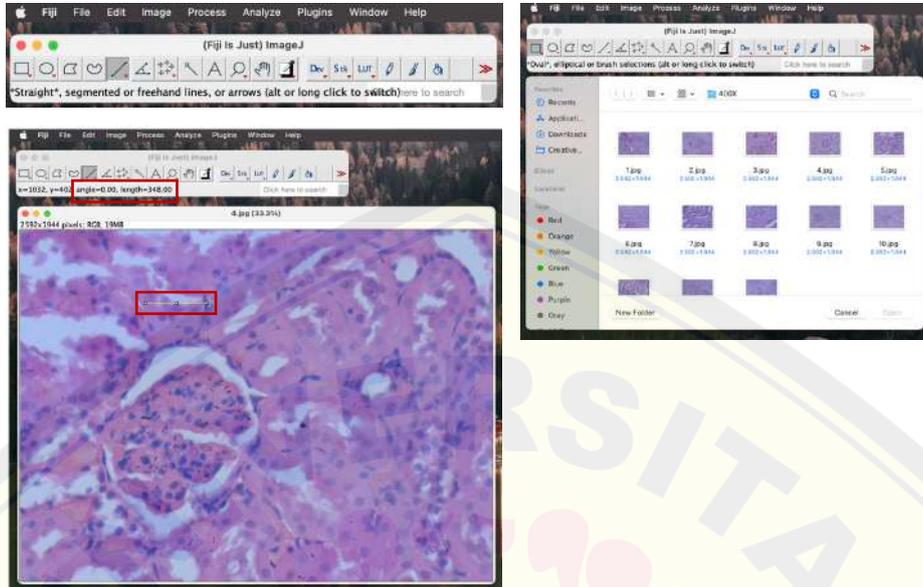


- 2) Buka gambar yang akan dilakukan analisa, dengan klik *File >> Open >>* pilih gambar yang akan dianalisis >> *Open*.

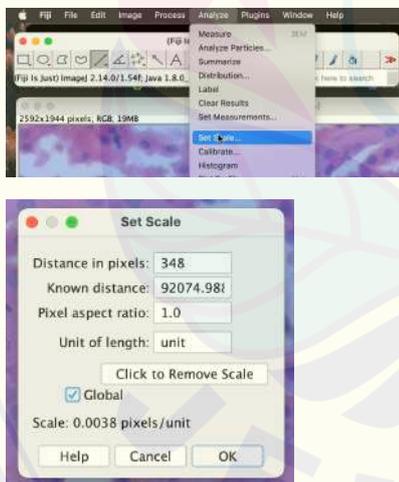


- 3) Lakukan kalibrasi dengan cara klik menu yang berbentuk garis >> tarik garis lurus sudut 0° di gambar dengan ukuran bebas >> lihat panjang garis dalam pixel >> *convert* ke satuan μm (convert di google). Ex. Pada

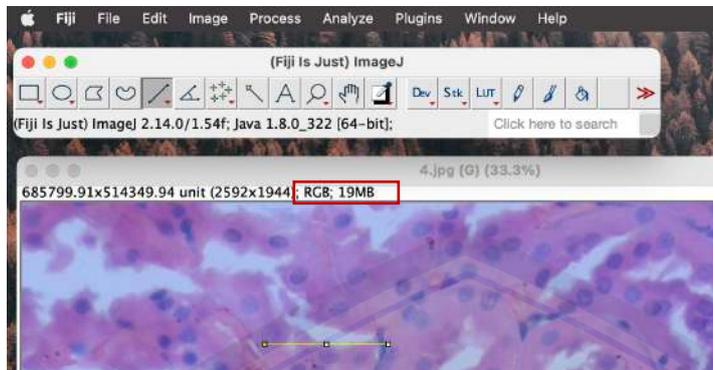
gambar panjang garis adalah 348,00 pixel bila di convert menjadi 92074,9884 μm .



- 4) Setelah itu klik “*Analyze*” >> *Set Scale* >> masukkan hasil convert ke μm pada bagian “*Known distance*” >> Ubah satuan di bagian “*Unit of length*” menjadi μm >> Centang kolom “*Global*” >> klik “*Ok*”.

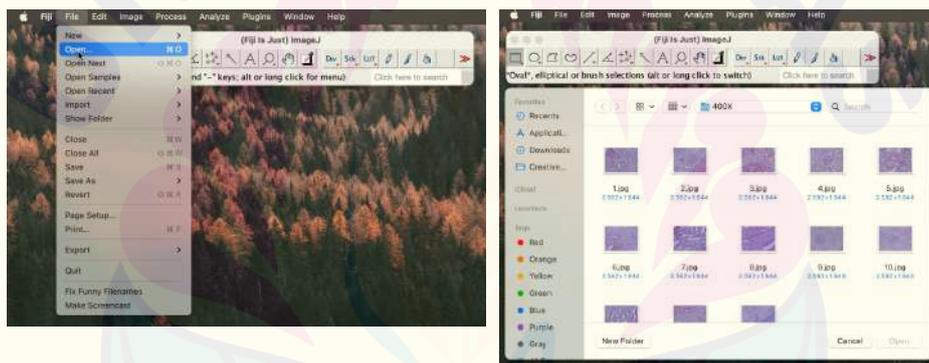


5) Proses kalibrasi sudah selesai.



b. Prosedur Pembuatan Bilik Hitung

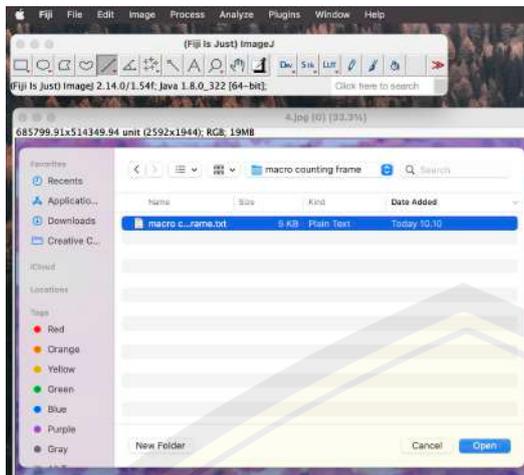
1) Buka aplikasi Fiji ImageJ >> klik “File” >> “Open” >> Pilih gambar yang akan di pasang bilik hitung >> klik “Open”.



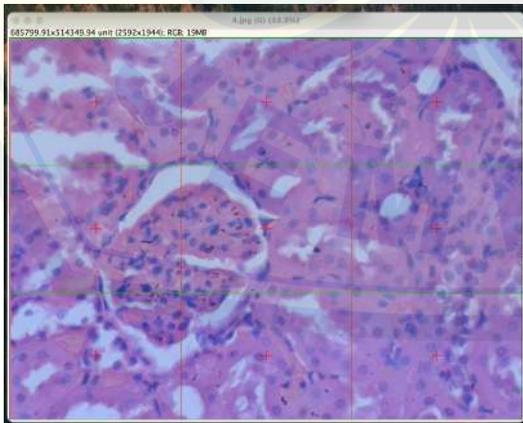
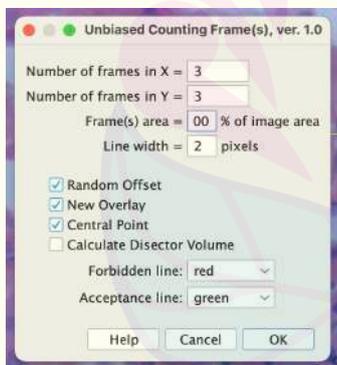
2) Lakukan proses kalibrasi dengan prosedur diatas apabila belum dilakukan kalibrasi, apabila sudah maka tidak perlu melakukan lagi.

3) Untuk memasang bilik hitung, klik menu “Plugins” >> “Macros” >> “Run...” >> buka folder tempat menyimpan file “macro counting frame” >> pilih file >> klik “Open”.

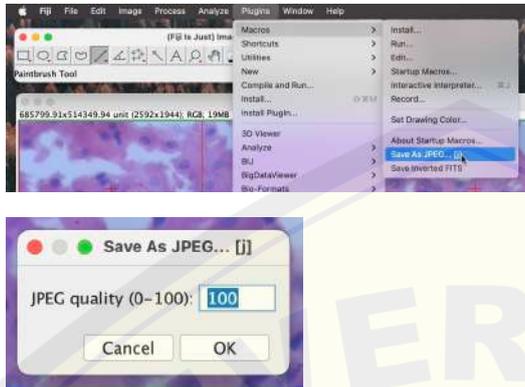




- 4) Kemudian akan terbuka seperti gambar dibawah, lakukan penyesuaian jumlah bilik hitung yang diinginkan pada menu “*Number of frame in X*” dan “*Number of frame in Y*”. Setelah itu pada bagian “*Frame(s) area*” diubah menjadi 100% agar semua lapang pandang terpasang bilik hitung. “*Line width*” bisa diubah sesuai keperluan. Setelah klik “*Ok*” akan keluar seperti dibawah ini.



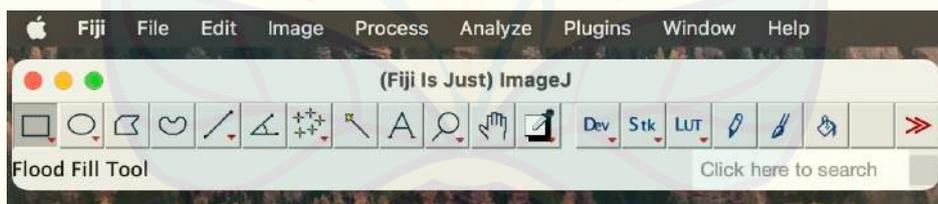
- 5) Untuk menyimpan gambar yang sudah ada bilik hitung, klik “*Plugins*” >> “*Macros*” >> “*Save Image As JPEG...*” >> pada kotak dialog penyesuaian bisa diisi 100 >> klik “*OK*”.



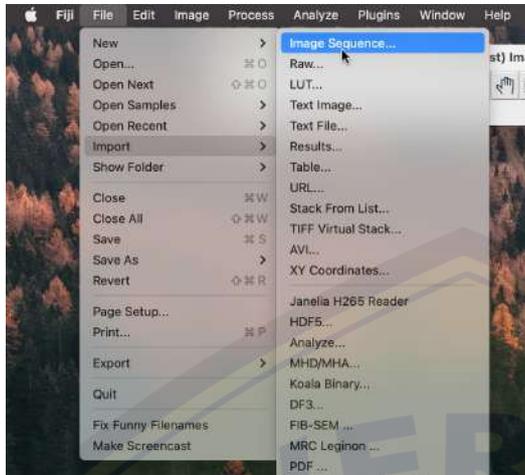
- 6) Proses pemasangan bilik hitung sudah selesai. Gambar asli dan gambar dengan bilik hitung diletakkan pada satu folder, gambar dengan bilik hitung diberi nomor 1 sedangkan gambar asli nomor 2.

c. Prosedur Penghitungan Jumlah Sel

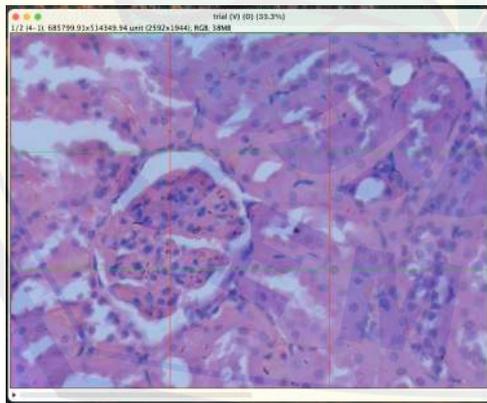
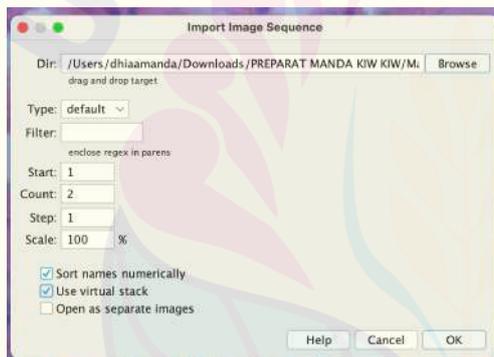
- 1) Susun semua pasangan *dissector* dalam satu folder dan dinamakan sesuai urutannya, misal 1 dan 2.
- 2) Buka Fiji ImageJ.



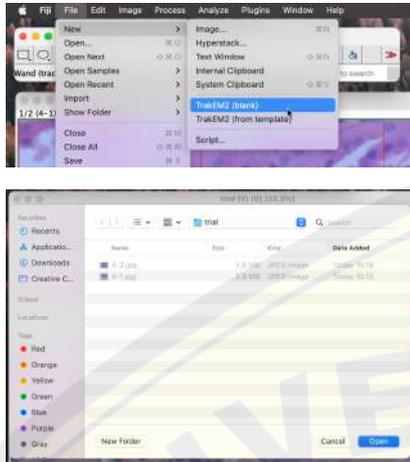
3) Klik “File” >> “Import” >> “Image Sequence”.



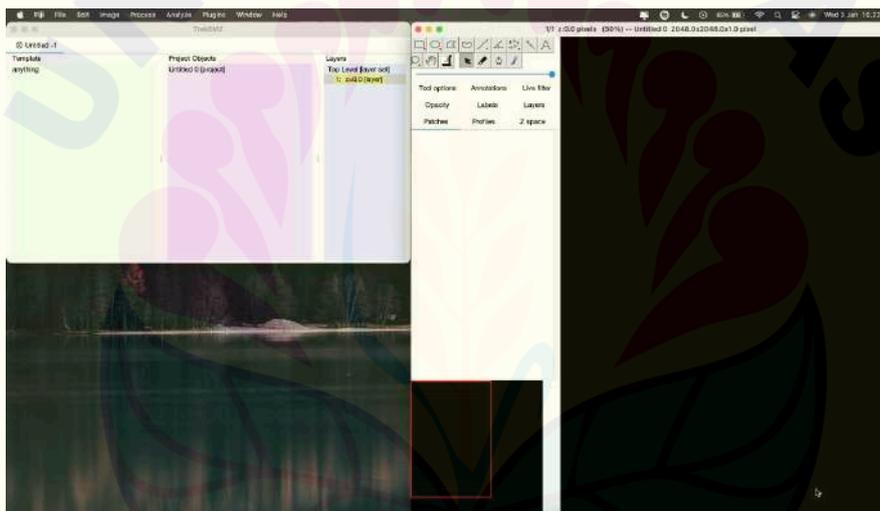
4) Pilih folder yang sudah disusun, dengan klik “Browse” >> pilih folder >> “Open” >> centang pada bagian “Sort Names Numerically” dan “Use Virtual Stack” >> “Ok”. Setelah itu akan terbuka jendela seperti dibawah.



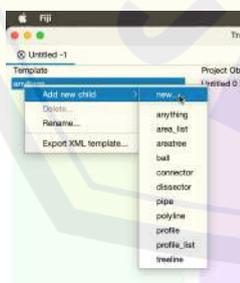
- 5) Klik “File” >> “New” >> “TrakEM2 (blank)” >> pilih folder yang akan diolah >> “Open”.



- 6) Kemudian akan terbuka jendela seperti dibawah.

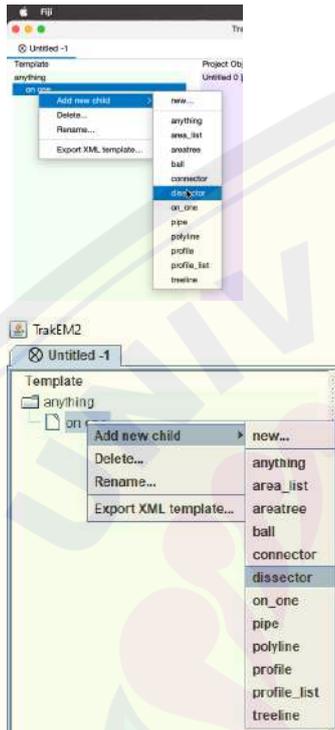


- 7) Pada kolom template TrakEM2, klik kanan pada bagian “anything” >> “Add new child” >> “New”. Beri nama “On One” >> “Ok”.





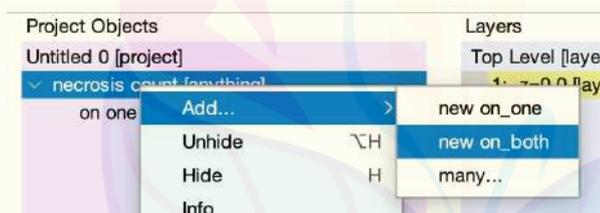
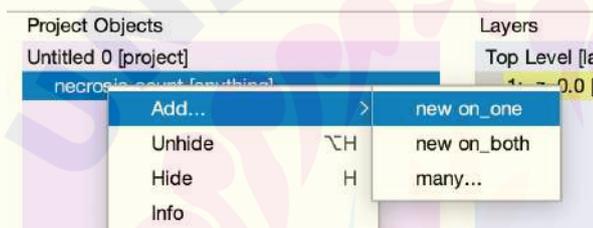
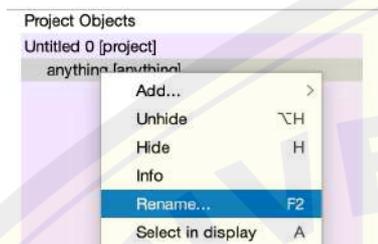
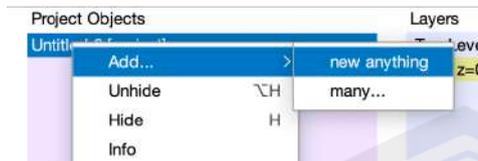
8) Klik kanan pada bagian “On One” >> “Add new child” >> “Dissector”.



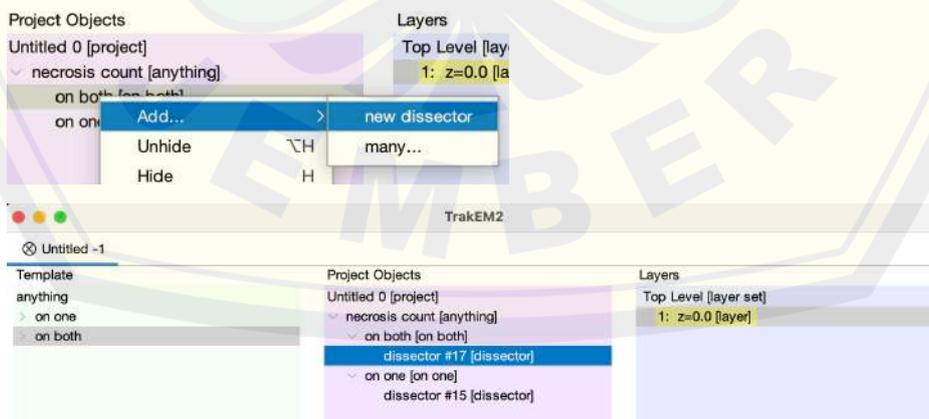
9) Ulangi langkah nomor 8 dan 9, beri nama “On Both”. Tampilan akan menjadi seperti ini.



- 10) Klik kanan pada *Project Objects* >> “Add...” >> “New Anything” >> ubah nama menjadi “*necrosis count*” >> klik kanan pada neuron count >> “Add...” >> “On One”. Ulangi langkahnya dan pilih “On Both”.



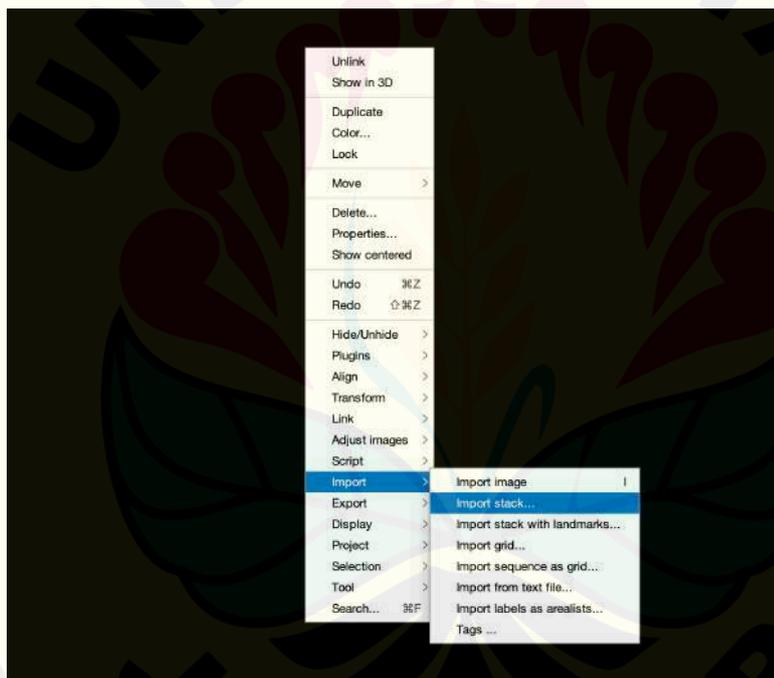
- 11) Klik kanan pada bagian “On One” dan “On Both” >> “Add...” >> “New Dissector”. Rename objek dissector menjadi On One dan On Both.



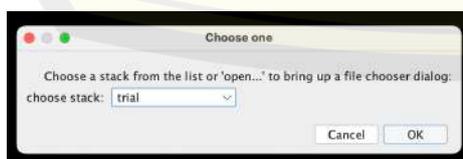
- 12) Pada jendela Image Processing akan muncul objek dissector #17 dan #15.

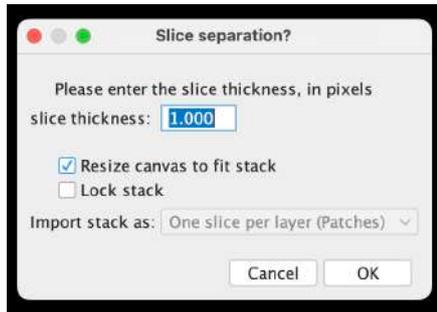


- 13) Klik kanan pada “Image Processing” >> “Import” >> “Import stack”.

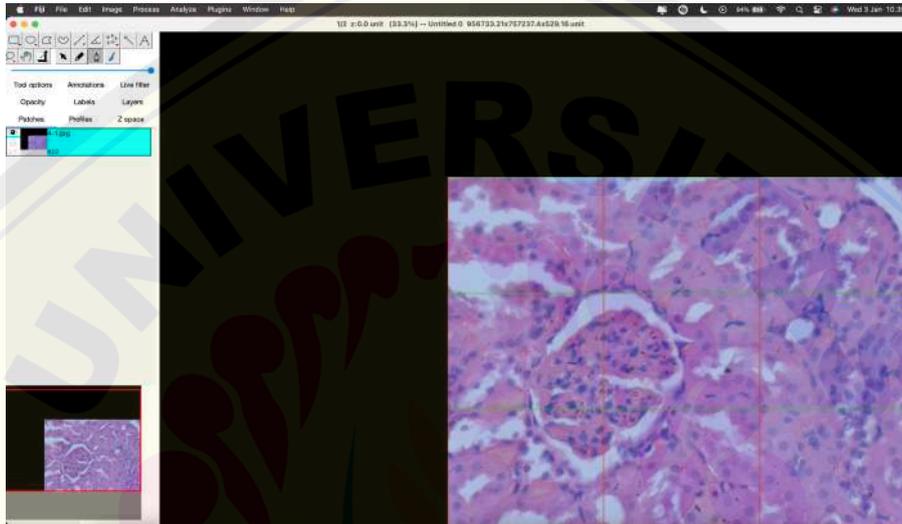


- 14) Akan muncul seperti gambar dibawah, kemudian pilih folder yang diinginkan. Klik “Ok” >> muncul kolom selanjutnya dan klik “Ok” tanpa memasukkan “Slide Thickness”.

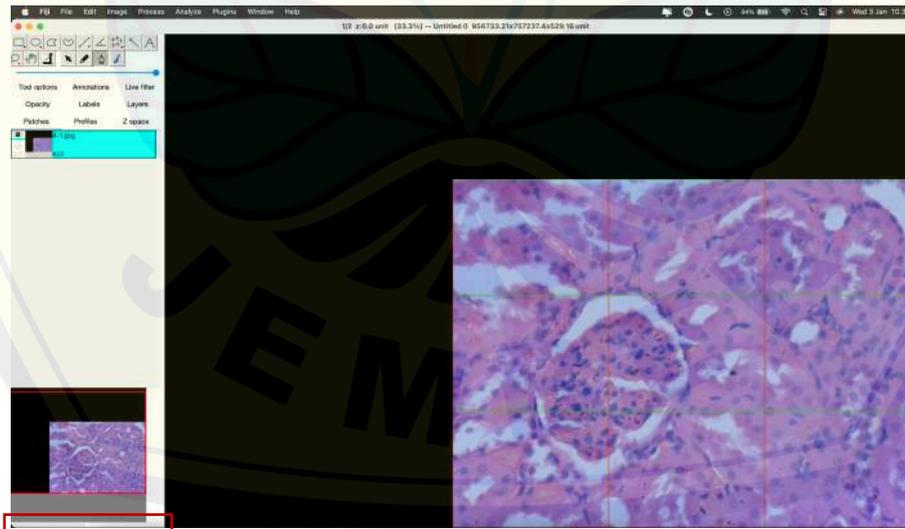




15) Kemudian akan keluar gambar pada *Image Processing*.

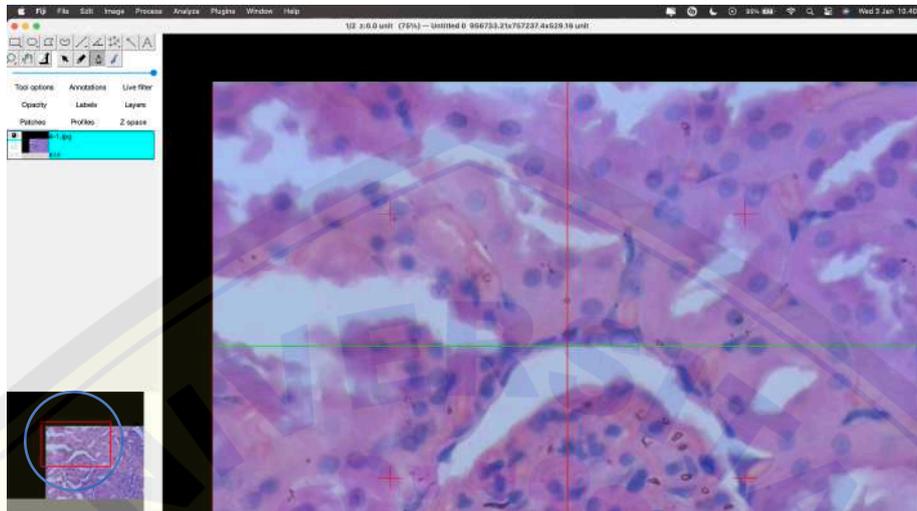


16) Untuk pindah dari gambar pertama ke gambar kedua maka geser ke kanan atau kiri *navigation bar* di pojok kiri bawah.



17) Beberapa cara untuk navigasi:

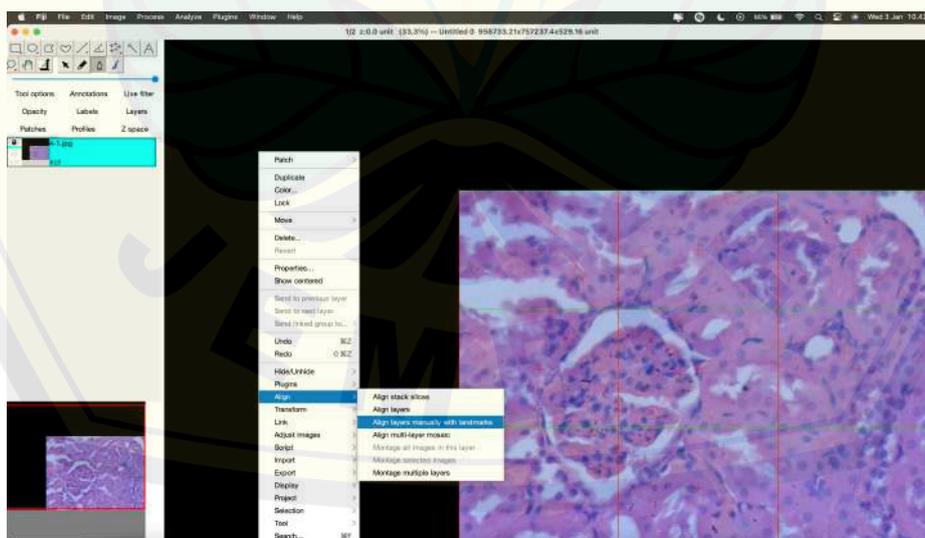
Menggeser lapang pandang, maka “*drag*” kotak berikut ke lokasi yang diinginkan.



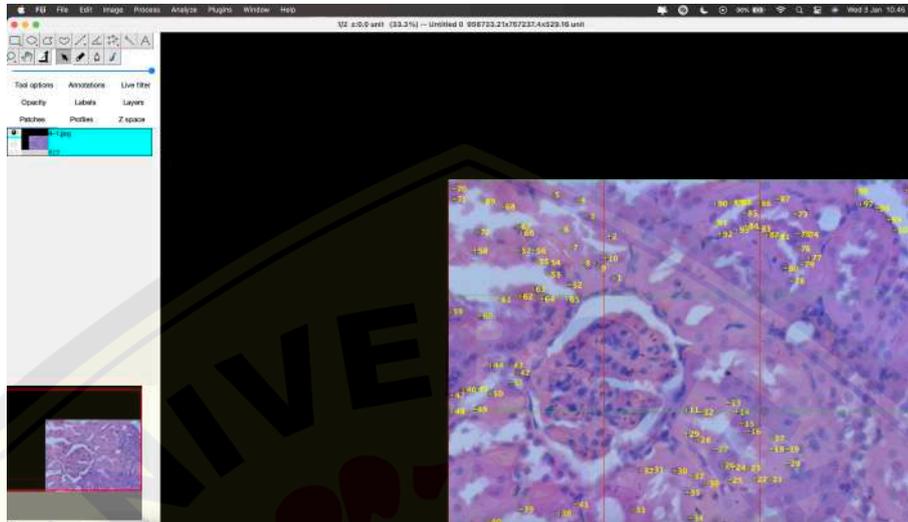
Zoom in, maka klik tombol “+” pada *keyboard*.

Zoom out, maka klik tombol “-” pada *keyboard*.

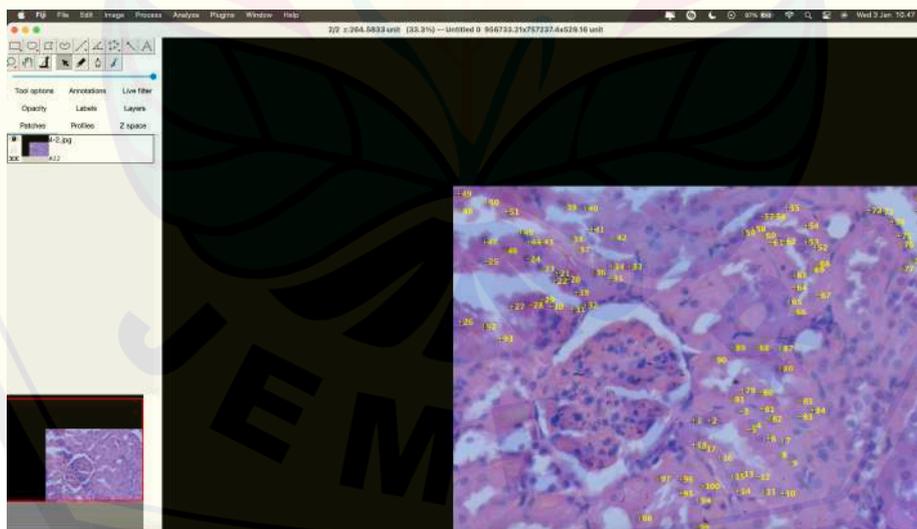
18) Selanjutnya lakukan penyesuaian posisi gambar pertama dan gambar kedua atau sebaliknya untuk memastikan gambar benar-benar bertumpuk. Klik kanan >> “*Align*” >> “*Align layers manually with landmarks*”.

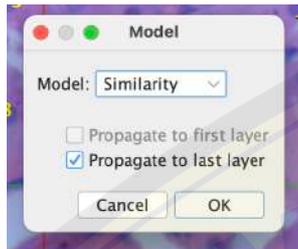


- 19) Tentukan titik pada struktur (*ex.* Sel tubulus kontortus proksimal) pada gambar pertama dengan klik kiri pada objek tersebut, kemudian akan keluar titik kuning dengan angka seperti pada gambar.

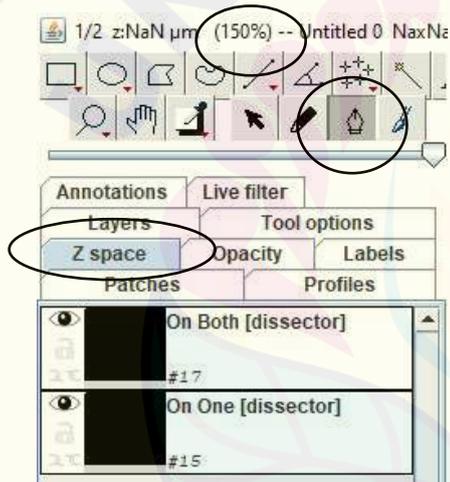


- 20) Kemudian pindah ke gambar kedua, lakukan hal yang sama. Pastikan lokasi dan urutan titik yang dipilih sesuai dengan gambar pertama. Setelah yakin dengan posisi titik maka klik kanan >> “Apply transform” >> setelah muncul kotak pada kolom “Model” pilih “Similarity” >> klik “Ok”.

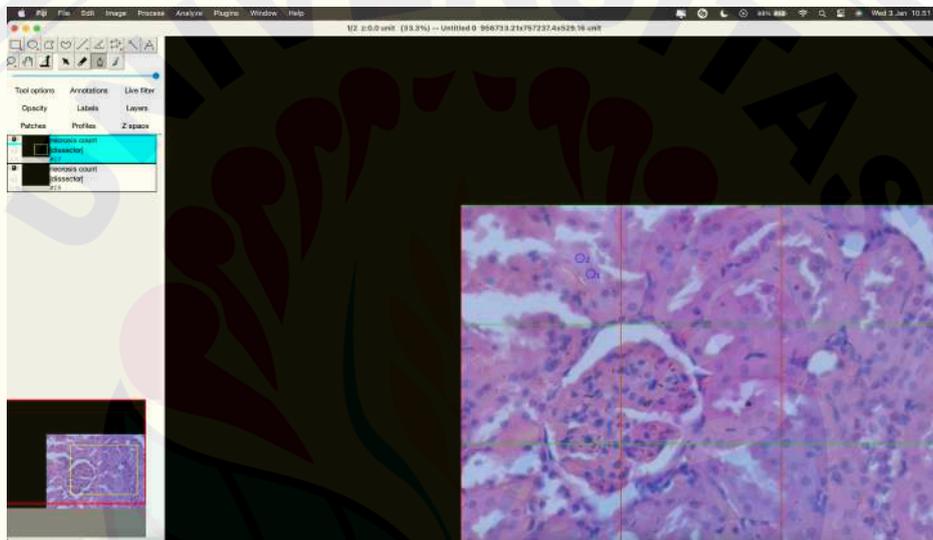
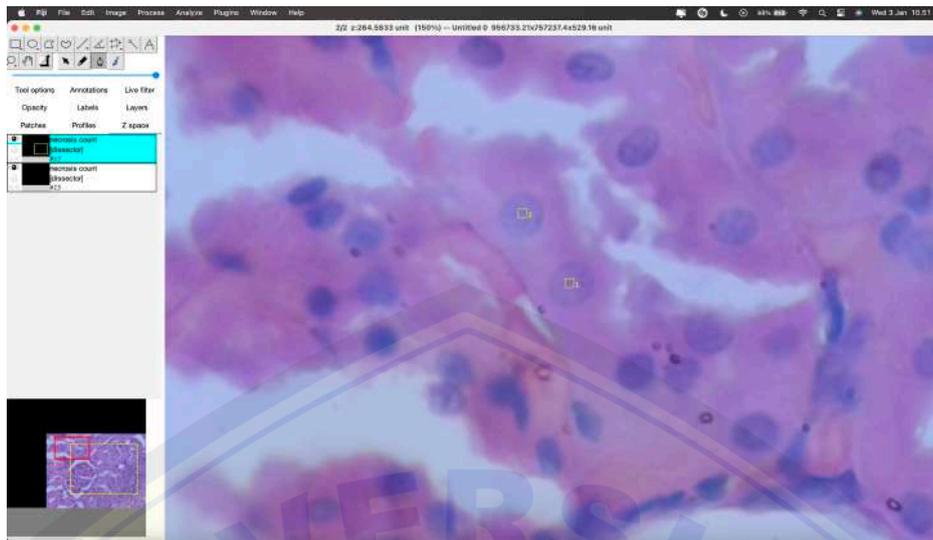




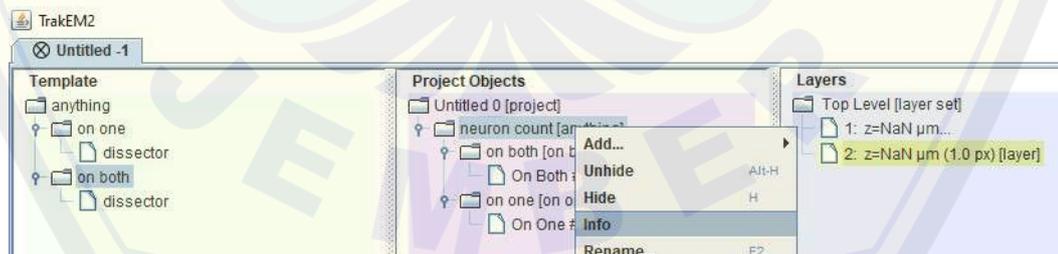
21) Zoom in hingga 150% >> klik pada tab “Z-space” >> klik ikon pada toolbar.



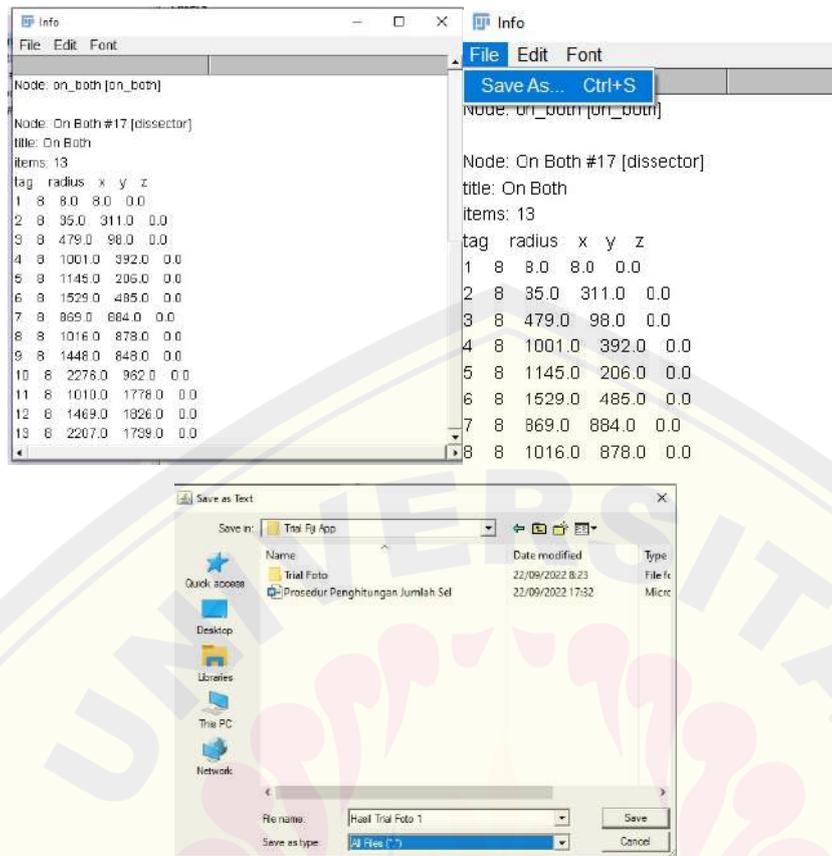
22) Kemudian mulai tandai sel yang diinginkan, klik pada objek “On Both” apabila sel terlihat pada gambar pertama maupun kedua. Jika sel tubulus kontortus proksimal hanya terdapat pada salah satu gambar maka klik pada objek “On One”.



23) Untuk melihat hasil perhitungan buka jendela “*template*” >> klik kanan pada objek “*Anything*” >> “*Info*”.



24) Kemudian akan muncul jendela info yang berisi hasil perhitungan yang telah dilakukan. File bisa disimpan dengan format “.txt” sehingga bisa dibuka dengan *software* seperti *notepad*, atau *Microsoft Word*.



25) Prosedur penghitungan jumlah sel sudah selesai. Ulangi langkah 1-25 pada semua pasangan disektor.

Lampiran 3.11 Hasil Uji Statistik Nekrosis

a. Uji normalitas *Saphiro-Wilk*

Tests of Normality

Jumlah Nekrosis	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	Kelompok Kontrol	.385	3	.	.750	3	.000
	Kelompok Perlakuan Dosis 100 ug/KgBB	.250	4	.	.945	4	.683
	Kelompok Perlakuan Dosis 150 ug/KgBB	.441	4	.	.630	4	.001
	Kelompok Perlakuan Dosis 200 ug/KgBB	.307	4	.	.729	4	.024

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas *Lavene*

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Nekrosis		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
	Based on Mean	1.224	2	11	.331
	Based on Median	.435	2	11	.658
	Based on Median and with adjusted df	.435	2	9.393	.660
	Based on trimmed mean	1.171	2	11	.346

c. Uji Non-Parametrik *Kruskal Wallis*

Test Statistics^{a,b}

	Protein_rekombinan
Kruskal-Wallis H	1.389
df	1
Asymp. Sig.	.239

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Nekrosis

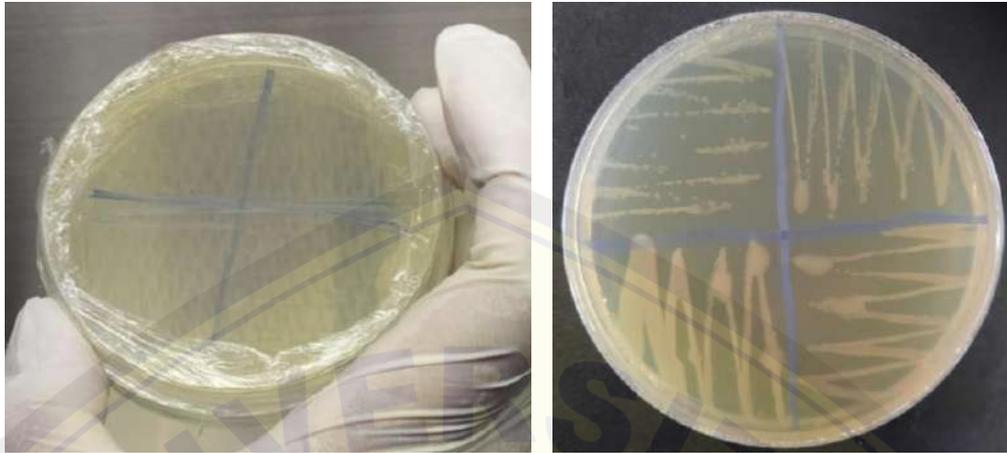
d. Uji Reabilitas *Cronbach-α*

Reliability Statistics

Cronbach's Alpha	N of Items
.975	2

Lampiran 3.12 Dokumentasi Penelitian

a. Penumbuhan bakteri



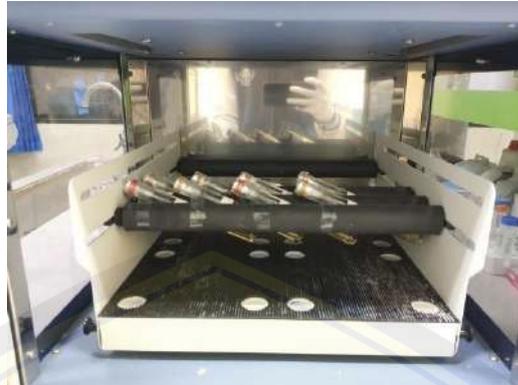
Pertumbuhan koloni bakteri transforman *E.coli* strain BL21 (DE3) dari stok gliserol pada media LB padat

b. Pembuatan media LB cair



Pembuatan media LB cair pada tabung erlenmeyer

c. Proses pembuatan *starter* kultur



Inkubasi *starter* kultur selama 16 jam di dalam *shaker incubator* bersuhu 37 °C dengan kecepatan 160 RPM

d. Pemindahan *starter* kultur ke tabung erlenmeyer



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

e. Sentrifugasi



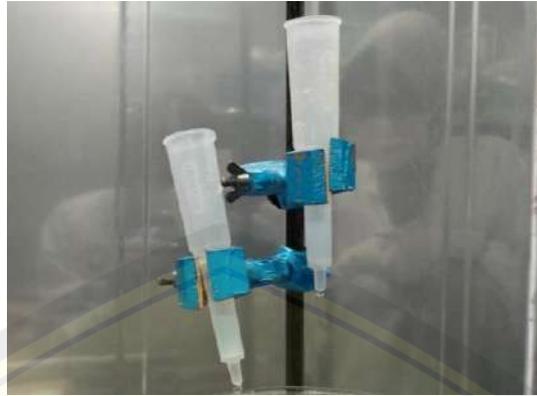
Proses sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4°C.

f. Ekstraksi protein rekombinan



Proses ekstraksi protein rekombinan menggunakan sonikator (*output 3, duty cycle 30*) dengan durasi 40 detik dan *resting time* 80 detik sebanyak 18-20 siklus.

g. Purifikasi protein rekombinan



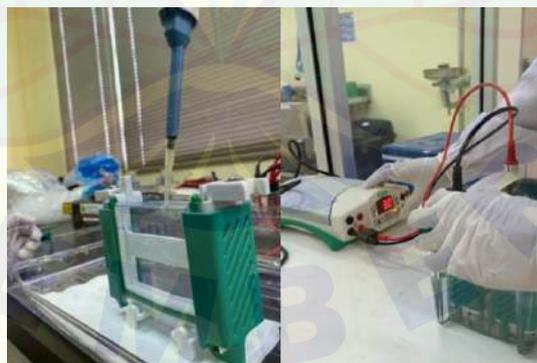
Proses purifikasi protein rekombinan dengan metode kromatografi afinitas

h. Penyimpanan protein rekombinan



Penyimpanan hasil purifikasi protein rekombinan di dalam *freezer* $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

i. Elektroforesis dengan SDS-PAGE

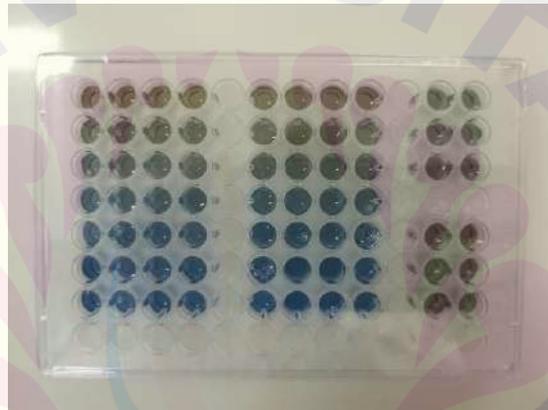


Proses *running* SDS-PAGE dengan voltase 50 V selama 1 jam untuk *stacking/upper gel* dan 80 V selama 3 jam untuk *separation/lower gel*



Proses *staining* atau pewarnaan gel dengan menggunakan *Coomassie BrilliantBlue* (CBB) selama 45-60 menit

j. Pengukuran konsentrasi protein rekombinan



Proses pembuatan kurva standar *bradford protein assay* menggunakan *BovineSerum Albumin* (BSA)



Proses pengukuran konsentrasi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1

k. Perlakuan pada hewan coba



Aklimatisasi hewan coba di dalam kandang plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 13cm yang alasnya diberi serbuk kayu (sekam) selama 14 hari



Proses injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 (kelompok perlakuan) dan NaCl 0,9% (kelompok kontrol) secara subkutan pada hewan coba



Proses terminasi hewan coba pada hari ke-56 pasca imunisasi primermenggunakan kombinasi *ketamine-xylazine*



Pembedahan hewan coba

1. Organ ginjal hewan coba



m. Pembuatan preparat histologi



n. Proses penghitungan jumlah nekrosis inti sel tubulus kontortus proksimal

