

Deteksi Protein 270 kDa *Plasmodium falciparum* Isolat Malang pada Membran Eritrosit Penderita Malaria dengan Komplikasi (*Detection of 270 kDa Plasmodium falciparum Protein Malang Isolate on Erythrocyte Membrane of Complicated Malaria Patient*)

Dewi Indiasari¹, Sri Winarsih², Loeki Enggar Fitri³

¹Divisi Penyakit Tropik & Infeksi, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Jl Jaksa Agung Suprpto No. 2 Malang

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Jl. Veteran Malang

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Jl. Veteran Malang

e-mail: indiastari83@gmail.com; lukief@ub.ac.id

Abstract

Erythrocyte which is infected by Plasmodium falciparum will have various changes on its architecture, affinity, and biomolecular. Beside that, the infected erythrocyte also forms a knob at its surface. This knob are contained with various parasite proteins, one of them is Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1). Our previous study had been identified a protein with molecular weight 270 kDa at P. falciparum infected erythrocyte from Malang isolate that was playing a role in cytoadherence process. The aim of this study was to detect the possibility of 270 kDa protein expression at complicated malaria falciparum patient erythrocyte membrane. The method that used was immunocytochemistry with polyclonal antibody to 270 kDa protein. The results showed that two (2) erythrocyte samples from healthy people as control had negative reaction, and so did with five (5) erythrocyte samples of uncomplicated malaria patient, but there was positive reaction that shown at two (2) samples of complicated malaria patient erythrocyte. It can be concluded from the results that 270 kDa membrane protein of P. falciparum infected erythrocyte in complicated malaria patient might be a PfEMP-1. This protein can be detected by immunocytochemistry method using polyclonal antibody and can be used for the candidate of complicated malaria diagnostic

Keywords: *Plasmodium falciparum*, 270 kDa protein, immunocytochemistry, polyclonal antibody

Abstrak

Eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* mengalami berbagai perubahan yaitu perubahan bentuk, afinitas dan biomolekuler. Selain itu terjadi pembentukan *knob* di permukaan eritrosit terinfeksi. Berbagai protein parasit ditranslokasikan ke *knob*, salah satunya adalah *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1). Penelitian terdahulu telah mengidentifikasi protein *P. falciparum* isolat Malang dari penderita malaria berat dengan berat molekul 270 kDa yang berperan dalam *cytoadherence*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi ekspresi protein 270 kDa pada membran eritrosit penderita malaria dengan komplikasi isolat Malang. Metode yang digunakan dengan imunositokimia menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein 270 kDa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua (2) sampel eritrosit orang sehat menunjukkan imunoreaksi negatif, demikian juga lima (5) sampel eritrosit penderita malaria tanpa komplikasi menunjukkan imunoreaksi negatif, tetapi dua (2) sampel eritrosit penderita malaria dengan komplikasi terbukti bereaksi positif. Diduga ekspresi protein 270 kDa *P. falciparum* pada membran eritrosit penderita malaria komplikasi adalah PfEMP-1 yang dapat dideteksi melalui imunositokimia menggunakan antibodi poliklonal dan dapat digunakan untuk diagnosis malaria komplikasi.

Kata Kunci: *Plasmodium falciparum*, protein 270 kDa, imunositokimia, antibodi poliklonal

Pendahuluan

Malaria masih menjadi masalah kesehatan utama dunia, terutama di Afrika dan negara-negara tropis di Amerika dan Asia, termasuk Indonesia [1]. Malaria mengenai 170 juta orang tiap tahunnya di hampir 103 negara endemis [2]. Lebih dari 2,7 juta meninggal setiap tahunnya di seluruh dunia [3]. Di Indonesia, diperkirakan 35% penduduk tinggal di daerah yang beresiko tertular malaria. Data dari Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI 2017 menunjukkan Angka Kesakitan Malaria Tahun 2016 sebanyak 200.378 kasus, sedangkan angka *Annual Parasite Incidence* (API) Malaria per 1.000 penduduk sebesar 0,77. Terdapat 412 kota di Indonesia dengan angka API < 1 dan terdapat 5 provinsi dengan angka API > 1 yaitu Bengkulu, Maluku Utara, Maluku, Nusa Tenggara Timur, Papua Barat dan Papua (API 39,33) [4]. Diantara ke lima spesies penyebab malaria, *Plasmodium falciparum* paling sering menjadi malaria berat yang menyebabkan kematian [5].

Virulensi malaria berkaitan dengan kemampuan eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* untuk berikatan (adhesi) dengan endotel pembuluh darah inang (*cytoadherence*), memicu terjadinya reaksi inflamasi, obstruksi jaringan dan disfungsi organ. Patofisiologi yang mendasari proses terjadinya komplikasi serebral malaria adalah adanya sekuestrasi bentuk *P.falciparum* matang di mikrovaskuler otak akibat adanya adhesi eritrosit terinfeksi [6]. Adhesi eritrosit terinfeksi pada endotel mikrovaskuler merupakan faktor virulensi utama dan berhubungan dengan *rosetting* dengan eritrosit yang tidak terinfeksi. Proses adhesi dapat mencegah eritrosit terinfeksi parasit masuk dalam sirkulasi darah dan dihancurkan oleh sistem komplemen dan limpa [7].

Adhesi eritrosit terinfeksi diperantarai ekspresi protein *P.falciparum* yang disebut *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP-1), yang mampu berikatan dengan berbagai reseptor di endotel [8]. Analisis berbagai genom *P.falciparum* membuktikan bahwa PfEMP-1 akan berinteraksi dengan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *endothelial protein C receptor* (EPCR). PfEMP-1, yang berikatan dengan ICAM-1 dan EPCR berhubungan dengan peningkatan resiko timbulnya malaria serebral. Penemuan terhadap

adanya fenotipe tempat ikatan PfEMP-1 merupakan target terapi pencegahan terjadinya malaria berat [9].

Penelitian sebelumnya secara *in vitro* telah menemukan protein pada eritrosit terinfeksi *P.falciparum* isolat Malang yang mengadakan *cytoadherence* pada kultur HUVEC's. Protein dengan berat molekul 270 kDa tersebut diduga merupakan PfEMP-1 [10]. Disebutkan bahwa PfEMP-1 mempunyai berat molekul berkisar antara 250-350 kDa [3]. Penelitian mengenai sifat imunogenisitas protein membran eritrosit 270 kDa akan bermanfaat sebagai *screening test* untuk mengetahui ada atau tidaknya kecenderungan terjadinya sekuestrasi yang merupakan mekanisme dasar pada kasus malaria berat serta sebagai pengembangan diagnostik malaria.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif untuk mendeteksi protein membran eritrosit terinfeksi menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein 270 Kda. Penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu dengan tahap pembuatan antibodi poliklonal dan tahap uji spesifisitas antibodi dengan metode imunositokimia. Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dilaksanakan pada bulan Juli 2003 sampai dengan bulan Agustus 2004.

Populasi penelitian adalah penderita malaria *P. falciparum* isolat Malang yang telah melalui pemeriksaan klinis dan laboratoris. Sampel penelitian yaitu hapusan darah tepi dari orang normal yang tidak sedang atau pernah menderita malaria dan dari penderita malaria *falciparum* tanpa komplikasi yang dipilih sebagai kontrol, serta penderita malaria *falciparum* isolat Malang dengan komplikasi yang diambil darahnya untuk dibuat hapusan darah. Jumlah sampel sebanyak 9 *slide* preparat hapusan darah tepi terdiri dari 2 *slide* dari orang sehat yang tidak menderita malaria dan 5 *slide* dari penderita malaria *falciparum* tanpa komplikasi sebagai kontrol, serta 2 *slide* penderita malaria *falciparum* dengan komplikasi. Protein eritrosit terinfeksi *P. falciparum* adalah protein BM 270 kDa yang diperoleh dari penelitian sebelumnya

[10]. Antibodi poliklonal yaitu antibodi yang didapat dari serum tikus terhadap induksi protein *P. falciparum* isolat Malang dengan BM 270 kDa. Imunositokimia merupakan metode untuk mendeteksi antigen pada membran eritrosit menggunakan prinsip ABC (*Avidin-Biotin Complex*).

Prosedur pembuatan antibodi poliklonal (Tahap I)

Elektroforesis eritrosit terinfeksi *P. falciparum*

Sampel darah penderita malaria *falciparum* Isolat Malang ditambah dengan PBS dan *reducing sampel buffer* dengan perbandingan 1:50:2. Kemudian sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. *Plate* pembentuk gel disusun. Larutan *separating gel* dituang ke dalam *plate* menggunakan pipet sampai $\frac{3}{4}$ tinggi *plate*. Aquades dituang di atas larutan gel. Didiamkan selama 30 menit hingga memadat. Aquades dibuang dan larutan *stacking gel* dituang ke dalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet sampai *plate* penuh. Diselipkan sisir pembentuk sumur sampel ke dalam *stacking gel* segera setelah dituang dan didiamkan selama 30 menit sampai gel memadat, setelah itu sisir diangkat. *Plate* dimasukkan dalam *chamber* elektroforesis, *running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah terendam. 10µl sampel dimasukkan ke dasar sumur dengan *Hamilton syringe*. *Syringe* dibilas dengan aquades atau *running buffer* sampai 3 kali. *Running* sampel dilakukan pada arus 40 mA dan tegangan 120 V selama 90 menit dan didiamkan *overnight* pada suhu kamar. *Running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*. Gel direndam dalam 20 ml *staining solution* sambil digoyang selama 15 menit, dicuci dengan aquades sebanyak 2-3 kali, dan direndam dalam 50 ml *destaining solution* selama sekitar 30 menit atau sampai *band* protein terlihat jelas.

Induksi protein 270 kDa untuk memperoleh anti protein 270 kDa

Digunakan dua ekor tikus *Wistar* jantan normal berumur tiga bulan, dengan berat badan berkisar antara 200-300 gram. Satu ekor tikus digunakan sebagai kontrol (hanya diimunisasi

dengan *adjuvant*) dan satu ekor tikus sebagai hewan coba untuk produksi antibodi poliklonal (diimunisasi dengan protein membran BM 270 kDa ditambah dengan *adjuvant*).

Imunisasi Hewan Coba dengan Protein 270 kDa

Imunogen yang terdiri dari protein BM 270 kDa yang diperoleh dari penelitian sebelumnya diemulsikan dengan *Complete Freund's Adjuvant* untuk dosis primer dan dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* untuk dosis sekunder. Injeksi imunogen sebanyak 100 µL ditambah dengan *adjuvant* 100µL, secara intraperitoneal tikus *Wistar* pada satu sisi. Injeksi dosis sekunder sebanyak 3 kali, masing-masing berjarak 7 hari. Pada minggu ke empat dilakukan pengambilan darah dari jantung tikus, volume darah yang didapatkan sebanyak 5 cc.

Isolasi Serum dari Hewan Coba

Darah yang telah didapat sesuai masa inkubasinya, didiamkan selama sepuluh menit pada suhu ruang. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu ruang selama 15 menit. Presipitat dibuang, supernatan sebagai serum dipindahkan ke dalam eppendorf dan disimpan pada suhu - 20°C untuk selanjutnya dilakukan uji spesifisitas dengan imunohistokimia.

Prosedur Deteksi Protein Membran Eritrosit Terinfeksi (Tahap II)

Deteksi protein BM 270 kDa pada membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum* menggunakan metode imunohistokimia

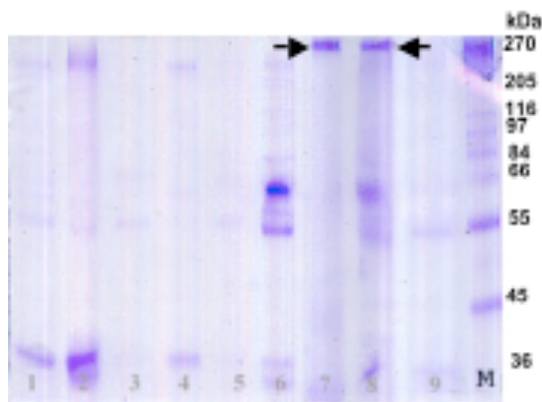
Anti protein membran BM 270 kDa yang dihasilkan diuji spesifisitasnya dengan teknik Imunositokimia menggunakan prinsip ABC. Preparat hapusan darah penderita malaria *P.falciparum* isolat Malang difiksasi terlebih dahulu dengan *methanol* selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 2 kali. Setelah itu ditetesi dengan *peroxidase* dan didiamkan selama 5 menit dan segera dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditetesi dengan *normal goat serum blocking solution* dan PBS dengan perbandingan 1:9 dan didiamkan selama 20

menit. Setelah itu ditetesi dengan 200µl antibodi primer (didapat dari prosedur imunisasi) yang telah dilarutkan dengan 800µl serum block dan diinkubasi dalam suhu -20°C *overnight*. Sampel yang telah diinkubasi dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder (*Rat Polyclonal Antibody*) yang telah ditambahkan dengan *biotin* dan PBS dengan perbandingan 1:50 dan didiamkan selama 1 jam. Selanjutnya dicuci lagi dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian ditetesi dengan *Streptavidin HRP* selama 40 menit. Dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan segera ditetesi dengan larutan DAB yang terdiri dari 5 ml DAB *buffer* pH 7,6 dan 2,5 mg DAB substrat yang telah *divortex* dan telah ditambahkan dengan 50µl H₂O₂ selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dikeringanginkan dan ditetesi larutan *Entellan* untuk di *mounting* atau ditutup dengan *cover glass*. Preparat diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x.

Hasil Penelitian

Deteksi protein BM 270 kDa pada membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum*

Untuk mengetahui dan meyakinkan bahwa pada eritrosit sampel (eritrosit terinfeksi *P.falciparum*) terdapat protein membran berat molekul 270 kDa, dilakukan elektroforesis (SDS PAGE). Hasil elektrogram dapat dilihat pada gambar 1.

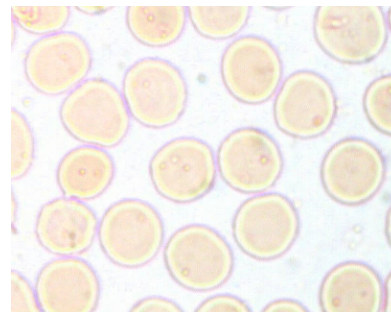


Gambar 1. Hasil Elektroforesis protein membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum* dengan pewarnaan *Commase Brilliant Blue*. Lajur 1, 3, 4, 5, dan 6 adalah ekspresi

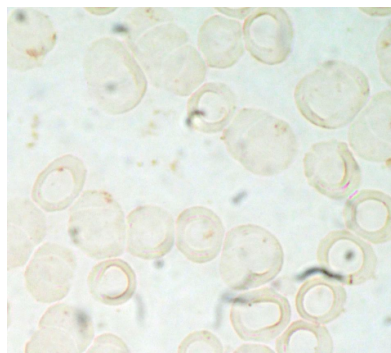
protein membran dari eritrosit penderita malaria *falciparum* tanpa komplikasi. Lajur 2 dan 9 adalah ekspresi protein pada eritrosit normal. Tanda panah pada lajur 7 dan 8 menunjukkan ekspresi protein yang memiliki berat molekul 270 kDa pada eritrosit penderita malaria *falciparum* dengan komplikasi. Lajur M adalah protein marker.

Uji spesifisitas antibodi protein membran 270 kDa terhadap protein membran 270 kDa pada eritrosit terinfeksi *P. falciparum* dengan cara imunositokimia

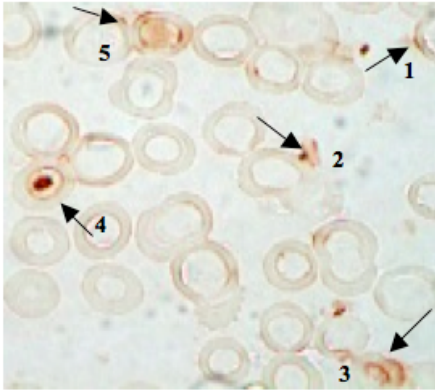
Uji spesifisitas bertujuan untuk membuktikan bahwa protein membran eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* dengan berat molekul 270 kDa dapat dideteksi dengan antibodi poliklonal. Uji spesifisitas dilakukan menggunakan cara imunositokimia (metode ABC). Didapatkan gambaran imunositokimia seperti yang tampak pada Gambar 2 sampai Gambar 4.



Gambar 2. Foto Eritrosit dari orang normal setelah diberi antibodi poliklonal terhadap protein membran 270 kDa (Pemulasan Imunositokimia dengan perbesaran 1000x).



Gambar 3. Foto eritrosit Terinfeksi *Plasmodium falciparum* dari penderita malaria tanpa komplikasi setelah diberi antibodi poliklonal terhadap protein membran 270 kDa (Pemulasan Imunositokimia dengan perbesaran 1000x).



Gambar 4. Foto eritrosit Terinfeksi *P. falciparum* dari penderita malaria dengan komplikasi setelah diberi antibodi poliklonal terhadap protein membran 270 kDa (Pemulasan Imunositokimia dengan perbesaran 1000x). Tanda panah 1,3 dan 5 menunjukkan tempat ikatan protein membran 270 kDa dengan antibodi protein 270 kDa (warna coklat). Tanda panah 2 dan 4 menunjukkan keberadaan parasit dalam eritrosit

Terlihat pada Gambar 2 dan gambar 3 pada preparat kontrol tidak menunjukkan adanya fokus ikatan antibodi-antigen seperti pada Gambar 4. Pada Gambar 4 terdapat berbagai gambaran fokus ikatan antigen-antibodi yang berwarna coklat, karena telah berikatan dengan pewarna (larutan DAB). Pada anak panah nomor 1, 2, 3, dan 5 terlihat adanya suatu fokus ikatan antigen-antibodi pada membran eritrosit. Sedangkan pada gambar yang ditunjuk anak panah nomor 4, juga terlihat adanya suatu fokus ikatan antigen-antibodi tetapi berbeda dengan seperti yang tampak pada anak panah 1, 2, 3, dan 5.

Pembahasan

Dari hasil elektroforesis pada Gambar 1 didapatkan bahwa pada lajur penderita malaria dengan komplikasi, terlihat suatu *band* atau garis pada berat molekul 270 kDa, sedangkan

pada hampir semua lajur terlihat *band* pada berat 205 kDa dan 45 kDa. Sedikitnya terdeteksi 15 *band* protein utama pada hasil elektroforesis terhadap protein membran dari eritrosit manusia, dengan berat molekul bervariasi antara 15 kDa hingga 250 kDa. Diduga diantara protein-protein tersebut adalah *spectrin*, *glycophorin*, dan *band 3* meliputi lebih dari 60 % dari total seluruh protein membran. Berat molekul tertinggi adalah *spectrin* yang mempunyai dua rantai *polypeptide* yaitu α *spectrin* 240 kDa dan β *spectrin* 220 kDa, berperan sebagai rangka eritrosit, mempertahankan struktur dan bentuk *biconcave* eritrosit. *Ankyrin* mempunyai berat molekul 210 kDa, *band 3* 100 kDa, *glycophorin* 30 kDa, sedangkan *actin* 43 kDa. Heterodimer dari *spectrin* saling bertautan pada ujung-ujungnya membentuk tetramer dan dihubungkan dengan tetramer-tetramer lainnya oleh suatu kompleks filamen *actin* (terdiri dari 13 monomer *actin*) membentuk suatu jaring-jaring rangka (*cytoskeleton*). *Cytoskeleton* bertautan dengan membran oleh suatu ikatan *indirect* antara tetramer *spectrin* dengan protein *band 3* melalui molekul *ankyrin* [11].

Menurut Stephenson *et al* (2001) protein berat 45 kDa merupakan bentuk heterotrimerik G-protein G_s . Aktivasi reseptor G-protein G_s menyebabkan pelepasan ATP, G_s merupakan komponen transduksi sinyal pelepasan ATP dari eritrosit [12]. Komponen yang menonjol dari sitoskeleton eritrosit adalah suatu polipeptida yang disebut *spectrin*. Dua *isoform spectrin*, alfa (260 kDa) dan beta (225 kDa), membentuk garis spiral atau rantai *helix*. Dua rantai *helix* tersebut berhubungan satu sama lain membentuk tunggal tetramer, dan mampu mengikat beberapa protein lain, termasuk *spectrin* molekul lain. Tetramer *spectrin* tersebut dikumpulkan dalam suatu tempat di membran oleh *ankyrin* (215 kDa). *Ankyrin* sendiri dihubungkan dengan protein transmembran yang disebut *band 3* atau *anion exchanger protein* (90-100 kDa). *Band* dengan berat molekul 78 kDa berfungsi untuk menstabilkan ikatan *spectrin* dengan *actin* (berat molekul 43 kDa) seperti halnya protein *adducin* (BM 100 dan 105 kDa) [13, 14]. Dari sinilah timbul dugaan bahwa kemungkinan protein berat molekul 205 kDa yang tampak pada hampir semua lajur pada elektroforesis adalah suatu *spectrin* yang berfungsi sebagai *cytoskeleton* eritrosit normal atau yang tidak terinfeksi *P.falciparum*. Sedangkan protein dengan berat molekul 45 kDa yang juga tampak pada hampir

semua lajur elektroforesis, diduga merupakan suatu *actin* yang turut berfungsi bersama-sama *spectrin* sebagai *cytoskeleton* eritrosit normal.

Menurut Stephenson *et al* (2001) protein berat 45 kDa merupakan bentuk heterotrimerik G-protein G_s . Aktivasi reseptor G-protein G_s menyebabkan pelepasan ATP, G_s merupakan komponen transduksi sinyal pelepasan ATP dari eritrosit [12]. Komponen yang menonjol dari sitoskeleton eritrosit adalah suatu polipeptida yang disebut *spectrin*. Dua *isoform spectrin*, alfa (260 kDa) dan beta (225 kDa), membentuk garis spiral atau rantai *helix*. Dua rantai *helix* tersebut berhubungan satu sama lain membentuk tunggal tetramer, dan mampu mengikat beberapa protein lain, termasuk *spectrin* molekul lain. Tetramer *spectrin* tersebut dikumpulkan dalam suatu tempat di membran oleh *ankyrin* (215 kDa). *Ankyrin* sendiri dihubungkan dengan protein transmembran yang disebut *band 3* atau *anion exchanger protein* (90-100 kDa). *Band* dengan berat molekul 78 kDa berfungsi untuk menstabilkan ikatan *spectrin* dengan *actin* (berat molekul 43 kDa) seperti halnya protein *adducin* (BM 100 dan 105 kDa)[13,14]. Dari sinilah timbul dugaan bahwa kemungkinan protein berat molekul 205 kDa yang tampak pada hampir semua lajur pada elektroforesis adalah suatu *spectrin* yang berfungsi sebagai *cytoskeleton* eritrosit normal atau yang tidak terinfeksi *P. falciparum*. Sedangkan protein dengan berat molekul 45 kDa yang juga tampak pada hampir semua lajur elektroforesis, diduga merupakan suatu *actin* yang turut berfungsi bersama-sama *spectrin* sebagai *cytoskeleton* eritrosit normal.

Dari hasil elektroforesis pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa protein berat molekul 270 kDa terdapat dalam sel darah merah penderita malaria dengan komplikasi. Menurut Degen (1999), *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1) merupakan protein adhesi parasit yang utama digambarkan sebagai *strain specific* dengan berat molekul tinggi (250-350 kDa) [3]. Fitri (2004) secara *in vitro* telah menemukan protein membran pada eritrosit terinfeksi *P. falciparum* yang mengadakan adhesi pada kultur HUVEC's adalah protein dengan berat molekul 270 kDa

[10]. Diduga bahwa protein membran dengan berat molekul 270 kDa yang diidentifikasi pada penelitian ini merupakan suatu variasi bentuk PfEMP-1.

PfEMP-1 merupakan protein yang sangat polimorfik yang terdapat di permukaan eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* dan berperan dalam proses adhesi dengan reseptor di permukaan sel endotel seperti CD36, *thrombospondin*, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan lain-lain[3]. PfEMP-1 merupakan protein polimorfik dengan berat molekul sekitar 300kDa, dikode gen hingga > 60 variabel[15]. Munculnya PfEMP-1 di permukaan eritrosit terinfeksi menunjukkan bahwa parasit mentranslokasikan protein ke permukaan eritrosit terinfeksi yang akan berperan penting dalam pertautan *resptor-ligand* antara inang dan protein parasit¹⁶. Pemeriksaan yang cermat menggunakan mikroskop elektron memperlihatkan eritrosit berparasit secara langsung terikat pada sel endotel vaskuler melalui tonjolan kecil, padat elektron yang disebut *knob* pada permukaan eritrosit berparasit. Terlihat bahwa PfEMP-1 menonjol keluar dari membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum*. Hal ini menyebabkan protein parasit yang terdapat di luar *knob* lebih mudah berikatan dengan sel inang. Interaksi spesifik antara PfEMP-1 dan *ligand* sel endotel seperti ICAM-1 atau E-selectin akan menyebabkan sekuestrasi eritrosit terinfeksi sehingga mengurangi aliran darah mikrovaskuler dan menyebabkan hipoksia [6,8,17,18]. Sekuestrasi eritrosit berparasit *P. falciparum* sebenarnya mempunyai dua fungsi yaitu pertama memberikan suatu lingkungan yang baik untuk perkembangan dan replikasi parasit dan fungsi kedua merupakan suatu mekanisme perlindungan terhadap mekanisme penghancuran parasit yang diaktifkan oleh limpa. Tingkat sekuestrasi berhubungan dengan terjadinya gejala pada malaria berat [18].

Uji imunositokimia dapat menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal. Dalam penelitian ini digunakan antibodi poliklonal. Hal ini dikarenakan proses pembuatan antibodi poliklonal relatif lebih murah dan mudah

dibandingkan dengan antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal berasal dari beberapa epitop spesifik antigen, maka kemungkinan terjadi reaksi silang dengan antigen lain tetap ada. Sehingga pada waktu proses pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi poliklonal, harus menggunakan preparat kontrol untuk memastikan ada atau tidaknya reaksi silang [17]. Oleh karena itu, pada penelitian ini disertakan eritrosit normal dari orang sehat yang tidak terinfeksi malaria dan eritrosit penderita malaria tanpa komplikasi sebagai kontrol. Preparat imunositokimia yang dipakai adalah hapusan darah tepi penderita malaria dengan komplikasi dari isolat Malang. Preparat telah difiksasi dengan methanol, yang bertujuan untuk menjaga sifat antigen eritrosit terinfeksi. Penambahan *normal goat serum* dimaksudkan untuk mengatasi ikatan non spesifik terhadap IgG oleh kelompok molekul bebas pada jaringan yang reaktif [19].

Dari hasil penelitian berupa gambar imunositokimia dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa protein 270 kDa pada membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum* pada sampel eritrosit penderita malaria dengan komplikasi yang diduga merupakan suatu bentuk PfEMP-1, yang berperan dalam mekanisme *cytoadherence* dan *sequestration* pada kasus malaria dengan komplikasi, dapat dideteksi dengan antibodi poliklonal yang diperoleh dengan cara imunisasi pada hewan coba (tikus *Wistar*) terhadap protein 270 kDa. Selanjutnya dapat dikembangkan dalam hal pembuatan antibodi monoklonal, antibodi ini spesifik terhadap satu epitop antigen, sehingga dapat meminimalkan terjadinya reaksi silang (*cross reaction*) dengan antigen lain. Lebih lanjut dapat mencegah dan digunakan sebagai terapi *sequestration* di kapiler otak melalui respon imunologis yang lebih spesifik .

Simpulan dan Saran

Protein 270 kDa *P. falciparum* isolat Malang pada membran eritrosit penderita malaria dengan komplikasi dapat dideteksi dengan antibodi poliklonal terhadap protein membran eritrosit terinfeksi *P. falciparum* 270 kDa.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memilih sampel atau populasi dari daerah endemis dengan metode yang lebih sensitif dan akurat misalnya dengan *immunoblot* atau menggunakan antibodi monoklonal. Selain itu, perlu juga penelitian *cross reaction* dengan melibatkan populasi sampel yang lebih banyak dan dari berbagai daerah baik endemis maupun non endemis malaria.

Daftar Pustaka

- [1] Sardjono TW, Fitri LE. Malaria: Mekanisme Terjadinya Penyakit dan Pedoman Penanganannya. Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya. Malang. 2007.
- [2] Nugroho A, Harijanto PN, Datau EA. Imunologi Malaria, dalam Harijanto P.N. Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis & Penanganannya. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000. hal: 128-147.
- [3] Degen R. Identification and Analysis of *P. falciparum* Genes Mediating Cytoadherence. Inaugural dissertation. Basel. 1999.
- [4] Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia. 2016.
- [5] Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kementerian Kesehatan RI. Buku Saku Penatalaksanaan Kasus Malaria. Jakarta. 2017.
- [6] Azasi Y, Lindergard G, Ghumra A, Mu J, Miller LH, Rowe A. Infected Erythrocytes Expressing DC13 PfEMP1 differ from recombinant proteins in EPCR-binding function. PNAS Early ed. 2017. DOI:10.1073/pnas.1712879115.
- [7] Patel SK, Jasrai YT, George LB, Highland HN. Screening of Xanthenes in Combating Malaria Targeting *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1). Asian J Biomed. Pharma Sci. 2012; 1(6): 1-5.
- [8] Lennartz F, Bengtsson A, Olsen RW, Joergensen L, Brown A, Remy L, Man P, Forest E, Barford LK, Adams Y, Higgins MK, Jensen ATR. Mapping the Binding Site of a Cross-Reactive *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Monoclonal Antibody Inhibitory of ICAM-1 Binding. J Immunol. 2015; 195: 3273-3283.
- [9] Lennartz F, Adams Y, Bengtsson A, Olsen RW, Turner L, Ndam NT, et al.

- Structure-Guided Identification of Family Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *J.Chem.* 2017; (21): 403-414.
- [10] Fitri LE. Analisis Patogenitas Malaria dengan Komplikasi: Tinjauan Molekuler terhadap Peran Molekul Adhesi Eritrosit Terinfeksi *Plasmodium falciparum* Isolat Malang dan Keterlibatan Senyawa Oksigen Reaktif. Disertasi. 2004.
- [11] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 10: Membrane Structure in *Molecular Biology of the Cell* 6th Edition. New York: Garland Publishing. 2015; p:591-595.
- [12] Stephenson A, Olearczyk JJ, Lonigro AJ, Sprague R. Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein G_s results in ATP release from erythrocyte. *Int Med J Exp Clin Res.* 2001; 7: 669-674.
- [13] Mohandas N, Gallagher PG. Red Cell Membrane: Past, Present and Future. *Blood J.* 2008; 112(10). DOI 10.1182/blood-2008-07-161166.
- [14] Oliveira S, Saldanha C. An Overview about Erythrocyte Membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2010; 44: 63-74. DOI 10.3233/CH-2010-1253.
- [15] Patarroyo ME, Alba MP, Curtidor H, Vanegas M, Almonacis H. Using the PfEMP1 Head Structure Binding Motif to Deal a Blow at Severe Malaria. *PLoS ONE.* 2014; 9(2): e88420. doi:10.1371/journal.pone.0088420
- [16] White NJ. *Malaria in Manson's Tropical Disease* 23rd ed. London: Elsevier Saunders. 2014; p: 532-600.
- [17] Tambajong EH. Patobiologi Malaria, dalam Harijanto P.N. *Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis & Penanganannya.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000; hal: 55-72.
- [18] Gillrie MR, Renaux B, Russell-Goldman E, Avril M, Brazier AJ, Mihara K, et al. Thrombin Cleavage of *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 Inhibits Cytoadherence. *mBio.* 2016; 7(5): e01120-16. doi:10.1128/mBio.01120-16.
- [19] Khaitan T, Bhattacharya PT. Principle and Techniques of Immunohistochemistry – A Review. *Int J Biol Med Res.* 2015; 6(3): 5204-5210.