



## Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit (*Mus musculus Balb/C*) yang Diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*

Miftah Ar Rahmah<sup>1</sup>, Adria<sup>2</sup>, Yenita<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

<sup>2</sup> Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

<sup>3</sup> Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

### ABSTRACT

#### Abstrak

**Latar Belakang:** *P. berghei* adalah parasit yang menyebabkan malaria pada rodensia kecil. Parasit ini dianalogikan dengan *P. falciparum* penyebab malaria berat pada manusia dengan risiko kematian yang paling tinggi dibandingkan 4 spesies plasmodium lain. Komplikasi malaria falciparum pada mikrosirkulasi ginjal adalah AKI (Acute Kidney Injury). Kejadian AKI ini didahului dengan kejadian ATN (Acute Tubular Necrosis) dan MPGN (Mesangioproliferative Glomerulonephritis) dengan prevalensi terbanyak adalah ATN.

**Objektif:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologi tubulus ginjal mencit putih *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei*.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan metode deksriptif analisis dengan pendekatan kuantitatif. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Penelitian dilakukan selama bulan Februari sampai Oktober 2020. Besar sampel yang digunakan ditentukan dengan rumus Federer (2008).

**Hasil:** Persentase rerata kerusakan sel tubulus ginjal secara berturut-turut adalah 8,42% untuk kelompok kontrol, 4,52% untuk kelompok ekstrak pellet, dan 2,74% untuk kelompok ekstrak supernatan.

**Kesimpulan:** Rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal tertinggi adalah ginjal mencit yang diimunisasi dengan grup kontrol, dan persentase rerata kerusakan sel tubulus ginjal terendah adalah ginjal mencit yang diimunisasi dengan ekstrak supernatan.

**Kata kunci:** *P. berghei*, ATN, Grup Kontrol, Ekstrak Pellet, Ekstrak Supernatan.

#### Abstract

**Background:** *P. berghei* is a parasite that causes malaria in small rodents. This parasite is analogous to *P. falciparum* which causes severe malaria in humans with the highest risk of death compared to 4 other plasmodium species. Complications of falciparum malaria in renal microcirculation is AKI (Acute Kidney Injury). AKI is preceded by the incidence of ATN (Acute Tubular Necrosis) and MPGN (Mesangioproliferative Glomerulonephritis) with ATN being the highest prevalence.

**Objective:** This study aims to determine the histopathological appearance of renal tubules of white mice *Mus musculus Balb/C* which are infected with *P. berghei*.

**Methods:** Descriptive analysis method with quantitative approach is used in this study. The study was conducted at the Anatomical Pathology Laboratory of the Faculty of Medicine, Andalas University. The study was conducted since February to October 2020. The sample size was determined by the Federer formula (2008).

**Results:** Percentage of renal tubular cell damage which were 8.42% for the control group, 4.52% for the pellet extract group, and 2.74% for supernatant extract group.

**Conclusion:** The study concluded that highest percentage of kidney tubular cell damage was found in the kidney of mice immunization with the control group, and the lowest percentage of kidney tubular cell damage was found in the kidney of mice immunization with supernatant extract.

**Keyword:** *P. berghei*, ATN, Control Group, Pellet Extract, Supernatant Extract

#### Apa yang sudah diketahui tentang topik ini?

*P. berghei* parasit malaria pada mencit yang memiliki analog dengan infeksi oleh *P. falciparum* pada manusia.

#### Apa yang ditambahkan pada studi ini?

Hubungan gambaran histopatologi ginjal mencit dengan infeksi yang disebabkan oleh *P. berghei*

#### CORRESPONDING AUTHOR

Phone: +6282387369894

E-mail: miftaharrahmah012@gmail.com

#### ARTICLE INFORMATION

Received: December, 7<sup>th</sup>, 2020

Revised: July, 18<sup>th</sup>, 2021

Available online: July, 30<sup>th</sup>, 2021

## Pendahuluan

Parasit penyebab malaria terbanyak di dunia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*, tetapi penyebab kematian terbanyak disebabkan oleh infeksi *P. falciparum*.<sup>1</sup> *P. falciparum* termasuk kedalam filum *apicomplexan* yang mengandung parasit protozoa yang biasa menginfeksi manusia dan organisme lain. Parasit *apicomplexan* mengandung organ khusus yang disebut *apicoplast* dengan sifat non-fotosintesis tetapi aktif secara metabolik.<sup>2</sup> Parasit *P. falciparum* memiliki siklus hidup yang sangat kompleks didalam tubuh host dan vektornya, yaitu manusia dan nyamuk *Anopheles sp.*<sup>3</sup> Risiko Kematian pada balita yang terinfeksi oleh *P. falciparum* mencapai 10-20% yang dihubungkan dengan kejadian *cerebral malaria*.<sup>4</sup> Malaria yang disebabkan oleh infeksi *P. falciparum* akan mengalami *blackwater fever* atau urin kehitaman karena adanya proses hemolisis eritrosit yang sangat banyak.<sup>5</sup>

Infeksi *P. falciparum*, *P. malariae*, dan *P. vivax* dapat menyebabkan kerusakan pada struktural ginjal. Hal ini disebabkan oleh gangguan hemodinamik dan respon imun. Infeksi *P. falciparum* menyebabkan kerusakan yang paling berat pada ginjal.<sup>6</sup> Kejadian ini berhubungan dengan patogenesis dari infeksi *P. falciparum* yang menginfeksi sampai ke mikrosirkulasi, salah satunya perdarahan di ginjal. Infeksi *P. falciparum* akan menyebabkan perubahan pada permukaan sel darah merah yang sudah terinfeksi sehingga terjadi ikatan antara sel darah terinfeksi dengan endotel pembuluh darah atau trombosit yang disebut sitoadherensi, kemudian sitoadheren eritrosit akan menyebabkan eritrosit yang terinfeksi tinggal di dalam mikrovaskular disebut sekuesterasi, perlekatan dengan sepuluh atau lebih sel eritrosit yang tidak terinfeksi menyelubungi 1 sel eritrosit yang sudah terinfeksi disebut *rosetting*. Gangguan mikrosirkulasi yang diakibatkan oleh infeksi *P. falciparum* secara terus menerus akan mengakibatkan kerusakan pada ginjal secara akut.<sup>4</sup>

Kejadian AKI (*Acute Kidney Injury*) sering terjadi pada kasus malaria. Berdasarkan prevalensi global, AKI terjadi pada lebih kurang 20-50% pasien malaria yang di rawat di Rumah Sakit. Kejadian ini muncul bersamaan dengan gejala klinis malaria yaitu, demam, mual, gangguan pernapasan dan anemia.<sup>7</sup> Kejadian gagal ginjal akut akibat malaria disebabkan karena

kejadian ATN (*Acute Tubular Necrosis*) dan kasus MPGN (*Mesangioproliferative Glomerulonefritis*).

Berdasarkan data yang telah dikumpulkan didapatkan penyebab kejadian gagal ginjal akut adalah akibat ATN. Kasus ATN terjadi pada 1 - 4% kasus infeksi *P. falciparum*. Untuk melihat derajat keparahan malaria *falciparum* sebagai penyebab terbanyak kejadian ATN dilakukan pemeriksaan histopatologis sebagai pemeriksaan penunjang. Pemeriksaan histopatologi pada ATN akan menunjukkan gambaran nekrosis pada tubulus yang terjadi secara akut dan ditandai dengan adanya bagian epitel yang lepas serta hilangnya bagian *brush border*.<sup>8</sup>

Malaria *falciparum* dengan komplikasi AKI berpotensi juga untuk mengalami CKD (*Chronic Kidney Disease*) dan mendapatkan terapi pengganti ginjal. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Koopmans, *et al.* (2015), sekitar 52,5 % atau 39 pasien dengan malaria *falciparum* mengalami AKI di Rotterdam. Penelitian dilakukan berdasarkan kriteria KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) dengan syarat kreatinin serum diatas 120  $\mu\text{mol/L}$ , dan didapatkan 3 pasien membutuhkan terapi pengganti ginjal, sedangkan yang lain akan sembuh setelah 17 lebih kurang 6 hari.<sup>9</sup> Menurut penelitian yang dilakukan oleh Coca, *et al.* (2012), pasien AKI yang sembuh setelah beberapa hari bisa mengalami AKI ulangan atau CKD karena dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti imunitas dan riwayat penyakit ginjal sebelum terinfeksi malaria.<sup>10</sup>

Parasit *P. berghei* adalah salah satu hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil yang dibawa oleh nyamuk *An. stephensi*.<sup>11</sup> Infeksi parasit ini dapat dianalogikan dengan infeksi *P. falciparum* pada manusia. Parasit ini dapat menyebabkan malaria berat pada rodensia seperti *P. falciparum* pada manusia. Parasit ini dapat memasuki mikrosirkulasi sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada hati, otak, paru - paru dan ginjal rodensia. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Junaid, *et al.* (2017), terdapat perbedaan gambaran histopatologi ginjal rodensia sebelum dan setelah diinfeksi dengan *P. berghei*. Ginjal memberikan gambaran lebih pucat secara makroskopis dan secara mikroskopis memberikan gambaran nekrosis pada tubulus ginjal.<sup>12</sup> Menurut penelitian yang dilakukan Elias, *et al.* (2012),

terdapat perubahan permeabilitas kapiler ginjal karena produk stress oksidatif yang dihasilkan selama infeksi, penurunan pengiriman oksigen ke sel dan jaringan sehingga menimbulkan hipoksia serta diperberat karena penurunan efisiensi antioksidan dan mekanisme sitoprotektif pada mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi *P. berghei*. Peningkatan produk stress oksidatif juga ditandai dengan peningkatan ekspresi LOX-1 (*Lectin Like Oxidized LDL Receptor - 1*) yang diekspresikan oleh sel glomerulus ginjal.<sup>13</sup>

Parasit *P. berghei* memiliki banyak kesamaan dengan *P. falciparum* diluar kemampuannya untuk menyebabkan malaria berat pada inangnya. Parasit ini memiliki susunan kromosom yang berdekatan dengan *P. falciparum*.<sup>14</sup> Parasit ini merupakan parasit percobaan untuk mencit *Mus musculus Balb/C* yang tidak bisa menginfeksi manusia.<sup>13</sup> Parasit ini memiliki kesamaan proses untuk menembus pembuluh darah dengan menyekresikan enzim fosfolipase seperti *P. falciparum* yang menginfeksi manusia. Parasit ini memiliki kesamaan siklus hidup dan beberapa struktur tubuh dengan *P. falciparum*, yaitu memiliki lebih dari satu nukleolus, memiliki pigmen dan membran vesikula yang halus, memiliki membran pembatas yang rangkap dan tidak mempunyai bentukan mitokondria. Parasit ini memiliki protein permukaan yang sama untuk menginvasi eritrosit seperti *P. falciparum*.<sup>15,16</sup>

Malaria falciparum adalah malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum*. Malaria ini merupakan malaria berat karena bisa menyebabkan komplikasi berat pada penderitanya. Komplikasi ini dihubungkan dengan kemampuan infeksi *P. falciparum* mencapai ke mikrosirkulasi, diantaranya otak, ginjal dan paru-paru. Komplikasi malaria falciparum pada mikrosirkulasi ginjal adalah AKI. Kejadian AKI ini didahului dengan kejadian ATN dan MPGN dengan prevalensi terbanyak adalah ATN. Kejadian ATN ini ditandai dengan adanya perubahan gambaran histopatologi tubulus ginjal yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang. Nekrosis sel tubulus ginjal dapat ditandai dengan adanya perubahan pada inti sel tubulus ginjal dan melihat bagian *brush border* serta epitel sel tubulus ginjal. Perubahan gambaran histopatologi ginjal pada manusia yang terinfeksi *P. falciparum* bisa dianalogikan dengan gambaran histopatologi

ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei*.

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perubahan gambaran histopatologi tubulus ginjal pada mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* dan untuk mengetahui derajat keparahan kerusakan ginjal yang disebabkan oleh malaria falciparum sebagai penyebab kematian utama pada semua kasus malaria.

## Metode

Penelitian ini menggunakan metode deksriptif analisis dengan pendekatan kuantitatif. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Dr. Adrial pada tahun 2017 mengenai pengaruh ekstrak kelenjar ludah *An. sudaicus* terhadap kadar IL 12, IL 10, Nitrit Oksida (NO), dan kepadatan parasitemia mencit putih yang diinfeksi dengan *P. berghei* menggunakan metode eksperimental dengan desain *The Post Test Only Control Group Design*.

Populasi penelitian adalah semua preparat organ mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* yang sebelumnya telah diimunisasi dengan menggunakan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sudaicus* yang telah dibuat pada penelitian induk.

Penelitian ini menggunakan preparat ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* yang sebelumnya telah diimunisasi dengan menggunakan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. Sudaicus* yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Kriteria inklusi: preparat ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* dengan kondisi mencit yang masih hidup sampai akhir penelitian pada penelitian sebelumnya. Kriteria eksklusi : preparat ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* yang mengalami kerusakan dan tidak bisa dibaca dibawah mikroskop.

Data hasil yang diperoleh berupa nilai rerata dari tingkat perubahan gambaran histopatologi ginjal mencit yang diinfeksi *P. berghei* dan sebelumnya telah dilakukan imunisasi dengan 3 perlakuan yang berbeda dinilai berdasarkan sel tubulus yang mengalami nekrosis dijumlah kemudian dirata-rata dengan menggunakan *WPS Office Spreadsheets* dan dibandingkan dengan setiap perlakuan. Pengamatan pada morfologi dan

jumlah sel nekrotik ginjal dilakukan pada bagian korteks di beberapa lapang pandang.

Nomor izin kaji etik pada penelitian ini adalah No: 35/UN.16.2/KEP-FK/2020, dan institusi yang mengeluarkan no izin kaji etik penelitian ini adalah Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

## Hasil

Pembacaan preparat telah dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Hasil yang didapatkan pada setiap kelompok penelitian berupa rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* yang sebelumnya diimunisasi dengan grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan disajikan secara berturut-turut dalam Tabel 1, 2 dan 3. Perbandingan rerata kerusakan sel tubulus ginjal ketiga kelompok penelitian disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Rata-Rata Kerusakan Sel Tubulus Ginjal Mencit *Mus musculus Balb/C* yang Diinfeksi dengan *P. berghei* yang Sebelumnya Diimunisasi dengan Grup Kontrol.

No	Rerata Sel Tubulus Ginjal yang Mengalami Nekrosis pada Korteks (%)					Mean ± SD (%)
	1	2	3	4	5	
4	8,75	9,45	9,60	5,68	11,79	9,05 ± 2,21
5	11,15	10,74	7,03	8,30	6,54	8,75 ± 2,11
6	11,11	11,30	8,76	7,57	12,43	10,23 ± 2,00
7	11,46	9,17	5,90	7,55	7,97	8,41 ± 2,07
8	8,63	6,91	7,33	8,27	7,24	7,68 ± 0,74
14	7,17	5,13	6,47	5,65	7,64	6,41 ± 1,04
<b>Total Rerata</b>						<b>8,42 ± 2,02</b>

Tabel 2. Hasil Perhitungan Rata-Rata Kerusakan Sel Tubulus Ginjal Mencit *Mus musculus Balb/C* yang Diinfeksi dengan *P. berghei* yang Sebelumnya Diimunisasi dengan Ekstrak Pellet.

No	Rerata Sel Tubulus Ginjal yang Mengalami Nekrosis pada Korteks (%)					Mean ± SD (%)
	1	2	3	4	5	
4	3,85	4,41	4,31	4,09	3,65	4,06 ± 0,31
5	4,36	3,76	3,06	5,03	5,02	4,25 ± 0,85
6	5,44	4,92	5,54	5,63	3,97	5,10 ± 0,69
7	3,44	3,99	3,06	3,87	3,93	3,66 ± 0,40
8	5,31	4,23	5,40	3,93	5,65	4,91 ± 0,77
14	4,53	6,21	5,17	5,26	4,56	5,15 ± 0,69
<b>Total Rerata</b>						<b>4,52 ± 0,82</b>

Tabel 3. Hasil Perhitungan Rata-Rata Kerusakan Sel Tubulus Ginjal Mencit *Mus musculus Balb/C* yang Diinfeksi dengan *P. berghei* yang Sebelumnya Diimunisasi dengan Ekstrak Supernatan.

No	Rerata Sel Tubulus Ginjal yang Mengalami Nekrosis pada Korteks (%)					Mean ± SD (%)
	1	2	3	4	5	
4	2,17	3,13	2,44	2,67	3,10	2,70 ± 0,41
5	3,76	2,20	2,82	2,82	2,88	2,89 ± 0,56
6	1,94	2,16	2,52	2,44	3,69	2,55 ± 0,68
7	1,88	2,09	2,04	2,45	2,11	2,11 ± 0,21
8	2,99	2,78	3,14	2,79	3,57	3,05 ± 0,33
14	2,82	2,43	3,15	3,44	3,81	3,13 ± 0,54
<b>Total Rerata</b>						<b>2,74 ± 0,56</b>

Tabel 4. Perbandingan Hasil Perhitungan Rata-Rata Kerusakan Sel Tubulus Ginjal Mencit *Mus musculus Balb/C* yang Diinfeksi dengan *P. berghei* yang Sebelumnya Diimunisasi dengan Grup Kontrol, Ekstrak Pellet dan Ekstrak Supernatan.

Kelompok	Rerata Persentase Kerusakan Sel Tubulus		
	Kontrol (%)	Pellet (%)	Supernatan (%)
<b>Mencit 4</b>	9,05 ± 2,21	4,06 ± 0,31	2,70 ± 0,41
<b>Mencit 5</b>	8,75 ± 2,11	4,25 ± 0,85	2,89 ± 0,56
<b>Mencit 6</b>	10,23 ± 2,00	5,10 ± 0,69	2,55 ± 0,68
<b>Mencit 7</b>	8,41 ± 2,07	3,66 ± 0,39	2,11 ± 0,21
<b>Mencit 8</b>	7,68 ± 0,74	4,91 ± 0,77	3,05 ± 0,33
<b>Mencit 14</b>	6,41 ± 1,04	5,15 ± 0,69	3,13 ± 0,54
<b>Mean ± SD (%)</b>	<b>8,42 ± 2,02</b>	<b>4,52 ± 0,82</b>	<b>2,74 ± 0,56</b>

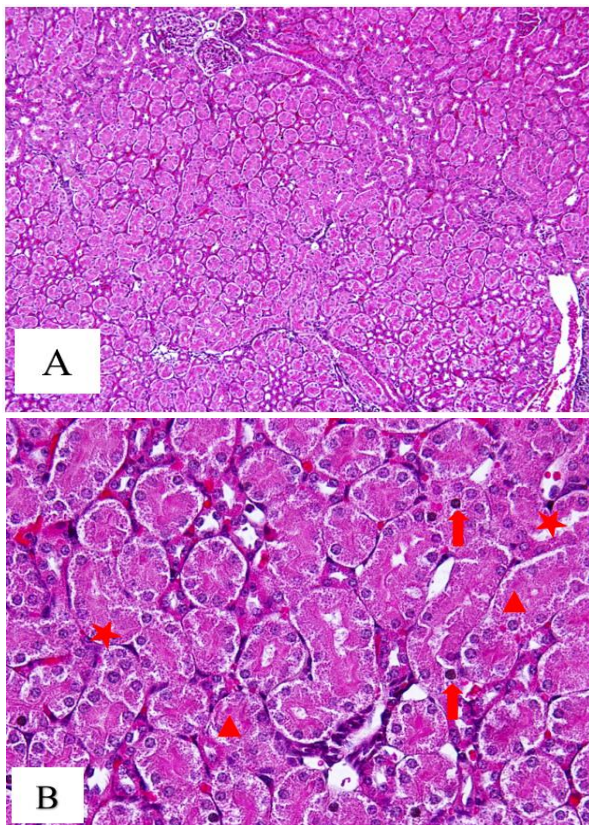
Berdasarkan hasil pada Tabel 1 didapatkan nilai rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal pada mencit yang diimunisasi grup kontrol adalah 8,42%, dengan rerata kerusakan tertinggi terdapat pada sampel no. 6, yaitu 10,23% dan rerata kerusakan terendah terdapat pada sampel no. 14, yaitu 6,41%.

Berdasarkan hasil pada Tabel 2 didapatkan nilai rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal pada mencit yang diimunisasi ekstrak pellet adalah 4,52%, dengan rerata kerusakan tertinggi terdapat pada sampel no. 14, yaitu 5,15% dan rerata kerusakan terendah terdapat pada sampel no. 4, yaitu 4,06%.

Berdasarkan hasil pada Tabel 3 didapatkan nilai rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal pada mencit yang diimunisasi ekstrak supernatan adalah 2,74%, dengan rerata kerusakan tertinggi terdapat pada sampel no. 14,

yaitu 3,13% dan rerata kerusakan terendah terdapat pada sampel no. 7, yaitu 2,11%.

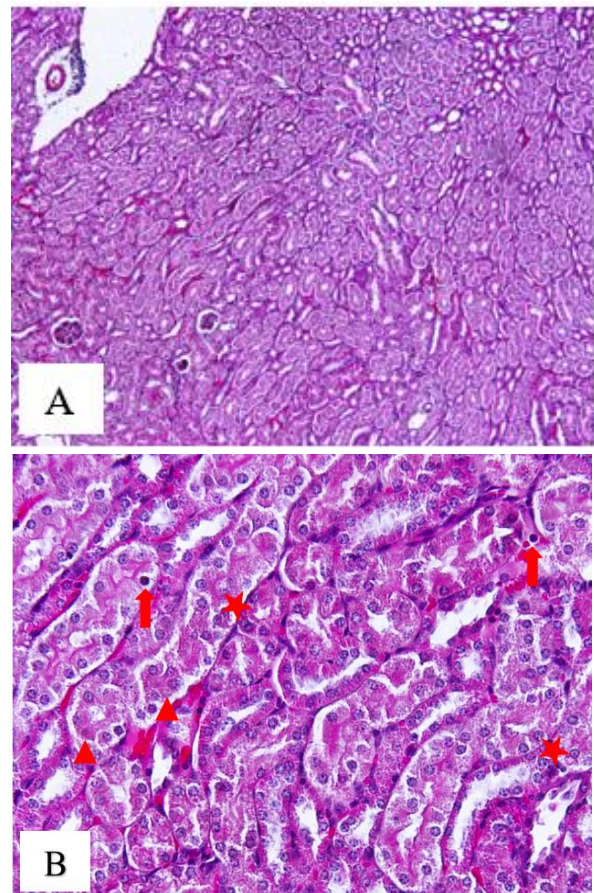
Berdasarkan hasil pada Tabel 4 didapatkan nilai rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal pada mencit yang diimunisasi grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan secara berturut-turut adalah 8,42%, 4,52%, dan 2,74%. Nilai rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal tertinggi terdapat pada grup kontrol dan terendah terdapat pada perlakuan dengan imunisasi ekstrak supernatan.



Gambar 1. Gambaran Mikroskopis Grup Kontrol. Pengecatan H&E. A) Perbesaran 100 Kali. B) Perbesaran 400 Kali. Sel Tubulus Inti Piknosis (←), Inti Karioreksis (★), dan Inti Kariolisis (▶)

Gambaran histopatologi kerusakan sel tubulus ginjal mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* yang sebelumnya diimunisasi dengan grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan secara berturut-turut disajikan pada Gambar 1, 2 dan 3. Pada Gambar 1 terlihat gambaran mikroskopis sel tubulus ginjal grup kontrol yang hanya diberikan campuran PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dengan ajuvan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) dan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*). Pada preparat ini ditemukan

sangat banyak sel yang mengalami nekrosis, terutama inti piknosis yang langsung terlihat jelas, yang ditunjukkan oleh tanda panah (←).

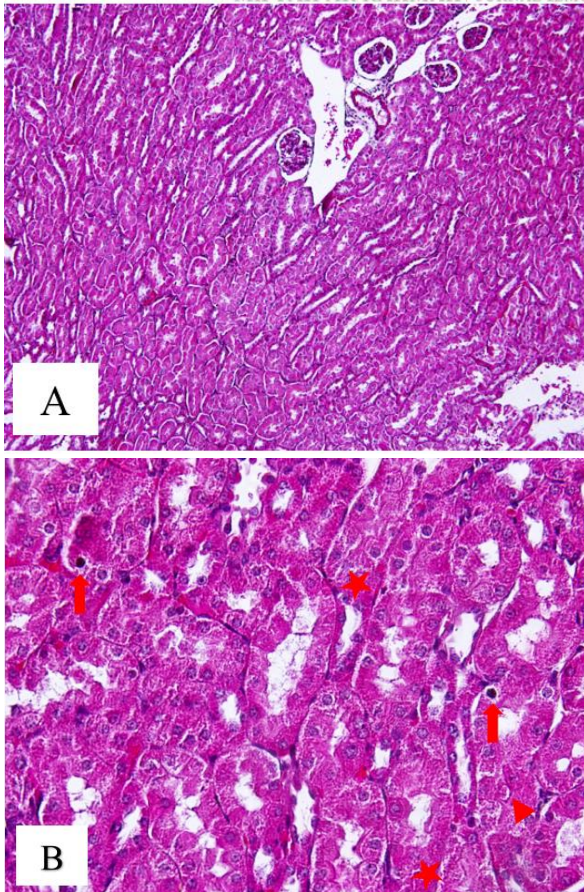


Gambar 2. Gambaran Mikroskopis Ekstrak Pellet. Pengecatan H&E. A) Perbesaran 100 Kali. B) Perbesaran 400 Kali. Sel Tubulus Inti Piknosis (←), Inti Karioreksis (★), dan Inti Kariolisis (▶)

Pada Gambar 2 terlihat gambaran mikroskopis sel tubulus ginjal yang diimunisasi dengan ekstrak ginjal yang diinfeksi dengan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sudaicus* dicampur PBS dengan ajuvan IFA dan CFA kemudian di sentrifugasi dan terdapat pada bagian dasar. Tampak adanya sel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis yang ditandai dengan inti piknosis, kariorekisis dan kariolisis lebih sedikit dibandingkan dari grup kontrol.

Pada Gambar 3 terlihat gambaran mikroskopis sel tubulus ginjal yang diimunisasi dengan ekstrak supernatan yang merupakan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sudaicus* dicampur PBS dengan ajuvan IFA dan CFA kemudian di sentrifugasi dan

terdapat pada bagian permukaan. Tampak adanya sel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis yang ditandai dengan inti piknosis, karioreksis dan kariolisis lebih sedikit dibandingkan dari grup kontrol dan dari sampel yang diimunisasi ekstrak pellet.



Gambar 3. Gambaran Mikroskopis Supernatan. Pengecatan H&E. A) Perbesaran 100 Kali. B) Perbesaran 400 Kali. Sel Tubulus Inti Piknosis (←), Inti Karioreksis (★), dan Inti Kariolisis (▶)

## Diskusi

### Kerusakan Sel Tubulus Ginjal

Hasil penelitian yang didapatkan untuk rerata persentase kerusakan sel tubulus pada imunisasi grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan secara berturut turut adalah 8,42%, 4,52%, dan 2,74%. Kelompok penelitian yang memiliki rerata persentase kerusakan sel tubulus paling banyak adalah mencit yang diimunisasi grup kontrol sedangkan kelompok dengan kerusakan sel tubulus paling sedikit adalah mencit yang diimunisasi ekstrak supernatan. Pemberian imunisasi dengan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sundaicus* memiliki kemungkinan untuk mengurangi jumlah nekrosis

sel tubulus ginjal karena partikel besar yang mengendap dan partikel kecil yang terlarut dapat berperan untuk meningkatkan imunitas tubuh host sehingga mengurangi jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit pada mikrosirkulasi. Hal ini sesuai dengan definisi dari ekstrak pellet dan supernatan menurut Griffith (2010), ekstrak supernatan ini merupakan partikel-partikel kecil yang terlarut pada larutan sisa endapan partikel besar yang terkonsentrasi pada bagian bawah tabung sentrifus. Partikel kecil dari ekstrak kelenjar ludah nyamuk yang terlarut tersebut memiliki efek proteksi yang baik untuk mencit terhadap paparan infeksi malaria sehingga mengurangi tingkat keparahan kerusakan organ yang akan muncul karena malaria.<sup>17,18</sup>

Imunisasi mencit dengan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sundaicus* terbukti dapat menurunkan rerata persentase kerusakan sel tubulus ginjal pada gambaran mikroskopisnya. Hal ini memungkinkan imunisasi dengan menggunakan ekstrak kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* mampu mencegah perburukan kerusakan sel tubulus ginjal lebih lanjut. Bentuk imunisasi dalam upaya mencegah infeksi malaria pada inang dan mencegah kerusakan organ yang berhubungan dengan kelenjar ludah nyamuk telah dibuktikan pada penelitian serupa yang dilakukan oleh Dragovic, *et al.* (2018), terdapat penurunan angka infeksi *P. berghei* pada mencit yang diimunisasikan dengan antiserum antigen kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* dengan cara kerja mengurangi aktivitas gerak sporozoit di dermis mencit sehingga mengurangi jumlah *Plasmodium* di dalam pembuluh darah mencit dan mencegah terjadinya kerusakan organ.<sup>19</sup> Angka kerusakan tertinggi yang terdapat pada ginjal mencit dengan imunisasi grup kontrol disebabkan karena tidak ada campuran ekstrak kelenjar ludah nyamuk *An. sundaicus* yang memiliki efek proteksi pada mencit terhadap *P. berghei*.<sup>20</sup>

Efek proteksi yang dimiliki oleh air ludah nyamuk *An. sundaicus* dengan peran penting pada imunitas serta faktor koagulasi host kemungkinan adalah komponen vasomodulator dan imunomodulator yang berfungsi dalam proses penghisapan darah dan transmisi patogen, salah satunya adalah parasit *Plasmodium* ke dalam tubuh inangnya. Pengeluaran air ludah nyamuk pada saat transmisi patogen dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Sor suwan, *et al.*

(2014), terdapat penurunan jumlah protein air ludah nyamuk pada saat nyamuk betina menghisap darah inangnya.<sup>21</sup> Komponen vasomodulator berfungsi sebagai antihemostasis, dengan cara menghambat proses vasokonstriksi, aktivitas agregasi trombosit, faktor koagulasi dan kaskade hemostasis, serta komponen imunomodulator berfungsi untuk menekan efek imunitas nonspesifik dan mengubah respon imun spesifik ke arah Th 2 sehingga lebih menguntungkan vektor pada paparan pertama. Perangsangan respon imun spesifik kearah Th 2 yang meningkatkan produksi antibodi inang pada awal gigitan nyamuk *Anopheles* telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Armiyanti, *et al.* (2017), terdapat peningkatan antibodi IgG anti-protein saliva pada penderita malaria akut dan orang sehat yang berada di wilayah endemis malaria.<sup>22</sup> Perangsangan respon imun spesifik kearah Th 1 terjadi pada saat paparan berulang imunisasi kelenjar ludah nyamuk. Hal tersebut telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan Aridama, *et al.* (2012), pada paparan berulang imunisasi ekstrak kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* akan menyebabkan pergeseran respon imun inang ke arah Th 1 yang sangat menguntungkan bagi inang. Subset Th 1 akan meningkatkan respon imun selular sehingga akan menghambat pertumbuhan dan perkembangan parasit di jaringan.<sup>15,20</sup>

Peningkatan peran Sel Th 2 kemungkinan akan meningkat pada awal imunisasi ekstrak kelenjar ludah nyamuk dan peningkatan peran sel Th 1 kemungkinan akan meningkat pada paparan berulang imunisasi ekstrak kelenjar ludah nyamuk juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Machrus, *et al.* (2014), terdapat peningkatan kadar IL 4 yang merupakan sitokin yang disekresikan oleh sel T yang telah teraktivasi menjadi Th 2 pada imunisasi pertama komponen ekstrak kelenjar ludah nyamuk dalam tubuh inang dan penurunan kadar IL 4 setelah paparan berulang imunisasi ekstrak kelenjar ludah yang menandakan penurunan peran sel Th 2 dan peningkatan peran sel Th 1.<sup>23</sup> Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Adrial, *et al.* (2013), terdapat peningkatan sitokin IFN- $\gamma$  yang merupakan sitokin yang disekresikan oleh sel Th 1 setelah paparan berulang dengan imunisasi kelenjar ludah nyamuk menandakan adanya respon protektif yang lebih

menguntungkan bagi inang dibandingkan vektor.<sup>24</sup> Efek proteksi yang tidak dimiliki mencit dari kelompok kontrol akan menyebabkan tingginya derajat parasitemia didalam tubuh mencit.

Peningkatan kadar parasitemia didalam tubuh mencit dari kelompok kontrol telah dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Adrial, *et al.* (2017), mengenai perbedaan derajat parasitemia pada mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* setelah diberikan imunisasi dengan menggunakan grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan. Pada penelitian tersebut didapatkan persentase derajat parasitemia ekstrak supernatan, ekstrak pellet dan grup kontrol secara berturut turut yaitu, 3,35%, 7,02%, dan 8,81%. Persentase derajat parasitemia tertinggi terdapat pada mencit yang diimunisasi grup kontrol, diikuti dengan ekstrak pellet dan persentase terendah terdapat pada mencit yang diimunisasi ekstrak supernatan.<sup>25</sup> Peningkatan derajat parasitemia pada mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* berbanding lurus dengan peningkatan kerusakan sel tubulus ginjal yang terjadi karena kemungkinan adanya penurunan aliran darah ke ginjal dalam waktu yang lama. Derajat parasitemia yang tinggi pada mencit akan menyebabkan tingginya angka eritrosit yang terinfeksi oleh parasit pada saat parasit mencapai pembuluh darah. Parasit yang menginfeksi eritrosit akan menyebabkan hemolisis eritrosit secara besar-besaran sehingga mencapai ke mikrosirkulasi. Pada mikrosirkulasi akan terjadi proses sitoaderansi, sekuesterasi dan *rosetting*. Sitoaderansi terjadi karena terdapatnya knob PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1*) yang menyebabkan perlekatan eritrosit terinfeksi ke endotel pembuluh darah. Sekuesterasi terjadi karena *cytoadhesion* pada kapiler dan venula serta terjadi akibat kekakuan dari sel darah merah yang terinfeksi. *Rosetting* terjadi karena menempelnya eritrosit yang tidak terinfeksi pada sel eritrosit yang sudah terinfeksi.<sup>26</sup>

Proses hemolisis kemungkinan mempengaruhi proses pembekuan darah atau sistem koagulasi. Gangguan yang terjadi pada sistem koagulasi meliputi trombositopenia, disfungsi trombosit, aktivasi koagulasi serta deposit fibrin akibat kerusakan endotel. Hal ini berhubungan dengan penelitian yang dilakukan oleh Fontaine, *et al.*

(2011), Komponen vasomodulator pada air ludah nyamuk *Anopheles* dapat menghambat atau menurunkan proses agregasi trombosit sehingga akan menyebabkan penurunan risiko sumbatan aliran darah di mikrosirkulasi dan mencegah terjadinya kerusakan pada ginjal. Komponen vasomodulator yang dapat menghambat atau menurunkan proses agregasi platelet yaitu, *anophelin* dan *hamadarin*. *Anophelin* akan bekerja sebagai *alpha thrombin inhibitor* yang bertujuan menghambat proses agregasi trombosit. *Hamadarin* berfungsi untuk menghambat kerja kaskade koagulasi yaitu pada perubahan faktor *hageman* (FXII-XIIa).<sup>27</sup> Penelitian lain yang terkait dengan komponen vasodilator, antikoagulan dan immunomodulator yang terdapat pada kelenjar ludah nyamuk adalah penelitian yang dilakukan oleh Septiawan, *et al.* (2017), protein D7 family merupakan protein yang berfungsi sebagai vasodilator, antikoagulan, dan immunomodulator. Protein ini akan menurunkan permeabilitas kapiler darah sehingga mengurangi jumlah mengurangi jumlah sel darah putih dan protein - protein sistem imun yang dikeluarkan sehingga sistem imun inang dapat dimodulasi dan memudahkan parasit masuk kedalam darah dengan mudah.<sup>28</sup> Imunitas yang sudah dimodulasi oleh protein pada kelenjar ludah nyamuk *An. sondaicus* sebagai immunomodulator akan menguntungkan bagi vektor di awal imunisasi ekstrak supernatan dan pellet.

Sumbatan pembuluh darah dalam waktu yang lama akan menyebabkan terjadinya ATN. Kejadian ATN dapat dilihat dengan mengamati kerusakan sel tubulus ginjal dengan menggunakan mikroskop cahaya berupa gambaran sel tubulus yang mengalami nekrosis ditandai dengan inti piknosis, karioreksis dan kariolisis. Kejadian ATN akibat infeksi mencit dengan *P. berghei* ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Junaid, *et al.* (2017), terdapat perbedaan gambaran histopatologi ginjal rodensia sebelum dan setelah diinfeksi dengan *P. berghei*. Ginjal memberikan gambaran lebih pucat secara makroskopis dan secara mikroskopis memberikan gambaran nekrosis pada tubulus ginjal.<sup>12,29</sup> Kejadian ini juga dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Yoo DE, *et al.* (2012), terbukti ATN adalah penyakit awal yang mendahului komplikasi AKI sebagai bentuk kerusakan ginjal

pada malaria yang disebabkan oleh infeksi *P. falciparum* yang dianalogikan dengan *P. berghei*.<sup>30</sup>

Kerusakan ginjal akibat infeksi *P. berghei* kemungkinan bisa terjadi dengan berbagai macam mekanisme, selain sumbatan langsung terhadap pembuluh darah yang bisa menyebabkan penurunan aliran darah, kerusakan disebabkan juga oleh perubahan permeabilitas kapiler ginjal. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan Elisa, *et al.* (2012), terdapat perubahan permeabilitas kapiler ginjal karena produk stress oksidatif yang dihasilkan selama infeksi, penurunan pengiriman oksigen ke sel dan jaringan sehingga menimbulkan hipoksia serta diperberat karena penurunan efisiensi antioksidan dan mekanisme sitoprotektif pada mencit *Mus musculus Balb/C* yang diinfeksi *P. berghei*. Peningkatan produk stress oksidatif juga ditandai dengan peningkatan ekspresi LOX-1 (*Lectin Like Oxidized LDL Receptor-1*) yang diekspresikan oleh sel glomerulus ginjal.<sup>13</sup> Kerusakan sel ginjal karena adanya penurunan aliran darah ke mikrosirkulasi ginjal dan proses lainnya kemungkinan dapat dilihat dari perubahan fungsi tubulus. Penelitian terkait yang berhubungan dengan perubahan fungsi tubulus sebagai bukti kerusakan ginjal akibat infeksi *P. berghei* dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Silva, *et al.* (2018), terdapat penurunan reabsorpsi natrium pada tubulus kurtortus proksimal dan peningkatan jumlah cairan yang diterima pada tubulus kurtortus distal yang membuktikan adanya kerusakan pada tubulus mencit setelah diinfeksi oleh *P. berghei*. Kerusakan tersebut dihubungkan dengan adanya proses sitoadherensi kapiler peritubular yang menyebabkan penurunan aliran darah ke sel tubulus.<sup>31</sup> Penurunan aliran darah ke mikrosirkulasi ginjal dalam waktu yang lama ini akan mempengaruhi perubahan morfologi dan sifat pada sel tubulus. Perubahan tersebut juga dipengaruhi oleh seberapa lama mikrosirkulasi ginjal tersumbat oleh proses yang disebabkan karena adanya eritrosit yang terinfeksi parasit.

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 yang terpengaruh karena kondisi penurunan aliran



darah ke ginjal sehingga mengalami jejas. Proses yang penting dari kejadian nekrosis adalah autolisis dan heterolisis. Autolisis merupakan kondisi dimana enzim katalitik dari lisosom sel yang mati mencerna secara enzimatis bagian tubuhnya sendiri, sedangkan apabila enzim katalitik itu berasal dari lisosom leukosit imigran disebut heterolisis. 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 diduga karena DNAase.<sup>29,32,33</sup> Perbedaan inti sel yang piknosis, karioreksis dan kariolisis dipengaruhi oleh seberapa lama sumbatan mikrosirkulasi terjadi. Urutan kerusakannya berdasarkan waktu didahului dengan terjadinya piknotik, selanjutnya karioreksis dan dalam jangka waktu yang sangat lama terjadi kariolisis.<sup>33</sup>

### Simpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan bahwa nilai rerata nekrosis sel tubulus ginjal mencit *Mus musculus Balb / C* yang diinfeksi dengan *P. berghei* yang sebelumnya diimunisasi dengan grup kontrol, ekstrak pellet dan ekstrak supernatan tertinggi terdapat pada grup kontrol dan terendah terdapat pada perlakuan dengan imunisasi ekstrak supernatan.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih peneliti sampaikan kepada semua pihak yang turut membantu dalam menyelesaikan dan menyempurnakan penelitian ini.

### Daftar Pustaka (revisi)

1. Ghazanfari, N, Mueller SN, Heath WR, Craig A. Cerebral Malaria in Mouse and Man. 2018; 9(September). p. 1-11.
2. Rai, P, Sharma D, Soni R, Khatoon N, Sharma B, Bhatt TK. *Plasmodium falciparum* apicoplast and its transcriptional regulation through calcium signaling. 2017. p. 1-6
3. Wahlgren, M, Goel S, Akhouri RR. Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. Sweden : Karolinska Institutet (KI), Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC). 2017.

4. Milner, DA. Malaria Pathogenesis. Massachusetts: Harvard T.H. Chan School of Public Health. 2018. p. 1-11
5. Shanks, GD. The Multifactorial Epidemiology of Blackwater Fever. 2017; 97(March 1943). p. 1804-1807.
6. Maria, G, Farias N, Daher EDF. Kidney involvement in malaria: an update. 2017; (February). p. 1-6.
7. Kaur, C, Pramanik A, Kumari K, Mandage R, Dinda AK. Renal detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* in malaria associated acute kidney injury: a retrospective case – control study. *BMC Res Notes*. 2020. p. 1-7.
8. Nayak, KC, Kumar S, Gupta BK, Surendar K, Gupta A, Prakash P, *et al*. Clinical and histopathological profile of acute renal failure caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* mono-infection: An observational study from Bikaner, northwest zone of Rajasthan, India. 2014; (March). p. 40-46.
9. Koopmans LC, Wolfswinkel ME Van, Hesselink DA, Hoorn EJ, Koelewijn R, Hellemond JJ, *et al*. Acute kidney injury in imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*. 2015. p. 1-7.
10. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int*. 2012 March; 81(5): 442 - 448.
11. Dehghan, H, Oshaghi MA, Mosa-Kazemi SH, Abai MR, Rafie F, Nateghpour M, *et al*. Experimental study on *Plasmodium berghei*, *Anopheles stephensi*, and *Mus musculus BALB/C* mouse system: Implications for malaria transmission blocking assays. *Iran J Parasitol*. 2018; 13(4): 549-559.
12. Junaid QO, Khaw LT, Mahmud R, Ong KC, Lau YL, Borade PU, *et al*. Pathogenesis of *Plasmodium berghei* ANKA infection in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental model for severe malaria. 2017; 24: 38.
13. Elias RM, Correa-costa M, Barreto CR, Silva RC, Hayashida CY, Castoldi A, *et al*. Oxidative Stress and Modification of Renal Vascular Permeability Are Associated with Acute Kidney Injury during *P. berghei* ANKA Infection. 2012; 7(8): 1-11.
14. Briquet, S, Nadou L.H, Bertran B, Soares MP, Peronet R Smith L, *et al*. Disruption of parasite hmg2 gene attenuates *Plasmodium berghei* ANKA pathogenicity. 2015 Jul; 83(7): 2771-2784.
15. Adrial. Pengaruh ekstrak kelenjar ludah *Anopheles sudaicus* terhadap kadar IL 12, IL 10, Nitrit Oksida (NO), dan kepadatan parasitemia mencit putih yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. Disertasi: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 2017.
16. Maier, AG, Matuschewski K, Zhang M, Rug M. *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2018. p. 10-11.
17. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Laz VN, Kulemin NA, Semina SE. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Report*. 2015. p. 1-13.
18. Griffith OM, Ph D. Practical Techniques for Centrifugal Separations. Thermo Scientific: 2010.
19. Dragovic SM, Agunbiade TA, Freudzon M, Yang J, Hastings AK, Schleicher TR, *et al*. Immunization with AgTRIO, a Protein in *Anopheles* Saliva, Contributes to Protection against *Plasmodium* Infection in Mice. *HHS Public Access*. 2018; 23(4): 523-535

20. Aridama WR, Senjarini K. Derajat Parasitemia Mencit Galur *Mus musculus BALB/C* yang Divaksinasi Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* sebagai Model Transmission Blocking Vaccine (TBV) Melawan Malaria. Fakultas Kedokteran Universitas Jember. 2012. p. 1-5.
21. Sor-suwan S, Jariyapan N, Roytrakul S, Paemane A. Identification of Salivary Gland Proteins Depleted after Blood Feeding in the Malaria Vector *Anopheles campestris*-like Mosquitoes (Diptera: Culicidae). 2014; 9(3): 1-9.
22. Armiyanti Y, Fitri LE, Sardjono TW. Respon Humoral terhadap Protein Kelenjar Saliva Nyamuk *Anopheles maculatus* dan *Anopheles sundaicus*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember. 2017; 3(2): 53-61.
23. Machrus A, Adrial, Armiyanti Y, Wiyono HT, Senjarini K. Profil Interleukin-4 dan Interferon Gamma pada Mencit galur *Mus musculus Balb/C* Pasca Vaksinasi Ekstrak Kelenjar saliva *Anopheles sundaicus* dan Diinfeksi *Plasmodium berghei* - ANKA. Jurnal Ilmu Dasar. 2014; 15(2): 75-80.
24. Adrial, Edward Z, Lestari S. Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Sebagai Target Potensial Dalam Pembuatan Transmission Blocking Vaccine (TBV) Melawan Malaria. Prosiding Semirata Universitas Lampung. 2013. p. 21-30.
25. Adrial, Nasrul E, Rasyid R. Parasitemia Density Of White Mice Vaccinated of *Anopheles sundaicus* Salivary Gland Extract And *Plasmodium berghei* Infected As A Model In Fighting Malaria. Proceedings of the 1<sup>st</sup> EAI International Conference on Medical And Health Research, ICoMHER November 13-14<sup>th</sup> 2018, Padang, West Sumatera, Indonesia. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 2018. p. 1-8.
26. Plewes K, Turner GDH, Dondorp AM. Pathophysiology clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating falciparum malaria. 2018. p. 69-77.
27. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. 2011: 1-17.
28. Septiawan M, Budayatin, Wiyono HT dan Senjarini K. Imunogenitas Ekstrak Protein Kelenjar Saliva dari *Anopheles aconitus* di Daerah Endemik. Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. 2017; 18(1): 25-30.
29. Bakti AS. Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit (*Mus musculus*) Setelah Diinduksi Racun Lebah (*Apis mellifera*) [skripsi]. Bogor (ID): Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. 2018.
30. Yoo DE, Kim JH, Kie JH, Park Y. Immunoglobulin A Nephropathy Associated with *Plasmodium falciparum* Malaria. 2012: 446-449.
31. Silva LS, Peruchetti DB, Silva-aguiar RP, Abreu TP, Dal-Chaeri BKA, Takiya CM, et al. The angiotensin II / AT1 receptor pathway mediates malaria-induced acute kidney injury. 2018. p. 1-13.
32. Zachary JF, McGavin MD. Pathologic Basis of Veterinary Disease-E-Book. St. Louis (US): Elsevier Health Sciences; 2013.
33. Fahrimal Y, Aliza D. Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Diinfeksi *Trypanosoma evansi* Dan Diberi Ekstrak Daun Sernai (*Wedelia biflora*). Jurnal Medika Veterinaria. 2014; 10(2): 166-170.