



**PENGARUH PEMBERIAN DOSIS BERTINGKAT PROTEIN  
REKOMBINAN DBL2 $\beta$ -PfEMP1 TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR  
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Nisrina Hana Aziza  
202010101056**

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



**PENGARUH PEMBERIAN DOSIS BERTINGKAT PROTEIN  
REKOMBINAN DBL2 $\beta$ -PfEMP1 TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR  
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

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

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Nisrina Hana Aziza  
202010101056**

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

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua saya, Ayah dan Mama yang tercinta;
2. Kakak dan adik saya yang tersayang;
3. Guru-guru saya yang telah mendidik dan membimbing saya mulai dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, serta;
4. Almamater saya, Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



**MOTTO**

“Jika kamu tidak sanggup menahan lelahnya belajar, maka kamu harus sanggup menahan perihnya kebodohan.”

(Imam Syafi’i)\*



---

\*) Imron, M. J. (2023). *Jangan Pernah Berhenti Belajar* (1st ed.). Pustaka Imam Asy-Syafi'i.

**PERNYATAAN ORISINALITAS**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nisrina Hana Aziza

NIM : 202010101056

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “*Pengaruh Pemberian Dosis Bertingkat Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap Gambaran Histopatologi Tikus Wistar (Rattus norvegicus)*” 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, 18 Januari 2024

Yang menyatakan,



Nisrina Hana Aziza

NIM 2020101056

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Dosis Bertingkat Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap Gambaran Histopatologi Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)” telah diuji dan disetujui oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

Hari : Kamis  
Tanggal : 18 Januari 2024  
Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M. Kes.

NIP. 197203182003122001

dr. Nindya Shinta Rumastika, M. Ked.,  
Sp. THT-KL.

NIP. 197808312005012001

Anggota II,

Anggota III,

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

dr. Sheilla Rachmania, M. Biotek.

NIP. 199010122015042001

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,



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

**ABSTRACT**

*Malaria is a serious global health problem, and Plasmodium falciparum is the most prevalent and causing severe cases. Vaccination is a key preventive strategy. The Duffy binding-like 2 $\beta$  (DBL2 $\beta$ ) domain is a protein of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1 (PfEMP1) that can potentially become a malaria vaccine candidate. The recombinant DBL2 $\beta$ -PfEMP1 protein has been shown to elicit humoral and cellular immune responses. Therefore, further study on the safety of the protein to various organs, including the liver, needs to be conducted. The liver is a detoxification organ. Exposure to any substances potentially affects the liver structure. This study aimed to determine the effect of recombinant DBL2 $\beta$ -PfEMP1 protein injection at gradual doses on the liver histopathology of Wistar rats. The protein is produced, purified, and finally measured for its concentration using Bradford protein assay. The protein was injected subcutaneously at the dose of 100, 150, and 200  $\mu\text{g}/\text{kgBW}$  to each treatment group and NaCl 0.9% to the control group. The injections were done on days 0, 21, and 42 and terminated on day 56 for organ harvesting. The parameters of liver histopathology were changes in hepatocyte shape and widening of the hepatic sinusoids were examined using a light microscope and an Outilab camera with the Fiji ImageJ software. Each slide was observed in 5 fields of view from zone III. The hepatocyte was observed using 400 $\times$  magnification and scored based on the Manja Roenigk classification, and the sinusoid dilatation was assessed using 100 $\times$  magnification and scored based on the hepatic sinusoid lesion classification. Statistical analysis using the One-Way ANOVA test for hepatocytes showed  $p=0.461$ , indicating no significant difference between the control and treatment groups, and the Post-Hoc Tukey test results in  $p>0.05$ , indicating no significant difference between the individual groups on hepatocyte features. Analysis of hepatic sinusoids using the Kruskal-Wallis test showed  $p=0.260$ , indicating no significant difference between the control and treatment groups, and the Post-Hoc Mann-Whitney test results in  $p>0.05$ , indicating no significant difference between the individual groups on hepatic sinusoid features. The study concluded that the injection of recombinant DBL2 $\beta$ -PfEMP1 protein at gradual dose did not affecting the liver structure and indicating its safety as malaria vaccine candidate.*

*Keywords: protein, Duffy binding-like domain, histopathology, liver, malaria vaccine candidate*

## RINGKASAN

**Pengaruh Pemberian Dosis Bertingkat Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*);** Nisrina Hana Aziza; 202010101056; 2024; 48 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Malaria merupakan penyakit infeksi akibat *Plasmodium sp.* dan *P. falciparum* menjadi penyebab malaria terbanyak yang mampu mengakibatkan malaria berat, salah satunya karena mengekspresikan PfEMP1 pada permukaan eritrosit terinfeksi. Domain penting dari PfEMP1 adalah DBL2 $\beta$  domain yang secara spesifik mampu mengikat ICAM-1 sehingga menjadi perantara sitoadherensi. Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 telah terbukti bersifat imunogenik sehingga berpotensi menjadi kandidat vaksin malaria. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji keamanan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap berbagai organ tubuh, salah satunya adalah hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat terhadap gambaran histopatologi hepar tikus wistar.

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan rancangan *post-test only control group*. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol dengan 3 ekor tikus dan 3 kelompok perlakuan dengan masing-masing 4 ekor tikus. Kelompok kontrol diinjeksi NaCl 0,9% sedangkan kelompok perlakuan diinjeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis 100, 150, dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ . Injeksi dilakukan pada hari ke-0, 21, dan 42 serta terminasi pada hari ke-56. Organ hepar diambil untuk pemeriksaan histopatologi. Preparat diamati dan dinilai menggunakan skoring *Manja Roenigk* dan skoring lesi sinusoid hepar. Data hasil pengamatan hepatosit dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Tukey* sedangkan data pengamatan sinusoid hepar dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Mann-Whitney*.

Hasil rata-rata skor *Manja Roenigk* pada kelompok kontrol, perlakuan dosis 100, 150, dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  berturut-turut adalah  $100,5 \pm 0,500$ ,  $101 \pm 0,816$ ,  $101,375 \pm 0,629$ , dan  $101,25 \pm 0,866$ . Hasil uji *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai  $p=0,461$  sehingga tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji *Post-Hoc Tukey* menghasilkan nilai  $p>0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok. Hasil rata-rata skor lesi sinusoid hepar pada kelompok kontrol, perlakuan dosis 100, 150, dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  yaitu  $0,666 \pm 0,702$ ,  $1,1 \pm 0,115$ ,  $1,3 \pm 0,115$ , dan  $1,3 \pm 0,115$ . Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai  $p=0,260$  menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji *Post-Hoc Mann-Whitney* menghasilkan nilai  $p>0,05$  yang berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok.

Kesimpulan penelitian ini adalah injeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis 100, 150, dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  tidak memengaruhi struktur hepar sehingga aman digunakan sebagai kandidat vaksin malaria.



## PRAKATA

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah Swt. atas limpahan rahmat dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyusun skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Dosis Bertingkat Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)” hingga selesai. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk menamatkan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis bermaksud untuk mengucapkan rasa terima kasih kepada:

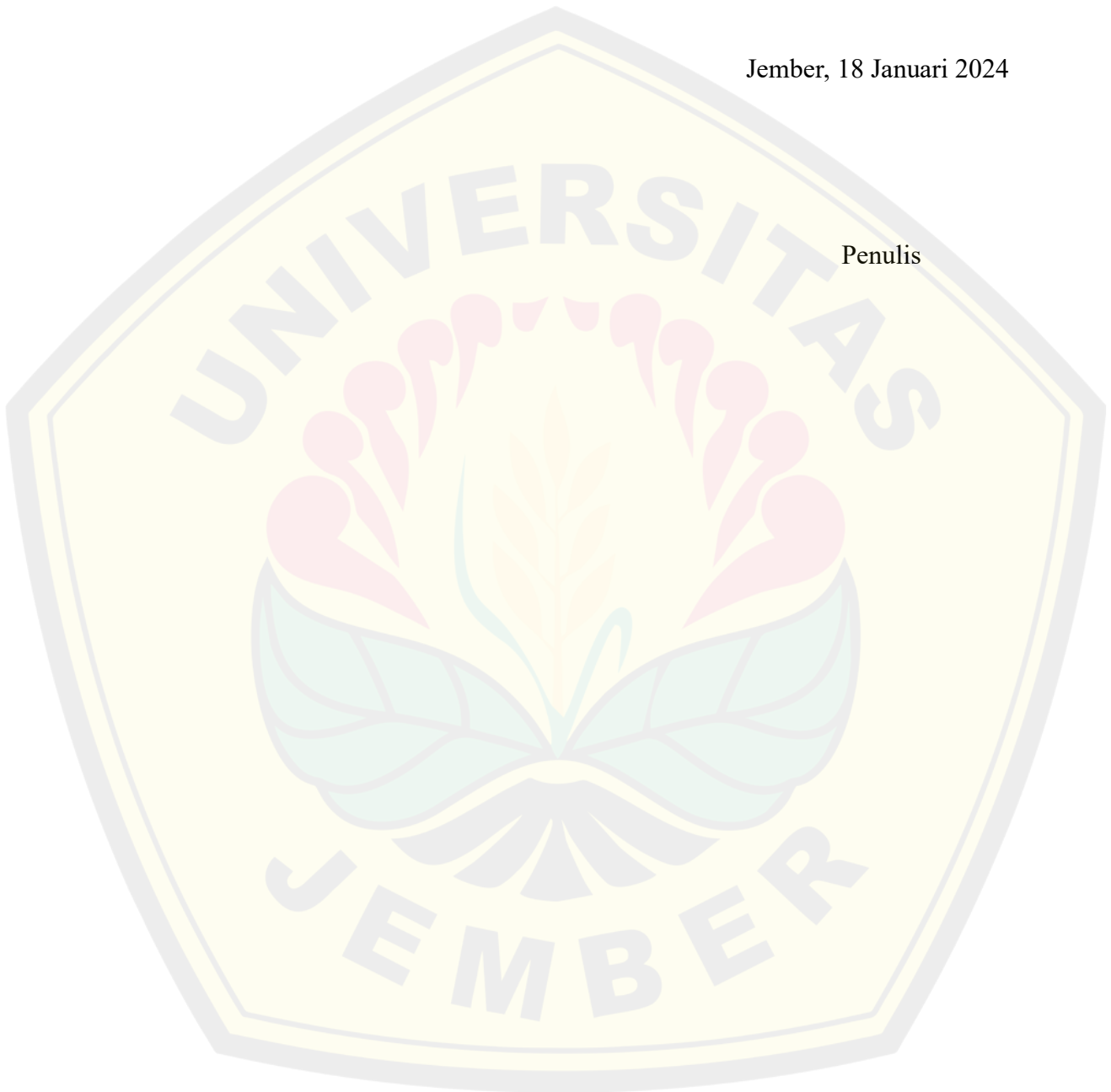
1. Ayah, Daru Luhur Budi Prayitno, dan Mama, Fauzia Irmawati, yang tidak pernah berhenti menyayangi, mengasihi, menyemangati, memotivasi, membantu, memberi *support*, serta senantiasa menyebut nama penulis dalam doa;
2. Kakak Orchida Rahma Aulia dan Adik Andru Falah Arifin yang selalu memberi teladan, dukungan, doa, serta memberi motivasi bagi penulis agar dapat menjadi adik sekaligus kakak yang pantas dibanggakan;
3. dr. Ulfa Elfiah, M. Kes., Sp. BE-RE., Subsp. L.B.L. (K). selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
4. Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M. Si., Gcert.AgHealthMed. selaku Dosen Pembimbing Utama sekaligus Ketua Kelompok Riset (KeRis) Malaria dan dr. Sheilla Rachmania, M. Biotek. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah berkenan untuk meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing penulis;
5. Dr. dr. Diana Chusna Mufida, M. Kes. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Nindya Shinta Rumastika, M. Ked., Sp. THT-KL. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah berkenan untuk menguji sekaligus memberikan saran dan ilmu kepada penulis;
6. dr. Rosita Dewi, M. Biotek. dan dr. Irawan Fajar Kusuma, M. Sc., Sp. PD. selaku dosen anggota Kelompok Riset (KeRis) Malaria yang turut serta

- mendampingi, membimbing, dan menyemangati penulis selama pelaksanaan penelitian;
7. dr. Al Munawir, M. Kes., Ph. D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membantu dan mendampingi penulis dalam proses akademik selama 7 semester di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
  8. Seluruh dosen pengajar dan civitas akademika yang telah memberi ilmu serta membantu penulis selama 7 semester di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
  9. Para analis di Laboratorium Rekayasa Biomaterial dan Bioproses Unit Penunjang Akademik (UPA) Pengelolaan Limbah dan Laboratorium Terpadu Universitas Jember, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta Laboratorium Histologi dan Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membantu dan mendampingi penulis selama pelaksanaan penelitian;
  10. Fajarica Indah Rahmasari dan Nindya Audatus Sa'diyah yang telah berjuang bersama penulis sejak menempuh semester pertama di Fakultas Kedokteran Universitas Jember hingga saat ini;
  11. Nashyatul Zahwa Agreliasiwi, Rachma Firdayanti, dan Pratidina Dinar Fatih selaku sahabat penulis sejak SMA yang tidak pernah berhenti mendukung, memotivasi, dan menyemangati penulis;
  12. Dhia Amanda Intan Permata, Nindya Audatus Sa'diyah, dan Nafisah Hani Asyifah Rahma selaku rekan Kelompok Riset (KeRis) Malaria yang telah berjuang bersama dan banyak membantu penulis selama pelaksanaan penelitian sekaligus pengerjaan skripsi;
  13. Kakak-kakak Kelompok Riset (KeRis) Malaria, Mbak Nisya, Mbak Khai, Mbak Ufi, Mbak Risma, Mas Udin, dan Mas Teguh yang telah membimbing, membantu, dan memberikan ilmu serta arahan kepada penulis selama pelaksanaan penelitian sekaligus pengerjaan skripsi;
  14. Keluarga besar AORTA Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2020;
  15. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu oleh penulis.

Semoga Allah Swt. senantiasa melimpahkan rahmat dan nikmat kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyusun hingga menyelesaikan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberi manfaat baik untuk penulis sendiri maupun perkembangan keilmuan. Aamiin YRA.

Jember, 18 Januari 2024

Penulis

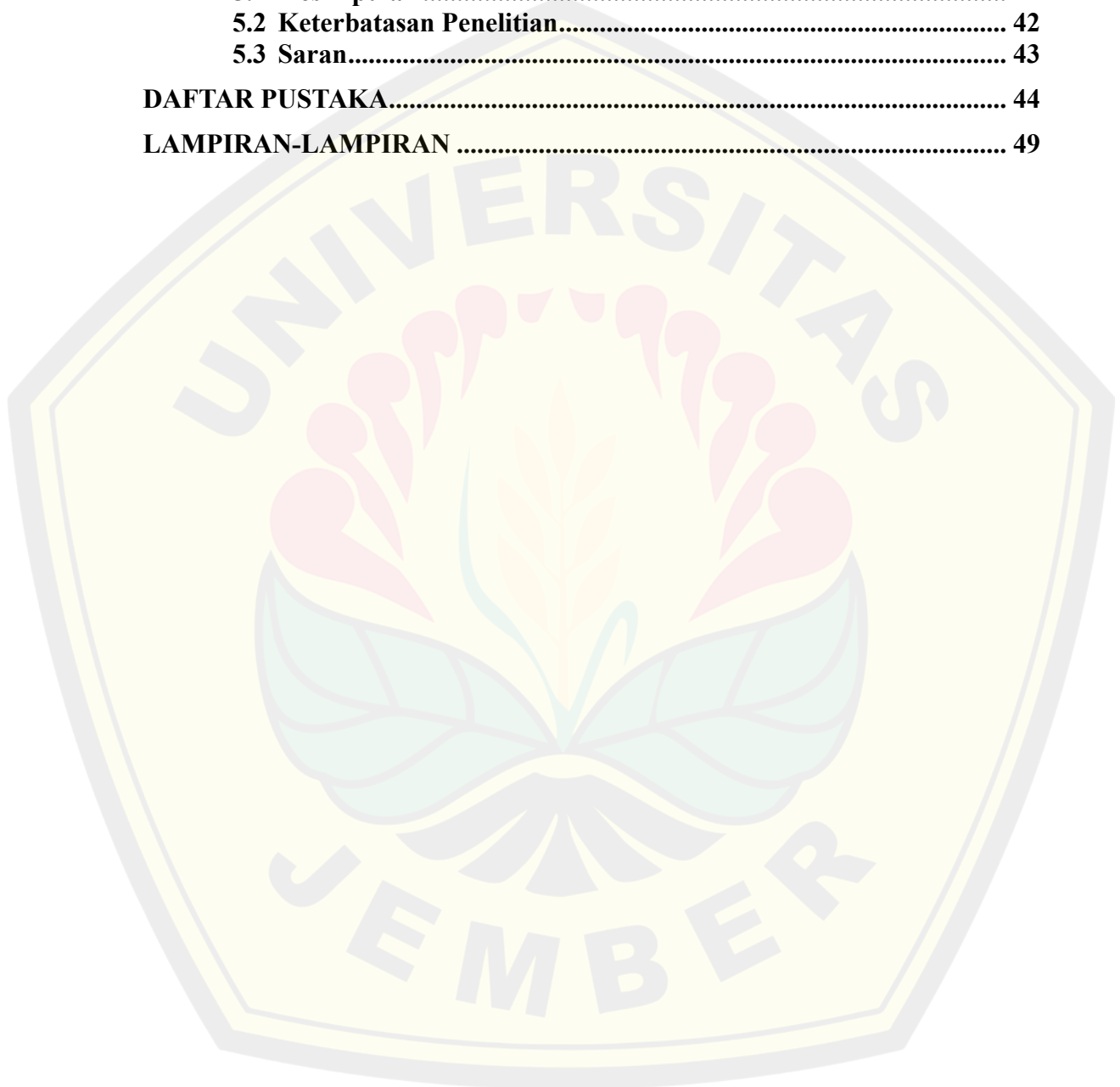


DAFTAR ISI

SKRIPSI.....	i
SKRIPSI.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO .....	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>3</b>
1.4.1 Manfaat bagi Peneliti.....	3
1.4.2 Manfaat bagi Institusi .....	3
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN TEORI .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Malaria .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Epidemiologi Malaria .....	4
2.1.2 Etiologi Malaria .....	4
2.1.3 Siklus Hidup <i>Plasmodium sp.</i> .....	5
2.1.4 Patofisiologi dan Patogenesis Malaria .....	6
2.1.5 Manifestasi Klinis Malaria.....	7
2.1.6 Diagnosis Malaria .....	8
2.1.7 Tatalaksana Malaria .....	8
<b>2.2 Protein DBL2<math>\beta</math>-PfEMP1 .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Struktur PfEMP1 .....	9
2.2.2 Domain DBL2 $\beta$ .....	9
2.2.3 Fungsi PfEMP1 .....	10

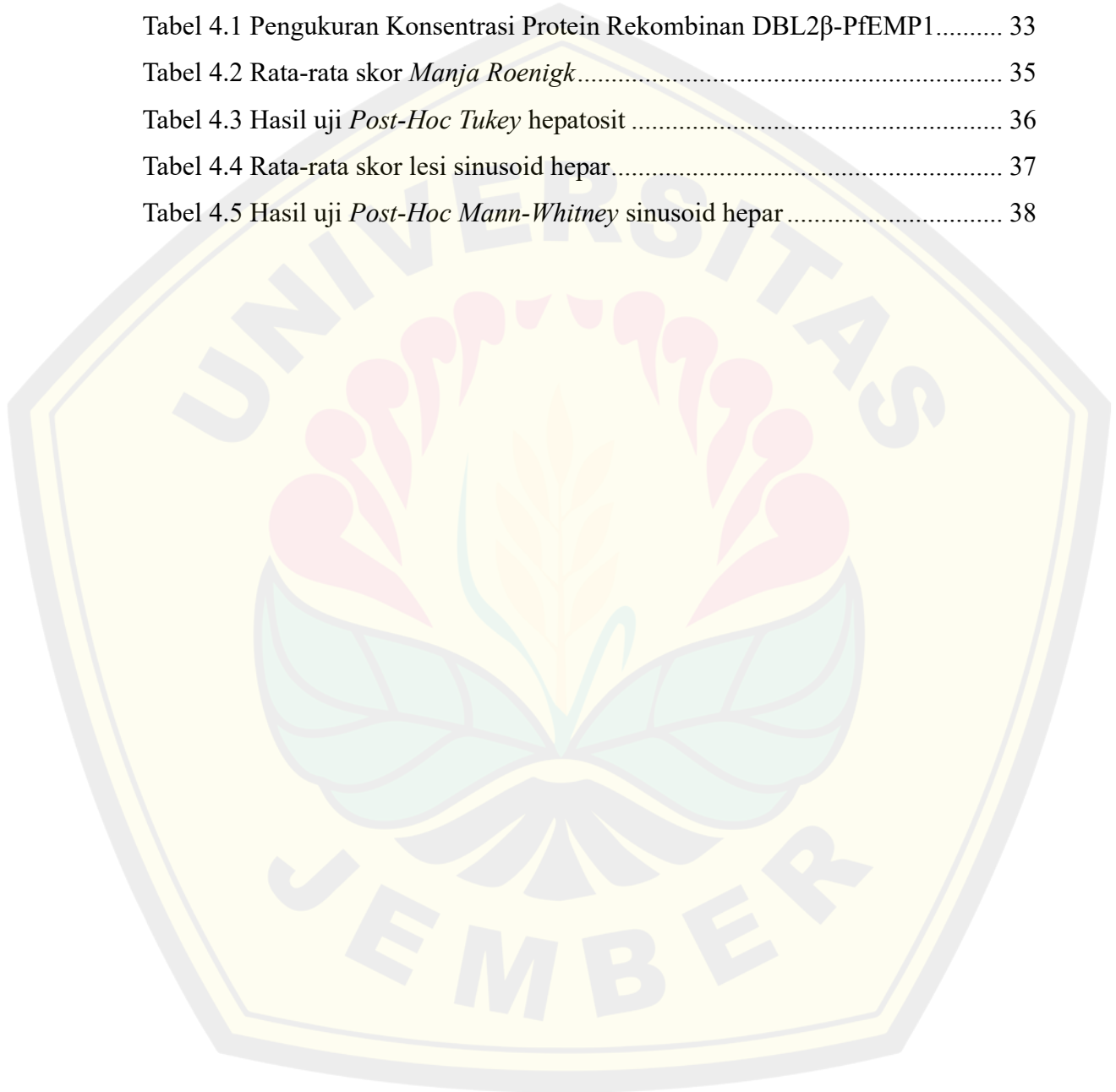
2.2.4 Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 .....	10
<b>2.3 Vaksin Malaria .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Hepar .....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Anatomi Hepar.....	11
2.4.2 Histologi Hepar.....	13
2.4.3 Fisiologi Hepar .....	15
2.4.4 Histopatologi Hepar.....	16
<b>2.5 Kerangka Teori.....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Kerangka Konsep.....</b>	<b>18</b>
<b>2.7 Hipotesis Penelitian.....</b>	<b>18</b>
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Jenis Penelitian .....	19
3.1.2 Rancangan Penelitian.....	19
<b>3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Waktu Penelitian .....	19
3.2.2 Tempat Penelitian.....	19
<b>3.3 Populasi dan Sampel Penelitian .....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Populasi Penelitian.....	20
3.3.2 Sampel Penelitian .....	20
<b>3.4 Jenis dan Sumber Data Penelitian.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Jenis Data .....	21
3.4.2 Sumber Data .....	21
<b>3.5 Variabel Penelitian .....</b>	<b>21</b>
3.5.1 Variabel Bebas ( <i>Independent</i> ).....	21
3.5.2 Variabel Terikat ( <i>Dependent</i> ).....	21
3.5.3 Variabel Kontrol.....	22
<b>3.6 Definisi Operasional.....</b>	<b>22</b>
<b>3.7 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>23</b>
3.7.1 Uji Kelayakan Etik ( <i>Ethical Clearance</i> ).....	23
3.7.2 Sterilisasi Alat .....	23
3.7.3 Produksi Protein.....	23
3.7.4 Ekstraksi Protein .....	24
3.7.5 Purifikasi Protein .....	24
3.7.6 Visualisasi Protein.....	25
3.7.7 Analisis Konsentrasi Protein.....	26
3.7.8 Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba .....	27
3.7.9 Terminasi dan Pengambilan Organ Hewan Coba .....	28
3.7.10 Pembuatan Preparat Organ .....	28
3.7.11 Visualisasi Preparat Organ .....	29
<b>3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9 Alur Penelitian.....</b>	<b>31</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian.....</b>	<b>32</b>

4.1.1 Visualisasi Protein.....	32
4.1.2 Analisis Konsentrasi Protein.....	32
4.1.3 Analisis Histopatologi Hepatosit .....	34
4.1.4 Analisis Lesi Sinusoid Hepar.....	36
<b>4.2 Pembahasan .....</b>	<b>38</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Keterbatasan Penelitian.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Saran.....</b>	<b>43</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN .....</b>	<b>49</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel.....	22
Tabel 3.2 Klasifikasi <i>Manja Roenigk</i> .....	29
Tabel 3.3 Klasifikasi lesi sinusoid hepar.....	30
Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1.....	33
Tabel 4.2 Rata-rata skor <i>Manja Roenigk</i> .....	35
Tabel 4.3 Hasil uji <i>Post-Hoc Tukey</i> hepatosit .....	36
Tabel 4.4 Rata-rata skor lesi sinusoid hepar.....	37
Tabel 4.5 Hasil uji <i>Post-Hoc Mann-Whitney</i> sinusoid hepar.....	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Siklus Hidup <i>Plasmodium sp.</i> .....	5
Gambar 2.2	Struktur PfEMP1 .....	9
Gambar 2.3	Anatomi hepar tikus .....	12
Gambar 2.4	Lobulus hepar perbesaran 100× .....	14
Gambar 2.5	Kerangka teori .....	17
Gambar 2.6	Kerangka konsep .....	18
Gambar 3.1	Rancangan penelitian .....	19
Gambar 3.2	Alur penelitian .....	31
Gambar 4.1	Hasil visualisasi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 .....	32
Gambar 4.2	Kurva standar <i>Bradford Protein Assay</i> .....	33
Gambar 4.3	Gambaran histopatologi hepatosit .....	34
Gambar 4.4	Gambaran histopatologi sinusoid .....	36



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 3.1 <i>Ethical Clearance</i> Penelitian.....	49
Lampiran 3.2 SOP Aklimatisasi Hewan Coba .....	50
Lampiran 3.3 SOP <i>Handling</i> Hewan Coba .....	50
Lampiran 3.4 Hasil Pengukuran Berat Badan Hewan Coba.....	51
Lampiran 3.5 Hasil Hitung Dosis Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 .....	51
Lampiran 3.6 SOP Injeksi Hewan Coba .....	52
Lampiran 3.7 SOP Terminasi, Pembedahan, dan Pemusnahan Hewan Coba.....	52
Lampiran 3.8 SOP Penghitungan Hepatosit Menggunakan <i>Fiji ImageJ</i> .....	53
Lampiran 3.9 SOP Pengamatan Sinusoid Hepar.....	55
Lampiran 4.1 Hasil Pengamatan Hepatosit.....	56
Lampiran 4.2 Hasil Pengamatan Sinusoid Hepar .....	57
Lampiran 4.3 Hasil Uji Statistik Hepatosit .....	57
Lampiran 4.4 Hasil Uji Statistik Sinusoid Hepar.....	59
Lampiran 4.5 Dokumentasi Penelitian.....	61

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Malaria masih menjadi masalah kesehatan dunia yang serius sampai sekarang. Sebanyak 247 juta kasus menyebabkan 619 ribu kematian di 84 negara endemik malaria pada tahun 2021. Indonesia merupakan salah satu negara endemik malaria. Pada tahun 2022, Indonesia menempati posisi kedua di wilayah Asia Tenggara dengan total 399.666 kasus terkonfirmasi positif dan 82 kematian akibat malaria (CDC, 2021; Kementerian Kesehatan RI, 2023; WHO, 2022).

Kasus infeksi dan kematian akibat malaria di Indonesia paling banyak diakibatkan oleh *Plasmodium falciparum* (Kementerian Kesehatan RI, 2019). *P. falciparum* sering menyebabkan malaria berat karena kemampuannya dalam sitoaderensi yang diperantarai oleh *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1* (PfEMP1) sehingga eritrosit terinfeksi (iE) dapat melekat pada endotel, platelet, atau eritrosit lain (uE) (Milner, 2018). Perlekatan antara iE dan uE menyebabkan proses *rosetting* yang dapat memicu sekuestrasi akibat akumulasi iE pada dinding kapiler dan venula. Proses tersebut dapat merusak endotel, menyumbat mikrovaskular, dan menghindarkan parasit dari penguraian limpa (Mcquaid *et al.*, 2019; Zekar & Sharman, 2023).

*World Health Organisation* (WHO) menerapkan vaksinasi sebagai salah satu strategi pencegahan malaria. Pengembangan vaksin malaria masih aktif diteliti sampai saat ini, terutama berfokus pada *P. falciparum* (Khosasih, 2023). Salah satu protein target dalam pengembangan vaksin malaria adalah PfEMP1 dengan domain penting, yaitu DBL (*duffy binding-like*)-2 $\beta$  yang selalu muncul pada hampir semua molekul PfEMP1 (Sulistyaningsih, 2020). Domain DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dapat berikatan secara spesifik dengan reseptor *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) pada endotel. Antibodi terhadap antigen DBL2 $\beta$ -PfEMP1 akan menghambat proses ikatan antara DBL2 $\beta$  dan ICAM-1 yang dapat memutus patogenesis malaria berat (Chandley *et al.*, 2023; Hasanah *et al.*, 2020). Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 telah teruji secara *in vivo* bersifat

imunogenik dan dapat memicu produksi antibodi sehingga berpotensi sebagai kandidat vaksin malaria. Oleh karena itu, imunisasi dengan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 diharapkan mampu mencegah terjadinya malaria berat (Rachmania *et al.*, 2021). Sebelum dilakukan uji klinis, diperlukan uji keamanan non klinis kandidat vaksin untuk mengetahui keamanan serta mendukung pengembangan potensi kandidat vaksin (Hamdam *et al.*, 2013).

Uji keamanan farmakologi (*safety pharmacology*) merupakan tahapan penting dalam proses pengembangan vaksin. Uji keamanan farmakologi dapat memprediksi potensi efek farmakodinamik yang tidak diinginkan dari suatu zat pada fungsi fisiologis dengan pemberian dalam rentang dosis terapeutik dan di atasnya. Studi ini melibatkan pemeriksaan pada sistem organ vital seperti sistem kardiovaskular, sistem saraf pusat, sistem pernapasan, dan sistem organ spesifik lainnya, termasuk organ hepar (Hamdam *et al.*, 2013).

Hepar merupakan organ pusat metabolisme serta detoksifikasi xenobiotik. Fungsi detoksifikasi hepar memiliki keterbatasan sehingga paparan zat toksik berlebih akan tertimbun di dalam parenkim hepar yang menyebabkan perubahan struktur sel. Hal ini mengakibatkan tingginya risiko hepar terhadap kerusakan (Maulina, 2018; Prasetiawan *et al.*, 2013). Kerusakan struktur hepar secara histopatologis dapat dilihat dari perubahan morfologi hepatosit dan pelebaran sinusoid melalui pemeriksaan mikroskopis (Narwanto *et al.*, 2023; Surasa *et al.*, 2014). Belum adanya studi yang meneliti tentang pengaruh protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 pada respons organ hepar melandasi peneliti untuk melakukan penelitian mengenai uji keamanan dosis bertingkat kandidat vaksin berbasis protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap gambaran histopatologi hepar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah ‘Apakah injeksi menggunakan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 memengaruhi gambaran histopatologi hepar sebagai salah satu parameter keamanan kandidat vaksin malaria?’

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini memiliki tujuan umum untuk mengetahui gambaran histopatologi hepar setelah injeksi menggunakan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dalam rangka menguji keamanan kandidat vaksin malaria.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Penelitian ini memiliki tujuan khusus sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui perbedaan gambaran histopatologi pada hepatosit setelah pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat.
- b. Untuk mengetahui perbedaan gambaran histopatologi pada sinusoid hepar setelah pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat bagi Peneliti**

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sarana bagi peneliti untuk menambah wawasan tentang protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 sekaligus menjadi sarana bagi peneliti untuk meningkatkan kompetensi dalam bekerja di lingkungan laboratorium secara profesional.

#### **1.4.2 Manfaat bagi Institusi**

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi dan studi ilmiah yang dapat dijadikan referensi data bagi penelitian yang akan datang.

#### **1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat**

Manfaat penelitian ini adalah sebagai kontribusi dalam mendukung percepatan pengembangan vaksin malaria sebagai upaya pengendalian dan pencegahan infeksi malaria.

## BAB 2. TINJAUAN TEORI

### 2.1 Malaria

#### 2.1.1 Epidemiologi Malaria

Malaria masih menjadi beban masalah kesehatan global hingga saat ini. Pada tahun 2021, jumlah kasus malaria yang tercatat menyentuh angka 247 juta kasus dan total kasus kematian yang terjadi mencapai 619 ribu kasus di seluruh dunia (WHO, 2022). Malaria merupakan *re-emerging disease* yang dapat muncul kembali seiring dengan perubahan kondisi alam (Hakim *et al.*, 2018). Malaria cenderung menjangkiti negara-negara dengan iklim tropis dan subtropis. Infeksi akibat malaria meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas terutama di negara berkembang (CDC, 2021).

Indonesia berada di posisi kedua se-Asia Tenggara dengan kasus terkonfirmasi positif sejumlah 399.666 kasus (Kementerian Kesehatan RI, 2023). Daerah dengan status endemis tinggi terpusat di Indonesia bagian timur. Sementara itu, mayoritas wilayah Indonesia lainnya berstatus endemis sedang, endemis rendah, hingga eliminasi malaria secara tersebar (Kemenkes RI, 2022).

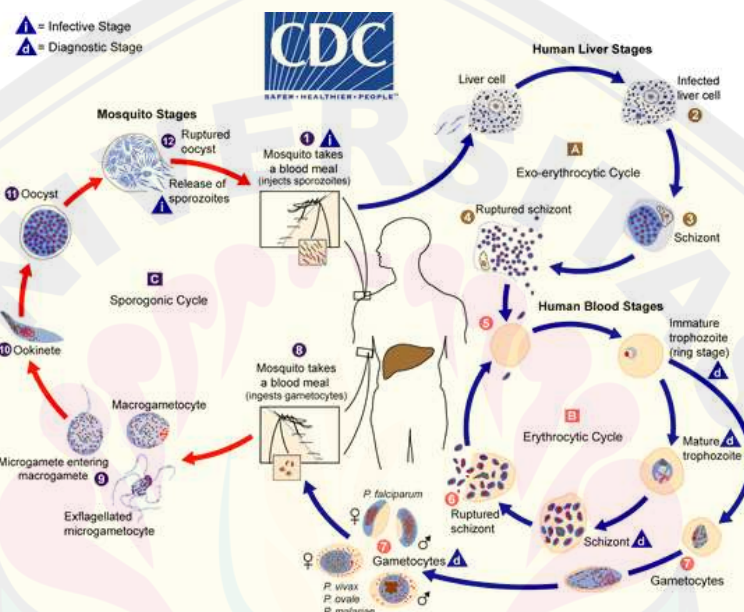
#### 2.1.2 Etiologi Malaria

Malaria merupakan penyakit infeksi akibat parasit yang ditransmisikan oleh vektor nyamuk dari genus *Anopheles* betina melalui gigitannya. Terdapat lima spesies protozoa dari genus *Plasmodium* yang diketahui menjadi penyebab malaria pada manusia, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi* (Zekar & Sharman, 2023).

*P. falciparum* merupakan parasit penyebab malaria yang paling sering ditemukan dan seringkali berkaitan dengan kasus malaria berat hingga kematian. *P. falciparum* termasuk ke dalam kategori protozoa, mikroorganisme eukariota mirip hewan yang bersifat heterotrof. Oleh karena itu, *P. falciparum* menjadi parasit obligat intraseluler dari hepatosit dan eritrosit manusia (Maier *et al.*, 2019).

### 2.1.3 Siklus Hidup *Plasmodium sp.*

Siklus hidup *Plasmodium sp.* membutuhkan dua inang sekaligus, yaitu nyamuk dan manusia. Saat menghisap darah manusia, nyamuk betina *Anopheles sp.* yang terinfeksi akan menginjeksikan saliva serta sporozoit yang terkandung di dalamnya. Sporozoit yang merupakan fase infeksius bagi manusia akan segera memulai siklus skizogoni ekso-eritrositik di dalam hepatosit. Sporozoit kemudian bereplikasi secara aseksual menjadi skizon (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Siklus Hidup *Plasmodium sp.* (Sumber: CDC, 2020)

Setelah matur, skizon akan pecah dan merozoit motil akan terlepas ke sirkulasi, sehingga *Plasmodium sp.* dapat melanjutkan siklus skizogoni fase eritrositik di dalam eritrosit. Proses replikasi aseksual *Plasmodium sp.* di dalam eritrosit berlangsung melalui beberapa tahap, yaitu *ring form* (trofozoit imatur), trofozoit matur, dan skizon yang dapat ruptur kembali untuk menginfeksi eritrosit lain. Siklus tersebut kemudian akan bereplikasi secara berulang setiap 48 hingga 72 jam di dalam eritrosit sehingga menyebabkan pertumbuhan eksponensial dan perkembangan penyakit yang cepat.

Sebagian merozoit dapat berkembang biak secara seksual menjadi gametosit yang bersifat infeksius bagi nyamuk *Anopheles sp.* Ketika nyamuk menghisap darah manusia yang terinfeksi oleh *Plasmodium sp.*, gametosit akan tertelan dan masuk ke saluran pencernaan nyamuk. Siklus sporogoni segera

berlangsung, di mana zigot berkembang menjadi sporozoit yang kemudian bermigrasi ke kelenjar saliva nyamuk untuk menginfeksi manusia kembali (CDC, 2020; Zekar & Sharman, 2023).

#### 2.1.4 Patofisiologi dan Patogenesis Malaria

Patofisiologi malaria berkaitan erat dengan kejadian demam. Demam pada malaria disebabkan oleh tiga proses utama, yaitu ruptur eritrosit akibat skizon, fagositosis merozoit oleh makrofag, atau adanya *antigen-presenting* trofozoit di dalam sirkulasi maupun limpa yang dapat memicu kaskade pelepasan *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan marker inflamasi lain, seperti *Interleukin 10* (IL-10) dan *Interferon  $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ).

Demam akibat infeksi malaria memiliki pola khas yang membedakan antarspesies. Hal ini berhubungan dengan periode waktu yang diperlukan fase skizon tiap spesies untuk matur di dalam eritrosit. Infeksi *P. vivax* dan *P. ovale* menyebabkan demam tertian yang terjadi setiap 48 jam, sedangkan *P. malariae* menyebabkan demam kuartan yang terjadi setiap 72 jam. Di sisi lain, *P. falciparum* seringkali menunjukkan pola demam yang ireguler, tetapi dapat menyebabkan demam tertian (Fikadu & Ashenafi, 2023; Zekar & Sharman, 2023).

Faktor utama virulensi *P. falciparum* adalah kemampuan modifikasi permukaan iE menjadi *sticky cell*. Hal ini merupakan strategi evasi imun di mana parasit akan menghilang dari sirkulasi selama hampir separuh siklus aseksualnya karena melekat pada endotel, platelet, atau eritrosit lain. Mekanisme tersebut dikenal sebagai sitoadherensi. Sitoadherensi kemudian dapat memicu sekuestrasi. Jika sekuestrasi terjadi pada endotel vaskular atau mikrovaskular di berbagai organ, dapat berakibat pada obstruksi mikrovaskular, gangguan perfusi jaringan, asidosis laktat, hingga kerusakan organ akhir. Molekul reseptor seperti *Cluster of Differentiation* (CD36) dan ICAM-1 teridentifikasi sebagai reseptor pengikat iE pada sel endotel. Apabila iE berikatan dengan reseptor ICAM-1 dan CD36 pada sel endotel otak, terdapat kemungkinan untuk menyebabkan malaria serebral.

Perlekatan eritrosit normal oleh iE akan menimbulkan koagulasi yang dapat menghambat mikrovaskular dan menyebabkan hipoksia seluler. Fenomena ini disebut sebagai *rosetting*, yaitu pengikatan spontan antara eritrosit normal dengan iE. *Rosetting* memfasilitasi terjadinya sekuestrasi serta berkorelasi dengan kejadian malaria berat. Terdapat lima reseptor yang teridentifikasi berperan dalam proses *rosetting*, yakni antigen golongan darah A dan B, CD36, *Complement Receptor-1* (CR1), dan *Heparan Sulfate Glycosaminoglycans* (HS-GAGs). Selain dapat menghindari imun, *rosetting* juga melindungi iE dari agen antimalaria (Fikadu & Ashenafi, 2023; Hasanah *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022).

#### 2.1.5 Manifestasi Klinis Malaria

Gejala utama infeksi malaria adalah demam. Di periode awal infeksi, demam dapat muncul secara tidak teratur. Terdapat tiga tahapan gejala paroksismal klasik akibat infeksi malaria, yaitu *cold stage*, *hot stage*, dan *sweating stage*. *Cold stage* ditandai dengan menggigil dan *flu-like syndrome*. Selanjutnya, memasuki *hot stage* yang berupa demam tinggi hingga mencapai 41°C, kulit kering dan memerah, sakit kepala, mual, hingga muntah. Pada tahap terakhir, yaitu *sweating stage*, demam akan turun drastis yang dicirikan oleh berkeringat. Periodisitas demam bergantung pada jenis malaria. Gejala lain seperti diare, pegal-pegal, dan nyeri otot juga dapat ditemukan. Di daerah endemis, manifestasi klinis yang muncul tidak selalu berupa gejala klasik.

Malaria dibedakan menjadi malaria tanpa komplikasi dan malaria berat berdasarkan kriteria klinis dan laboratoris. Malaria tanpa komplikasi dicirikan dengan timbulnya gejala klasik, tetapi tanda klinis dan laboratorium tidak menunjukkan keparahan serta tidak terjadi disfungsi organ. Sebaliknya, infeksi malaria dikategorikan berat apabila terkonfirmasi parasitemia *P. falciparum*, *P. vivax*, atau *P. knowlesi* stadium aseksual yang diikuti oleh gejala disfungsi organ (Fikadu & Ashenafi, 2023; Kemenkes RI, 2020; Zekar & Sharman, 2023).



### 2.1.6 Diagnosis Malaria

*Golden standart* diagnosis malaria adalah pemeriksaan mikroskopis secara kuantitatif dengan sediaan darah, baik tebal maupun tipis, yang dilakukan sebanyak tiga kali pemeriksaan dengan jarak 12-24 jam tiap pemeriksaan. Pemeriksaan darah tetes tebal dapat mendeteksi parasitemia hingga 30-50 parasit/ $\mu$ L, sedangkan sediaan apusan darah tepi dapat menentukan stadium sekaligus spesies *Plasmodium sp.* yang menginfeksi.

Selain itu, *Rapid Diagnostic Test* (RDT) dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat dilakukan dalam penegakan diagnosis malaria. Pemeriksaan RDT memanfaatkan metode imunokromatografi untuk mengidentifikasi antigen parasit malaria. Namun, pemeriksaan RDT tetap memerlukan konfirmasi pemeriksaan kuantitatif karena rawan menghasilkan *false positive* pada infeksi *P. falciparum*. Sedangkan PCR dinilai sebagai modalitas diagnostik malaria yang sangat sensitif dan spesifik karena dapat mendeteksi DNA *Plasmodium sp.* yang menginfeksi. Akan tetapi, metode ini jarang digunakan karena biaya pengoperasian yang tinggi (Kemenkes RI, 2020; Zekar & Sharman, 2023).

### 2.1.7 Tatalaksana Malaria

Pengobatan malaria tanpa komplikasi dianjurkan menggunakan kombinasi obat antimalaria *Artemisinin Combination Theray* (ACT), yaitu *Dihydroartemisinin-Piperaquine* (DHP) dan *Primaquine* yang bertujuan untuk meningkatkan efektivitas serta mencegah resistensi. Obat diberikan secara per oral dan diminum setelah makan sesuai dosis yang ditentukan. Penentuan dosis obat didasarkan pada jenis malaria dan tingkat keparahan yang diderita.

Pada kasus malaria berat, penanganan hanya dapat dilakukan di Rumah Sakit atau puskesmas perawatan. Pilihan utama pengobatan malaria berat adalah injeksi intravena artesunat secara bolus perlahan-lahan, kemudian dilanjutkan dengan pemberian DHP per oral (Kemenkes RI, 2020).

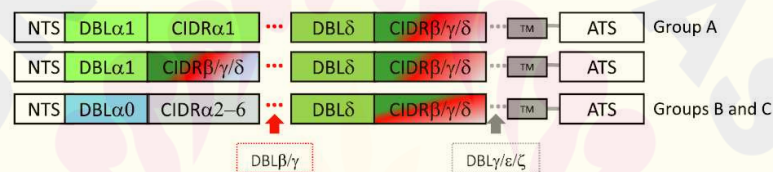
WHO menerapkan vaksinasi sebagai salah satu upaya pengendalian sekaligus pencegahan infeksi malaria. Pada tahun 2021, WHO

merekomendasikan vaksin RTS,S (Mosquirix) dengan empat dosis untuk mencegah infeksi *P. falciparum* pada anak-anak mulai usia 5 bulan yang tinggal di wilayah transmisi sedang hingga tinggi. Kemudian pada tahun 2023, WHO kembali merekomendasikan vaksin R21 (Matrix-M) dengan empat dosis yang telah dinyatakan aman dan efektif untuk mencegah infeksi malaria pada anak-anak (Khosasih, 2023; WHO, 2023).

## 2.2 Protein DBL2 $\beta$ -PfEMP1

### 2.2.1 Struktur PfEMP1

Protein PfEMP1 diekspresikan dari iE oleh *P. falciparum* dan terdeposit di dalam struktur *knob* yang terletak di permukaan membran iE. Protein ini menjadi ligan utama yang berkaitan dengan sitoadherensi dan malaria berat.



Gambar 2.2 Struktur PfEMP1 (Sumber: Jensen *et al.*, 2020)

Susunan molekul PfEMP1 berukuran besar dan polimorfik yang dikodekan oleh gen *var*. Gen *var* meliputi ekson I dan II. Ekson I membentuk struktur ekstraseluler yang panjang. Bagian ini memiliki struktur kepala berupa *N-Terminal Segment* (NTS) yang disambung oleh 2-10 domain DBL dan CIDRs dengan urutan subtype masing-masing. NTS tersusun atas DBL $\alpha$  dan CIDR dan bersifat *semi-conserved* pada hampir seluruh molekul PfEMP1. Sementara ekson II menyusun struktur intraseluler yang pendek serta *conserved*, meliputi transmembran dan *Acidic Terminal Segment* (ATS) (Sulistyaningsih, 2022).

### 2.2.2 Domain DBL2 $\beta$

Secara umum, susunan PfEMP1 serupa, namun terdapat perbedaan pada lokasi, jumlah, urutan, dan tipe domain penyusunnya. Meskipun urutannya bervariasi, domain penyusun PfEMP1 dapat diketahui dari tipe serta posisinya di dalam protein. Sebagai prototipe protein yang bersifat *semi-conserved*, domain DBL2 $\beta$  hampir selalu dapat ditemukan pada molekul protein PfEMP1.

Sebagian besar domain DBL2 $\beta$  terdiri atas urutan 16 residu sistein dan blok asam amino *conserved* dengan daerah polimorfik di sekitarnya. Domain DBL2 $\beta$  memiliki struktur ‘Y’ sebagai situs pengikatan reseptor. Semua residu sistein berkontribusi dalam proses pengikatan antara DBL2 $\beta$  dan ICAM-1 dengan titik optimal pada setengah bagian depan. Struktur tersebut mendukung domain DBL2 $\beta$  dalam memediasi pengikatan dengan reseptor ICAM-1 yang dapat menyebabkan malaria berat (Sulistyaningsih, 2020).

### 2.2.3 Fungsi PfEMP1

Protein PfEMP1 memiliki peran utama dalam mekanisme dasar yang berhubungan dengan patogenesis malaria berat, yaitu sebagai perantara proses sitoaderensi terhadap beberapa reseptor pada sel endotel, antara lain CD36, ICAM-1, *Endothelial Protein C Receptor* (ECPR), *Chondroitin Sulfate A* (CSA), dan antigen golongan darah ABO. Ekspresi reseptor-reseptor tersebut dipengaruhi oleh berbagai sitokin yang bervariasi pada tiap lapisan endotel (Sulistyaningsih, 2022).

### 2.2.4 Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1

Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 adalah produk hasil teknik rekayasa genetika berupa DNA rekombinan. DNA rekombinan diekspresikan oleh bakteri, di mana protein DBL2 $\beta$ -PfEMP1 memanfaatkan bakteri *Escherichia coli strain* BL21 (DE3) sebagai sel inang. Bakteri ditumbuhkan dalam media untuk kemudian diekstraksi dan dipurifikasi sehingga didapatkan protein target.

Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terbukti bersifat imunogenik karena dapat menginduksi respons imun humoral dan seluler, khususnya *Immunoglobulin G* (IgG) dan *Cluster of Differentiation 4+* (CD4<sup>+</sup>). Injeksi berulang protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 mampu merangsang respons imun sekunder tubuh. Hal ini menunjukkan kemampuan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dalam memproduksi antibodi. Dengan demikian, protein

rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 merupakan kandidat vaksin malaria yang potensial (Rachmania *et al.*, 2021).

### 2.3 Vaksin Malaria

Pada prinsipnya, pengembangan vaksin malaria bertujuan untuk menghentikan siklus hidup parasit pada fase-fase berikut (Sulistyaningsih, 2020, 2022):

- a. Fase pre-eritrositik adalah vaksin dengan target utama sporozoit untuk menimbulkan efek anti-infeksi sehingga proliferasi dan migrasi sporozoit di dalam hepatosit dapat dicegah.
- b. Fase eritrositik adalah vaksin dengan target utama merozoit untuk menekan jumlah parasit dalam sirkulasi sehingga perkembangan aseksual parasit dapat dihambat.
- c. Fase seksual adalah vaksin pencegah transmisi dengan target utama gametosit untuk mengontrol penyebaran parasit dari manusia ke nyamuk sehingga siklus sporogoni parasit dapat diputus.

Uji keamanan farmakologi (*safety pharmacology*) merupakan tahapan yang penting dalam proses pengembangan vaksin. Uji keamanan farmakologi bertujuan untuk memprediksi potensi efek farmakodinamik yang tidak diinginkan dari suatu zat pada fungsi fisiologis dengan pemberian dalam rentang dosis terapeutik dan di atasnya. Studi ini melibatkan pemeriksaan pada sistem organ vital seperti sistem kardiovaskular, sistem saraf pusat, sistem pernapasan, dan sistem organ spesifik lainnya. Uji keamanan farmakologi dilakukan sebelum uji klinis pada manusia sehingga keamanan peserta uji klinis akan terjamin dengan adanya penilaian dan pencegahan risiko terkait kandidat vaksin yang diujikan (Hamdam *et al.*, 2013).

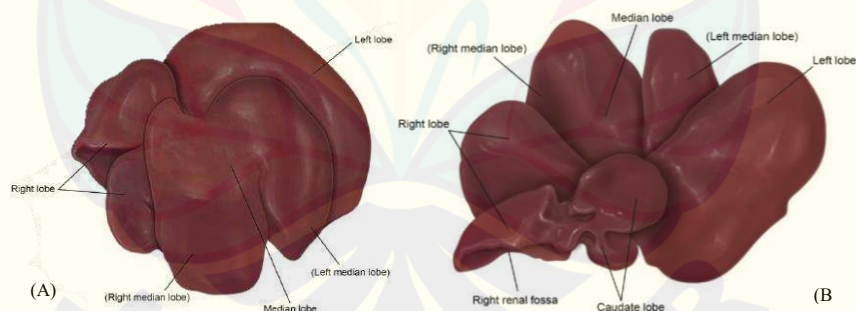
### 2.4 Hepar

#### 2.4.1 Anatomi Hepar

Hepar adalah struktur kelenjar paling besar di dalam tubuh manusia yang menempati sebagian besar regio hipokondrium kanan, memanjang ke

epigastrium, hingga ke bagian medial hipokondrium kiri. Normalnya, hepar berstruktur halus, lunak, dan lentur serta berwarna merah tua atau kecoklatan. Hepar ditunjang oleh ligamen dari lipatan peritoneum sehingga melekat pada permukaan inferior diafragma.

Hepar memiliki empat lobus, yaitu lobus dextra, lobus sinistra, lobus caudatus, dan lobus quadratus. Lobus dextra terdiri atas lobus caudatus di bagian superior dan lobus quadratus di bagian inferior. Di antara lobus caudatus dan lobus quadratus, terdapat hilus atau porta hepatis yang tampak dari permukaan posteroinferior. Lobus dextra dan sinistra dipisahkan oleh ligamentum falciforme yang menempel dari permukaan anterior hepar yang meluas ke permukaan superior hingga akhirnya membelah menjadi ligamentum coronarium serta ligamentum triangulare. Ligamentum-ligamentum tersebut membentuk perlekatan antara hepar dengan dinding anterior abdomen. Tepi bawah ligamentum falciforme berbentuk seperti tali, disebut ligamentum teres hepatis. Ligamentum teres hepatis adalah vena umbilicalis yang sudah tertutup. Serupa dengan ligamentum venosum yang sebelumnya merupakan duktus venosus. Kedua ligamentum tersebut berubah menjadi pita fibrosa sewaktu janin lahir (Bazira, 2023; Maulina, 2018).



Gambar 2.3 Anatomi hepar tikus. (A) Sisi diafragma dan (B) sisi viseral (Sumber: Treuting *et al.*, 2018)

Pada tikus, hepar melekat erat pada diafragma di sisi kanan rongga perut yang dilindungi oleh tulang rusuk. Hepar tikus terdiri atas enam lobus, antara lain lobus lateral kiri, lateral kanan, medial kiri, medial kanan, caudatus, dan quadratus yang ditunjang oleh ligamen-ligamen tipis.

Secara umum, hepar tikus memiliki dua permukaan, yaitu sisi diafragma dan viseral (Gambar 2.3). Sisi diafragma melekat pada diafragma dan dinding perut kanan. Sebagian besar sisi diafragma dilapisi oleh peritoneum. Sementara sisi viseral terletak di dalam peritoneum dan berhubungan dengan organ-organ pencernaan (Vdoviaková *et al.*, 2016).

#### 2.4.2 Histologi Hepar

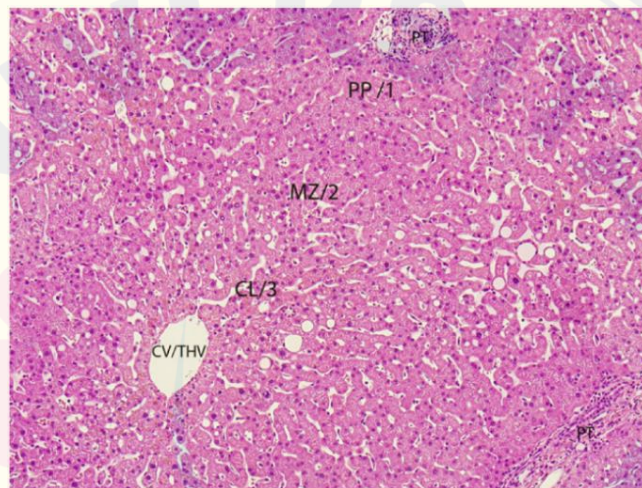
Struktur utama hepar di level seluler adalah sel-sel hepatosit. Hepatosit (sel parenkimal) menyusun sekitar 80% dari total massa hepar, sedangkan sisanya terdiri atas sel sinusoidal (sel non-parenkimal). Hepatosit tersusun berkelompok membentuk lapisan dengan satu atau dua nukleus yang masing-masing memiliki satu hingga dua nukleolus. Kumpulan hepatosit tersebut merupakan unit fungsional atau yang disebut sebagai lobulus hepar.

Lobulus hepar memiliki membran apikal dan basolateral. Membran apikal membendung struktur kanalikuli sebagai tempat aliran empedu. Sementara membran basolateral membatasi lumen sinusoid di mana darah dari cabang vena hepatica mengalir. Setiap lobulus hepar dibangun oleh tiga struktur utama. Struktur pertama berbentuk heksagonal dengan vena sentralis di tengahnya. Struktur kedua berbentuk segitiga (segitiga Kiernan) dengan vena sentralis di sudut-sudunya dan *portal triad* sebagai pusatnya. Struktur terakhir merupakan unit terkecil pada hepar, yaitu asinus hepar (Braet *et al.*, 2018; Kalra *et al.*, 2023; Maulina, 2018).

Berdasarkan fungsi dan perfusinya, sel-sel asinus hepar dibagi menjadi tiga zona berbeda (Gambar 2.4), yaitu (Kalra *et al.*, 2023; Maulina, 2018):

- a. Zona I (zona periportal; perifer) terletak paling dekat dengan *portal triad* sehingga memiliki perfusi terbaik. Sel-sel di dalam zona I akan mengalami regenerasi pertama kali karena kaya oksigen, nutrisi, serta minim metabolit. Zona I berfungsi dalam metabolisme oksidatif seperti beta oksidasi, glukoneogenesis, pembentukan cairan empedu, kolesterol, dan katabolisme asam amino.

- b. Zona II (zona midzonal; perisentral) terletak di antara zona I dan III yang tidak mendapat oksigen dan nutrisi sebanyak zona I.
- c. Zona III (zona sentrilobuler) terletak paling jauh dari *portal triad* dan paling dekat dengan vena sentralis sehingga memiliki perfusi paling buruk karena hanya sedikit oksigen dan nutrisi yang masuk sementara konsentrasi metabolitnya tinggi. Zona III berperan besar dalam detoksifikasi, biotransformasi obat-obatan, ketogenesis, glikolisis, lipogenesis, sintesis glikogen, dan pembentukan glutamin. Oleh karena itu, kerusakan dan akumulasi lipid lebih sering terjadi pada zona ini.



Gambar 2.4 Lobulus hepar perbesaran 100×. PT: *portal triad*, PP/1: zona I/periportal, MZ/2: zona II/midzonal, CL/3: zona III/sentrilobuler, CV: vena sentralis (Sumber: Krishna, 2013)

Hepatosit memiliki ribuan lobulus dengan 3-6 *portal triad* pada tepiannya serta vena sentralis di pusatnya. Hepatosit tersusun radier dalam lobulus hepar, bermula dari *portal triad* dan berujung di vena sentralis. Di tengah susunan sel-sel hepatosit, terdapat sinusoid hepar yang memuat sel-sel endotel dan sel-sel fagosit (sel *Kupffer*).

Sinusoid hepar adalah saluran vaskular yang menjadi penghubung antara *portal triad* dan vena sentralis. Lumen sinusoid hepar memiliki struktur berliku-liku dengan diameter yang berkisar antara 10-30  $\mu\text{m}$ . Sinusoid hepar mengatur mikrosirkulasi di dalam hepar. Sinusoid hepar dilapisi oleh sel endotel yang berfungsi dalam pertukaran cairan, zat terlarut, dan partikel dari darah

menuju ruang perisinusoidal. Lumen sinusoid hepar dilengkapi celah *Disse* yang berisi sel *Ito* dan berperan dalam proses penyimpanan retinoid serta regenerasi hepar (Furlan *et al.*, 2016; Kalra *et al.*, 2023; Maulina, 2018).

### 2.4.3 Fisiologi Hepar

Hepar merupakan organ vital yang bertanggung jawab dalam menjalankan beberapa fungsi untuk mendukung metabolisme, imunitas, pencernaan, detoksifikasi, penyimpanan vitamin, dan lainnya. Sebagai pusat detoksifikasi utama, hepar bertanggung jawab untuk melindungi tubuh dari zat-zat toksik dan bahan asing atau xenobiotik yang masuk dari luar, seperti makanan dan obat-obatan, maupun dari dalam tubuh itu sendiri.

Segala bentuk senyawa yang beracun bagi tubuh akan dirombak melalui dua fase reaksi di dalam hepatosit, tepatnya pada retikulum endoplasma halus. Reaksi ini merombak xenobiotik dari bentuk lipofilik menjadi lebih hidrofilik agar dapat dieleminasi keluar dari tubuh dengan mudah.

Reaksi fase I mengubah zat melalui tahapan oksidasi, reduksi, dan hidrolisis untuk menyusun metabolit berupa molekul polar yang bersifat lebih tidak toksik dengan bantuan enzim kelompok sitokrom 450 (CYP450). Dalam proses ini, terbentuk berbagai radikal bebas yang apabila jumlahnya berlebihan dapat merusak hepatosit. Pada reaksi fase II, terjadi mekanisme konjugasi yang berperan sebagai penetral untuk menghilangkan sifat toksin dengan penempelan molekul lain pada produk yang dihasilkan sebelumnya. Beberapa macam konjugasi seperti konjugasi sulfat, glukoronat, glutathion, glisin, metil, dan asetil dapat terjadi menyesuaikan zat yang dimetabolisme. Misalnya, alkohol akan dikonjugasi dengan sulfat dan bilirubin dikonjugasi dengan glukoronat. Zat hasil konversi kemudian ditransport menuju darah agar dapat dieksresikan oleh ginjal. Tahap ini sering dianggap sebagai fase III detoksifikasi (Kalra *et al.*, 2023; Maulina, 2018).



#### 2.4.4 Histopatologi Hepar

Kerusakan pada hepar dapat diakibatkan oleh zat kimia. Dari segi histopatologi, kerusakan hepar dicirikan oleh perubahan pada level seluler, baik perubahan *reversible* maupun *irreversible*.

Kerusakan dengan pola *reversible* dapat berupa pembengkakan sel (degenerasi hidropik) dan perlemakan (steatosis). Kerusakan *reversible* memiliki dua nasib. Jika kerusakan tersebut terkompensasi dengan baik dan sumber penyebab kerusakan dihentikan, maka kerusakan masih bisa diperbaiki serta sel dapat normal kembali. Namun, apabila derajat kerusakan sel cukup parah dan terjadi dalam jangka waktu yang lama sehingga sel tidak lagi mampu mengompensasi kerusakan, akan terjadi gangguan metabolisme pada sel. Mekanisme tersebut membuat sel jatuh pada kondisi *irreversible* berupa nekrosis.

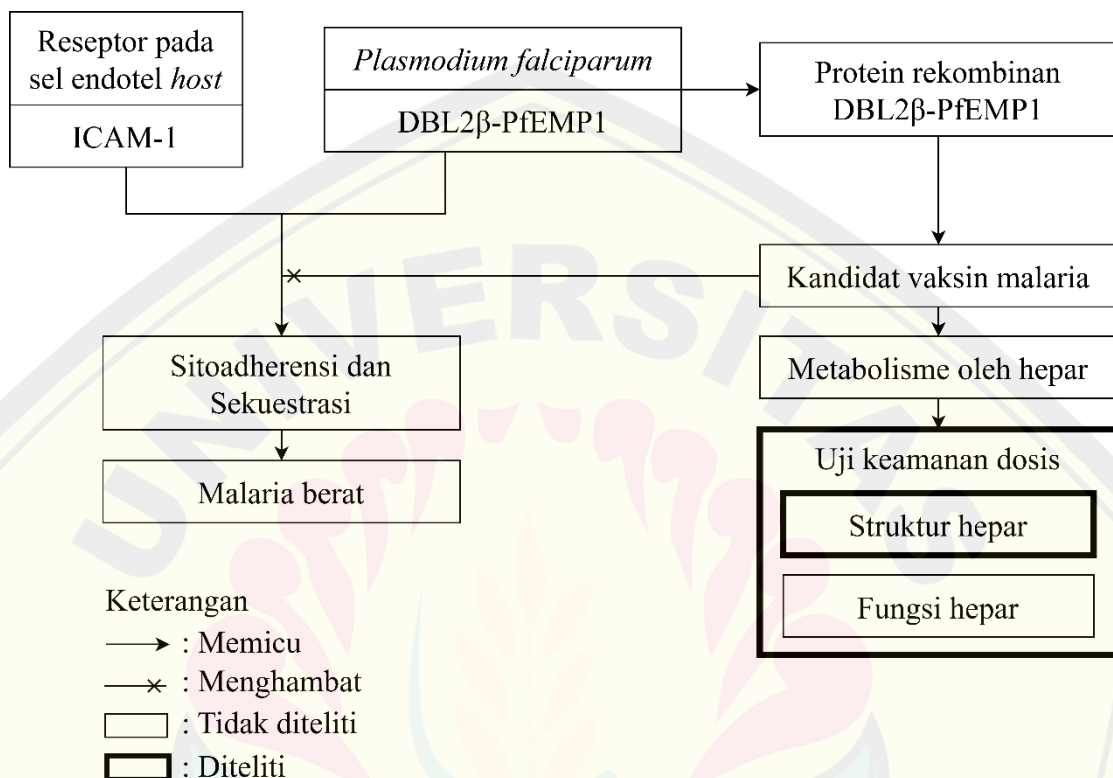
Nekrosis merupakan kondisi perubahan morfologi sel yang meliputi gambaran mutasi dan destruksi nukleus. Terdapat tiga bentuk nekrosis, yaitu kariolisis, piknosis, serta karioreksis. Kariolisis akan terlihat sebagai sel dengan basofil kromatin yang memudar. Piknosis dapat diidentifikasi dari tampilan sel yang mengecil dengan peningkatan basofil. Sementara karioreksis dicirikan oleh adanya fragmentasi pada nukleus yang piknotik (Maulina, 2018).

Nekrosis hepatosit berhubungan dengan kejadian dilatasi sinusoid. Hepatosit yang mengalami nekrosis berakibat pada perubahan bentuk sel. Bentuk yang tidak fisiologis dan tidak teratur memengaruhi susunan lobulus beserta struktur-struktur di sekitarnya sehingga pelebaran dapat terjadi pada sinusoid hepar. Selain itu, dilatasi sinusoid dapat diakibatkan oleh tingginya kadar zat toksik dalam aliran darah yang melewati jalur vaskularisasi sinusoid hepar dari *portal triad* ke vena sentralis (Furlan *et al.*, 2016).

Secara umum, dilatasi sinusoid terjadi melalui dua mekanisme utama, yaitu obstruktif dan non-obstruktif. Penyebab obstruktif dapat berupa penyumbatan aliran sinusoid atau vena sentral, sedangkan penyebab non-obstruktif diakibatkan oleh penyusutan hepatosit serta peningkatan aliran darah

dan substansi terlarut. Dilatasi sinusoid non-obstruktif dapat diidentifikasi dengan jelas pada zona III (Maeda *et al.*, 2021; Sunjaya *et al.*, 2018).

## 2.5 Kerangka Teori

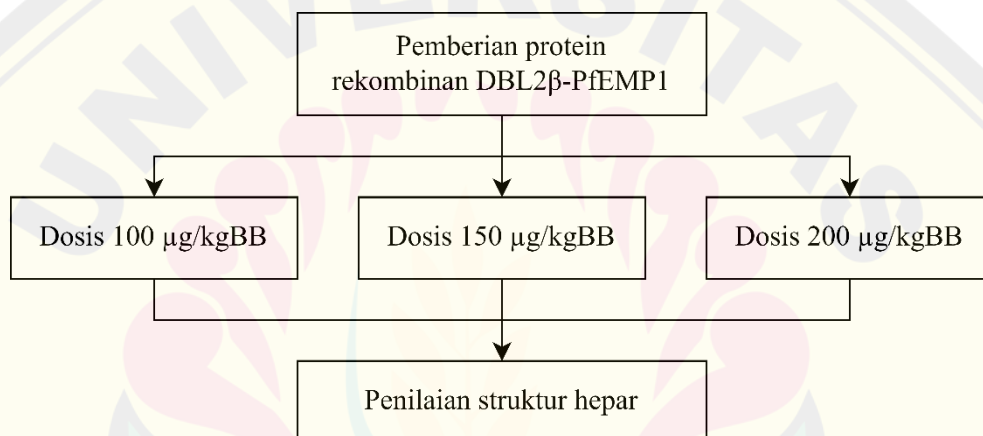


Gambar 2.5 Kerangka teori

Sebagian besar kasus malaria berat disebabkan oleh *P. falciparum*. Salah satu protein penting dalam patogenesis malaria berat adalah PfEMP1 yang memiliki beberapa domain, di antaranya DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang merupakan ligan spesifik reseptor ICAM-1 pada sel endotel *host*. Perlekatan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan ICAM-1 dapat memicu sitoadherensi, sekuestrasi, dan *rosetting* yang menjadi mekanisme kunci patogenesis malaria berat. Injeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dapat menghasilkan antibodi yang mampu menginhibisi ikatan dengan reseptor ICAM-1 sehingga berpotensi untuk mencegah kejadian malaria berat. Oleh karena itu, domain DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dapat dijadikan sebagai basis vaksin malaria.

Dalam pengembangannya, perlu dilakukan uji keamanan dosis kandidat vaksin terhadap respons berbagai organ, salah satunya pada hepar. Sebagai organ detoksifikasi utama, hepar bertanggung jawab untuk mengeliminasi bahan-bahan toksik di dalam tubuh. Hepatosit yang merupakan komponen utama struktur hepar berperan penting dalam menjalankan fungsi tersebut. Pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat diharapkan tidak mengganggu proses metabolisme oleh hepar sehingga tidak memengaruhi struktur hepar (Gambar 2.5).

## 2.6 Kerangka Konsep



Keterangan

: Diteliti

Gambar 2.6 Kerangka konsep

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap struktur hepar setelah diinjeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat, yaitu 100  $\mu$ g/kgBB, 150  $\mu$ g/kgBB, dan 200  $\mu$ g/kgBB. Kemudian, penilaian kerusakan struktur hepar ditentukan melalui pengamatan lesi sinusoid hepar dan penghitungan hepatosit (Gambar 2.6).

## 2.7 Hipotesis Penelitian

Tidak terdapat pengaruh pemberian dosis bertingkat protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap gambaran histopatologi hepar.

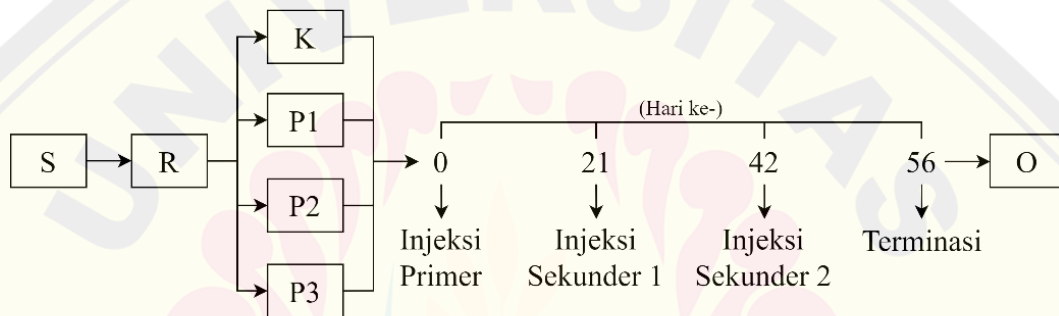
### BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

##### 3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental design* dengan rancangan penelitian *post-test only control group design* untuk menilai kerusakan struktur hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) pasca pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang menggunakan tiga dosis berbeda.

##### 3.1.2 Rancangan Penelitian



##### 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 Rancangan penelitian

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

##### 3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September-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, serta Laboratorium Histologi dan Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan kriteria inklusi yang meliputi tikus berusia 2-3 bulan, memiliki berat berkisar antara 150-300 gram, dan sehat secara fisik, ditandai oleh nafsu makan baik ditambah pergerakan aktif. Di samping itu, penelitian ini menggunakan kriteria eksklusi antara lain tikus yang memiliki luka infeksi dan rambut rontok atau kusam, tikus yang mati sebelum diberi perlakuan, dan mengalami penurunan berat sebesar  $>10\%$  setelah periode aklimatisasi.

#### 3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini didapatkan melalui teknik randomisasi *simple random sampling*, kemudian dihitung berdasarkan rumus metode *resource equation* dengan *E-value* sebesar 10-20 sebagai nilai replikasi yang adekuat. Hasil *E-value* ditentukan melalui rumus 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:

- a. 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 hasil penghitungan tersebut, didapatkan sebanyak 4-6 ekor tikus per kelompok sebagai jumlah sampel yang adekuat. Pada penelitian ini, diambil empat ekor tikus pada masing-masing kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan, maka jumlah sampel pada penelitian ini adalah 16 ekor tikus. Sementara itu, penentuan jumlah tikus pada kelompok kontrol menerapkan prinsip *reduction* sehingga hanya diambil tiga ekor tikus. Oleh karena itu, jumlah akhir sampel pada penelitian ini menggunakan sebanyak 15 ekor tikus.

### **3.4 Jenis dan Sumber Data Penelitian**

#### **3.4.1 Jenis Data**

Jenis data pada penelitian ini adalah data kuantitatif berupa konsentrasi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dan data semi-kuantitatif berupa hasil pengamatan histopatologi hepatosit dan lumen sinusoid pada preparat organ hepar tikus.

#### **3.4.2 Sumber Data**

Sumber data pada penelitian ini adalah data primer yang didapatkan secara langsung melalui percobaan di laboratorium mulai dari perlakuan pada hewan coba hingga observasi preparat organ hepar tikus.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas (*Independent*)**

Penelitian ini menggunakan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang telah melalui tahapan produksi, purifikasi, dan visualisasi dengan dosis bertingkat sebagai variabel bebas.

#### **3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent*)**

Penelitian ini menggunakan gambaran histopatologi hepatosit dan sinusoid hepar sebagai variabel terikat.

### 3.5.3 Variabel Kontrol

Penelitian ini menggunakan *placebo* berupa NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif.

### 3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala
1.	Dosis bertingkat protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1	Protein yang diekspresikan oleh DNA rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 <i>P. falciparum</i> melalui inang <i>E. coli</i> BL21 (DE3). DNA merupakan hasil kloning gen, produksi, hingga purifikasi (Rachmania <i>et al.</i> , 2021). Lalu, protein rekombinan diinjeksikan pada tikus dengan dosis bertingkat, yaitu 100 $\mu$ g/kgBB, 150 $\mu$ g/kgBB, dan 200 $\mu$ g/kgBB.	Pengukuran konsentrasi dosis menggunakan <i>Bradford protein assay</i> dan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm sehingga didapatkan satuan $\mu$ g/mL (Putri <i>et al.</i> , 2022).	Rasio
2.	Histopatologi hepatosit	Pengamatan gambaran histopatologi berdasarkan struktur hepar pada 20 hepatosit dari masing-masing lima lapang pandang menggunakan metode <i>zig-zag</i> dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 $\times$ (Narwanto <i>et al.</i> , 2023). Foto preparat diambil menggunakan aplikasi <i>optilab</i> , lalu sel dihitung dengan memasang <i>grid</i> pada aplikasi <i>Fiji ImageJ</i> .	Penghitungan skor hepatosit dikalikan dengan skor <i>Manja Roenigk</i> pada setiap sel yang dipilih, kemudian dijumlahkan dan dirata-rata untuk menghasilkan data pada 1 hewan coba. Skor dinyatakan dengan (Narwanto <i>et al.</i> , 2023): 1 : normal 2 : degenerasi parenkim 3 : degenerasi hidropik 4 : nekrosis	Ordinal
3.	Histopatologi sinusoid hepar	Pengamatan gambaran histopatologi berdasarkan pelebaran atau dilatasi sinusoid hepar pada lima lapang pandang menggunakan metode <i>zig-zag</i> dengan mikroskop cahaya perbesaran 100 $\times$ (Valla & Cazals-Hatem, 2016). Foto preparat diambil menggunakan aplikasi <i>Optilab</i> , kemudian pengamatan dilatasi sinusoid dibantu dengan aplikasi <i>Microsoft Powerpoint</i> .	Penghitungan skor dilatasi sinusoid dikategorikan berdasarkan skor lesi sinusoid Valla & Cazals-Hatem, lalu dijumlahkan dan dirata-rata untuk memperoleh data pada 1 hewan coba. Skor dinyatakan dengan (Valla & Cazals-Hatem, 2016): 0 : normal 1 : dilatasi ringan 2 : dilatasi sedang 3 : dilatasi berat	Ordinal

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Uji Kelayakan Etik (*Ethical Clearance*)

Penelitian ini telah mendapatkan izin kelayakan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomor surat No.1828/H25.1.11/KE/2023. Penerbitan *ethical clearance* menunjukkan bahwa penelitian ini terqualifikasi oleh standar uji kelayakan etik.

#### 3.7.2 Sterilisasi Alat

Sebelum digunakan, alat dan bahan perlu disterilisasi terlebih dahulu, seperti *aquadest*, mikrotip 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , dan 10  $\mu\text{L}$ , *Eppendorf tube* 1,5 mL, tabung *falcon* 15 mL dan 50 mL. Sterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 60 menit.

#### 3.7.3 Produksi Protein

Langkah awal produksi dimulai dengan pembuatan media LB cair dalam 8 tabung erlenmeyer 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. LB broth (Merck) dengan berat 0,02 gram dilarutkan dan dihomogenkan dalam *aquadest* steril menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah tercampur, disegel untuk disterilisasi di dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 60 menit.

Media yang sudah steril dibiarkan pada suhu ruang hingga dingin. Jika sudah dingin, ditambahkan sejumlah 50  $\mu\text{g/mL}$  kanamisin dan 50  $\mu\text{L}$  stok gliserol *E. coli* BL21 (DE3) ke dalam tabung reaksi untuk membuat *starter* kultur. Lalu, media diinkubasi dengan suhu 37 °C dan kecepatan 150 rpm selama 16 jam menggunakan *shaker incubator*. Setelah 16 jam, hasil kultur dicampurkan ke dalam tabung erlenmeyer yang sebelumnya sudah ditambahkan 50  $\mu\text{g/mL}$  kanamisin. Media kemudian diinkubasi dengan kecepatan 190 rpm selama 4 jam menggunakan *shaker incubator* hingga nilai  $\text{OD}_{600}$  sebesar 0,6-0,8.



Selanjutnya, media diinduksi dengan 50  $\mu$ L IPTG 0,5 mM dan diinkubasi kembali dengan kecepatan 190 rpm selama 8 jam menggunakan *shaker incubator*. Lalu, media disentrifugasi dengan suhu 4 °C dan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Di akhir proses, akan terbentuk endapan (*pellet*) di dasar botol. *Pellet* dipindahkan seluruhnya ke dalam tabung *falcon* 15 mL dan segera disimpan di dalam *freezer* -80 °C jika tidak langsung dilanjutkan ke proses ekstraksi.

#### 3.7.4 Ekstraksi Protein

Tabung *falcon* berisi *pellet* dicampurkan dengan 4 mL *buffer* (Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500  $\mu$ M, imidazole 5  $\mu$ M, serta NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50  $\mu$ M) dengan perbandingan 2:1 untuk *buffer* dan *pellet*. Setelah itu, ditambahkan lisozim 1 mg/mL dan didiamkan di dalam *ice box* dengan suhu 4 °C selama 30 menit. Lalu, *pellet* disonikasi dengan *output* 3 dan *duty cycle* 30 sebanyak 18-20 siklus. Setiap siklus terdiri dari 40 detik *running* dan 80 detik *resting time*.

Protein yang telah tersonikasi disentrifugasi dengan suhu 4 °C dan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung *falcon* 15 mL baru dan segera disimpan di dalam *freezer* -80°C apabila belum dilanjutkan ke proses purifikasi.

#### 3.7.5 Purifikasi Protein

Purifikasi protein mengikuti prosedur yang ada pada kit resin *Ni-NTA QIAGEN* dengan menggunakan kolom kromatografi. Pertama-tama, kolom dicuci dengan NaOH 0,1 M dan etanol 30% sebanyak 3 $\times$ 5 mL. Sejumlah 1 mL resin *Ni-NTA slurry* dimasukkan dan didiamkan selama 30 detik hingga resin mengendap. Cairan resin dibuang lalu dibilas menggunakan *aquadest* hingga 3 $\times$ 5 mL dan ditunggu sampai cairan habis.

Disambung dengan pemberian *buffer* lisis (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 5 mM dengan pH 8,0) sebanyak 3 $\times$ 5 mL. Pada pemberian ketiga, lubang di bawah kolom ditutup dan cairan dibiarkan menggenang selama 1 jam. Setelah itu, penutup dibuka untuk mengeluarkan cairan dari

dalam kolom. Bagian atas dan bawah kolom ditutup, sebanyak 4 mL supernatan hasil ekstraksi ditambahkan ke dalam kolom. Kolom dimasukkan ke dalam *orbital shaker* dengan suhu 4 °C dan kecepatan 100 rpm selama 1 jam.

Setelah itu, penutup dapat dibuka kembali dan cairan yang keluar dari lubang di bawah kolom ditampung dengan *Eppendorf tube* berlabel FT. Kemudian, dibilas menggunakan *wash buffer 1* (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 10 mM dengan pH 8,0) sebanyak 2×2,5 mL. Selanjutnya, dibilas kembali menggunakan *wash buffer 2* (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 20 mM dengan pH 8) sebanyak 2×2,5 mL. Cairan yang keluar ditampung menggunakan *Eppendorf tube* dengan label W1.1, W1.2, W2.2, dan W2.2.

Dilanjutkan dengan pemberian *buffer elusi 1* (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 30 mM dengan pH 8,0) sebanyak 2×500 µL, disambung oleh *buffer elusi 2* (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 50 mM dengan pH 8,0) sebanyak 2×500 µL, dan *buffer elusi 3* (NaCl 500 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, dan imidazole 100 mM dengan pH 8,0) sebanyak 2×500 µL. Masing-masing cairan elusi ditampung menggunakan *Eppendorf tube* dengan label E1.1, E1.2, E2.1, E2.2, E3.1, dan E3.2. Protein yang telah dipurifikasi disimpan di dalam *freezer* -80°C dan dapat dikeluarkan saat hendak divisualisasi.

### 3.7.6 Visualisasi Protein

Visualisasi protein dilakukan dengan teknik elektroforesis vertikal SDS-PAGE. *Separating gel* dibuat dengan konsentrasi akrilamid 12,5% (*lower gel buffer* 4X pH 8,8 5 mL, ddH<sub>2</sub>O 6,6 mL, akrilamid 30% 8,3 mL, TEMED 10 µL, dan APS 10% 100 µL) dimasukkan ke kaca dan dibiarkan sampai memadat. Lalu, *stacking gel* dengan konsentrasi akrilamid 4,5% (*upper gel buffer* 4X pH 6,8 3 mL, ddH<sub>2</sub>O 7 mL, akrilamid 30% 1,8 mL, TEMED 15 µL, dan APS 10% 150 µL) dituang ke kaca, dipasang *comb*, dan didiamkan hingga tercetak sumuran. Setelah itu, kaca dipasang dan dimasukkan 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.

*Buffer* sampel (gliserol, *bromophenol blue* 0,5%,  $\beta$ -*mercaptoethanol* 5%, SDS 10%, Tris HCl 0,5 M pH 6,8) dicampurkan dengan protein hasil purifikasi sebanyak 20-50  $\mu$ L 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  $\mu$ L *protein marker* dan 15  $\mu$ L sampel.

Selanjutnya, alat dipasangkan pada kutub masing-masing dan disambungkan ke sumber listrik. Elektrofesis *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*. Bagian *stacking gel* dipotong dan dibuang. 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 melalui *Bradford protein assay* didahului dengan pembuatan kurva standar menggunakan *bovine serum albumin* (BSA). Sebanyak 1 mL reagen *Bradford* dimasukkan ke dalam *Eppendorf tube*, kemudian per *tube* ditambahkan BSA dengan konsentrasi berbeda, dari terkecil hingga terbesar, dan dilakukan 2-3 kali replikasi. Setelah diinkubasi selama 10 menit, absorbansi dapat diukur menggunakan *microplate reader*. Dari hasil absorbansi dan konsentrasi BSA, terbentuk kurva standar yang dipakai untuk menentukan konsentrasi protein.

Selanjutnya, *Eppendorf tube* diisi sebanyak 995  $\mu$ L reagen *Bradford* dan ditambahkan dengan 5  $\mu$ L protein. Sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Lalu, sampel dipindah ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya

menggunakan panjang gelombang 595 nm. Penentuan jumlah pemberian protein didapatkan dengan rumus berikut:

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

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

### 3.7.8 Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

Sebanyak 15 ekor tikus yang telah melalui proses *sampling* diaklimatisasi selama dua minggu di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember agar hewan coba terbiasa dengan lingkungan baru. Tikus dipelihara di dalam kandang plastik berukuran 40×30×13 cm dengan alas serbuk kayu. Satu kandang terdiri atas 1-2 ekor tikus. Tikus diberi pakan ternak standar 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 kelompok perlakuan dengan masing-masing empat ekor tikus. Pemberian perlakuan dilakukan dengan injeksi NaCl 0,9% pada kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan diinjeksi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 menggunakan dosis 100 μg/kgBB, 150 μg/kgBB, dan 200 μg/kgBB setiap 200 gram tikus. Injeksi menggunakan *glass syringe luer lock* dan *needle* 23G secara subkutan di area leher pada hari ke-0, 21, dan 42. Injeksi dilakukan melalui 2 tahap, yaitu primer dan sekunder. Injeksi primer diberikan 1 kali menggunakan campuran protein rekombinan dan *Freund's complete adjuvant* dengan perbandingan 1:1. Sementara injeksi sekunder diberikan 2 kali dalam interval 3 minggu menggunakan campuran protein rekombinan dan *Freund's incomplete adjuvant* dengan perbandingan 1:1. Injeksi kelompok kontrol menggunakan NaCl 0,9% dilakukan dengan jumlah, waktu, serta lokasi yang sama seperti kelompok perlakuan.

### 3.7.9 Terminasi dan Pengambilan Organ Hewan Coba

Terminasi hewan coba dilakukan pada hari ke-56 dengan menginjeksikan 40-90 mg/kgBB *ketamine* ditambah 5-10 mg/kgBB *xylazine* secara *intraperitoneal* (Fang *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2019). Kemudian, dilakukan fiksasi menggunakan jarum pada papan bedah. Pengambilan organ hepar dapat dilakukan dengan pembedahan. Setelah organ berhasil diambil, organ dicuci menggunakan NaCl lalu direndam dalam BNF 10% (*aquadest* 900 mL, CH<sub>2</sub>O 40% 100 mL, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 gr, dan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,5gr pH 7,0).

### 3.7.10 Pembuatan Preparat Organ

Preparat organ hepar dibuat dengan metode parafin dan pewarnaan HE. Organ yang sudah direndam dalam BNF 10% selama 24 jam dilanjutkan ke proses *trimming* organ supaya dapat diletakkan dalam *tissue cassette*. Pelaksanaan tahap berikutnya yang meliputi dehidrasi, *clearing*, dan *embedding* menggunakan *Automatic Tissue Processor Leica TP1020* dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 100%, *xylol*, *xylol*, *xylol*, parafin, dan parafin. Pencelupan tiap cairan dilakukan selama 1 jam. Proses *embedding* jaringan dilakukan dengan *HistoCore Arcadia H Paraffin Embedding Station* yang menghasilkan blok preparat padat. Hasil *embedding* dipotong dengan ketebalan 4-6 µm menggunakan *microtom*. Potongan dimasukkan ke *waterbath* lalu ditangkap dengan *object glass* dan dikeringkan pada *slide dryer*.

Selanjutnya, preparat dideparafinisasi perendaman *xylol* 1 dan 2 selama masing-masing 10 dan 15 menit. Kemudian, preparat didehidrasi dengan etanol absolut, alkohol 95%, alkohol 70%, dan *aquadest* selama 5 menit per cairan. Lalu, preparat di-*staining* selama 15 menit dalam hematoksilin dan dibilas air mengalir selama 5 menit. Preparat dimasukkan ke dalam larutan *alcohol acid* 1% sebanyak 3 kali selama 5-10 detik dan dibilas air mengalir selama 1 menit. Untuk mempertegas warna, preparat dicelupkan sebanyak 3 kali dalam litium karbonat selama 5-10 detik. Berikutnya, preparat diwarnai menggunakan eosin 1% selama 10 menit dan didehidrasi dengan alkohol 70%, 95%, dan etanol absolut selama 1-3 menit per cairan. Preparat kemudian direndam selama 3-5

menit dalam *xylol* 1 dan *xylol* 2. Setelah itu, sediaan dikeringkan dan di-*mounting* dengan entelan lalu ditutup menggunakan *cover glass*.

### 3.7.11 Visualisasi Preparat Organ

Preparat diamati melalui mikroskop yang dihubungkan dengan kamera *optilab*. Foto preparat diambil dari komputer yang tersambung dengan kamera menggunakan *software optilab*. Pengamatan preparat dilakukan oleh dua orang pengamat yang menerapkan teknik *double-blind*, kemudian diverifikasi oleh ahli histopatologi dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang untuk masing-masing preparat dengan metode *zig-zag*.

Setiap satu lapang pandang, sebanyak 20 hepatosit dari zona III diamati pada perbesaran 400× dan dihitung dengan memasang *grid* pada aplikasi *Fiji ImageJ*, di mana setiap *grid* dapat berisi 2-3 sel. Penghitungan dimulai dari *grid* paling kiri sebelah atas. Kemudian tiap sel dikalikan dengan skor histopatologi *Manja Roenigk* (Tabel 3.2) dan dijumlahkan sehingga dihasilkan data untuk satu tikus. Dengan demikian, dapat ditentukan rentang skor yang berkisar antara 100 hingga 400 (Cahya *et al.*, 2022; Narwanto *et al.*, 2023).

Tabel 3.2 Klasifikasi *Manja Roenigk* (Sumber: Narwanto *et al.*, 2023)

Skor	Kategori Kerusakan	Gambaran Histopatologi
1	Normal	Sel hepatosit berbentuk poligonal, sitoplasma merah homogen, dan inti sel berbatas jelas
2	Degenerasi parenkim	Sel hepatosit membesar, sitoplasma keruh, dan batas antara inti sel dengan sitoplasma tidak jelas
3	Degenerasi hidropik	Sel hepatosit membesar, sitoplasma pucat, dan terdapat vakuola di sitoplasma atau sekitar inti sel
4	Nekrosis	Inti sel hepatosit mengecil dan menggelap (piknotik), inti dan kromatin sel memudar (kariolisis), dan fragmentasi inti sel yang gelap dan menyebar (karioreksis)

Sementara itu, untuk penilaian dilatasi sinusoid, tiap lapang pandang dilakukan pengamatan pada lumen sinusoid dari zona III dengan perbesaran 100× menggunakan bantuan aplikasi *Microsoft Powerpoint*. Setiap gambaran dilatasi diberi skor berdasarkan klasifikasi lesi sinusoid hepar (Tabel 3.3) (Valla

& Cazals-Hatem, 2016), kemudian hasil dijumlahkan sehingga didapatkan data untuk satu tikus.

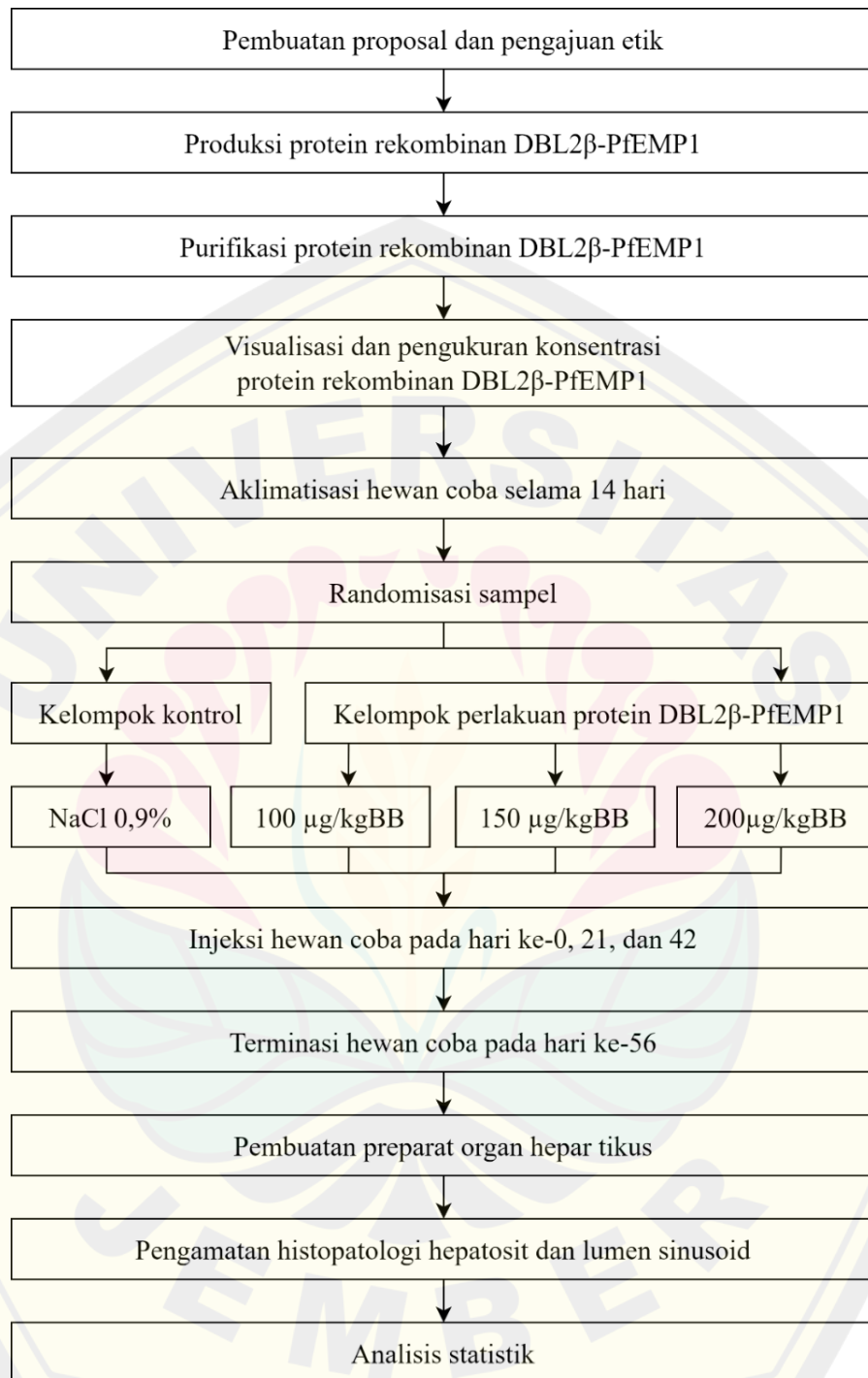
Tabel 3.3 Klasifikasi lesi sinusoid hepar (Sumber: Valla & Cazals-Hatem, 2016)

Skor	Kategori Kerusakan	Gambaran Histopatologi
0	Normal	Tidak ditemukan dilatasi sinusoid hepar
1	Dilatasi ringan	Dilatasi sinusoid hepar kurang dari 1/3 lobulus
2	Dilatasi sedang	Dilatasi sinusoid hepar antara 1/3-2/3 lobulus
3	Dilatasi berat	Dilatasi sinusoid hepar lebih dari 2/3 lobulus

### 3.8 Teknik Penyajian dan Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan *software* IBM SPSS *Statistics* 29. Data dianalisis menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene-test* dengan nilai signifikansi  $>0,05$  yang berarti data terdistribusi normal dan homogen (Dahlan, 2021). Kemudian, untuk mengetahui reliabilitas data, dilakukan uji *Cronbach- $\alpha$*  dan didapatkan nilai  $\alpha > 0,7$  sehingga data reliabel (Taber, 2018). Untuk mencari tahu efek protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 pada kelompok kontrol dan perlakuan, dilakukan uji parametrik komparasi dengan *One way ANOVA* pada data penghitungan hepatosit sedangkan data pengamatan sinusoid hepar dianalisis menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Penelitian ini menggunakan nilai *confidence interval* 95%.

### 3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian

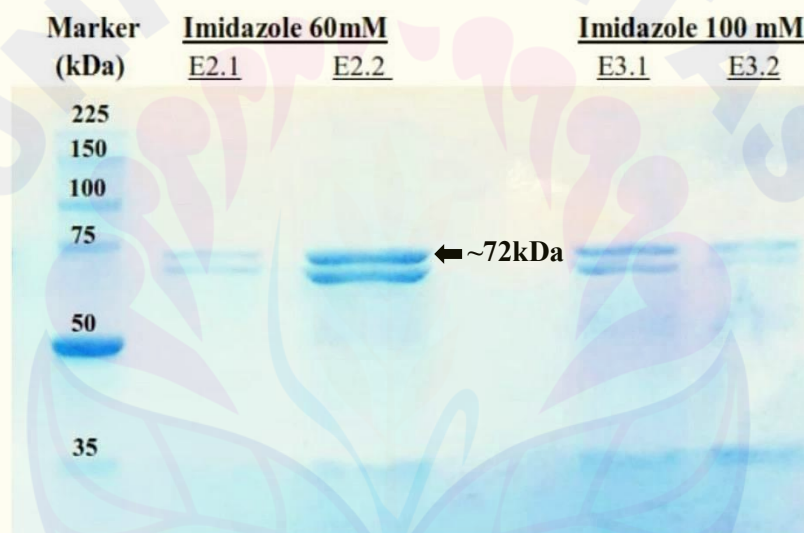


## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Visualisasi Protein

Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang telah melalui tahap purifikasi kemudian divisualisasi dengan *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Visualisasi protein dilakukan untuk mengonfirmasi keberadaan protein target sebelum diinjeksikan kepada tikus. Visualisasi protein target muncul sebagai pita/*band* berukuran ~72kDa yang tampak tebal pada kelompok elusi 2.2 (E2.2) dengan konsentrasi imidazole 60mM (Gambar 4.1).



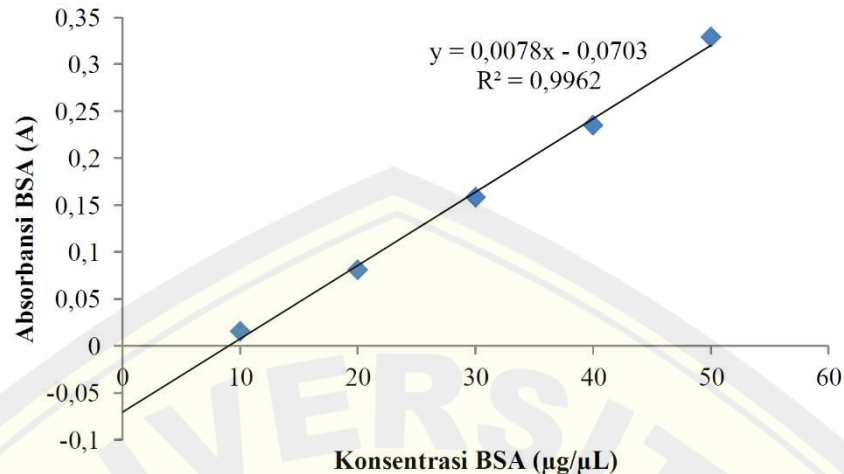
Keterangan: ➡ (protein target)

Gambar 4.1 Hasil visualisasi SDS-PAGE protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1

#### 4.1.2 Analisis Konsentrasi Protein

Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang terkonfirmasi melalui visualisasi SDS-PAGE dapat dilanjutkan ke tahap analisis konsentrasi menggunakan *Bradford protein assay*. Hasil penghitungan konsentrasi protein digunakan untuk menentukan jumlah protein dari masing-masing dosis yaitu 100  $\mu$ g/kgBB, 150  $\mu$ g/kgBB, dan 200  $\mu$ g/kgBB sebelum diinjeksikan kepada

tikus. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat kurva standar menggunakan *bovine serum albumine* (BSA) (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Kurva standar *Bradford Protein Assay*

Persamaan yang digunakan untuk mengukur konsentrasi protein berdasarkan kurva standar di atas adalah  $y=0,0078x-0,0703$  dengan nilai  $R^2$  sebesar 0,9962. Konsentrasi protein yang diukur adalah protein terpurifikasi dengan label E2.2 (imidazole 60Mm).

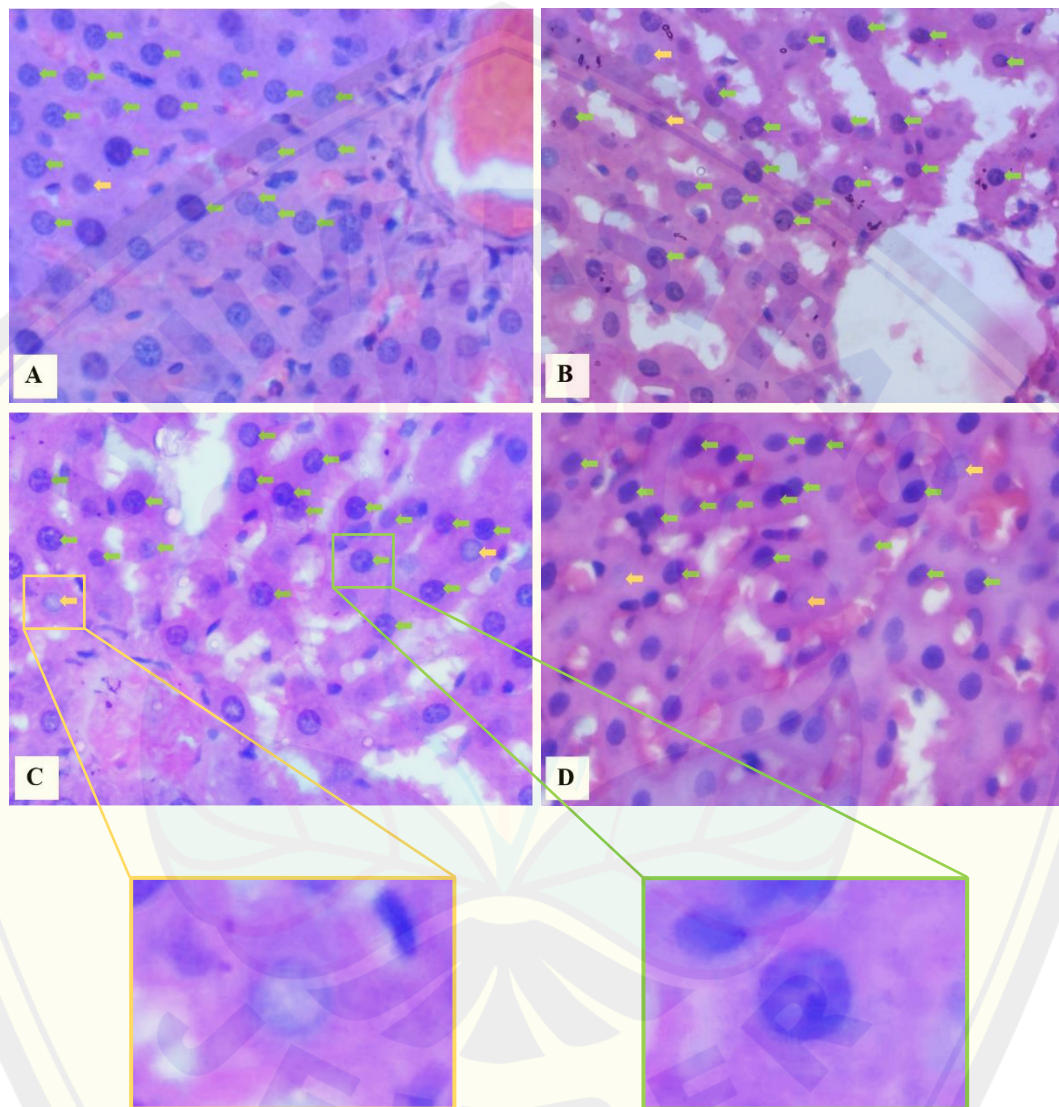
Pengukuran absorbansi dengan reagen *Bradford* direplikasi sebanyak tiga kali lalu diambil nilai rata-ratanya. Nilai rata-rata tersebut selanjutnya digunakan sebagai variabel  $y$  pada persamaan  $y=0,0078x-0,0703$  sehingga dapat ditentukan nilai variabel  $x$ . Hasil perhitungan nilai variabel  $x$  adalah konsentrasi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 yang diinjeksikan pada tikus, yaitu sebesar 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1

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

#### 4.1.3 Analisis Histopatologi Hepatosit

Preparat hepar dianalisis secara mikroskopis pada lima lapang pandang dengan bantuan aplikasi *Fiji ImageJ*. Sebanyak dua puluh hepatosit per lapang pandang diamati dari zona III. Gambaran histopatologi hepatosit dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Keterangan: → (sel normal), → (sel dengan degenerasi parenkim yang ditandai dengan nukleus pucat dan/atau batas antara nukleus dan sitoplasma tidak jelas)

Gambar 4.3 Gambaran histopatologi hepatosit. Perbandingan gambaran histopatologi hepatosit antara (A) kelompok kontrol, (B) kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100 µg/kgBB, (C) kelompok perlakuan 2 dengan dosis 150 µg/kgBB, dan (D) kelompok perlakuan 3 dengan dosis 200 µg/kgBB. Pada semua kelompok, baik kontrol maupun perlakuan, didapatkan gambaran hepatosit normal dan degenerasi parenkim (Olympus CX23, 400×, HE).

Pengamatan dilakukan oleh dua orang pengamat menggunakan teknik *double-blind*. Setiap sel yang diamati diklasifikasikan berdasarkan skor histopatologi *Manja Roenigk* kemudian dihitung dan diambil nilai rata-ratanya (Tabel 4.2). Untuk mengetahui reliabilitas data dilakukan uji reliabilitas menggunakan uji *Cronbach- $\alpha$* . Hasil uji *Cronbach- $\alpha$*  menunjukkan bahwa data penelitian ini reliabel dengan nilai  $\alpha=0,807$  (*Sig.*>0,7) (Lampiran 4.3).

Tabel 4.2 Rata-rata skor *Manja Roenigk*

Kelompok		Rata-rata skor tiap sel	Rata-rata skor <i>Manja Roenigk</i>	Rata-rata skor tiap kelompok $\pm$ SD
Kontrol	1	1,00	100,5	100,5 $\pm$ 0,500
	2	1,01	101	
	3	1,00	100	
Dosis 100 $\mu$ g/kgBB	1	1,02	102	101 $\pm$ 0,816
	2	1,01	101	
	3	1,00	100	
	4	1,01	101	
Dosis 150 $\mu$ g/kgBB	1	1,00	100,5	101,375 $\pm$ 0,629
	2	1,01	101,5	
	3	1,01	101,5	
	4	1,02	102	
Dosis 200 $\mu$ g/kgBB	1	1,01	101	101,25 $\pm$ 0,866
	2	1,01	101	
	3	1,00	100,5	
	4	1,02	102,5	

Berdasarkan analisis statistik (Lampiran 4.3) dengan aplikasi IBM SPSS *Statistic* 29, dalam uji *Saphiro-Wilk* dan *Levene-test* masing-masing menghasilkan nilai *Sig.*>0,05 sehingga data penghitungan skor histopatologi hepatosit terdistribusi secara normal dan homogen pada setiap kelompok. Untuk mengetahui pengaruh pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 pada kelompok kontrol dan perlakuan, data dapat dilanjutkan dengan uji komparasi parametrik *One-Way ANOVA*.

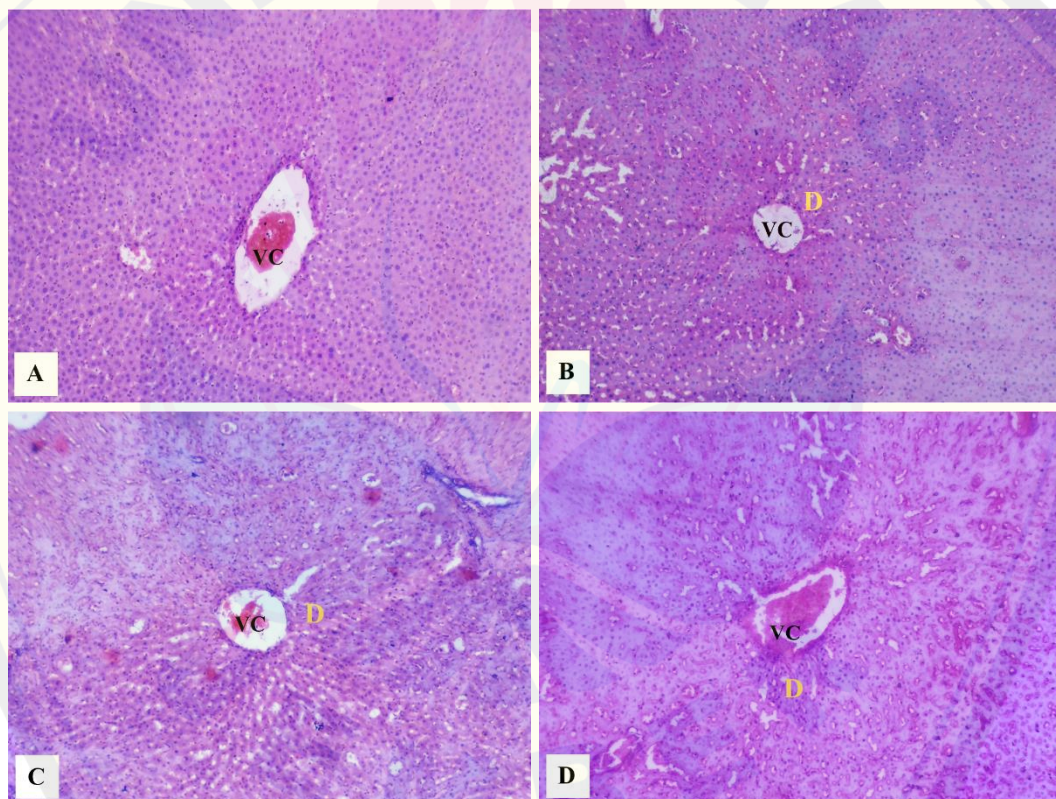
Hasil uji komparasi parametrik *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai *Sig.*>0,05 yaitu sebesar 0,461 (Lampiran 4.3) yang berarti tidak terdapat perbedaan yang berarti antara kelompok kontrol dan perlakuan. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Post-Hoc Tukey* karena data terdistribusi normal dan homogen (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Hasil uji *Post-Hoc Tukey* hepatitis

	Kontrol	100 µg/kgBB	150 µg/kgBB	200 µg/kgBB
Kontrol		$p=0,810$	$p=0,438$	$p=0,560$
100 µg/kgBB	$p=0,810$		$p=0,886$	$p=0,962$
150 µg/kgBB	$p=0,438$	$p=0,886$		$p=0,995$
200 µg/kgBB	$p=0,560$	$p=0,962$	$p=0,995$	

Hasil penghitungan menggunakan uji *Post-Hoc Tukey* menunjukkan nilai signifikansi yang lebih dari 0,05 baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok pada gambaran hepatitis.

#### 4.1.4 Analisis Lesi Sinusoid Hepar



Keterangan: VC (Vena sentralis), D (dilatasi ringan)

Gambar 4.4 Gambaran histopatologi sinusoid. Perbandingan gambaran lesi sinusoid hepar antara (A) kelompok kontrol, (B) kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100 µg/kgBB, (C) kelompok perlakuan 2 dengan dosis 150 µg/kgBB, dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis 200 µg/kgBB. Pada semua kelompok, baik kontrol maupun perlakuan, ditemukan gambaran sinusoid normal dan dilatasi ringan (Olympus CX23, 100×, HE).

Preparat hepar dianalisis secara mikroskopis pada lima lapang pandang. Pengamatan lesi sinusoid dilakukan di zona III dengan bantuan aplikasi *Microsoft Powerpoint*. Gambaran histopatologi sinusoid dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Pengamatan dilakukan oleh dua orang pengamat menggunakan teknik *double-blind*. Hasil pengamatan kemudian diberi skor berdasarkan klasifikasi lesi sinusoid hepar untuk dihitung dan diambil nilai rata-ratanya (Tabel 4.4). Data hasil pengamatan diuji reliabilitas menggunakan uji *Cronbach- $\alpha$* . Hasil uji *Cronbach- $\alpha$*  menunjukkan bahwa data penelitian ini reliabel dengan nilai  $\alpha=0,724$  (*Sig.*>0,7) (Lampiran 4.4).

Tabel 4.4 Rata-rata skor lesi sinusoid hepar

Kelompok		Rata-rata skor pengamat 1	Rata-rata skor pengamat 2	Rata-rata skor lesi sinusoid hepar	Rata-rata skor tiap kelompok $\pm$ SD
<b>Kontrol</b>	1	0,2	0,4	0,3	0,666 $\pm$ 0,702
	2	0,6	0,8	0,7	
	3	0	0	0	
<b>Dosis 100 <math>\mu</math>g/kgBB</b>	1	0,6	0,4	0,5	1,1 $\pm$ 0,115
	2	0,6	0,6	0,6	
	3	0,6	0,4	0,5	
	4	0,6	0,6	0,6	
<b>Dosis 150 <math>\mu</math>g/kgBB</b>	1	0,6	0,6	0,6	1,3 $\pm$ 0,115
	2	0,6	0,6	0,6	
	3	0,6	0,8	0,7	
	4	0,8	0,6	0,7	
<b>Dosis 200 <math>\mu</math>g/kgBB</b>	1	0,6	0,6	0,6	1,3 $\pm$ 0,115
	2	0,6	0,8	0,7	
	3	0,6	0,6	0,6	
	4	0,8	0,6	0,7	

Berdasarkan analisis statistik (Lampiran 4.4) dengan aplikasi IBM SPSS *Statistic 29*, hasil uji *Saphiro-Wilk* dan *Levene-test* masing-masing menunjukkan bahwa data penghitungan skor lesi sinusoid hepar tidak terdistribusi secara normal dan homogen pada setiap kelompok (*Sig.*<0,05) sehingga pengolahan data dilanjutkan dengan uji komparasi non-parametrik *Kruskal-Wallis* untuk menilai pengaruh pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap kelompok kontrol dan perlakuan.

Hasil uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan  $Sig.>0,05$  yaitu sebesar 0,260 (Lampiran 4.4) sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Post-Hoc Mann-Whitney* (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Hasil uji *Post-Hoc Mann-Whitney* sinusoid hepar

	Kontrol	100 µg/kgBB	150 µg/kgBB	200 µg/kgBB
Kontrol		$p=0,463$	$p=0,266$	$p=0,266$
100 µg/kgBB	$p=0,463$		$p=0,096$	$p=0,096$
150 µg/kgBB	$p=0,266$	$p=0,096$		$p=1,000$
200 µg/kgBB	$p=0,266$	$p=0,096$	$p=1,000$	

Hasil perbandingan statistik antar kelompok menggunakan uji *Post-Hoc Mann-Whitney* menunjukkan  $p$  value lebih besar dari 0,05 baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang berarti antar kelompok pada gambaran sinusoid hepar pasca injeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1.

## 4.2 Pembahasan

Hepar merupakan organ utama dalam metabolisme dan detoksifikasi berbagai bahan sisa, hormon, obat-obatan, atau substansi asing di dalam tubuh melalui sejumlah fase reaksi. Fungsi tersebut menyebabkan hepar berisiko tinggi terhadap kerusakan. Kerusakan pada hepar dapat terjadi melalui mekanisme toksisitas langsung akibat adanya konversi xenobiotik menjadi toksin aktif atau juga dapat terjadi melalui mekanisme imunologik. Kerusakan struktur hepar dapat diperiksa secara histopatologis melalui pengamatan preparat hepar dengan mikroskop (Maulina, 2018; Murti *et al.*, 2016; Narwanto *et al.*, 2023). Preparat hepar diambil dengan memotong lobus medial secara transversal. Secara anatomis, lobus medial merupakan lobus paling besar pada hepar tikus dan mendapatkan distribusi vaskularisasi yang lebih banyak dibandingkan lobus lainnya. Kondisi tersebut membuat lobus median menjadi lebih sensitif terhadap adanya kerusakan (Sänger *et al.*, 2015; Stan, 2018;

Treuting *et al.*, 2018; Vdoviaková *et al.*, 2016). Preparat hepar diamati pada zona III atau zona sentrilobular yang terletak di sekitar vena sentralis. Hepatosit pada zona III lebih rentan mengalami kerusakan dibandingkan 2 zona lainnya karena memiliki kandungan metabolit yang lebih tinggi (Maulina, 2018).

Hasil penghitungan skor histopatologi hepatosit menggunakan klasifikasi *Manja Roenigk* (Tabel 4.2) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan (*Sig.*>0,05). Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 bersifat aman bagi hepatosit. Hasil uji lanjutan menggunakan uji *Post-Hoc Tukey* menunjukkan bahwa tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antar masing-masing kelompok (*p*>0,05). Gambaran hepatosit yang ditemukan pada pengamatan preparat paling banyak dalam kondisi normal. Terdapat beberapa bentukan degenerasi parenkim, namun tidak dijumpai bentukan sel dengan degenerasi hidropik dan nekrosis pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis 100  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  tidak memengaruhi struktur hepatosit.

Kerusakan pada sel hepar terjadi melalui proses degenerasi yang diawali dengan hepatosit normal, degenerasi parenkim, degenerasi hidropik, hingga yang paling berat yaitu nekrosis. Degenerasi parenkim pada hepatosit dapat terjadi akibat pengaruh beberapa faktor, seperti faktor internal yang berupa perbedaan resistensi atau daya tahan tiap tikus dan faktor eksternal yang berupa kondisi lingkungan, stres, atau pengaruh zat serta penyakit lain. Sel yang mengalami degenerasi parenkim merupakan sel dengan derajat kerusakan paling ringan yang bersifat *reversible* sehingga masih dapat terjadi perbaikan dan sel menjadi normal kembali. Kondisi ini dipengaruhi oleh dosis dan jangka waktu paparan. Apabila dosis dan paparan terjadi secara berlebihan, dapat terjadi perburukan pada kondisi sel karena tidak dapat dikompensasi oleh tubuh. Akibatnya, dapat terjadi kerusakan berupa degenerasi hidropik dan nekrosis yang bersifat *irreversible*. Kerusakan pada sel dapat mengganggu atau menghambat fungsi detoksifikasi. Meskipun mengalami penurunan, hepatosit



dengan degenerasi parenkim dan degenerasi hidropik masih mampu menjalankan fungsi metabolismenya. Hepatosit akan kehilangan fungsinya ketika sudah terjadi nekrosis dan menjadi sel yang mati (Kumar *et al.*, 2018; Yuningtyaswari & Dewi, 2020).

Hasil penghitungan skor lesi sinusoid pasca tikus diinjeksi protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 (Tabel 4.4) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan secara statistik (*Sig.*>0,05). Hasil uji lanjutan menggunakan uji *Post-Hoc Mann-Whitney* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada masing-masing kelompok. Gambaran lesi sinusoid pada kelompok kontrol dan perlakuan paling banyak ditemukan dilatasi ringan dan tidak didapatkan tanda-tanda inflamasi berupa *distended sinusoid* dan ekstravasasi eritrosit. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis 100  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  tidak memengaruhi struktur sinusoid hepar.

Injeksi menggunakan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 akan dikenali sebagai bahan asing oleh tubuh, kemudian akan didistribusikan melalui pembuluh darah dan pembuluh limfa. Proses distribusi tersebut dijalankan oleh beberapa organ seperti hepar, limpa, sumsum tulang, ginjal, dan nodus limfa sehingga menyebabkan substansi asing memasuki sel-sel tertentu pada tiap jaringan (Nossal & Ada, 2014). Sinusoid hepar memegang fungsi utama dalam proses transpor oksigen serta nutrien dari pembuluh darah dan hepatosit. Substansi asing dalam darah yang melewati sinusoid hepar dapat bersifat hepatotoksik sehingga dapat menimbulkan respons patologis pada hepar, salah satunya adalah pelebaran atau dilatasi pada lumen sinusoid hepar. Dilatasi sinusoid ditandai dengan adanya pelebaran kapiler hepar dan dapat diklasifikasikan sesuai dengan zona lobulus hepar yang terkena, seperti periportal, sentrilobular, atau ireguler. Dilatasi sinusoid dapat memengaruhi mikrosirkulasi sehingga akan berakibat pada fungsi kompleks hepar secara keseluruhan dalam biosintesis, metabolisme, detoksifikasi, dan fungsi lainnya.

Hubungan antara hepatotoksitas dan dilatasi sinusoid merupakan proses yang kompleks karena melibatkan berbagai faktor sekaligus, mulai dari anatomi seluler yang menyusun sinusoid itu sendiri atau juga dapat berhubungan dengan fungsi hepatosit. Mekanisme patofisiologi primer maupun sekunder dari dilatasi sinusoid masih belum diketahui secara pasti dan dapat bervariasi sesuai dengan penyebab yang mendasarinya. Beberapa dugaan mekanisme yang menjadi penyebab dilatasi sinusoid antara lain atrofi hepar, perubahan hemodinamik karena peningkatan *artery flow*, serta aktivasi jalur molekuler seperti ekspresi interleukin-6 (IL-6) maupun reseptornya akibat infeksi dan cedera jaringan yang berkaitan dengan pertahanan tubuh. Selain itu, dilatasi sinusoid juga dapat disebabkan oleh robekan artifisial pada proses pembuatan preparat jaringan. Tanda inflamasi pada sinusoid hepar adalah *distended sinusoid* yang dapat disertai dengan ekstravasasi eritrosit ke dalam parenkim hepar, terutama pada zona III. Pada kebanyakan kasus, dilatasi sinusoid dapat kembali menjadi normal setelah penyebab yang mendasarinya dihentikan. Dilatasi sinusoid ringan berpeluang untuk menjadi normal kembali karena integritas endotel sinusoid masih tinggi dan belum rusak (Brunt *et al.*, 2014; Furlan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016; Sunjaya *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2014).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis bertingkat, yaitu 100  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ , dan 200  $\mu\text{g}/\text{kgBB}$  tidak memengaruhi struktur hepar karena tidak menyebabkan perubahan bentuk hepatosit dan tidak menimbulkan pelebaran lumen sinusoid hepar sesuai dengan hipotesis penelitian ini. Hal ini mengindikasikan bahwa protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 aman digunakan sebagai kandidat vaksin malaria.

## **BAB 5. KESIMPULAN, KETERBATASAN, DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa:

- a. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada gambaran hepatosit serta sinusoid hepar antara kelompok kontrol dan perlakuan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1.
- b. Protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis 100  $\mu$ g/kgBB, 150  $\mu$ g/kgBB, dan 200  $\mu$ g/kgBB aman digunakan sebagai kandidat vaksin malaria berdasarkan gambaran histopatologi hepatosit dan sinusoid hepar.

### **5.2 Keterbatasan Penelitian**

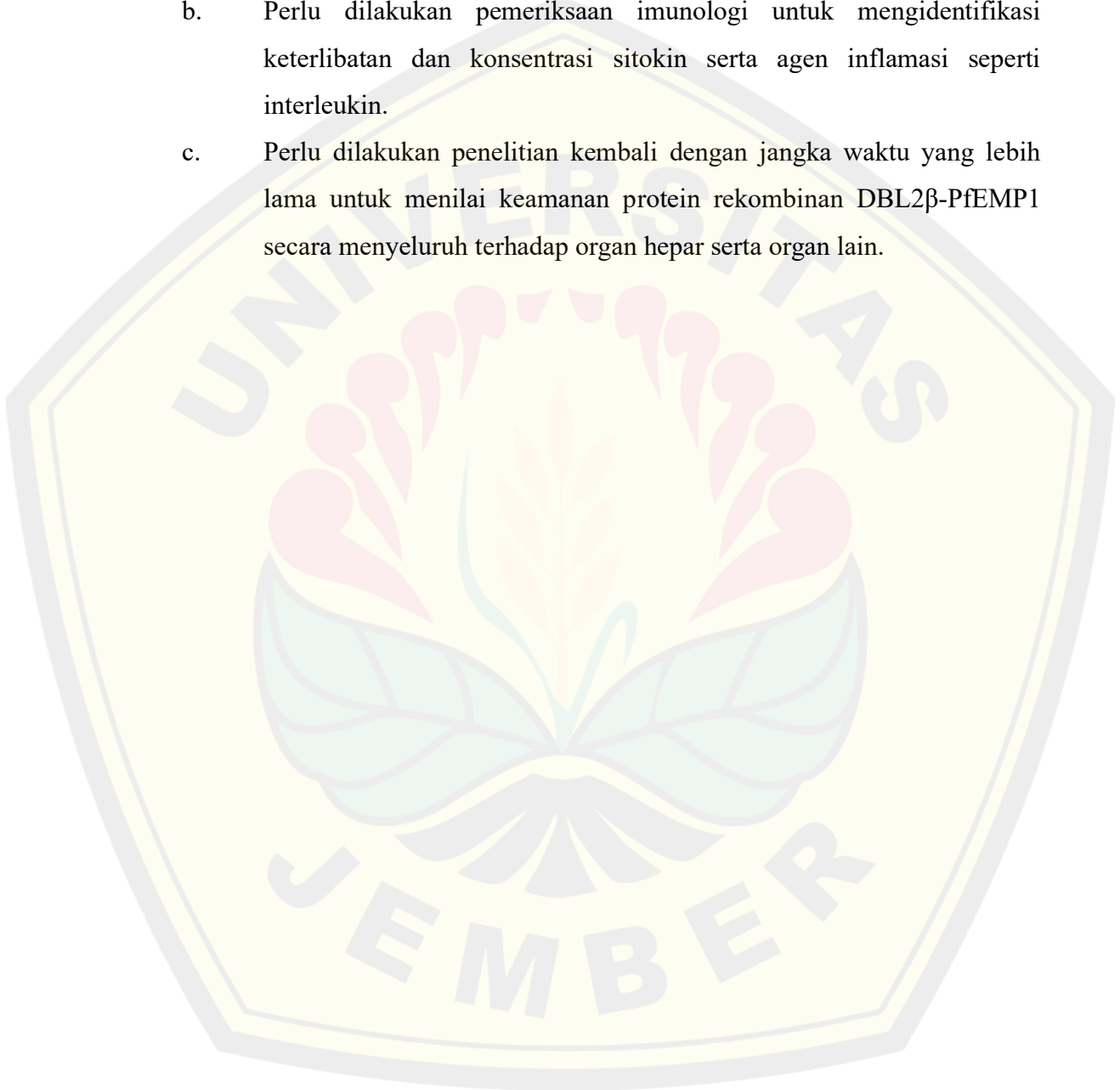
Keterbatasan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Tingkat kesulitan yang tinggi dalam pengamatan sinusoid hepar karena banyaknya faktor yang dapat memengaruhi hasil pengamatan, seperti adanya robekan artifisial saat proses pembuatan preparat jaringan.
- b. Lapang pandang yang diamati masih terbatas sehingga belum mencakup seluruh preparat.
- c. Dosis yang diteliti hanya sampai 200  $\mu$ g/kgBB sehingga belum diketahui efek protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 dengan dosis yang lebih tinggi.
- d. Pengamatan hanya dilakukan pada organ hepar sehingga belum diketahui efek protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 terhadap organ lain.

### 5.3 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

- a. Perlu digunakan metode pewarnaan lain untuk preparat jaringan seperti *Immunohisto Chemistry* (IHC) agar dapat mendeteksi antigen spesifik di dalam sel dan jaringan.
- b. Perlu dilakukan pemeriksaan imunologi untuk mengidentifikasi keterlibatan dan konsentrasi sitokin serta agen inflamasi seperti interleukin.
- c. Perlu dilakukan penelitian kembali dengan jangka waktu yang lebih lama untuk menilai keamanan protein rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1 secara menyeluruh terhadap organ hepar serta organ lain.



## DAFTAR PUSTAKA

- 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>
- Bazira, P. J. (2023). Anatomy of the liver. *Surgery*, 41(6), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2023.02.024>
- Braet, F., Taatjes, D. J., & Wisse, E. (2018). Probing the unseen structure and function of liver cells through atomic force microscopy. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 73, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.001>
- Brunt, E. M., Gouw, A. S. H., Hubscher, S. G., Tiniakos, D. G., Bedossa, P., Burt, A. D., Callea, F., Clouston, A. D., Dienes, H. P., Goodman, Z. D., Roberts, E. A., Roskams, T., Terracciano, L., Torbenson, M. S., & Wanless, I. R. (2014). Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology*, 64(7), 907–920. <https://doi.org/10.1111/his.12364>
- Cahaya, N., Dewi, R., Hasan, M., & Helianti, D. (2022). Ekstrak Ethanol Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Memperbaiki Kerusakan Hati Tikus Wistar yang Diinduksi Diazinon. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan : Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*, 9(3), 263–270. <https://doi.org/10.32539/JKK.V9I3.18862>
- CDC. (2020, October 6). *Malaria*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- CDC. (2021). *Malaria's Impact Worldwide*. Center for Disease Control and Prevention. [http://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html)
- Chandley, P., Ranjan, R., Kumar, S., & Rohatgi, S. (2023). Host-parasite interactions during Plasmodium infection: Implications for immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 13(January), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1091961>
- Dahlan, M. (2021). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat* (6th ed.). Epidemiologi Indonesia. <https://doku.pub/download/statistik-untuk-kedokteran-dan-kesehatan-msopiyudin-dahlan-30j8pxk4p5lw>
- Fang, C., Zhou, D., Zhan, S., He, Y., Lin, Z., Huang, C., & Li, J. (2013). Amelioration of Experimental Autoimmune Uveitis by Leflunomide in Lewis Rats. *PLoS ONE*, 8(4), e62071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062071>

- Fikadu, M., & Ashenafi, E. (2023). Malaria: An Overview. *Infection and Drug Resistance*, Volume 16(May), 3339–3347. <https://doi.org/10.2147/IDR.S405668>
- Furlan, A., Minervini, M. I., Borhani, A. A., Dioguardi Burgio, M., Tublin, M. E., & Brancatelli, G. (2016). Hepatic Sinusoidal Dilatation: A Review of Causes With Imaging-Pathologic Correlation. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 37(6), 525–532. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.08.007>
- Hakim, L., Wahono, T., Ruliansyah, A., & Jajang Kusnandar, A. (2018). Potensi Kemunculan Kembali Malaria di Kabupaten Pangandaran Potential of Malaria Re-emergence at Pangandaran District. *Aspirator*, 10(1), 37–48.
- Hamdam, J., Sethu, S., Smith, T., Alfirevic, A., Alhaidari, M., Atkinson, J., Ayala, M., Box, H., Cross, M., Delaunoy, A., Dermody, A., Govindappa, K., Guillon, J.-M., Jenkins, R., Kenna, G., Lemmer, B., Meecham, K., Olayanju, A., Pestel, S., ... Goldring, C. (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>
- Hasanah, F. H., Sulistyarningsih, E., & Sawitri, W. D. (2020). The Expression of The PfEMP1-DBL2 $\beta$  Recombinant Protein of Plasmodium falciparum Welch, 1897 Isolated From Indonesia. *Jurnal ILMU DASAR*, 21(1), 67. <https://doi.org/10.19184/jid.v21i1.10494>
- 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. *Immunological Reviews*, 293(1), 230–252. <https://doi.org/10.1111/imr.12807>
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2023). Physiology, Liver. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
- Kemenkes RI. (2020). Tatalaksana Kasus Malaria. In *Direktorat Jenderal P2P Kementerian Kesehatan*. <http://www.malaria.id/p/buku-malaria.html>
- Kemenkes RI. (2022). Profil Kesehatan Indonesia 2021. In F. Sibuea, B. Hardhana, & W. Widiyanti (Eds.), *Pusdatin Kemenkes*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian Kesehatan RI. (2019). *Laporan Nasional RISKESDAS 2018*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LBP).
- Kementerian Kesehatan RI. (2023). *Informasi Malaria Tahun 2022*. Web Page. <https://p2pm.kemkes.go.id/publikasi/infografis/informasi-malaria-tahun-2022>

- Khosasih, A. E. (2023). Pengembangan Vaksin Malaria RTS,S/AS01. *Cermin Dunia Kedokteran*, 50(5), 274–277. <https://doi.org/10.55175>
- Ko, M. J., Mulia, G. E., & van Rijn, R. M. (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(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00096>
- Krishna, M. (2013). Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease*, 2(SUPPL. 1), 4–7. <https://doi.org/10.1002/cld.147>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2018). *Robbins Basic Pathology* (10th ed., Vol. 6, Issue August). Elsevier.
- Lee, W. C., Russell, B., & Rénia, L. (2022). Evolving perspectives on rosetting in malaria. *Trends in Parasitology*, 38(10), 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.001>
- Maeda, K., Sadoughi, S., Morimoto, A., Uchida, K., Chambers, J., Sanjoba, C., Yamagishi, J., & Goto, Y. (2021). Hepatomegaly Associated with Non-Obstructive Sinusoidal Dilation in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, 10(11), 1356. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111356>
- 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>
- Maulina, M. (2018). *Zat-Zat yang Mempengaruhi Histopatologi Hepar* (1st ed.). Unimal Press.
- Mcquaid, F., Rowe, J. A., Mcquaid, F., & Rowe, J. A. (2019). *Rosetting revisited : a critical look at the evidence for host erythrocyte receptors in Plasmodium falciparum rosetting.*
- Milner, D. A. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Murti, F. K., Amarwati, S., & Wijayahadi, N. (2016). Pengaruh Ekstrak Daun Kersen (Muntingia Calabura) Terhadap Gambaran Mikroskopis Ginjal Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Etanol Dan Soft Drink. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 5(4), 658–664. <https://doi.org/10.14710/dmj.v5i4.14433>
- Narwanto, M. I., Jamalita, S., & Hermansyah, Y. (2023). Changes in histopathological features of adolescent rat livers due to subchronic exposure to Chlorpyrifos, Carbofuran, and Cypermethrin. *Qanun Medika - Medical Journal Faculty of Medicine Muhammadiyah Surabaya*, 7(2), 221–231. <https://doi.org/10.30651/jqm.v7i2.16880>

- Nossal, G. J. V., & Ada, G. L. (2014). *Antigens, Lymphoid Cells and the Immune Response* (F. J. Dixon & H. G. Kunkel (eds.)). Academic Press.
- Prasetyawan, E., Sabri, E., & Ilyas, S. (2013). Gambaran Histologis Hepar Mencit (Mus Musculus L.) Strain Ddw Setelah Pemberian Ekstrak N-Heksan Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc.) Selama Masa Pra Implantasi Dan Pasca Implantasi. *Saintia Biologi*, *1*(1), 1–6.
- Putri, D. A. S., Sulistyarningsih, E., Kusuma, I. F., & Dewi, R. (2022). Total leukocyte count in *Rattus norvegicus* after duffy binding-like 2 $\beta$ -Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 recombinant protein injection: The way to a peptide-based malaria vaccine development. *Biomolecular and Health Science Journal*, *5*(2), 71. [https://doi.org/10.4103/bhsj.bhsj\\_30\\_22](https://doi.org/10.4103/bhsj.bhsj_30_22)
- Rachmania, S., Sulistyarningsih, E., & Ratna Dewi, A. A. I. (2021). Recombinant DBL2 $\beta$ -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>
- Sänger, C., Schenk, A., Ole Schwen, L., Wang, L., Gremse, F., Zafarnia, S., Kiessling, F., Xie, C., Wei, W., Richter, B., Dirsch, O., & Dahmen, U. (2015). Intrahepatic vascular anatomy in rats and mice - Variations and surgical implications. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141798>
- Shen, H., Dong, J., Xia, L., Xu, J., & Xu, L. (2016). Rat liver sinusoidal dilatation induced by perfusion in vitro through portal vein alone, hepatic artery alone, and portal vein together with hepatic artery. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(6), 11284–11291.
- Stan, F. G. (2018). Comparative Study of the Liver Anatomy in the Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, *75*(1), 33. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:002717>
- Sulistyarningsih, E. (2020). *Vaksin Malaria: Perkembangan generasi vaksin, kandidat protein untuk vaksin dan tantangannya* (1st ed.). UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Sulistyarningsih, E. (2022). *Protein Kandidat Vaksin Malaria* (1st ed.). UPT Penerbitan dan Percetakan Universitas Jember.
- Sunjaya, D. B., Ramos, G. P., Neto, M. B. B., Lennon, R., Mounajjed, T., Shah, V., Kamath, P. S., & Simonetto, D. A. (2018). Isolated hepatic non-obstructive sinusoidal dilatation, 20-year single center experience. *World Journal of Hepatology*, *10*(5), 417–424. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i5.417>



- Surasa, N. J., Utami, N. R., & Isnaeni, W. (2014). Struktur Mikroanatomi Hati dan Kadar Kolesterol Total Plasma Darah Tikus Putih Strain Wistar Pasca Suplementasi Minyak Lemuru dan Minyak Sawit. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(2), 117–127. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v6i2.3778>
- 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>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295–a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., & Montine, K. S. (2018). *Comparative Anatomy and Histology a Mouse, Rat, and Human Atlas* (2nd ed.). Elsevier Inc.
- Valla, D.-C., & Cazals-Hatem, D. (2016). Sinusoidal obstruction syndrome. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 40(4), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.01.006>
- Vdoviaková, K., Vdoviaková, K., Petrovová, E., Krešáková, L., Maloveská, M., Teleky, J., Jenčová, J., Živčák, J., & Jenča Jr., A. (2016). Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Medical Science Monitor*, 22, 4716–4728. <https://doi.org/10.12659/MSM.899129>
- WHO. (2022). World malaria report 2022. In *World Health Organization*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- WHO. (2023). *WHO recommends R21/Matrix-M vaccine for malaria prevention in updated advice on immunization*. <https://www.who.int/news/item/02-10-2023-who-recommends-r21-matrix-m-vaccine-for-malaria-prevention-in-updated-advice-on-immunization>
- Yuningtyaswari, & Dewi, M. S. (2020). The Effect of Phoenix Dactylifera Pollen on Histology Liver of Rattus norvegicus Exposed with Air Fresheners. *Universitas Muhammadiyah Yogyakarta*, October, 13–14. <http://repository.umy.ac.id/handle/123456789/36464>
- 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 DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121  
- Email : [etik@uncjember.ac.id](mailto:etik@uncjember.ac.id)

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
**ETHICAL APPROVAL**

Nomor : 1828 /H25.1.11/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 :*

Pengaruh Pemberian Dosis Bertingkat Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -P $\beta$ EMP1 terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Peneliti Utama : Nisrina Hana Aziza  
*Name of the principal investigator*

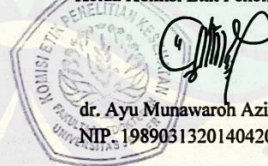
NIM/NIP : 202010101056

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, 23 November 2023  
Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan



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

## Lampiran 3.2 SOP Aklimatisasi Hewan Coba

- a. Tikus diletakkan di dalam kandang, satu kandang diisi dua ekor tikus.
- b. Pemeliharaan tikus dalam ruangan yang tenang, kondisi 12 jam siklus terang dan 12 jam siklus gelap menggunakan bak plastik berukuran 40×30×15 cm dengan anyaman kawat sebagai penutup, alas lantai dilapisi serabut kayu untuk menyerap kencing dan menjaga kelembapan.
- c. Kandang dibersihkan 3 hari sekali untuk menghilangkan bau amoniak dan cuci tangan dengan sabun lalu semprot dengan air mengalir, ruangan aklimatisasi dilengkapi dengan AC untuk menjaga suhu ruangan temperatur 24-28°C, kelembapan 50-70%, dan exhauster fan untuk mengeluarkan udara di dalam ruangan dan mengurangi bau amoniak.
- d. Penggantian sekam dilakukan setiap hari agar kandang tikus tidak bau dan tetap bersih.
- e. Pakan tikus yang digunakan adalah pelet dengan takaran 30-35 g atau 10% dari BB tikus per hari dan minuman hewan coba menggunakan air mineral dengan takaran 30-35 mL per hari.
- f. Minuman hewan coba menggunakan air mineral yang dimasukkan dalam tempat minum tikus 250 mL dan diisi ulang bila habis.
- g. Setelah hewan coba tikus diadaptasi 14 hari, tikus siap untuk diberikan perlakuan.

Lampiran 3.3 SOP *Handling* Hewan Coba

- a. Tikus dikeluarkan dari kandang dengan mengangkat tikus pada pangkal ekor menggunakan tangan kanan.
- b. Tangan kiri diletakkan pada belakang tubuh tikus (area punggung) menghadap ke arah kepala tikus. Tengukuk tikus diselipkan diantara jari tengah dan telunjuk tangan kiri. Ibu jari, jari manis, dan kelingking diselipkan di area perut tikus.

Lampiran 3.4 Hasil Pengukuran Berat Badan Hewan Coba

Kelompok		Sebelum Aklimatisasi (g)	Setelah Aklimatisasi (g)	Saat Injeksi Primer (g)	Saat Injeksi Sekunder 1 (g)	Saat Injeksi Sekunder 2 (g)
Kontrol	1	128	121	150	167	208
	2	133	144	182	195	223
	3	127	126	177	177	205
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
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
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 3.5 Hasil Penghitungan Dosis Injeksi Protein Rekombinan DBL2 $\beta$ -PfEMP1

Kelompok	Perhitungan Dosis		Jumlah Protein yang Diinjeksikan ( $\mu\text{l}$ )	
	BB Tikus (g)/200 gram $\times$ Dosis	Jumlah ( $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ )/ Konsentrasi ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )		
Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$	1	$178/200 \times 100$	89/2	44,5
	2	$189/200 \times 100$	94,5/2	47,25
	3	$222/200 \times 100$	111/2	55,5
	4	$212/200 \times 100$	106/2	53
Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$	1	$195/200 \times 150$	146,25/2	73,125
	2	$182/200 \times 150$	136,5/2	68,25
	3	$191/200 \times 150$	143,25/2	71,625
	4	$200/200 \times 150$	150/2	75
Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$	1	$200/200 \times 200$	200/2	100
	2	$178/200 \times 200$	178/2	89
	3	$234/200 \times 200$	134/2	117
	4	$197/200 \times 200$	197/2	98,5

## Lampiran 3.6 SOP Injeksi Hewan Coba

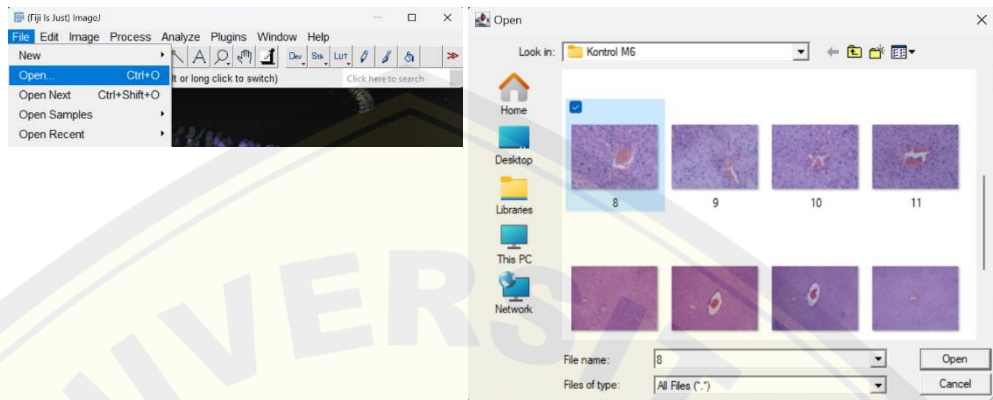
- a. Proses injeksi protein rekombinan dilakukan secara subkutan menggunakan *glass syringe luer lock* dengan *needle* berukuran 21G.
- b. Protein rekombinan dicampur dengan *Complete/Incomplete Freund's Adjuvant* dengan perbandingan 1:1 pada *glass syringe luer lock*.
- c. Tikus diletakkan di atas meja tindakan.
- d. Telapak tangan kiri diletakkan secara perlahan di belakang tikus, kulit dibagian tengkuk dipegang menggunakan ibu jari dan jari telunjuk.
- e. Tangan kanan memegang *glass syringe luer lock*, *needle* disuntikkan ke dalam lipatan kulit dengan cepat.
- f. *Needle* digerakkan menggunakan ibu jari dan jari telunjuk untuk menentukan posisi jarum pada tempat yang tepat, lalu disuntikkan dan dilepaskan secara perlahan

## Lampiran 3.7 SOP Terminasi, Pembedahan, dan Pemusnahan Hewan Coba

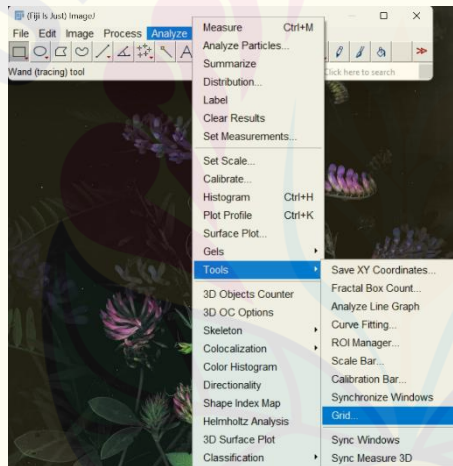
- a. Tikus diletakkan diatas meja tindakan.
- b. *Ketamine* (75-90 mg/KgBB) dan *xylazine* (5-10 mg/KgBB) diambil menggunakan *glass syringe luer lock* dan disuntikkan secara intraperitoneal pada tikus.
- c. Ketika pergerakan tikus telah terhenti, tikus diletakkan diatas papan fiksasi dengan posisi terlentang dan diamati  $\pm 15$  detik serta dilakukan tes nyeri menggunakan pinset untuk memastikan tikus telah mati.
- d. Kerangka dada tikus dibuka hingga hepar tikus terekspos.
- e. Hepar tikus diambil dan direndam di larutan BNF 10%.
- f. Pastikan tikus tidak mengalami *recovery* setelah dilakukan *euthanasia*.
- g. Gunakan sarung tangan, pakaian yang menutupi kulit, dan sekop untuk mengumpulkan tikus yang telah mati.
- h. Lakukan pembakaran dan penguburan di sekitar area penelitian. Lokasi penguburan memenuhi syarat berikut:
  - 1) Pada lahan yang ditinggikan dengan kemiringan  $< 5\%$ .
  - 2) Pemakaman dangkal dengan kedalaman 30-45 cm.
  - 3) Minimal 300 meter dari bangunan atau tempat umum.
- i. Apabila tidak memiliki karakteristik di atas, lubang pemakaman perlu dilapisi agar tidak mencemari air.
- j. Setelah itu, cuci tangan dan peralatan yang digunakan.

Lampiran 3.8 SOP Penghitungan Hepatosit Menggunakan *Fiji ImageJ*a. Prosedur Pembuatan Bilik Hitung (*Grid*)

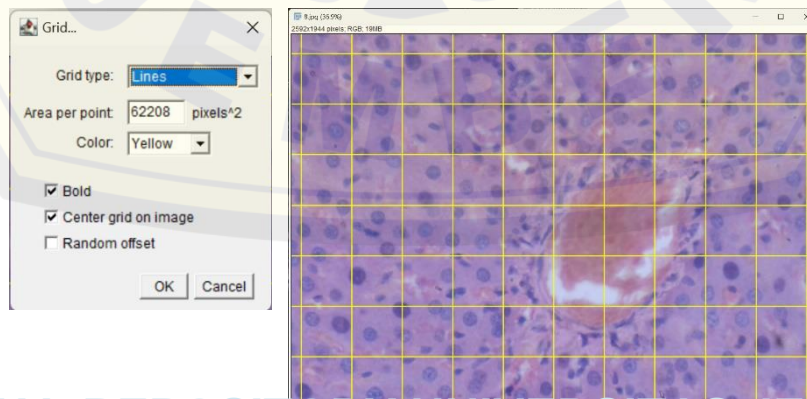
- 1) Buka aplikasi *Fiji ImageJ* >> klik “File” >> “Open” >> Pilih gambar yang akan dipasang *grid* >> klik “Open”



- 2) Setelah gambar terbuka, klik menu “Analyze” >> “Tools” >> “Grid”

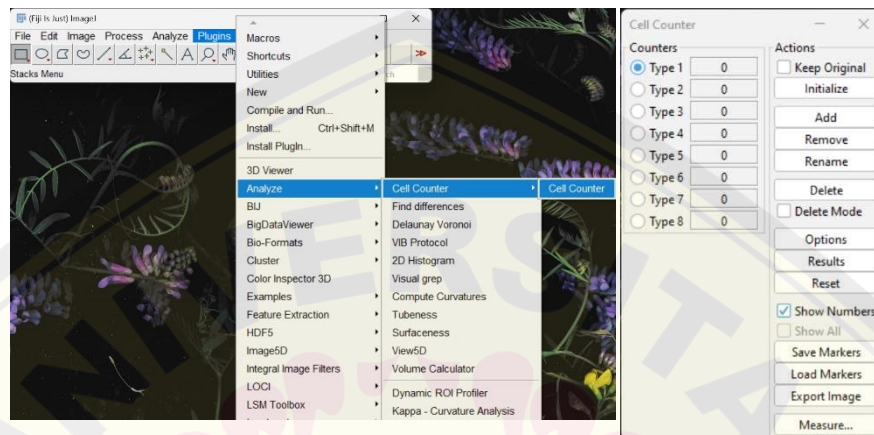


- 3) Kemudian akan terbuka menu berikut, atur ukuran *grid* agar memuat sebanyak 2-3 sel. Setelah sesuai, klik “Ok”

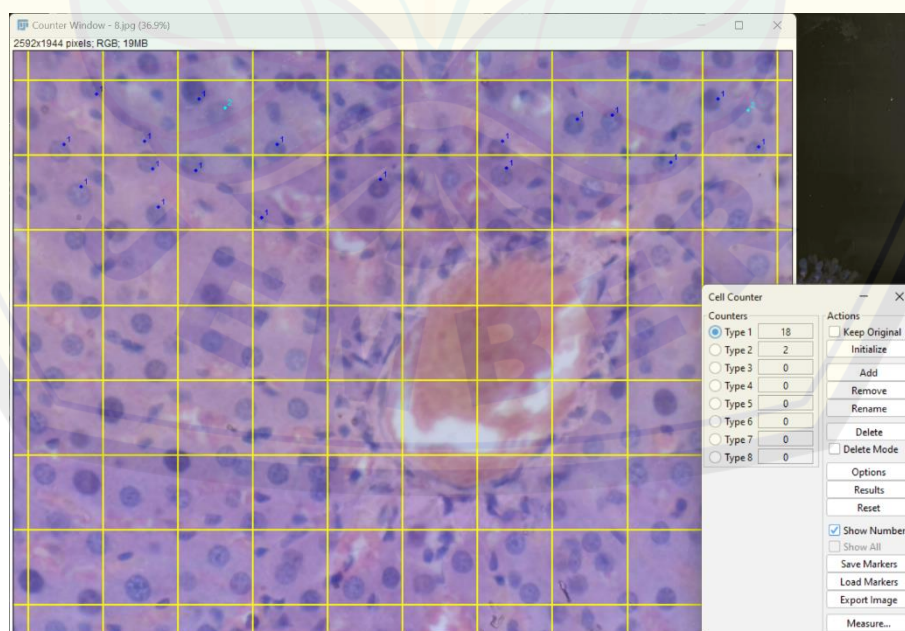


## b. Prosedur Penghitungan Sel

- 1) Klik “*Plugins*” >> “*Analyze*” >> “*Cell Counter*” >> “*Cell Counter*”. Kemudian akan terbuka menu berikut, klik “*Initialize*” sebelum melakukan penghitungan sel pada gambar. Jika gambar telah berhasil diinisialisasi, proses penghitungan dapat dilakukan.



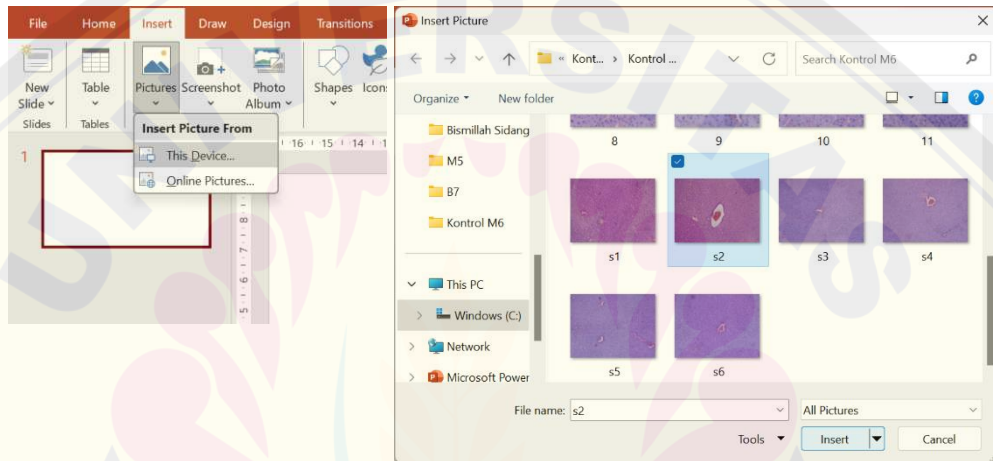
- 2) Sel secara keseluruhan dihitung hingga dua puluh sel menggunakan koding “*Type 1*” untuk sel normal, “*Type 2*” untuk sel dengan degenerasi parenkim, “*Type 3*” untuk sel dengan degenerasi hidropik, dan “*Type 4*” untuk sel nekrosis. Sel dihitung mulai dari *grid* paling kiri. Sel yang dihitung adalah sel yang berada dalam kotak dan/atau sel yang terpotong garis kanan dan/atau bawah kotak untuk menghindari penghitungan sel yang sama.



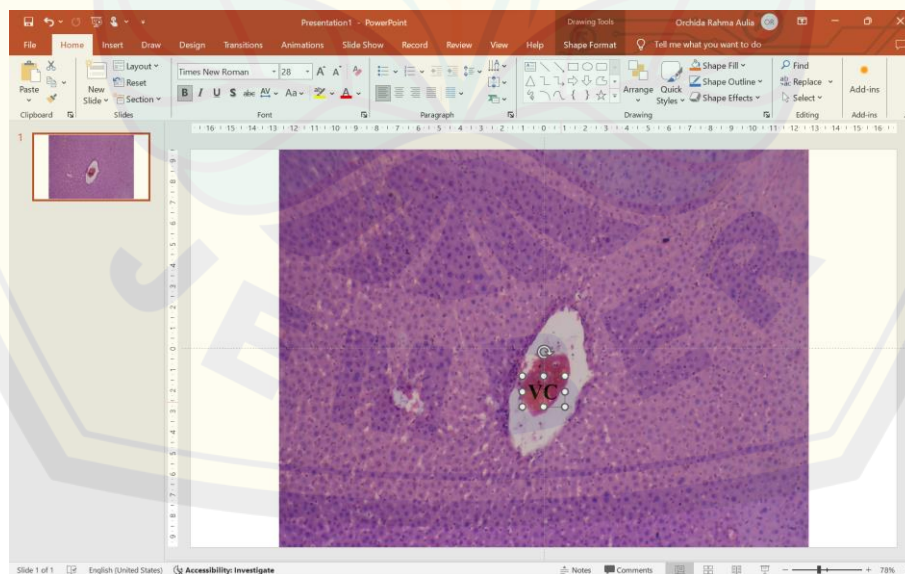
- 3) Hasil penghitungan kemudian dimasukkan ke dalam tabel yang pada *Microsoft Excel*.
- 4) Hasil pengamatan dikonsultasikan kepada ahli Patologi Anatomi

### Lampiran 3.9 SOP Pengamatan Sinusoid Hepar

- a. Buka aplikasi *Microsoft Powerpoint* >> “*Insert*” >> “*Picture*” >> “*This Device*” >> Pilih gambar yang akan diamati >> “*Open*”



- b. Lakukan identifikasi zona yang akan diamati





- c. Pelebaran sinusoid diamati di sekitar vena sentralis. Skor ditentukan dengan menyesuaikan kategori lesi
- d. Hasil pengamatan kemudian dikonsultasikan kepada ahli Patologi Anatomi

## Lampiran 4.1 Hasil Pengamatan Hepatosit

## a. Data Pengamat 1

Preparat	Normal		Degenerasi Parenkim		Degenerasi Hidropis		Nekrosis		Total Sel	Total Skor
	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor		
KB1	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
KB6	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
KM1	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
B1	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
B2	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M1	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
M2	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
B4	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
B5	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M4	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
M5	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
B7	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
B8	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M7	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
M8	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102

## b. Data Pengamat 2

Preparat	Normal		Degenerasi Parenkim		Degenerasi Hidropis		Nekrosis		Total Sel	Total Skor
	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor	Jumlah	Skor		
KB1	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
KB6	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
KM1	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
B1	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
B2	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M1	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100
M2	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
B4	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
B5	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
M4	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M5	98	98	2	4	0	0	0	0	100	102
B7	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
B8	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M7	99	99	1	2	0	0	0	0	100	101
M8	97	97	3	6	0	0	0	0	100	103

## Lampiran 4.2 Hasil Pengamatan Sinusoid Hepar

Preparat	Skor Pengamat 1					Skor Pengamat 2					Rata-rata Skor
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
KB1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0,3
KB6	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0,7
KM1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0,5
B2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0,6
M1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0,5
M2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0,6
B4	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0,6
B5	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0,6
M4	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0,7
M5	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0,7
B7	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0,6
B8	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0,7
M7	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0,6
M8	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0,7

## Lampiran 4.3 Hasil Uji Statistik Hepatosit

## a. Uji Normalitas

## Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hepatosit Kontrol	.175	3	.	1.000	3	1.000
Dosis 100	.250	4	.	.945	4	.683
Dosis 150	.329	4	.	.895	4	.406
Dosis 200	.364	4	.	.840	4	.195

## b. Uji Homogenitas

## Tests of Homogeneity of Variances

Hepatosit		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
		Based on Mean	.253	3	11
Based on Median		.087	3	11	.966
Based on Median and with adjusted df		.087	3	8.966	.966
Based on trimmed mean		.223	3	11	.878

c. Uji *One-Way ANOVA***ANOVA**

Hepatosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.496	3	.499	.924	.461
Within Groups	5.938	11	.540		
Total	7.433	14			

d. Uji *Post-Hoc Tukey***Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Hepatosit

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Dosis 100	-.5000	.5611	.810	-2.189	1.189
	Dosis 150	-.8750	.5611	.438	-2.564	.814
	Dosis 200	-.7500	.5611	.560	-2.439	.939
Dosis 100	Kontrol	.5000	.5611	.810	-1.189	2.189
	Dosis 150	-.3750	.5195	.886	-1.938	1.188
	Dosis 200	-.2500	.5195	.962	-1.813	1.313
Dosis 150	Kontrol	.8750	.5611	.438	-.814	2.564
	Dosis 100	.3750	.5195	.886	-1.188	1.938
	Dosis 200	.1250	.5195	.995	-1.438	1.688
Dosis 200	Kontrol	.7500	.5611	.560	-.939	2.439
	Dosis 100	.2500	.5195	.962	-1.313	1.813
	Dosis 150	-.1250	.5195	.995	-1.688	1.438

## e. Uji Reliabilitas

**Reliability Statistics**

Cronbach's Alpha	N of Items
.807	2

Lampiran 4.4 Hasil Uji Statistik Sinusoid Hepar

a. Uji Normalitas

**Tests of Normality**

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sinusoid Kontrol	.204	3	.	.993	3	.843
Dosis 100	.441	4	.	.630	4	.001
Dosis 150	.307	4	.	.729	4	.024
Dosis 200	.307	4	.	.729	4	.024

b. Uji Homogenitas

**Tests of Homogeneity of Variances**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Sinusoid	Based on Mean	5.032	3	11	.020
	Based on Median	3.498	3	11	.053
	Based on Median and with adjusted df	3.498	3	2.349	.203
	Based on trimmed mean	4.933	3	11	.021

c. Uji *Kruskal-Wallis*

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

Sinusoid	
Kruskal-Wallis H	4.011
df	3
Asymp. Sig.	.260

d. Uji *Post-Hoc Mann-Whitney*

1) Kontrol- Dosis 100 µg/kgBB

**Test Statistics<sup>a</sup>**

Sinusoid	
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.734
Asymp. Sig. (2-tailed)	.463
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.629 <sup>b</sup>

## 2) Kontrol-Dosis 150 µg/kgBB

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Sinusoid
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-1.111
Asymp. Sig. (2-tailed)	.266
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 <sup>b</sup>

## 3) Kontrol-Dosis 200 µg/kgBB

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Sinusoid
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-1.111
Asymp. Sig. (2-tailed)	.266
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 <sup>b</sup>

## 4) Dosis 100 µg/kgBB-Dosis 150 µg/kgBB

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Sinusoid
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.667
Asymp. Sig. (2-tailed)	.096
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>b</sup>

## 5) Dosis 100 µg/kgBB-Dosis 200 µg/kgBB

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Sinusoid
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.667
Asymp. Sig. (2-tailed)	.096
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>b</sup>

6) Dosis 150 µg/kgBB-Dosis 200 µg/kgBB

#### Test Statistics<sup>a</sup>

	Sinusoid
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>b</sup>

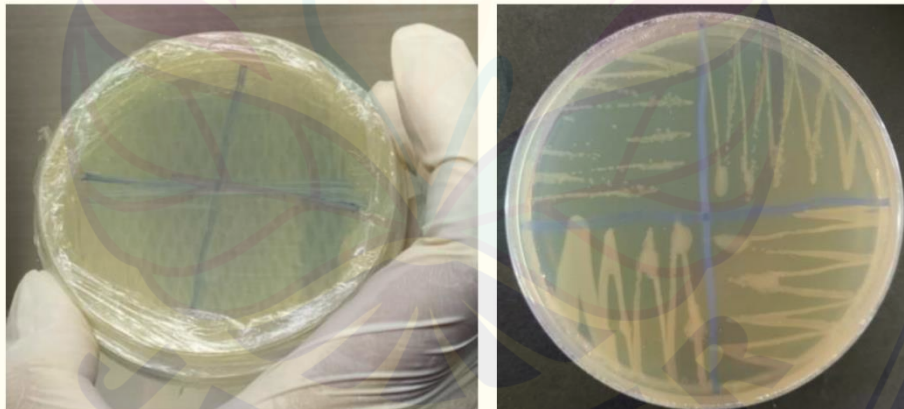
e. Uji Reliabilitas

#### Reliability Statistics

Cronbach's Alpha	N of Items
.724	2

#### Lampiran 4.5 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. Pembuatan *Starter* Kultur



Inkubasi *starter* kultur menggunakan shaker *incubator* dengan suhu 37 °C dan kecepatan 155 rpm selama 16 jam

d. Pemindahan *Starter* Kultur ke dalam Tabung Erlenmeyer



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

e. Sentrifugasi



Proses sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit

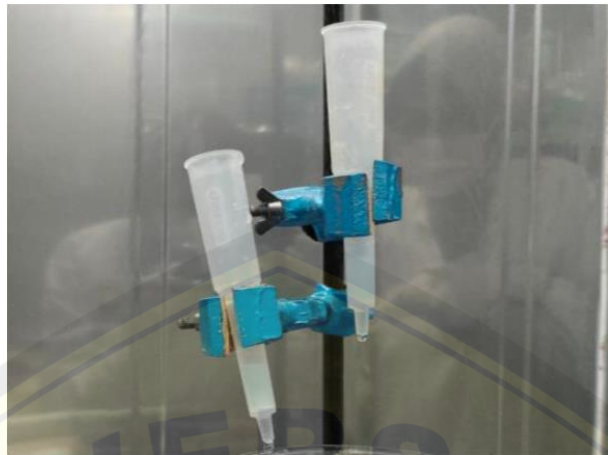
f. Sonikasi Protein



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



g. Purifikasi Protein



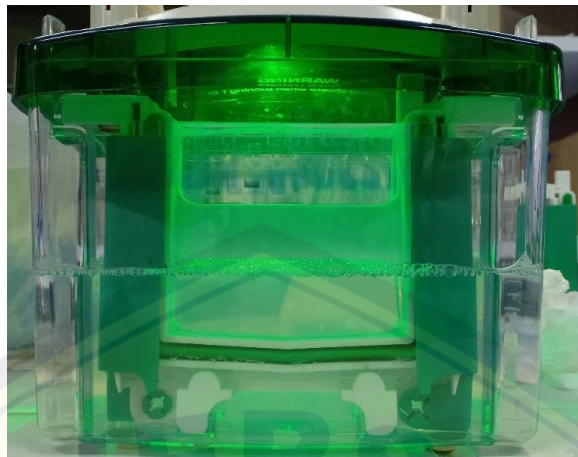
Proses purifikasi protein rekombinan dengan metode kromatografi afinitas

h. Penyimpanan Protein



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

i. Visualisasi Protein



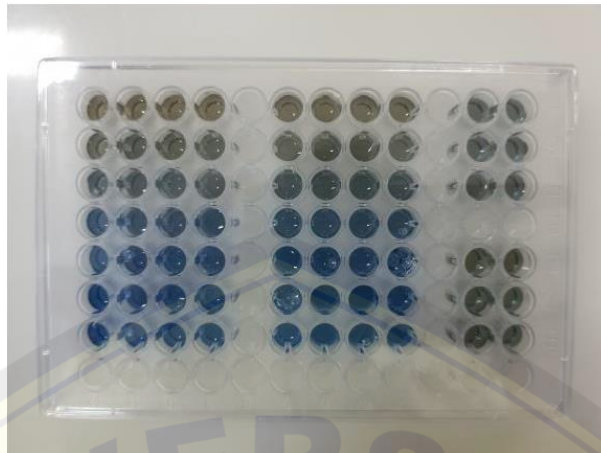
Proses visualisasi protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE dengan voltase 50 V selama 1 jam untuk *stacking/upper gel* dan 80 V selama 3 jam untuk *separation/lower gel*

j. Pewarnaan Gel Hasil Elektroforesis



Proses *staining* atau pewarnaan gel dengan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue*

k. Pengukuran Konsentrasi Protein



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



Proses pengukuran konsentrasi protein rekombinan DBL $\beta$ 2-PfEMP1

1. Perlakuan pada Hewan Coba



Proses aklimatisasi hewan coba di dalam kandang plastik berukuran 40×30×13 cm dengan alas serbuk kayu (sekam) selama 14 hari

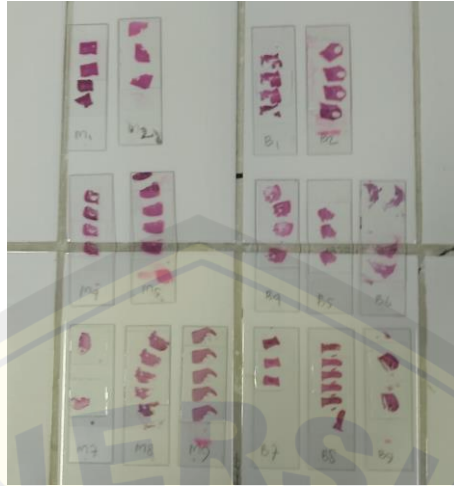


Proses injeksi protein rekombinan DBLβ2-PfEMP1 (kelompok perlakuan) dan NaCl 0,9% (kelompok kontrol) secara subkutan pada hewan coba



Proses terminasi hewan coba pada hari ke-56 pasca injeksi primer menggunakan *ketamine-xylazine*

m. Pembuatan Preparat Organ



Preparat organ hepar diwarnai menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin*

n. Pengamatan Preparat Organ



Proses pengamatan preparat organ menggunakan mikroskop cahaya dan kamera *Optilab*