



**UJI KEAMANAN PROTEIN REKOMBINAN DBL2B-PFEMP1
SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA BERDASARKAN
RESPON SEL KUPFFER HEPAR**

SKRIPSI

Oleh:
Muhammad Izzuddin Amin
NIM. 192010101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2023**



**UJI KEAMANAN PROTEIN REKOMBINAN DBL2 β -PfEMP1
SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA BERDASARKAN
RESPON SEL KUPFFER HEPAR**

SKRIPSI

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

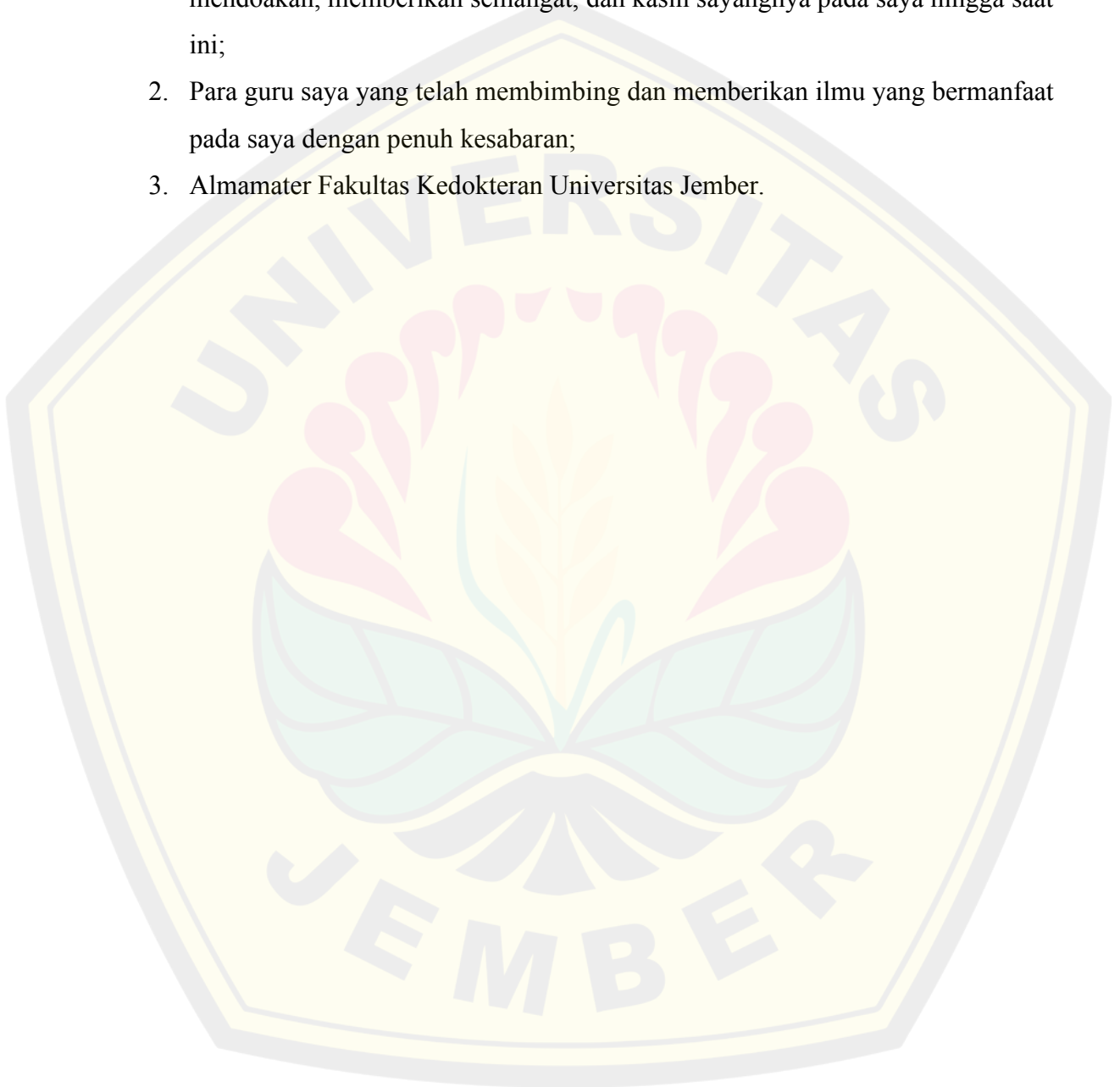
Oleh:
Muhammad Izzuddin Amin
NIM. 192010101037

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2023**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan untuk:

1. Kedua orang tua dan kakak, Abi, Umi dan Mas Dhanan yang senantiasa selalu mendoakan, memberikan semangat, dan kasih sayangnya pada saya hingga saat ini;
2. Para guru saya yang telah membimbing dan memberikan ilmu yang bermanfaat pada saya dengan penuh kesabaran;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Ikhtiar, Doa dan Tawakkal

“Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya, dan bahwasanya usaha itu kelak akan diperlihatkan”

(QS An-Najm (53):39)

“Atau siapakah yang memperkenankan (doa) orang yang dalam kesulitan apabila ia berdoa kepada-Nya, dan yang menghilangkan kesusahan dan yang menjadikan kamu (manusia) sebagai khalifah di bumi? Apakah di samping Allah ada Tuhan (yang lain)? Amat sedikitlah kamu mengingatnya”

(QS An-Naml (27):62)

...Dan barang siapa yang bertawakkal kepada Allah, niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya....

(QS At-Talaq (65):3)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Izzuddin Amin

NIM : 192010101037

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Keamanan Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Sebagai Kandidat Vaksin Malaria Berdasarkan Respon Sel Kupffer Hepar” adalah benar-benar hasil karya saya, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, karya yang belum pernah diajukan di institusi manapun dan 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 tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juli 2023

Yang menyatakan,

Muhammad Izzuddin Amin

NIM 192010101037

SKRIPSI

**UJI KEAMANAN PROTEIN REKOMBINAN DBL2 β -PfEMP1 SEBAGAI
KANDIDAT VAKSIN MALARIA BERDASARKAN RESPON SEL KUPFFER
HEPAR**

Oleh:

Muhammad Izzuddin Amin
NIM. 192010101037

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih,
M.Si., GCert.AgHealthMed.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Sheilla Rachmania, M.Biotek.

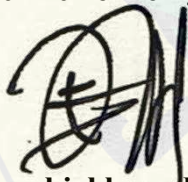
PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Uji Keamanan Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Sebagai Kandidat Vaksin Malaria Berdasarkan Respon Sel Kupffer Hepar” oleh Muhammad Izzuddin Amin NIM. 192010101037 telah disetujui pada:

Hari, tanggal : Senin, 10 Juli 2023

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,



Dr.rer.biol.hum.dr. Erma
Sulistyaningsih, M.Si.,
Gcert.AgHealthMed.
NIP 19770222 200212 2 001

Dosen Pembimbing Anggota,



dr. Sheilla Rachmania, M. Biotek
NIP 19901012 201504 2 001

RINGKASAN

Uji Keamanan Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Sebagai Kandidat Vaksin Malaria Berdasarkan Respon Sel Kupffer Hepar; Muhammad Izzuddin Amin; 192010101037; 2023; 63 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Malaria merupakan penyakit dengan penyebaran cukup luas di dunia, meliputi lebih dari 85 negara dengan iklim tropis dan sub-tropis termasuk Indonesia. Spesies *Plasmodium Sp* yang menyebabkan malaria berat adalah *P. falciparum*. *P. falciparum* memiliki kemampuan *cytoadherence* yang memungkinkannya melekat pada sel endotel atau sel eritrosit lainnya untuk menghindari *clearance* di limpa. Kemampuan ini dikendalikan oleh protein PfEMP1. PfEMP1 dikode oleh gen *var* dengan ektodomain terdiri atas kombinasi *Duffy binding-like* (DBL) dan domain adhesi *cysteine-rich interdomain region* (CIDR). Domain DBL β mampu berikatan dengan reseptor ICAM-1 untuk memediasi terjadinya malaria berat. Pada patogenesis malaria, hemozoin *P. falciparum* akan ditelan oleh sel Kupffer. Sel Kupffer kemudian teraktivasi dan menelan beberapa sitokin seperti IL-1 dan TNF alfa. Karena peran penting dalam patogenesis malaria berat, DBL2 β -PfEMP1 menjadi kandidat vaksin malaria berbasis peptida. Uji imunogenisitas protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 menunjukkan peningkatan IgG dan CD4+ ($p < 0,05$). Produksi IgG menghambat ikatan DBL2 β -PfEMP1 dengan ICAM-1, mengurangi inflamasi pada hepar. Namun, belum ada penentuan dosis aman protein rekombinan ini berdasarkan aktivasi dan proliferasi sel Kupffer hepar. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 berdasarkan aktivasi dan proliferasi sel Kupffer hepar paling sedikit.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni menggunakan metode *posttest only control group design*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST UNEJ, Laboratorium Parasitologi, Biokimia, dan Histologi FK UNEJ, serta Laboratorium Hewan Coba FKG UNEJ pada bulan Desember 2023 hingga Mei 2023.. Sampel terdiri atas 4 kelompok yaitu, kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 yang diberikan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, kelompok perlakuan 2 yang diberikan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, dan kelompok perlakuan 3 yang diberikan dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer berupa hasil hitung jumlah sel Kupffer teraktivasi dari preparat histologi hepar. Hasil hitung jumlah sel Kupffer teraktivasi kemudian direrata dan dianalisis menggunakan uji *One way ANOVA* dan uji *Post-hoc Tukey*.

Hasil rata-rata perhitungan jumlah sel Kupffer hepar teraktivasi menunjukkan adanya peningkatan pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol. Hasil rata-rata jumlah sel Kupffer hepar teraktivasi pada kelompok kontrol adalah 23, kelompok perlakuan dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ adalah 33, kelompok perlakuan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ adalah 31 dan kelompok perlakuan dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ adalah 42. Kelompok perlakuan dengan rata-rata jumlah aktivasi sel Kupffer paling rendah adalah kelompok perlakuan dengan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$. Uji analisis statistik

menggunakan ANOVA dan *post-hoc Tukey* menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikan $p=0,005$ pada kelompok perlakuan dosis 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ dalam memicu jumlah aktivasi sel Kupffer hepar. Dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 ditentukan berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar paling sedikit karena tidak mengakibatkan kerusakan pada jaringan hepar. Dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam penelitian ini adalah dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ dan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$. Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ dan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dapat menjadi kandidat vaksin malaria karena tidak mengakibatkan kerusakan pada jaringan hepar.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas sehalah rahmat dan berkah-Nya penulis bisa menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Keamanan Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Sebagai Kandidat Vaksin Malaria Berdasarkan Respon Sel Kupffer Hepar”. Skripsi ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis bermaksud untuk menyampaikan terima kasih kepada:

1. Abi Sutikno, Umi Ninik Sulastri, dan Mas Dhanan Abimanto yang telah memberikan semangat, motivasi, dan senantiasa mendoakan penulis;
2. dr. Ulfa Elfiah, M. Kes., Sp. BE-RE., Subsp. L. B. L. (K). selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
3. Dr.rer.biol.hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si., GCert.AgHealthMed. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan dr. Sheilla Rachmania, M. Biotek. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah berkenan untuk meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing selama penyusunan skripsi ini;
4. Dr. dr. Dina Helianti, M.Kes. selaku Dosen Penguji Utama (DPU) dan dr. Ika Rahmawati Sutejo M.Biotech. selaku Dosen Penguji Anggota (DPA) yang telah berkenan untuk menguji serta memberikan masukan dan ilmu kepada penulis selama proses pembuatan skripsi;
5. dr. Rosita Dewi, M.Biotek. dan dr. Irawan Fajar Kusuma, M. Sc., Sp. PD. selaku dosen anggota kelompok riset malaria yang telah memberikan saran kepada penulis dalam proses penulisan skripsi dan memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan dan penelitian di laboratorium;
6. Dr. dr. Sugiyanta, M.Ked. selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) yang telah membantu penulis dalam proses akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Jember selama 8 semester;

7. Seluruh dosen pengajar dan civitas akademika di Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan ilmunya dan membantu penulis selama menempuh pendidikan;
8. Mbak Husna selaku kakak ipar penulis dan keluarga besar abi maupun keluarga besar umi yang telah memberikan doanya kepada penulis.
9. Rizky, Fiqar, Arga, Tian, Arya, dan Raihan selaku sahabat penulis sejak SMP yang telah memberikan saran dan semangat kepada penulis;
10. Lucky, Dimas, Teguh, Diaz, dan Hudan selaku sahabat penulis ketika kuliah dan telah banyak membantu penulis dalam mengerjakan skripsi;
11. Risma, Nisya, Khai, Ufi, dan Teguh selaku rekan riset dan penelitian penulis yang sudah banyak membantu dalam proses pembuatan skripsi.
12. Mas dan Mba peneliti sebelumnya di kelompok riset malaria yaitu Mas Iqbal, Mas Renaldi, Mba Izza, Mba Dwi, Mba Annisa, Mba Resy, dan Mba Leny yang telah membimbing, mendukung, memberikan ilmu, dan arahan kepada penulis selama penyusunan skripsi dan penelitian di laboratorium;
13. Teman seangkatan COSTAE FK UNEJ 2019;
14. Pihak-pihak lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu

Semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan rahmat kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis untuk melaksanakan dan menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari dalam penulisan skripsi masih banyak kekurangan tetapi semoga skripsi ini bisa menjadi manfaat bagi penulis dan perkembangan keilmuan.

Jember, 11 Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTO	iv
PERNYATAAN	v
Halaman pembimbing	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat bagi Instutisi	3
1.4.2 Manfaat bagi Peneliti	4
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Malaria	4
2.1.1 Epidemiologi.....	4
2.1.2 Etiologi	7
2.1.3 Gejala.....	7

2.1.4	Diagnosis malaria	7
2.1.5	Pengobatan Malaria	8
2.1.6	<i>Plasmodium falciparum</i>	9
2.1.7	Siklus <i>P. falciparum</i>	9
2.1.8	Morfologi <i>P. falciparum</i>	10
2.1.9	Patogenesis <i>P. falciparum</i>	13
2.2	<i>Protein Duffy Binding Like DBL2β-PfEMP1</i>	13
2.3	Hepar	14
2.3.1	Anatomi Hepar	14
2.3.2	Fisiologi	15
2.3.3	Seluler	16
2.4	Sel Kupffer	17
2.4.1	Histologi Sel Kupffer	17
2.4.2	Peran sel Kupffer	18
2.5	Vaksin Malaria	19
2.6	Dosis Safety atau Dosis Aman	20
2.7	Kerangka Teori	21
2.8	Kerangka Konsep	23
2.9	Hipotesis Penelitian	23
BAB 3.	METODE PENELITIAN	24
3.1	Rancangan Penelitian	24
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.2.1	Waktu Penelitian	25
3.2.2	Tempat Penelitian	25
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian	25
3.3.1	Populasi	25
3.3.2	Sampel	25
3.4	Jenis dan Sumber Data	26
3.4.1	Jenis data	26
3.4.2	Sumber data	26
3.5	Variabel Penelitian	26
3.5.1	Variabel bebas (<i>Independent</i>)	26
3.5.2	Variabel terikat (<i>Dependent</i>)	27
3.6	Definisi Operasional	27

3.7 Prosedur Penelitian.....	27
3.7.1 Uji Kelayakan Etik (<i>Ethical Clearance</i>).....	27
3.7.2 Sterilisasi Alat.....	28
3.7.3 Produksi Protein Rekombinan	28
3.7.4 Purifikasi Protein Rekombinan.....	29
3.7.5 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE	30
3.7.6 Analisis Konsentrasi Protein.....	32
3.7.7 Pemeliharaan dan Injeksi Hewan Coba	32
3.7.8 Terminasi Hewan Coba	33
3.7.9 Pembuatan Preparat	33
3.7.10 Pengambilan Foto Preparat.....	34
3.7.11 Penghitungan Jumlah Sel Kupffer.....	35
3.7.12 Metode Analisis	35
3.8 Alur Penelitian	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hasil Penelitian	37
4.1.1 Visualisasi Protein Rekombinan.....	37
4.1.2 Analisis <i>Bradford Protein Assay</i>	37
4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Sel Kupffer	39
4.2 Pembahasan.....	41
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Status Eliminasi Malaria di Indonesia Tahun 2021	5
Gambar 2.2 Peta Endemis Malaria Tahun 2021	6
Gambar 2.3 Angka Kesakitan Malaria Per 1000 Penduduk	6
Gambar 2.4 Siklus Hidup <i>Plasmodium Sp</i>	10
Gambar 2.5 Ring stage <i>P. falciparum</i>	11
Gambar 2.6 Trophozoite stage <i>P. falciparum</i>	11
Gambar 2.7 Schizont stage <i>P. falciparum</i>	12
Gambar 2.8 <i>Gametosite Stage P. falciparum</i>	12
Gambar 2.9 Anatomi Hepar	15
Gambar 2.10 Zona Pada Lobulus Hepar	17
Gambar 2.11 Sel Kupffer Pada Hepar Manusia.....	18
Gambar 2.12 Kerangka Teori.....	22
Gambar 2.13 Kerangka Konsep	23
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian	24
Gambar 3.2 Alur Penelitian.....	36
Gambar 4.1 Visualisasi Protein Rekombinan DBL β 2-PfEMP1	37
Gambar 4.2 Kurva Standar <i>Bradford Protein Assay</i>	38
Gambar 4.3 Contoh Gambaran Hasil Hitung Jumlah Sel Kupffer Hepar	39
Gambar 4.4 Rata-Rata Jumlah Sel Kupffer Hepar pada Setiap Perlakuan	40

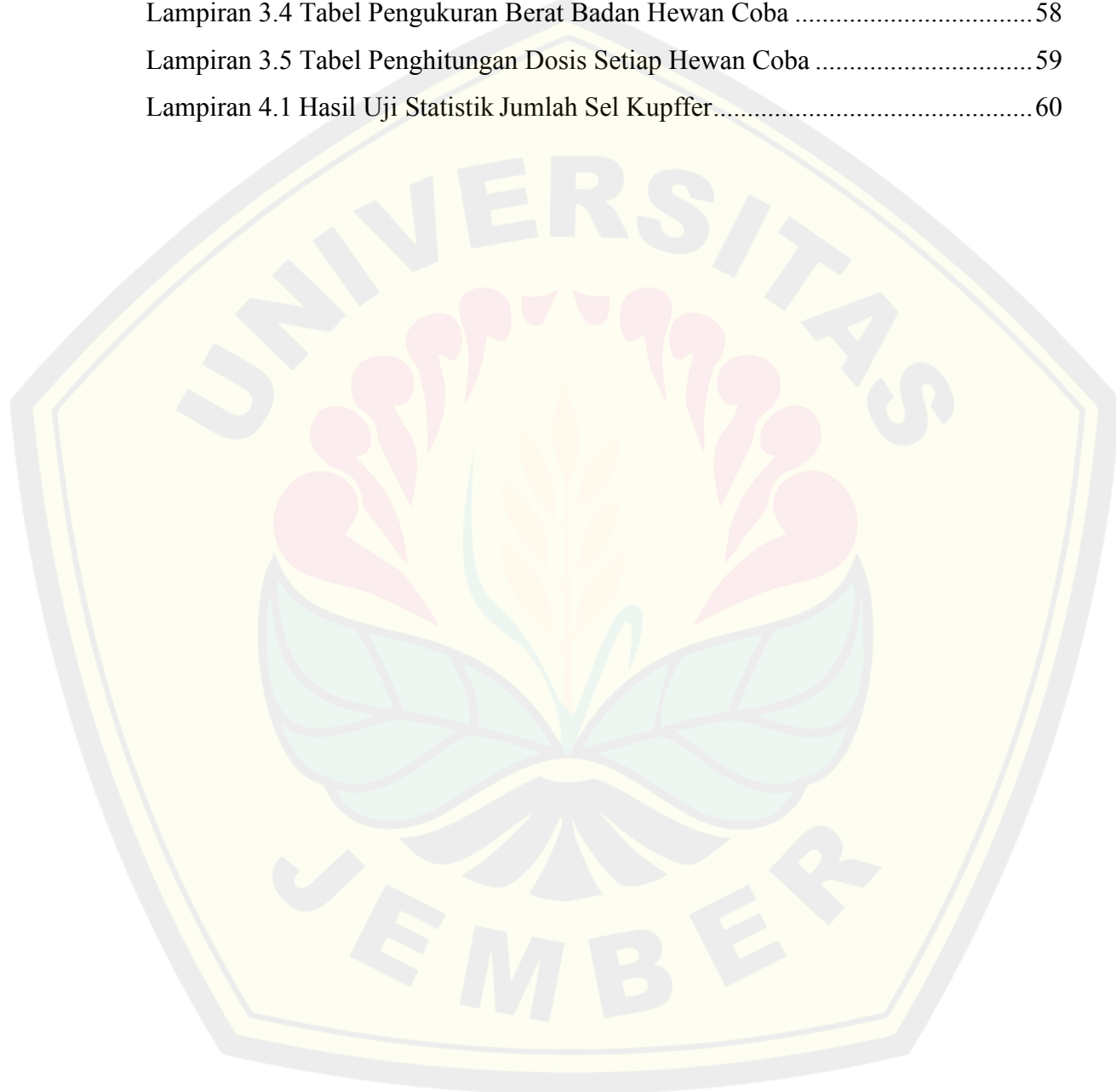
DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian	26
Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBL β 2-PfEMP1	38
Tabel 4.2 Nilai Signifikansi pada Uji <i>post-hoc Tukey</i>	41



DAFTAR LAMPIRAN

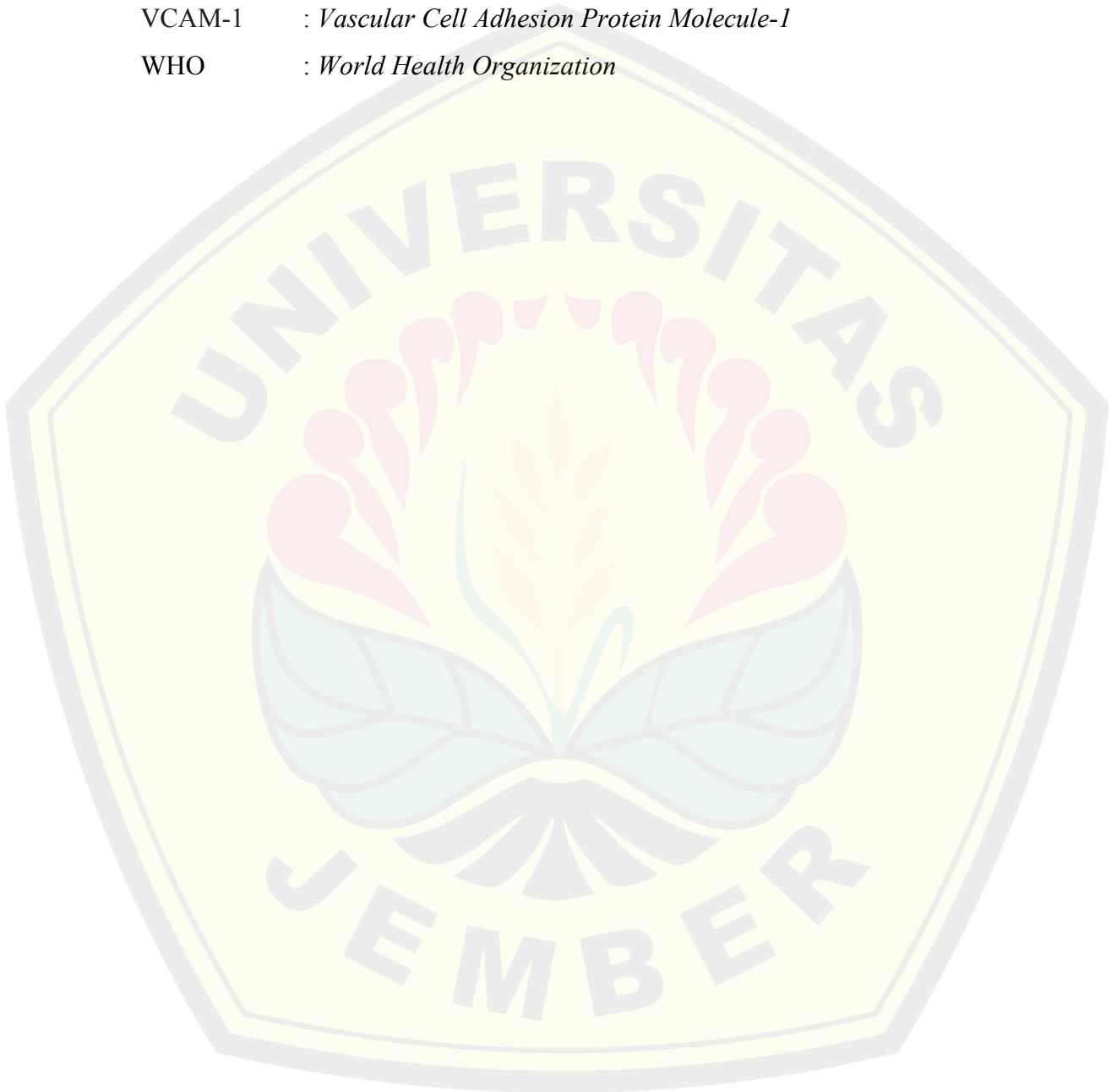
Lampiran 3.1 <i>Ethical Clearance</i>	44
Lampiran 3.2 Prosedur Perhitungan Sel Kupffer Hepar	46
Lampiran 3.3 Dokumentasi Penelitian	53
Lampiran 3.4 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba	58
Lampiran 3.5 Tabel Penghitungan Dosis Setiap Hewan Coba	59
Lampiran 4.1 Hasil Uji Statistik Jumlah Sel Kupffer	60



DAFTAR SINGKATAN

API	: <i>Annual Parasite Incidence</i>
ATS	: <i>Acidic Terminal Segment</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CBB	: <i>Comassie Brilliant Blue</i>
CDAST	: <i>Center of Development of Advanced Science and Technology</i>
CDC	: <i>Centers for Disease Control</i>
CIDR	: <i>Cysteine-rich Inter Domain Region</i>
CSP	: <i>Circum Sporozoite Protein</i>
DBL	: <i>Duffy Binding Like</i>
DHP	: <i>Dihydroartemisinin dan Piperakuin</i>
DIC	: <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Eschericia coli</i>
ECD	: <i>Extracellular Domain</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
ICAM-1	: <i>Inter Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IRBCs	: <i>Infected Red Blood Cells</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
LGB	: <i>Lower Gel Buffer</i>
MPS	: <i>Mononuclear Phagocytic System</i>
NTS	: <i>N-Terminal Segment</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PfEMP1	: <i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SSP	: <i>Sporozoit Surface Protein</i>
TBV	: <i>Transmission Blocking Vaccine</i>

TEMED	: <i>Tetramethylethylenediamin</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TMD	: <i>Transmembrane Domain</i>
UGB	: <i>Upper Gel Buffer</i>
URBCs	: <i>Uninfected Red Blood Cells</i>
VCAM-1	: <i>Vascular Cell Adhesion Protein Molecule-1</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan parasit *Plasmodium Sp*, melalui perantara nyamuk *Anopheles* betina. Penyebaran malaria cukup luas di dunia, meliputi lebih dari 85 negara dengan iklim tropis dan sub-tropis termasuk Indonesia. Berdasarkan *World Malaria Report* tahun 2022, terdapat lebih dari 247 juta kasus klinis dan 627.000 kasus kematian malaria yang terjadi pada tahun 2020 (WHO., 2021). Kasus malaria mencapai 254 ribu pada tahun 2020 di Indonesia (Kemenkes RI., 2021). Gejala yang timbul bervariasi mulai gejala ringan seperti demam, menggigil, pusing, mialgia, letih, lesu dan mual hingga gejala malaria berat yaitu kematian (Gonçalves dkk., 2016).

Plasmodium falciparum merupakan salah satu spesies *Plasmodium Sp* yang menyebabkan gejala malaria menjadi berat. *P. falciparum* menyebabkan komplikasi seperti *acute renal failure*, anemia berat, atau *acute respiratory distress syndrome*. Salah satu kemampuan *P. falciparum* yang menyebabkan malaria berat adalah *cytoadherence*, yaitu kemampuan *P. falciparum* melekat ke sel endotel atau sel eritrosit lain untuk berpindah ke pembuluh darah yang lebih dalam sehingga dapat menghindari *clearance* di limpa (Lee dkk., 2019). Kemampuan tersebut dimediasi oleh protein *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1* (PfEMP1), dimana protein PfEMP1 tersebut memiliki beberapa domain yaitu domain *Cysteine-rich Interdomain Regions* (CIDRs) dan dua sampai sepuluh domain *Duffy Binding Like* (DBL). Domain DBL β pada protein PfEMP1 dapat berikatan dengan reseptor *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) sehingga memediasi terjadinya malaria berat (Rask dkk., 2010; Jensen dkk., 2020).

Proses pathogenesis malaria diawali masuknya sporozoit setelah diinjeksikan oleh nyamuk *Anopheles* betina ke dalam tubuh manusia. Sporozoit masuk menuju hepar manusia melalui peredaran darah. Sporozoit berubah menjadi skizon di dalam hepar manusia ketika sporozoit sudah matang. Skizon yang matang mengeluarkan merozoit. Pada siklus eritrositik, merozoit melakukan penetrasi pada sel eritrosit

manusia dan berkembang menjadi trofozoit muda. Pada tahap ini, parasit *P. falciparum* menghasilkan pigmen hemozoin. Pigmen hemozoin yang terdegradasi kemudian ditelan oleh sel Kupffer pada hepar (Viriyavejakul dkk., 2014). Sel Kupffer teraktivasi sebagai respons terhadap benda asing yang memasuki jaringan hepar, sel Kupffer yang teraktivasi memfagosit *Plasmodium* dan mengeluarkan berbagai sitokin, seperti IL-1 dan TNF *alpha* yang berperan dalam imunitas tubuh (Nakhwa, 2016).

Pengendalian malaria dilakukan melalui beberapa pendekatan. Berbagai penelitian sedang dilakukan termasuk penelitian vaksin malaria (Meier dkk., 2022). Salah satunya adalah vaksin malaria berbasis peptida yang menggunakan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 telah terbukti bersifat imunogenik karena menginduksi produksi imunoglobulin G spesifik dan sel limfosit T CD4+ (Rachmania dkk., 2020). Produksi IgG menghambat ikatan DBL2 β -PfEMP1 dengan ICAM-1. Hambatan tersebut mengurangi inflamasi pada hepar (Gullingsrud dkk., 2013). Pada penelitian yang dilakukan oleh Putri pada tahun 2022 produksi IgG tertinggi terdapat pada dosis 150 μ g/KgBB. Hasil dari penelitian tersebut mengindikasikan dosis 150 μ g/KgBB protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 merupakan dosis optimal karena mampu memicu imunogenesitas tubuh tertinggi. Namun, pada hasil penelitian tersebut belum diteliti efek protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 terhadap kerusakan organ hepar (PUTRI, tanpa tahun). Salah satu tanda berkurangnya inflamasi pada hepar adalah menurunnya aktivasi dan proliferasi dari sel Kupffer hepar (Gonçaves dkk., 2016). Namun, hingga saat ini belum dilakukan uji keamanan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 berdasarkan aktivasi dan proliferasi dari sel Kupffer hepar untuk menentukan dosis aman protein rekombinan berdasarkan efeknya pada hepar manusia.

Uji keamanan suatu vaksin dilakukan untuk mengevaluasi potensi efek samping dan mengurangi kemungkinan toksisitas dalam suatu populasi (Forster, 2012; Pai dkk., 2015). Uji keamanan kandidat vaksin protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 berdasarkan aktivasi dan proliferasi sel Kupffer Hepar perlu dilakukan untuk mengetahui protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 bersifat aman bagi hepar manusia. Hal tersebut, yang mendasari peneliti untuk melakukan penelitian yang

berjudul “Uji Keamanan Protein Rekombinan DBL2 β -PfEMP1 Sebagai Kandidat Vaksin Malaria Berdasarkan Respon Sel Kupffer Hepar”.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Apakah protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 aman bagi hepar manusia berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar?
- b. Apakah terdapat perbedaan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar antara dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1?
- c. Berapakah dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang aman bagi hepar manusia berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum pada penelitian ini adalah menentukan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 aman bagi hepar manusia berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Penelitian ini bertujuan khusus untuk mengetahui perbedaan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar antara dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1.
- b. Penelitian ini juga bertujuan khusus untuk mengetahui dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Institusi

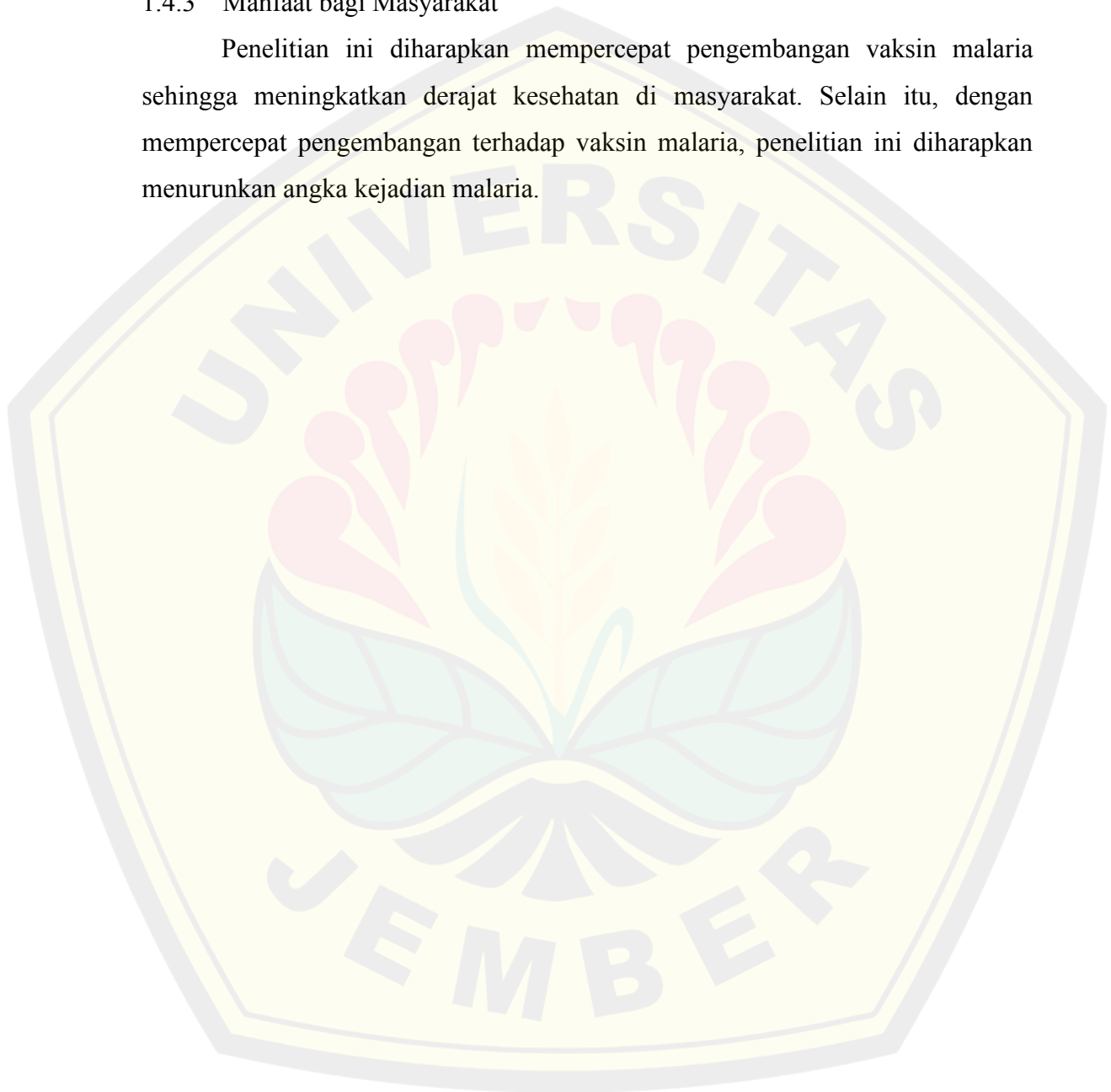
Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat bagi institusi sebagai bahan referensi dan pengetahuan. Penelitian ini juga diharapkan menjadi kajian ilmiah dan sumber data bagi penelitian vaksin malaria selanjutnya.

1.4.2 Manfaat bagi Peneliti

Manfaat bagi peneliti adalah menambah pengetahuan terkait vaksin malaria berbasis biomolekuler dan peptida. Penelitian ini juga bermanfaat bagi penulis dalam menambah keterampilan dalam pengembangan vaksin malaria.

1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan mempercepat pengembangan vaksin malaria sehingga meningkatkan derajat kesehatan di masyarakat. Selain itu, dengan mempercepat pengembangan terhadap vaksin malaria, penelitian ini diharapkan menurunkan angka kejadian malaria.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

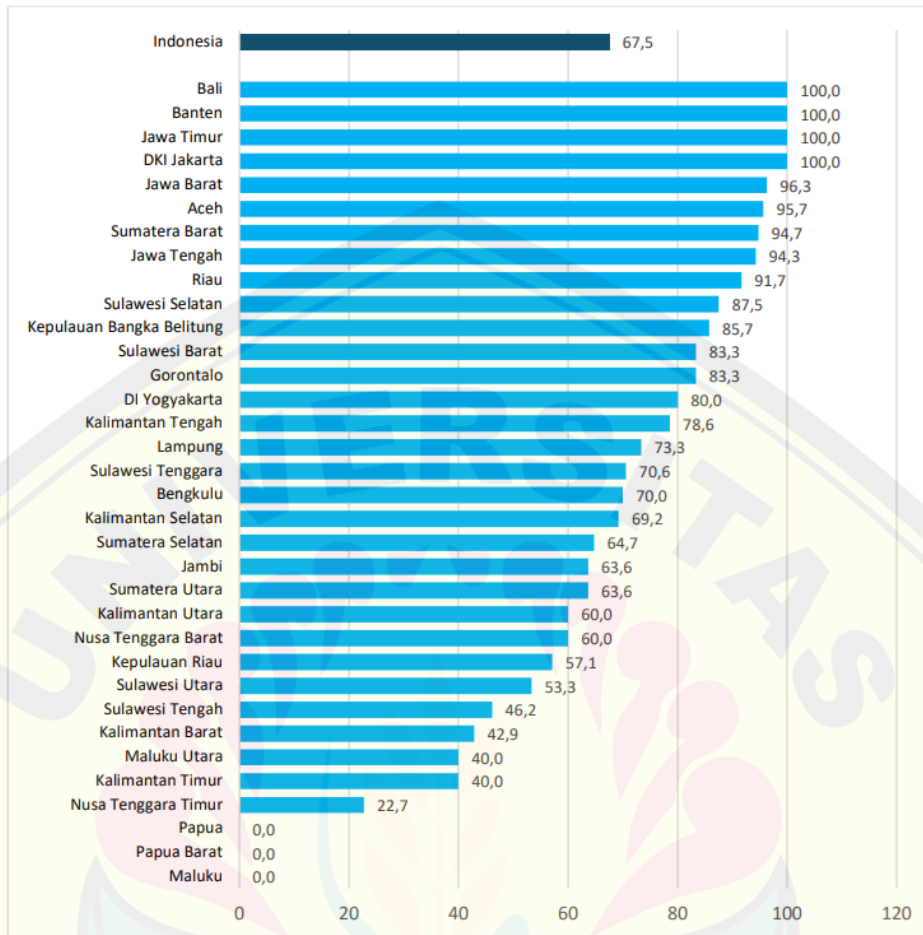
2.1.1 Epidemiologi

Malaria merupakan penyakit endemik di 84 negara di dunia termasuk negara Indonesia. Malaria menyebabkan 247 juta kasus klinis dan 619 ribu kasus kematian pada tahun 2021. Angka ini meningkat sebanyak 2 juta kasus dari tahun 2020. Benua Afrika merupakan penyumbang tertinggi keseluruhan kasus yang disebabkan malaria yaitu mencapai 95% dari kasus global (WHO, 2022).

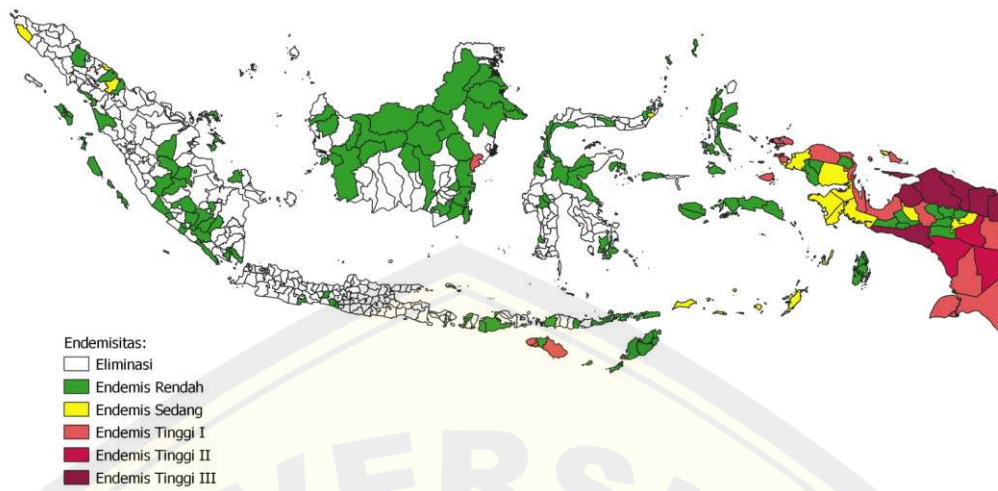
Indonesia merupakan negara dengan kasus klinis tertinggi kedua di kawasan Asia Tenggara berdasarkan data *World Malaria Report* yang diterbitkan oleh WHO pada tahun 2022 (WHO, 2022). Maluku, Papua Barat, dan Papua merupakan tiga provinsi dengan kota/kabupaten belum memiliki status eliminasi malaria di Indonesia (Gambar 2.1) (Kemenkes RI, 2021).

Gambar 2.2 menunjukkan provinsi Papua dan Papua Barat merupakan kawasan dengan status endemis tertinggi di Indonesia. Penentuan stratifikasi endemisitas ditentukan berdasarkan nilai API (*Annual Parasite Incidence*) per 1000 penduduk, wilayah endemis rendah jika API kurang dari satu, endemis sedang jika API sebesar satu sampai lima, endemis tinggi apabila API lebih dari lima. Data Kemenkes RI menunjukkan provinsi Papua, dan Papua Barat memiliki API sebesar 80,05 per 1000 penduduk yang jauh lebih besar dibandingkan dengan seluruh provinsi (Gambar 2.3) (Kemenkes RI, 2021).

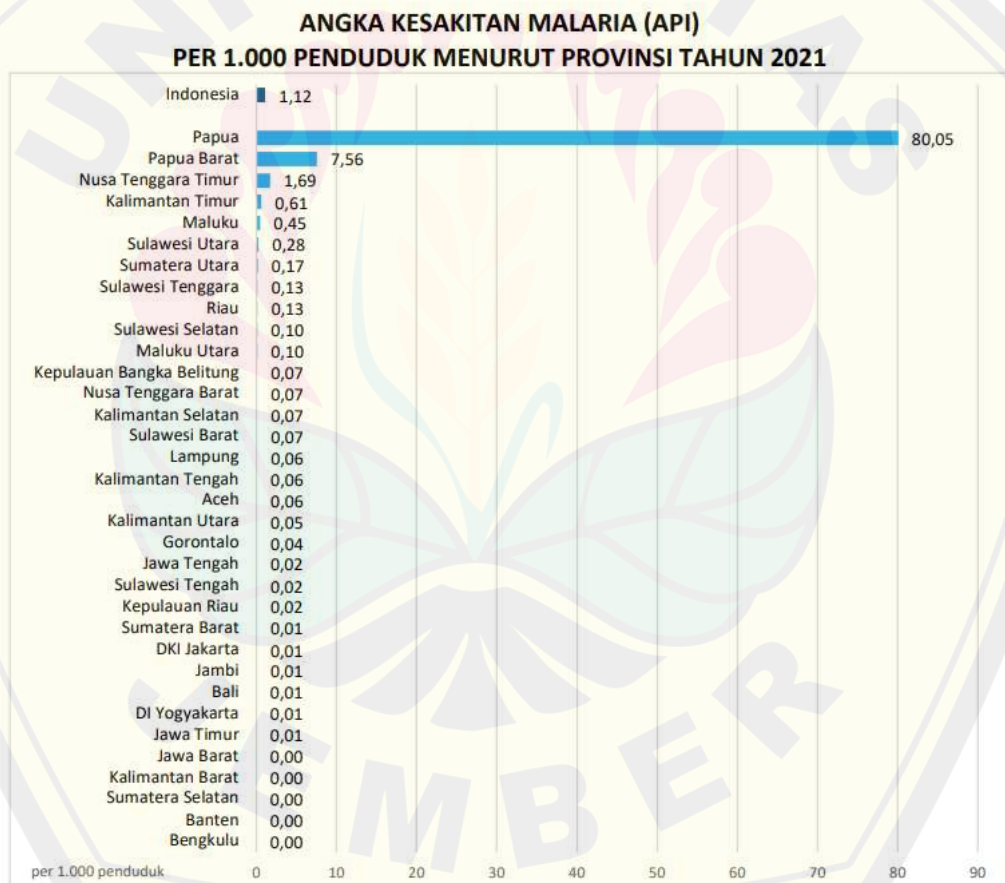
**PERSENTASE KABUPATEN/KOTA YANG MENCAPAI ELIMINASI MALARIA
MENURUT PROVINSI TAHUN 2021**



Gambar 2.1 Status Eliminasi Malaria Di Indonesia Tahun 2021 (Sumber: Kemenkes RI, 2021)



Gambar 2.2 Peta Endemis Malaria Tahun 2021 (Sumber: Kemenkes RI, 2021)



Gambar 2.3 Angka Kesakitan Malaria Per 1000 Penduduk Menurut Provinsi Tahun 2021 (Sumber: Kemenkes RI, 2021)

2.1.2 Etiologi

Malaria merupakan salah satu penyakit tropis yang ditularkan melalui vektor nyamuk yaitu nyamuk *Anopheles* betina (Varo dkk., 2020). Nyamuk ini membawa parasit penyebab malaria yaitu *Plasmodium Sp.* Terdapat enam spesies *Plasmodium sp* pada manusia yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale wallickeri*, *P. ovale curtisi*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi* (Milner, 2018). *P. falciparum* merupakan penyebab kematian terbesar dari beberapa spesies *Plasmodium Sp.* lainnya. Terhitung lebih dari 99% dari seluruh kematian terkait malaria secara global disebabkan oleh *P. falciparum*.

2.1.3 Gejala

Malaria tanpa komplikasi memiliki gejala yang tidak spesifik namun gejala akan menjadi parah dan fatal apabila tidak segera ditangani. Gejala malaria secara umum adalah demam, namun penderita malaria dapat memiliki gejala lain seperti pusing, mialgia, athralgia, letih, lesu, mual, dan diare. Gejala malaria berat dapat timbul akibat infeksi dari *P. falciparum*. Gejala tersebut dapat berupa *cerebral malaria*, gagal ginjal akut, anemia berat, atau *acute respiratory distress syndrome* (CDC, 2022).

2.1.4 Diagnosis malaria

Diagnosis malaria dapat dicari melalui anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium. *Gold-standard* untuk diagnosis malaria adalah pemeriksaan mikroskopis dari hapusan darah tipis (Buck dkk., 2022).

a. Anamnesis

Penderita akan diarahkan pada pertanyaan: apakah penderita mengalami demam yang naik turun dan mengalami gejala-gejala lain seperti pusing, myalgia, athralgia, letih, lesu, mual, dan diare. Selanjutnya ditanyakan: apakah penderita bepergian ke daerah atau tinggal di daerah endemis malaria (Sillehu dan Utami, 2018).

b. Pemeriksaan fisik

Seseorang dengan gejala malaria yang terkonfirmasi umumnya akan mengalami demam 37,5-40 °C selama tujuh hari atau lebih. Pada kasus

malaria berat akan ditemukan anemia yang ditandai dengan konjungtiva pucat, penurunan kesadaran, dehidrasi, hepatomegali dan splenomegali. Selain itu, pada kasus malaria berat dapat disertai dengan syok yang ditandai dari menurunnya tekanan darah (Buck dan Finnigan, 2022).

c. Pemeriksaan laboratorium

Penyakit malaria umumnya didiagnosis melalui manifestasi klinis, uji *imunoserologis* dan penemuan parasit (*Plasmodium*) dalam darah manusia. Parasit *Plasmodium Sp* diambil dari darah kapiler manusia dan diberi pengecatan menggunakan giemsa. Sampel kemudian dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan menggunakan minyak imersi. Pemeriksaan mikroskop berguna untuk mengidentifikasi fase *Plasmodium* dan spesies dari parasit *Plasmodium*. Parasit *Plasmodium* diidentifikasi berdasarkan morfologinya (Buck dan Finnigan, 2022). Pemeriksaan *imunoserologis* digunakan sebagai penunjang dalam melakukan diagnosis malaria. Pemeriksaan *imunoserologis* malaria yang dapat dilakukan adalah ELISA. Selain itu, diagnosis malaria dapat ditunjang menggunakan pemeriksaan molekuler seperti PCR (Sillehu dan Utami, 2018).

2.1.5 Pengobatan Malaria

Kemenkes RI merekomendasikan pengobatan malaria menggunakan DHP (*Dihydroartemisinin-Piperakuin*) dan Primakuin. Kombinasi tersebut berguna untuk meningkatkan efektivitas dan mencegah resistensi. Malaria tanpa komplikasi diobati menggunakan DHP yang diberikan secara oral dan Primakuin sebagai hipnozoidal dan gametosidal (Kemenkes RI, 2020).

Malaria merupakan penyakit yang dapat dicegah. Malaria dapat dicegah melalui beberapa cara yaitu memasang kelambu untuk mencegah nyamuk, dan melakukan vaksinasi terhadap malaria (Sillehu dan Utami, 2018). Data WHO menyebutkan lebih dari 900 ribu anak telah mendapat vaksin malaria dosis pertama pada Januari 2022 (WHO, 2022).

2.1.6 *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum merupakan salah satu spesies *Plasmodium sp* yang menyebabkan malaria pada manusia. *P. falciparum* memiliki tingkatan klasifikasi sebagai berikut (Schoch dkk., 2020):

Kelas	: Aconoidasida
Ordo	: Haemosporida
Famili	: <i>Plasmodiidae</i>
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Spesies	: <i>P. falciparum</i>

2.1.7 Siklus *P. falciparum*

P. falciparum membutuhkan dua hospes dalam siklus hidupnya (Gambar 2.4), yaitu nyamuk *Anopheles* yang berperan dalam siklus sporogoni dan manusia yang berperan dalam siklus skizogoni yaitu siklus eksoeritrositik dan siklus eritrositik (CDC, 2022).

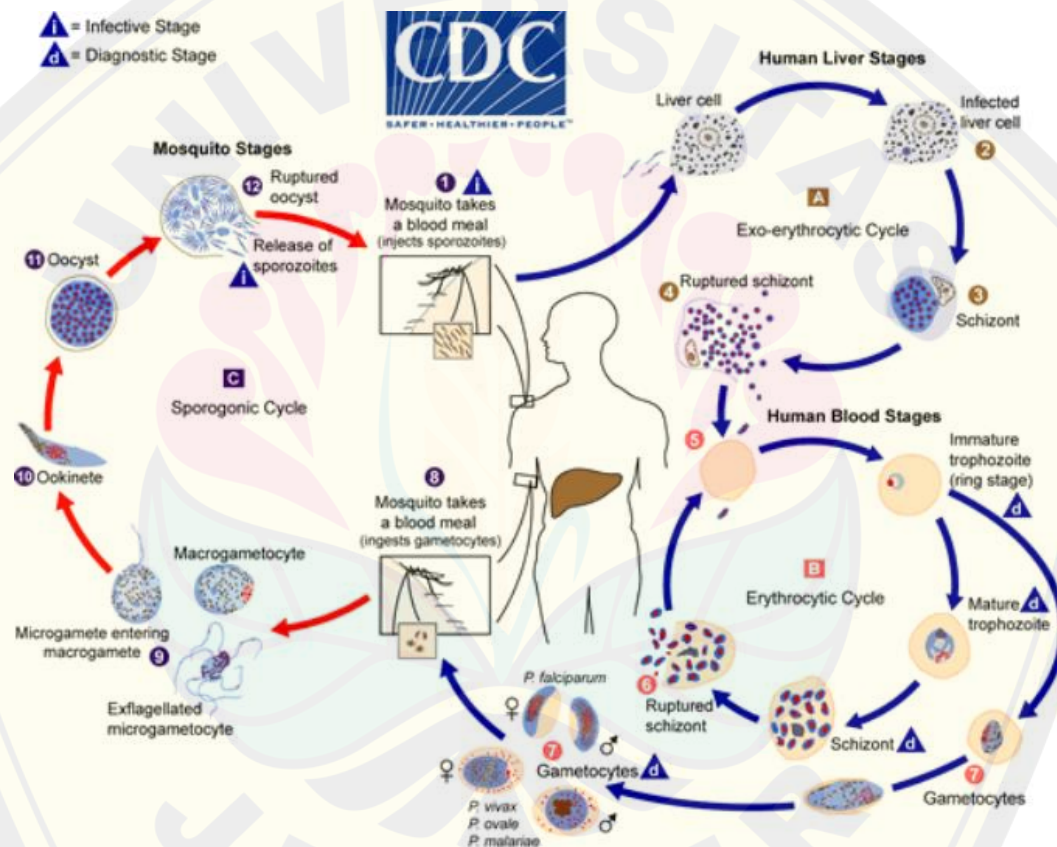
a. Siklus Sporogoni

Siklus sporogoni merupakan siklus seksual dari *P. falciparum* yang terjadi pada tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Siklus ini dimulai saat nyamuk *Anopheles* betina menghisap gametosit yang terbentuk dalam sel eritrosit manusia. Ketika berada pada perut nyamuk *Anopheles*, mikrogamet melakukan penetrasi pada makrogamet sehingga menghasilkan zigot. Selanjutnya, zigot berubah menjadi stadium aktif dan masuk dalam stadium ookinet. Pada lambung nyamuk, ookinet membesar dan memasuki sel epitel lambung nyamuk. Ookinet pada lambung nyamuk kemudian berkembang menjadi ookista. Ookista yang matang akan pecah dan mengeluarkan sporozoit (Gambar 2.4). Sporozoit kemudian bergerak menuju kelenjar saliva dari nyamuk dan dapat menularkan kembali kepada manusia (CDC, 2022).

b. Siklus Skizogoni

Siklus skizogoni merupakan siklus aseksual dari *P. falciparum* yang terjadi pada tubuh manusia. Siklus skizogoni terdiri dari dua siklus yaitu siklus eksoeritrositik dan siklus eritrositik. Siklus eksoeritrositik *Plasmodium sp*

dimulai ketika sporozoit yang dibawa nyamuk *Anopheles* betina masuk kedalam tubuh manusia (Gambar 2.4). Sporozoit mengikuti aliran darah manusia dan bergerak menuju hepar manusia. Pada hepar manusia, sporozoit matang dan menjadi skizon. Skizon kemudian pecah dan mengeluarkan merozoit. Siklus eritrositik dimulai ketika merozoit bergerak menuju peredaran darah manusia. Merozoit kemudian melakukan penetrasi pada sel eritrosit manusia dan berkembang menjadi trophozoit muda. Trophozoit muda berkembang menjadi trophozoit dewasa. Trophozoit dewasa berkembang menjadi skizon. Skizon kemudian pecah dan mengeluarkan merozoit (CDC, 2022).



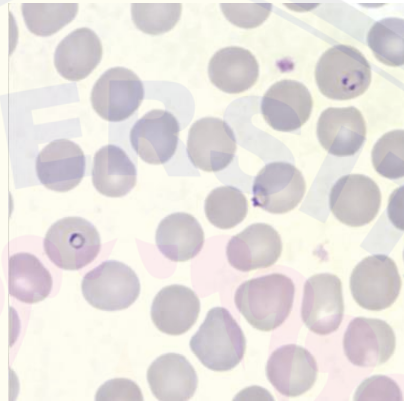
Gambar 2.4 Siklus Hidup *Plasmodium Sp* (Sumber: CDC, 2022)

2.1.8 Morfologi *P. falciparum*

P. falciparum mengalami perubahan bentuk dan morfologi dalam siklus hidupnya. Perubahan bentuk tersebut dapat diamati melalui mikroskop dan memiliki ciri morfologi yang berbeda sesuai stadium siklus hidupnya. Ciri morfologi *P. falciparum* adalah sebagai berikut (CDC, 2022):

a. *Ring stage*

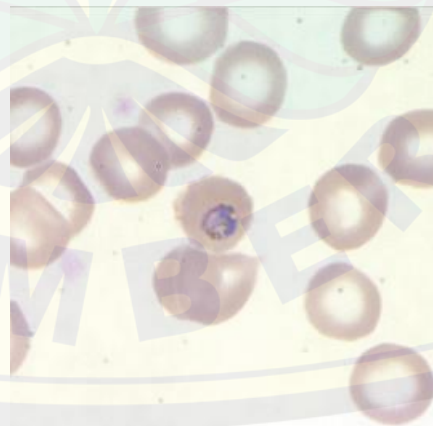
Stadium cincin atau *ring stage* *P. falciparum* memiliki sitoplasma yang tipis dan memiliki satu atau dua butir kromatin kecil. Sel darah merah yang terinfeksi *P. falciparum* memiliki ukuran yang sama dengan sel darah merah yang tidak terinfeksi. Gambaran khas pada stadium ini dinamakan “*headphone appearance*” yaitu gambaran *P. falciparum* yang menyerupai *headphone* (Gambar 2.5) (CDC, 2022).



Gambar 2.5 *Ring stage P. falciparum* (Sumber: CDC, 2022)

b. *Trophozoite stage*

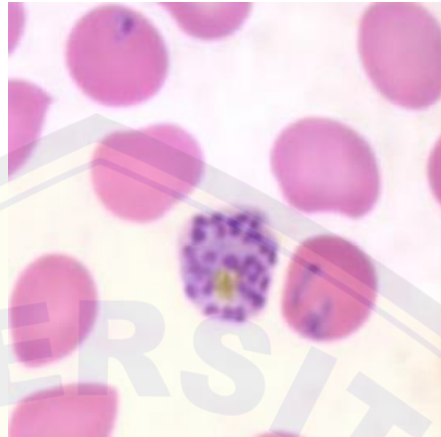
Morfologi *P. falciparum* stadium trophozoit atau *trophozoite stage* cenderung tetap dalam bentuk cincin, tetapi dengan sitoplasma yang lebih tebal dan padat (Gambar 2.6). Jumlah pigmen dan kromatin meningkat pada stadium ini meningkat. (CDC, 2022).



Gambar 2.6 *Trophozoite stage P. falciparum* (Sumber: CDC, 2022)

c. *Schizont stage*

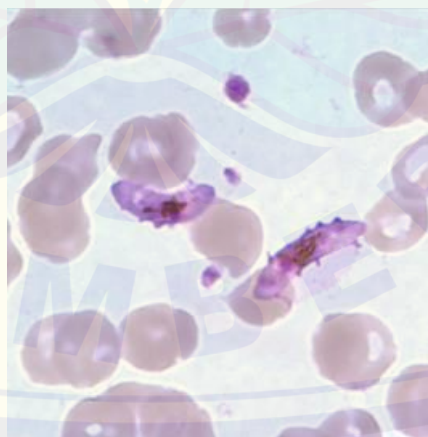
Skizon *P. falciparum* jarang terlihat pada hapusan darah tipis. Skizon *P. falciparum* mengandung 8-24 merozoit (Gambar 2.7). Skizon yang matang akan mengisi 2/3 sel darah merah yang terinfeksi (CDC, 2022).



Gambar 2.7 Schizont stage *P. falciparum* (Sumber: CDC, 2022)

d. *Gametosite stage*

P. falciparum memiliki bentukan seperti bulan sabit atau sosis pada fase gametosit (Gambar 2.8). Gametosit *P. falciparum* memiliki diameter dan panjang lebih besar satu setengah kali dari sel eritrosit di sekitarnya. Sitoplasma makrogametosit cenderung lebih gelap dan memiliki warna biru tua. Sedangkan, sitoplasma mikrogametosit cenderung lebih pucat. Kromatin merah lebih banyak terlihat pada makrogametosit dibandingkan dengan pada mikrogametosit (CDC, 2022).



Gambar 2.8 Gametosite Stage *P. falciparum* (Sumber: CDC, 2022)

2.1.9 Patogenesis *P. falciparum*

Infeksi parasit *P. falciparum* menyebabkan bentuk paling parah penyakit malaria. Pada fase eksoeritrositik, skizon yang pecah melepaskan merozoit. merozoit yang motil bergerak dalam sirkulasi darah manusia dan menyerang sel eritrosit. Respon imun yang meningkat yaitu TNF *alpha*, *interleukin* 10 (IL-10), dan *interferon-gamma* (IFN-gamma) (Zekar dan Sharman, 2020).

P. falciparum memiliki kemampuan *cytoadherence*. *Cytoadherence* merupakan kemampuan *P. falciparum* untuk menghindari respon imun tubuh manusia. *Cytoadherence* dimediasi melalui *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1). *P. falciparum* melekat pada berbagai jenis sel inang seperti sel endotel dan sel darah merah yang tidak terinfeksi, sehingga parasit dapat bersembunyi di sirkulasi darah dan menghindari *clearance* di limpa atau disebut sebagai sekuestrasi. *Cytoadherence* dan sekuestrasi merupakan ciri khas *P. falciparum* dan menyebabkan malaria menjadi lebih parah (Duffy dkk., 2021). Sekuestrasi oleh *P. falciparum* dapat menyebabkan oklusi pada pembuluh darah. Peristiwa ini dapat berakibat terjadinya hipoperfusi bahkan hingga disfungsi organ (Wassmer dkk., 2015).

2.2 Protein Duffy Binding Like DBL2 β -PfEMP1

Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) merupakan protein yang berperan penting dalam perkembangan malaria berat. PfEMP1 ditemukan pada sekitar permukaan iRBC (*infected-red blood cell*). Protein ini berperan memediasi adhesi iRBC ke berbagai reseptor sel host. PfEMP1 memiliki berat molekul 200-450 kD. PfEMP1 dikode dari 60 *var gene* per genom parasit. PfEMP1 terekspresi dalam jumlah besar, namun terbatas pada tahap infeksi intraeritrositik. PfEMP1 dapat dideteksi pada darah beberapa jam setelah merozoit menginvasi eritrosit, sedangkan ekspresi PfEMP1 dideteksi setelah 16 jam pascainvasi (Jensen dkk., 2020).

Protein PfEMP1 terdiri dari 3 bagian, yaitu *extracellular domain* (ECD), *transmembrane domain* (TMD), dan *acidic terminal segment* (ATS). Pada bagian *extracellular domain*, protein PfEMP1 memiliki dua domain, yaitu domain

Cysteinerich Interdomain Regions (CIDRs) dan domain *Duffy Binding Like* (DBL). Domain CIDR dikelompokkan menjadi empat subkelas, yaitu α , β , γ , dan δ . Domain DBL dikelompokkan menjadi tujuh subkelas, yaitu α , β , γ , δ , ϵ , dan χ . Setiap domain dari protein PfEMP1 memiliki peranan penting tersendiri dalam patogenesis malaria berat (Jensen dkk., 2020).

Domain DBL merupakan domain yang membantu parasit berikatan pada reseptor sel host. Domain DBL berperan dalam memediasi pengikatan pada ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (Bernabeu dan Smith, 2017). ICAM-1 merupakan reseptor untuk sitoaderensi iRBC di vaskuler serebral yang mengakibatkan malaria berat (Jensen dkk., 2020).

Protein PfEMP1 dapat dikenali oleh immunoglobulin G (IgG) pasien yang telah mendapat imunitas adaptif. Antibodi immunoglobulin G (IgG) bersifat protektif dan mampu melakukan *blocking* terhadap interaksi PfEMP1 dengan reseptor sel hospes sehingga menghambat adhesi parasit dengan mediasi respon imun humoral. Antibodi immunoglobulin G mampu melawan domain DBL2 β , pada penelitian sebelumnya menunjukkan antibodi meningkat pasca imunisasi dengan bakteri *E. coli* yang telah terdapat kloning dan ekspresi domain DBL2 β *full-length*. Antibodi yang terbentuk akibat imunisasi tersebut akan teraktivasi dan menghambat ikatan antara ICAM-1 dan DBL2 β (Gullingsrud dkk., 2013).

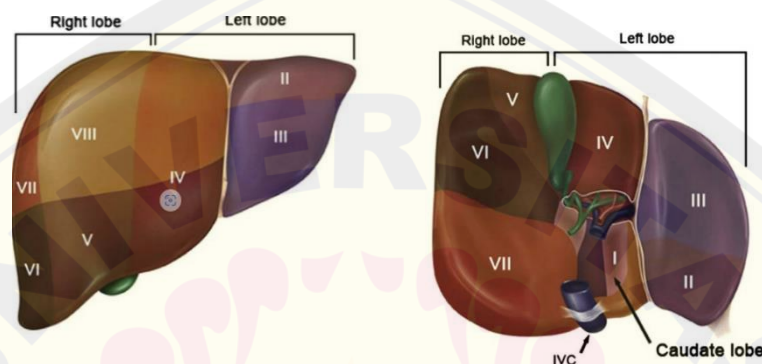
2.3 Hepar

Hepar merupakan organ penting dalam tubuh manusia. Hepar berperan dalam proses metabolisme, sistem imun, pencernaan, detoksifikasi, dan sistem penyimpanan. Hepar merupakan organ yang memiliki dua suplai darah, yaitu vena porta (75%) dan arteri hepatis (25%) (Kalra dkk., 2018).

2.3.1 Anatomi Hepar

Hepar memiliki berat sekitar 2% tubuh orang dewasa. Hepar memiliki permukaan yang halus dan berbentuk seperti kubah. Hepar terletak pada kuadrakan atas perut (Mirzaali dkk., 2022). Hepar memiliki delapan segmen yang berhubungan dengan arteri hepatis, vena porta hepatis dan drainase biliaris. Lobus kaudatus merupakan segmen hepar yang pertama, selanjutnya segmen hepar diberi

nomer sesuai arah jarum jam hingga segmen VII (Gambar 2.9). Tiap segmen hepar memiliki nama yang berbeda, yaitu segmen II hepar bernama area lateralis superior, segmen III hepar area lateralis inferior, segmen IV bernama area medialis superior, segmen V bernama area anterior inferior, segmen VI bernama area posterior inferior, segmen VII bernama area posterior superior, dan segmen VIII bernama area anterior superior (Drake dkk., 2012).



Gambar 2.9 Anatomi Hepar (Sumber: Mirzaali dkk., 2022)

Hepar memiliki suplai darah yang unik karena terbagi antara arteri hepatic, yang menyumbang 25% hingga 30% suplai darah, dan vena portal, yang bertanggung jawab atas 70% hingga 75% sisanya. Darah arteri dan portal akhirnya bercampur di dalam sinusoid hepatic sebelum dialirkan ke sirkulasi sistemik melalui sistem vena hepatica.

2.3.2 Fisiologi

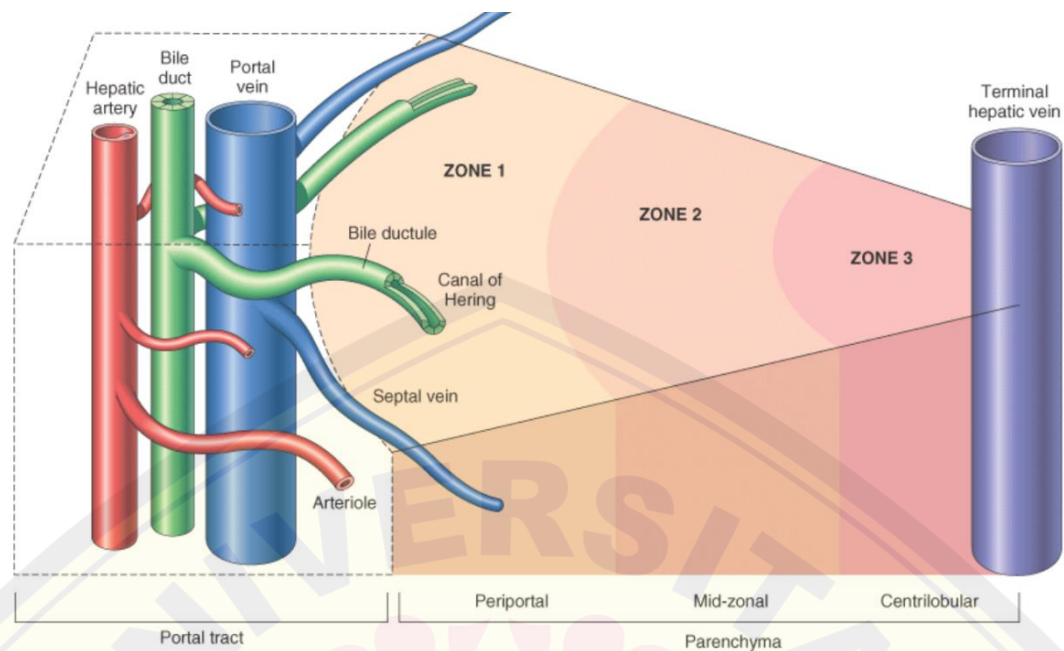
Hepar memiliki peran hampir pada setiap sistem organ dalam tubuh. Hepar berperan sebagai tempat penyimpanan dan/atau metabolisme vitamin larut lemak, metabolisme obat, metabolisme bilirubin dan sistem imun (Kalra dkk., 2018). Hepar membantu sistem endokrin dan gastrointestinal dengan melakukan pencernaan dan metabolisme. Hepar berperan sebagai lokasi penyimpanan vitamin dan menangani homeostasis kolesterol. Hepar berperan dalam hematologi dengan faktor pembekuan dan sintesis protein sebagai lokasi penyimpanan zat besi. Hepar juga berperan dalam pemecahan heme menjadi bilirubin tak terkonjugasi. Salah satu sel yang ada pada hepar yaitu Sel Kupffer, sel ini berperan penting dalam

sistem imunologi tubuh untuk memfagosit patogen yang masuk (Viriyavejakul dkk., 2014).

2.3.3 Seluler

Unit fungsional hepar adalah lobulus. Lobulus pada hepar berbentuk hexagonal. Setiap lobulus memiliki vena sentralis yang berada di tengah lobulus dan triad porta pada sudut lobulus. Triad porta terdiri dari vena porta, arteri hepatica, dan duktus biliaris. Hepatosit merupakan salah satu sel penyusun dari lobulus hepar. Area hepatosit terbagi menjadi tiga, yaitu zona I, zona II, zona III (Gambar 2.10) (Kalra dkk., 2018).

- a. Zona I terletak pada daerah periportal. Pada zona I, hepatosit mendapat perfusi yang cukup besar. Berdasarkan hal tersebut, zona I berperan penting dalam metabolisme oksidatif, glukoneogenesis, dan katabolisme asam amino (Kalra dkk., 2018).
- b. Zona II berada di antara zona I dan zona III (Kalra dkk., 2018).
- c. Zona III berada pada daerah perisentral. Pada zona ini, sel hepatosit mendapat perfusi cukup rendah. Oleh karena itu, zona III berperan dalam proses detoksifikasi, ketogenesis, glikolisis, lipogenesis dan glikogen sintesis (Kalra dkk., 2018).



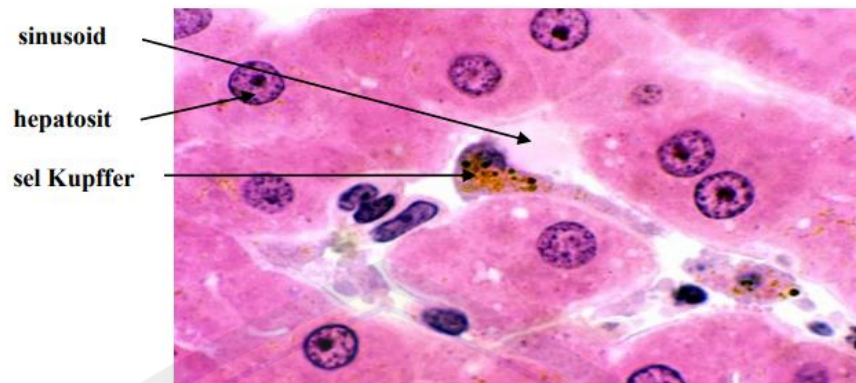
Gambar 2.10 Zona Pada Lobulus Hepar (Sumber: Ali, 2015)

2.4 Sel Kupffer

Sel Kupffer merupakan sel makrofag yang ditemukan di hepar. sel Kupffer memiliki nama lain yaitu *stellate sinusoidal macrophages* atau *Kupffer-Browicz cells*. Sel Kupffer memiliki waktu hidup tiga sampai empat hari. Sel Kupffer memiliki fungsi utama yaitu membersihkan debris dan patogen yang ada di hepar. Sel Kupffer dapat ditemukan di daerah perisentral dan periportal hepar, tetapi sel Kupffer lebih terkonsentrasi di daerah periportal (Basit dkk., 2018).

2.4.1 Histologi Sel Kupffer

Sel Kupffer ditemukan pada sinusoid hepar (Gambar 2.11). Sel Kupffer cenderung berbentuk amoboid ketika aktif. Pada permukaan sel Kupffer terdapat mikrovilli, pseudopodia, dan lamellipodia. Mikrovilli dan pseudopodia berperan dalam endositosis partikel. Nukleus sel Kupffer berbentuk bulat telur atau berlekuk dan dapat berlobus. Sel Kupffer juga mengandung retikulum endoplasma kasar, selubung nukleus, dan lamela annulata, yang semuanya memiliki aktivitas peroksidase (Basit dkk., 2018).



Gambar 2.11 Sel Kupffer Pada Hepar Manusia (Sumber: Lestari dan Wangko, 2012)

Sel Kupffer memiliki fungsi dan struktur yang berbeda bergantung pada lokasinya. Sel Kupffer yang berada di daerah periportal cenderung lebih besar, memiliki lebih banyak aktivitas enzim lisosom, dan memiliki banyak aktivitas fagositik, sedangkan sel Kupffer yang berada di daerah perisentral lebih banyak menghasilkan anion superoksida (Basit dkk., 2018).

2.4.2 Peran sel Kupffer

Peran utama sel Kupffer adalah membersihkan debris dan partikel asing dari sirkulasi sistem portal yang melewati hepar. Sel Kupffer menelan partikel besar melalui fagositosis dan partikel dan molekul kecil melalui pinositosis. Populasi sel Kupffer di hepar diatur oleh apoptosis, dan difagosit oleh sel Kupffer lain. Sel Kupffer memiliki kapasitas proliferaatif, yang memungkinkan regenerasi dirinya sendiri. Sel Kupffer memiliki kemampuan fagositik sangat luas. Sel Kupffer menelan patogen, kompleks imun, liposom, mikrosfer lipid, sel tumor, endotoksin, dan berbagai partikel lainnya. Sel Kupffer juga diketahui memiliki fungsi heterogen berdasarkan lokasinya. Di zona 1 (periportal) lobulus hati, sel Kupffer memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada di zona 3 (perisentral) (Basit dkk., 2018).

Sel Kupffer teraktivasi ketika bahan asing memasuki hepar. Sel Kupffer yang teraktivasi mengeluarkan IL-1 dan TNF-*alpha* yang mengaktifkan leukosit dan sel *sinusoidal endothelial* untuk mengekspresikan ICAM-1. Aktivasi sel Kupffer menghasilkan produksi *reactive oxygen species* (ROS), seperti superoksida,

yang menyebabkan stres oksidatif di hepar. (Basit dkk., 2018). Pada patogenesis malaria yang diakibatkan oleh *P. falciparum*, hemozoin yang terdegradasi ditelan oleh makrofag jaringan seperti sel Kupffer dan *alveolar macrophage*. Gambaran histopatologi dapat ditemukan sel Kupffer menjadi hiperplasia, reaktif, retensi pigmen hemozoin dan sekuestrasi minimal iRBC (Basit dkk., 2018).

2.5 Vaksin Malaria

Vaksin menurut definisi adalah agen biologis yang menimbulkan respons imun terhadap antigen spesifik yang berasal dari patogen penyebab penyakit menular (Czochor dan Turchick, 2014). Saat ini istilah 'vaksin' berlaku untuk semua sediaan biologis, yang diproduksi dari organisme hidup, yang meningkatkan kekebalan terhadap penyakit dan mencegah (vaksin profilaksis) atau, dalam beberapa kasus, mengobati penyakit (vaksin terapeutik). Vaksin dapat diberikan dalam bentuk cair, melalui injeksi, oral, atau rute intranasal (Jenner dkk., 2012).

Vaksin malaria merupakan agen biologis yang digunakan untuk memicu respons imun tubuh menghadapi parasit penyebab malaria yaitu *Plasmodium Sp.* Pengembangan vaksin malaria memasuki era baru pada tahun 2015 yaitu vaksin RTS,S. Vaksin RTS,S dibuat dari salah satu *Sporozoit Surface Protein* (SSP) yaitu *circumsporozoit protein* (CSP) (Hoffman dkk., 2015). Protein ini berperan membantu parasit untuk menginvasi sel-sel pada hepar (Daubenberger dan Moncunill, 2022). Selain vaksin RTS,S, terdapat vaksin malaria lain dengan kelompok target yang berbeda, yaitu vaksin malaria dengan target pada fase pre-eritrositik, vaksin dengan target pada fase eritrositik atau saat perkembangan aseksual, vaksin antitoksin dengan target toksin malaria, dan vaksin malaria dengan target pada fase seksual atau vaksin pencegah transmisi (*transmission-blocking vaccine*=TBV) (Sulistyaningsih, 2020).

Vaksin yang dikembangkan saat ini adalah vaksin menggunakan protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang bekerja pada fase eritrositik. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sulistyaningsih pada tahun 2013 membuktikan domain DBL2 β memiliki sekuens yang sama dengan beberapa struktur kristal protein yang

memiliki fungsi sebagai protein invasi dan adhesi *P. falciparum*. Dengan demikian, domain pada protein DBL2 β -PfEMP1 terlibat dalam terjadinya malaria berat.

2.6 Dosis Safety atau Dosis Aman

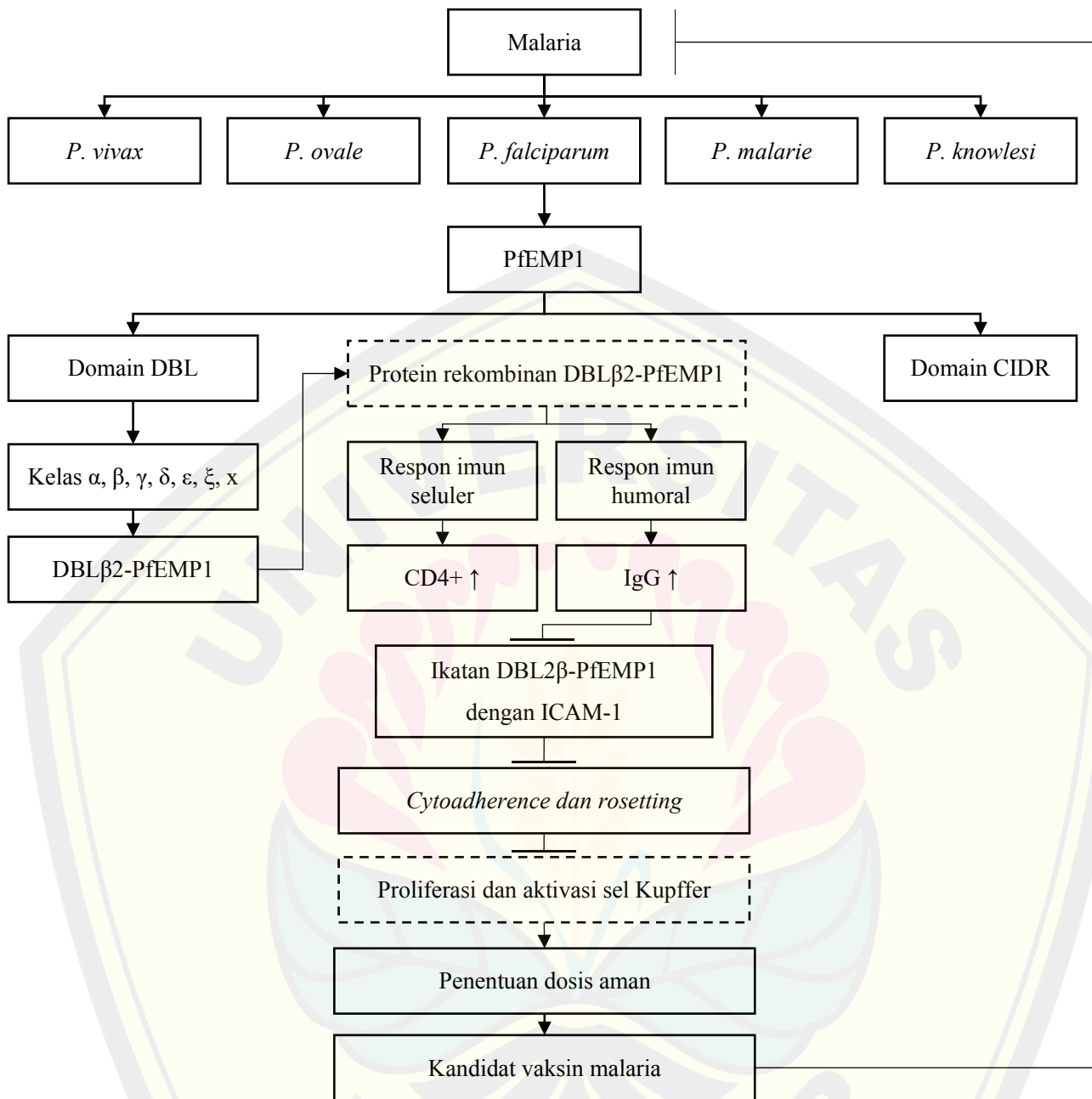
Dosis aman merupakan jumlah atau konsentrasi suatu zat yang memberikan efek yang diinginkan pada tubuh, dengan efek samping yang minimal atau dapat diterima. Dalam konteks farmakologi, dosis aman merujuk pada dosis obat yang memberikan efek terapeutik yang diinginkan pada pasien dengan efek samping yang dapat ditoleransi (Pai dkk., 2015).

Dosis aman dalam pengembangan vaksin merujuk pada jumlah vaksin yang diberikan kepada seseorang dengan tujuan mencapai efek perlindungan tanpa menyebabkan efek samping yang berbahaya atau toksis bagi penerimanya. Dalam pengembangan vaksin, penentuan dosis aman adalah proses penting untuk memastikan vaksin memberikan manfaat kesehatan yang maksimal sambil tetap meminimalkan risiko yang mungkin timbul. merujuk pada tingkat pemberian vaksin yang menghasilkan respons imun yang kuat dan melindungi individu dari penyakit target, sambil mempertimbangkan efek samping yang minimal. (Rhodes dkk., 2019).

Dosis aman dari penelitian ini mengambil referensi dari penelitian dosis optimal sebelumnya. Penelitian sebelumnya mencari dosis optimal berdasarkan konsentrasi IgG tertinggi. Dosis optimal protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang didapatkan pada penelitian sebelumnya adalah 150 μ g/KgBB. Dosis optimal 150 μ g/KgBB menjadi referensi pada penelitian ini karena memicu produksi IgG dengan konsentrasi tertinggi dibandingkan dengan beberapa pilihan dosis lainnya (Putri, 2022). Konsentrasi IgG yang tinggi membuktikan dosis 150 μ g/KgBB merupakan dosis yang memicu respon imun yang tinggi. Untuk menilai adanya efek samping pada organ, penelitian ini menggunakan jumlah sel Kupffer hepar yang teraktivasi sebagai indikator penilaian terhadap efek samping pada hepar (Lestari, 2012).

2.7 Kerangka Teori

P. falciparum merupakan parasit penyebab malaria berat. *P. falciparum* menyebabkan malaria berat akibat protein *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). Protein ini memiliki beberapa domain yaitu *Cysteine-rich Interdomain Regions* (CIDRs) dan *Duffy-binding-like* (DBL). Domain DBL dibagi menjadi tujuh (α , β , γ , δ , ϵ , ξ , κ) kelas deret utama, masing-masing diantaranya terbagi lagi menjadi banyak subdivisi lebih lanjut. Dari sekian banyak domain yang ada, domain DBL β 2-PfEMP1 merupakan salah satu domain yang telah berhasil dikloning. Domain DBL β 2-PfEMP1 dikloning untuk digunakan sebagai salah satu kandidat vaksin malaria. Dalam uji imunogenesitas penelitian sebelumnya, protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 menginduksi respon imun humoral dan respon imun seluler. Respon imun seluler ditandai adanya antibodi imunoglobulin G (IgG) dan respon imun humoral ditandai adanya CD4. Imunoglobulin G yang terbentuk kemudian menghambat ikatan DBL β 2-PfEMP1 dengan ICAM-1. Inhibisi dari ikatan DBL β 2-PfEMP1 dengan ICAM-1 menurunkan kemampuan *cytoadherence* dan *rosetting* *P. falciparum* meringankan inflamasi pada hepar. Salah satunya adalah berkurangnya proliferasi dan aktivasi dari sel Kupffer hepar. Berdasarkan berkurangnya aktivasi dan proliferasi sel Kupffer hepar, maka dosis aman ditentukan berdasarkan jumlah sel paling sedikit (Gambar 2.12).



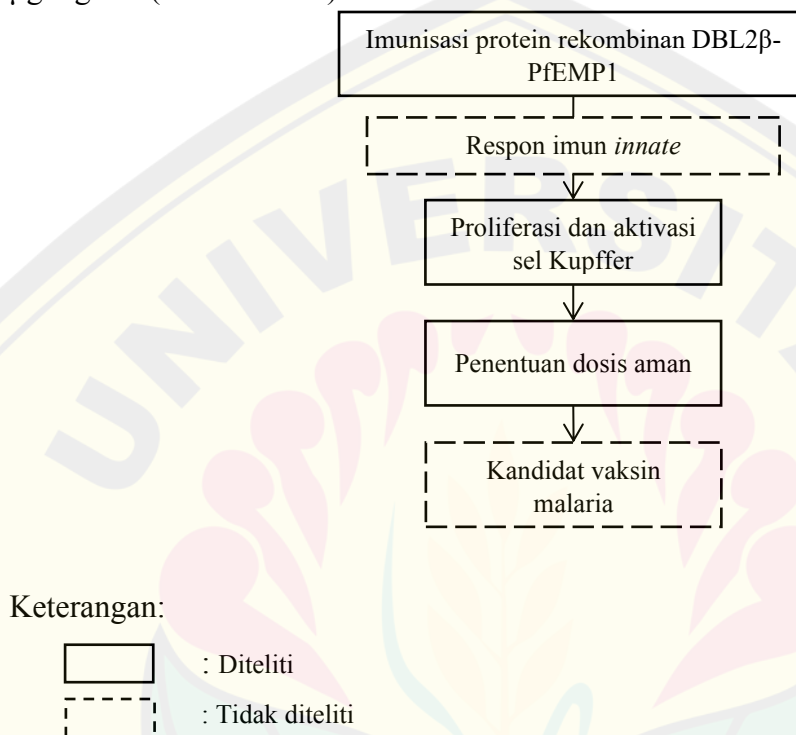
Keterangan:

- : Memengaruhi
- | : Menghambat
- : Tidak diteliti
- (dashed) : Diteliti

Gambar 2.12 Kerangka Teori

2.8 Kerangka Konsep

Pada penelitian dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dinilai berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar paling sedikit. Jumlah aktivasi sel Kupffer dihitung dari preparate organ yang diambil setelah injeksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan dosis 100 μ g/KgBB, 150 μ g/KgBB, 200 μ g/KgBB (Gambar 2.13).



Gambar 2.13 Kerangka Konsep

2.9 Hipotesis Penelitian

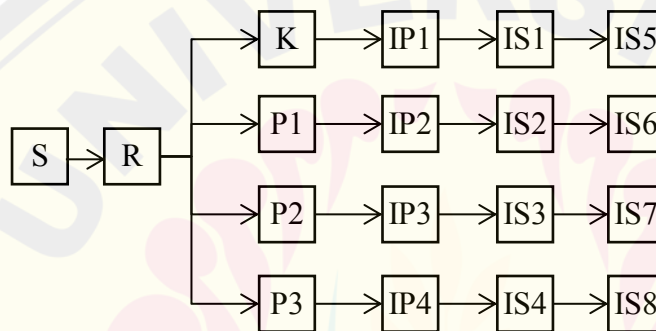
Hipotesis dalam penelitian ini adalah

- a. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 aman bagi hepar manusia
- b. Terdapat perbedaan antara dosis 100 μ g/KgBB, 150 μ g/KgBB, 200 μ g/KgBB protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam memengaruhi jumlah aktivasi sel Kupffer hepar.
- c. Dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam memengaruhi jumlah sel Kupffer hepar teraktivasi adalah dosis 150 μ g/KgBB.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian berjenis *true experimental* dengan membandingkan tiga dosis antigen sebagai kandidat vaksin malaria. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design* untuk menghitung jumlah sel Kupffer yang teraktivasi di hepar.



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : Sampel

R : Randomisasi sampel

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

P1 : Kelompok perlakuan pertama (Dosis 100 µg/KgBB)

P2 : Kelompok perlakuan kedua (Dosis 150 µg/KgBB)

P3 : Kelompok perlakuan ketiga (Dosis 200 µg/KgBB)

IP1, IP2, IP3, IP4 : Injeksi primer (Hari ke-0)

IS1, IS2, IS3, IS4 : Injeksi sekunder ke-1 (Hari ke-21)

IS5, IS6, IS7, IS8 : Injeksi sekunder ke-2 (Hari ke-42)

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2023 hingga bulan Mei 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Rekayasa Biomaterial dan Bioproses UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (CDAST) Universitas Jember, Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan kriteria inklusi sebagai berikut, tikus sehat dengan berat 150-300 gram dan memiliki umur 2-3 bulan. Sedangkan kriteria eksklusi penelitian ini adalah tikus yang mati pada saat perlakuan dan mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa aklimatisasi.

3.3.2 Sampel

Sampel dilakukan randomisasi menggunakan *cluster random sampling*. Jumlah sampel hewan coba selanjutnya dihitung menggunakan metode *resource equation*. Metode ini mengukur nilai E (*E value*) sebagai acuan. Penelitian dengan nilai E=10-20 merupakan penelitian dengan jumlah sampel yang adekuat. Penghitungan nilai E didapatkan dari rumus sebagai berikut (Charan dan Biswas, 2013):

$$E = \text{Total jumlah hewan coba yang digunakan} - \text{Total kelompok}$$

Sehingga E value pada penelitian ini, yaitu:

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

$$E = 16 - 4$$

$$E = 12$$

Berdasarkan perhitungan diatas, $E\ value=12$ menunjukkan jumlah sampel pada penelitian ini merupakan jumlah sampel yang adekuat. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan dua belas (12) ekor tikus. Tikus tersebut diberi perlakuan dengan tiga dosis berbeda, yaitu $100\ \mu\text{g}/\text{KgBB}$, $150\ \mu\text{g}/\text{KgBB}$, dan $200\ \mu\text{g}/\text{KgBB}$ (satu kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus). Pada kelompok kontrol negatif, tikus diinjeksi menggunakan NaCl 0,9%. Penentuan jumlah tikus pada kelompok kontrol menggunakan prinsip *reduction*, sehingga tikus yang digunakan dalam kelompok kontrol adalah tiga ekor tikus.

3.4 Jenis dan Sumber Data

3.4.1 Jenis data

Pada penelitian ini, jenis data yang digunakan adalah data primer. Data diperoleh dari awal perlakuan hewan coba hingga penghitungan jumlah sel Kupffer dari hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) sehingga dapat ditentukan dosis aman protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1.

3.4.2 Sumber data

Sumber data penelitian ini adalah pemeriksaan histologi organ hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Pemeriksaan histologi menggunakan mikroskop cahaya. Mikroskop cahaya disambungkan dengan alat *optilab* untuk memudahkan pengambilan gambar jaringan organ hepar. Jumlah sel Kupffer organ hepar dihitung menggunakan perangkat lunak *imageJ* dan *Fiji*.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 yang sebelumnya telah melalui proses produksi, purifikasi, visualisasi SDS-PAGE.

3.5.2 Variabel terikat (*Dependent*)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel Kupffer hepar tikus yang teraktivasi dan diidentifikasi menggunakan mikroskop cahaya dan dihitung menggunakan perangkat lunak *ImageJ*.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala
1	Dosis Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1	Dosis protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 yang memberikan efek terapi paling signifikan dan efek toksik paling sedikit. Dosis aman ditunjukkan dari jumlah sel Kupffer teraktivasi paling sedikit.	Dosis aman ditentukan melalui jumlah sel Kupffer teraktivasi paling sedikit. Hasil dinyatakan dalam dosis 100 μ g/KgBB, 150 μ g/KgBB, dan 200 μ g/KgBB	Rasio
2.	Sel Kupffer teraktivasi	Sel Kupffer adalah makrofag yang ditemukan di sinusoid hepar. Sel Kupffer teraktivasi berbentuk amoboid dan memiliki juluran sitoplasma pada sinusoid hepar. Sel Kupffer teraktivasi memiliki inti bulat dan sitoplasma lebih cerah dibanding dengan sel hepatosit (Khristian dkk., 2022).	Sel Kupffer diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 40x. Mikroskop disambungkan dengan alat <i>optilab</i> . Penghitungan jumlah sel Kupffer teraktivasi menggunakan perangkat lunak <i>ImageJ</i> dan <i>Fiji</i> .	Rasio

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Uji Kelayakan Etik (*Ethical Clearance*)

Uji kelayakan etik (*ethical clearance*) dilakukan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Peneliti mengajukan surat kelayakan etik (*ethical clearance*) kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk mendapatkan surat izin penelitian. Setelah surat kelayakan etik disetujui, peneliti

mendapatkan *ethical clearance* untuk penelitian ini dengan nomor surat 1297/H25.1.11/KE/2018.

3.7.2 Sterilisasi Alat

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dilakukan sterilisasi menggunakan mesin *autoclave* selama 60 menit pada suhu 121 °C. Alat dan bahan yang disterilisasi adalah:

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

Setelah semua alat dan bahan disterilisasi, maka alat dan bahan tersebut dapat digunakan pada penelitian ini.

3.7.3 Produksi Protein Rekombinan

Produksi protein dilakukan menggunakan kombinasi metode produksi protein yang sudah dioptimasi dan dilakukan oleh Rachmania dkk (2020) dan Setyoadji dkk (2021).

- a. Proses ini dimulai dengan peremajaan sel DBL2β-PfEMP1 dengan cara streaking bakteri *E. coli* BL21 (DE3) yang mengandung DNA rekombinan pada media LB padat yang sudah diberi kanamisin, kemudian LB padat diinkubasi selama 16 jam dengan suhu 37 °C.
- b. Setelah LB padat diinkubasi, koloni bakteri di cawan petri dapat terlihat. Koloni tersebut kemudian dimasukkan pada tabung ulir yang berisi 2 mL LB cair dan 2 µg kanamisin.
- c. Tabung ulir dimasukkan pada shaker inkubator dengan kecepatan 150 RPM selama 16 jam dengan suhu 37 °C.
- d. Setelah itu, LB cair 2 mL yang sudah berisi koloni bakteri dimasukkan dalam media LB cair 50 mL yang sudah diberi kanamisin 50 µL, lalu di kocok dengan kecepatan 150 RPM dan suhu 37 °C selama 4 jam pada *shaker inkubator*.
- e. Setelah 4 jam, dilakukan pengukuran nilai *optical density* (OD) atau absorbansi sampel dan blangko menggunakan panjang gelombang 600 nm.

- f. Apabila absorbansi mencapai 0,6 sampai 0,8, maka kultur tersebut bisa dibagi-bagi ke dalam tabung eppendorf. Satu tabung eppendorf berisi 350 μ L Gliserol 40% dan kultur bakteri 650 μ L. Tabung eppendorf ditutup kemudian disiram dengan nitrogen cair dan disimpan dalam kulkas -80 °C.
- g. Hasil dari proses peremajaan sel ini digunakan untuk produksi protein rekombinan berkali-kali.

Setelah melakukan proses peremajaan sel, selanjutnya dilakukan produksi protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan prosedur sebagai berikut (Putri, 2022).

- a. Sebanyak 50 μ L hasil kloning dan transformasi berupa stok gliserol *E. Coli* BL21(DE3) ditumbuhkan dalam 2 mL LB cair mengandung kanamisin 2 μ g pada shaker inkubator kecepatan 150 RPM suhu 37 °C selama 16 jam.
- b. Hasil kultur diinokulasi ke medium LB cair 50 mL yang mengandung kanamisin 50 μ g/mL.
- c. Kultur diinkubasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan 150 RPM selama 4 jam pada suhu 37 °C hingga OD kultur mencapai 600.
- d. Induksi IPTG 0,5 mM sebanyak 50 μ L ke dalam kultur, kemudian kultur dimasukkan kembali ke *shaker inkubator* selama 8 jam.
- e. Sentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6.000 RPM.
- f. Pellet yang dihasilkan diekstraksi bufer (NaCl 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, dan imidazole 5 mM dalam pH 8,0) dengan perbandingan bufer ekstraksi sebanyak 4 mL. Tambahkan lisozim 80 μ L dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kurang dari 4 °C.
- g. Sonikasi sebanyak 18-20 siklus (proses lisis) hingga konsistensi cair dan warna cairan terlihat lebih bening.
- h. Sentrifugasi sampel protein hasil lisis dengan kecepatan 12.000 RPM pada suhu 4 °C selama 30 menit. Apabila tidak segera dipurifikasi, hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas -80 °C.

3.7.4 Purifikasi Protein Rekombinan

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi afinitas resin Ni-NTA dengan prosedur sebagai berikut (Putri, 2022).

- a. Sebelum kolom digunakan, kolom dicuci dengan menggunakan NaOH 0,1M dan etanol 30%.
- b. Dilakukan pemberian resin Ni-NTA pada kolom dan dibiarkan selama 30 detik, lalu ditambahkan aquades sebanyak 3x5 mL.
- c. Pemberian bufer lisis (5 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, dan 500 mM NaCl) sebanyak 3x5 mL. Saat pemberian bufer lisis ketiga, bagian atas dan bawah kolom harus ditutup dan dibiarkan selama 1 jam. Setelah 1 jam, buka penutup atas dan bawah, lalu tunggu bufer lisis tersebut menetes hingga habis. Bila tersisa sedikit, maka gunakan spuit berisi udara untuk mendorong tetesan yang tersisa dalam kolom.
- d. Bagian atas dan bawah kolom ditutup kembali dan ditambahkan 4 mL crude yang telah diproduksi pada tahap sebelumnya. Kemudian kolom diletakkan dalam *orbital shaker* selama 60 menit pada suhu kurang dari 4 °C.
- e. Bagian atas dan bawah kolom dibuka dan dilakukan pemberian wash bufer I (50 mM Na-phosphate, 500 Mm NaCl, 10 Mm imidazol, pH 8) sebanyak 2 kali dan wash bufer II (50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8) sebanyak 2 kali.
- f. Bufer elusi pH 8 ditambahkan sebanyak 2x0,5 mL pada masing-masing konsentrasi dimulai dari yang terkecil. Bufer elusi I terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 30 mM imidazol. Bufer elusi II terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 60 mM imidazol. Bufer elusi III terdiri dari 50 mM Na-phosphate, 500 mM NaCl, dan 100 mM imidazol.

3.7.5 Visualisasi Protein melalui SDS-PAGE

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

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

ddH ₂ O	6,6 mL
<i>acrylamide/bis</i> 30%	8,3 mL
<i>lower gel</i> bufer 4X pH 8,8	5 mL
APS 10%	100 µL

TEMED 10 μ L

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

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

- c. *Upper gel* dibuat dengan konsentrasi acrylamide 4,5% dengan komposisi sebagai berikut:

ddH ₂ O	7 mL
acrylamide/bis 30%	1,8 mL
<i>upper gel</i> bufer 4X pH 6,8	3 mL
APS 10%	150 μ L
TEMED	15 μ L

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

- d. Setelah *upper gel* memadat, kaca SDS-PAGE dipasang dalam perangkat. Selanjutnya, 500 mL running bufer (Tris base 0,025 M, SDS 0,1%, dan glisin 0,192 M) dituang ke dalam chamber SDS-PAGE.
- e. Siapkan proses elektroforesis dengan memasang kabel hitam sebagai kutub negatif dan merah sebagai kutub positif.
- f. Sebanyak 15 μ L sampel protein yang sudah terdenaturasi dan 4 μ L *prestained protein marker dual color* (BioRad) dimasukkan ke sumuran *upper gel* yang sudah dibentuk dengan menggunakan sisir.
- g. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 50 V selama 45 menit untuk *upper gel* dan 80 V selama 2,5 jam untuk *lower gel*.
- h. Setelah elektroforesis selesai, kaca dilepas dari perangkat dan gel dapat diambil. Kemudian bagian *upper gel* dibuang.

- i. Pewarnaan pada gel menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* dan diletakkan dalam shaker selama 30 menit.
- j. Destaining dilakukan dengan cara merendam gel dalam *destaining solution* selama 1 jam dan kemudian hasilnya dapat dianalisa.

3.7.6 Analisis Konsentrasi Protein

Sebelum melakukan pengukuran konsentrasi protein dengan *Bradford protein assay*, dilakukan pembuatan kurva standar dengan menggunakan *bovine serum albumin (BSA)*. Pembuatan kurva ini membutuhkan *microplate* dan *microplate reader*. Sebanyak 1 mL reagen *Bradford* dimasukkan ke dalam tabung *microtube*. Masing-masing tabung ditambahkan cairan BSA dengan jumlah yang berbeda-beda, dari jumlah kecil hingga besar, serta dilakukan 2-3 kali replikasi. Kemudian, diinkubasi selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader*. Absorbansi dan konsentrasi BSA tersebut membentuk suatu kurva standar yang digunakan dalam penentuan konsentrasi protein. Untuk menghitung konsentrasi protein, reagen *Bradford* sebanyak 995 μL dimasukkan ke dalam tube, kemudian sampel protein ditambahkan dengan volume 5 μL . Sampel diinkubasi di suhu ruangan selama 10 menit. Sampel dipindahkan ke *cuvettes* dan diukur nilai absorbansinya menggunakan panjang gelombang 595 nm. Untuk menentukan jumlah protein yang diinjeksikan (dalam satuan μL), maka dosis protein target (dalam satuan μg) dibagi dengan konsentrasi protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) yang didapat dari hasil *Bradford protein assay* (Putri, 2022).

3.7.7 Pemeliharaan dan Injeksi Hewan Coba

Lima belas ekor tikus jantan galur wistar (dua belas tikus perlakuan dan tiga tikus kontrol) diaklimatisasi terlebih dahulu di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember selama empat belas hari. Hal ini bertujuan agar hewan coba tersebut dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Hewan coba dipelihara di dalam kandang plastik berukuran $40 \times 30 \times 13 \text{ cm}^3$ yang alasnya diberi serbuk kayu (sekam). Setiap kandang berisi satu atau dua ekor tikus yang diberi makanan berupa pakan ternak standar dalam wadah dan air mineral dalam botol setiap harinya secara *ad libitum*.

Setelah aklimatisasi selama 2 minggu dan hewan coba sudah memenuhi kriteria inklusi, maka perlakuan berupa injeksi protein rekombinan dapat dilakukan. Injeksi dilakukan pada hari ke-0, hari ke-21, dan hari ke-42. Injeksi dibagi menjadi tahap primer dan sekunder. Injeksi primer dilakukan 1 kali, sedangkan injeksi sekunder dilakukan 2 kali dengan periode interval 3 minggu. Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 dengan dosis yang telah ditentukan dicampur dengan *freund's complete adjuvant* (pada injeksi pertama) atau *freund's incomplete adjuvant* (pada injeksi kedua dan ketiga). Perbandingan antara protein rekombinan dan adjuvan yang digunakan adalah 1:1. Injeksi dilakukan secara subkutan pada area tengkuk. Pada kelompok kontrol, tiga tikus diberikan injeksi cairan NaCl 0,9% secara subkutan pada tempat yang sama. Sebanyak dua belas ekor tikus kelompok perlakuan dikelompokkan menjadi tiga kelompok dengan jumlah dosis antigen protein rekombinan yang berbeda, yaitu 100 μ g/KgBB, 150 μ g/KgBB, dan 200 μ g/KgBB untuk setiap tikus bermassa 200 gram.

3.7.8 Terminasi Hewan Coba

Terminasi hewan coba dilakukan setelah imunisasi sekunder kedua yaitu pada hari ke-56. Hewan diterminasi dengan cara menginjeksikan *ketamine* dan *xylazine* secara *intraperitoneal*. *Ketamine* diinjeksikan dengan dosis 40-90 mg/KgBB, sedangkan *xylazine* diinjeksikan dengan dosis 5-10 mg/KgBB. *Ketamine* dan *xylazine* dipilih karena tidak memiliki efek analgesia, tidak berdampak pada kardiovaskular, tidak mengakibatkan depresi napas dan merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan. Terminasi hewan coba dilakukan oleh tenaga ahli.

3.7.9 Pembuatan Preparat

Hewan coba yang telah diterminasi dibedah dan diambil organ hatinya. Hepar tikus dimasukkan ke dalam larutan *formalin* bufer 10% dan dibuat preparat histologi dengan metode paraffin. Pembuatan preparat menggunakan teknik pewarnaan *Hematoksilin* dan *Eosin* (HE). Proses pembuatannya adalah sebagai berikut:

- a. Dehidrasi

Tahap pertama adalah dehidrasi. Dehidrasi dilakukan untuk meniadakan cairan pada jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan dapat diisi dengan. Dehidrasi dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat.

b. *Clearing*

Clearing adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin .

c. *Embedding*

Embedding adalah proses untuk mengeluarkan cairan pembening (*clearing agent*) dari jaringan dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan harus benar-benar bebas dari cairan pembening karena sisa cairan pembening dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom menyebabkan jaringan menjadi mudah robek.

d. *Blocking*

Blocking adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Cairan paraffin lalu dituangkan sedikit ke dalam cetakan blok. Masukkan potongan organ secara perlahan dan kemudian tuangkan kembali paraffin hingga merendam organ.

e. *Mounting*

Mounting adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom.

3.7.10 Pengambilan Foto Preparat

Preparat diperiksa pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Mikroskop cahaya disambungkan pada kamera *optilab*. Pengambilan foto preparat dilakukan menggunakan komputer yang memiliki perangkat lunak *optilab* dan telah tersambung pada kamera *optilab*. Komputer yang telah tersambung memunculkan foto preparat. Foto preparat kemudian disimpan pada ruang penyimpanan di komputer. Pada penelitian ini, foto preparat diambil sebanyak lima lapang pandang pada zona I (periportal) dan lima lapang pandang pada zona III (perisentral)

(Khristian dkk., 2022). Foto preparat diambil pada seluruh sampel yaitu limabelas sampel.

3.7.11 Penghitungan Jumlah Sel Kupffer

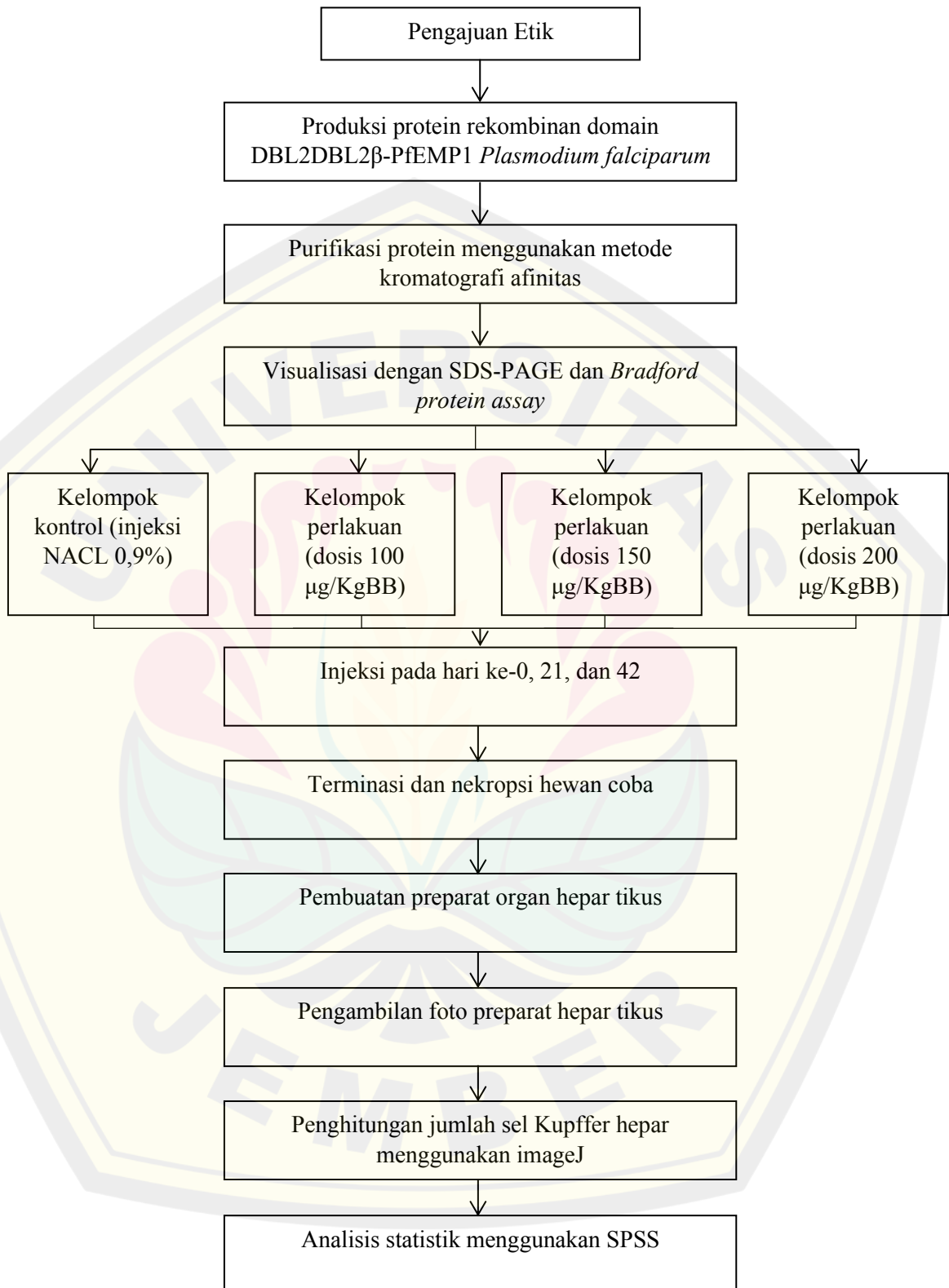
Foto preparat diidentifikasi menggunakan perangkat lunak imageJ & Fiji. Foto preparat dibagi menjadi empat kuadran menggunakan garis linier tegak lurus. Sel Kupffer dihitung pada setiap kuadran secara *zig-zag*. Sel Kupffer dihitung pada zona I dan zona III dengan satuan unit. Selanjutnya hasil perhitungan dari sepuluh lapang pandang sel Kupffer pada setiap perlakuan hewan coba direrata dan dilakukan analisis menggunakan aplikasi SPSS (Khristian dkk., 2022).

3.7.12 Metode Analisis

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dan data yang didapat adalah data berjenis kuantitatif. Data didapat dari jumlah sel Kupffer pada hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Data tersebut dianalisis menggunakan uji normalitas yaitu uji *Saphiro-wilk* untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi secara normal. Apabila distribusi data normal, maka data diuji kembali menggunakan uji homogenitas yaitu *Levene-test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka data diuji komparasi dengan menggunakan uji *one way ANOVA*. *Confidence interval* penelitian ini menggunakan nilai sebesar 95%.

Prosedur produksi protein rekombinan hingga pembuatan preparat organ dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya (PUTRI, 2022). Prosedur pengambilan foto preparat hingga analisis data dilakukan berdasarkan beberapa sumber jurnal yang telah peneliti dapatkan dan dilakukan oleh peneliti langsung.

3.8 Alur Penelitian



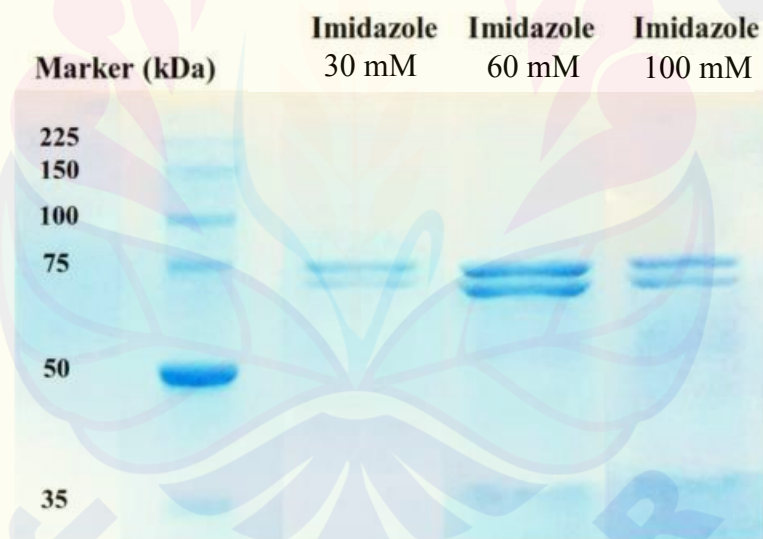
Gambar 3.2 Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Visualisasi Protein Rekombinan dengan menggunakan SDS PAGE

Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 yang telah didapatkan dari hasil purifikasi selanjutnya divisualisasi menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk mengonfirmasi keberadaan protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 berdasarkan dari ketebalan pita protein dan berat molekul protein rekombinan. Berat molekul dan pita dari protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 kemudian dicocokkan dengan protein marker dan didapatkan berat molekul berukuran ~72 kDa dengan pita paling tebal yang tampak pada hasil elusi konsentrasi imidazole 60 mM (Gambar 4.1).

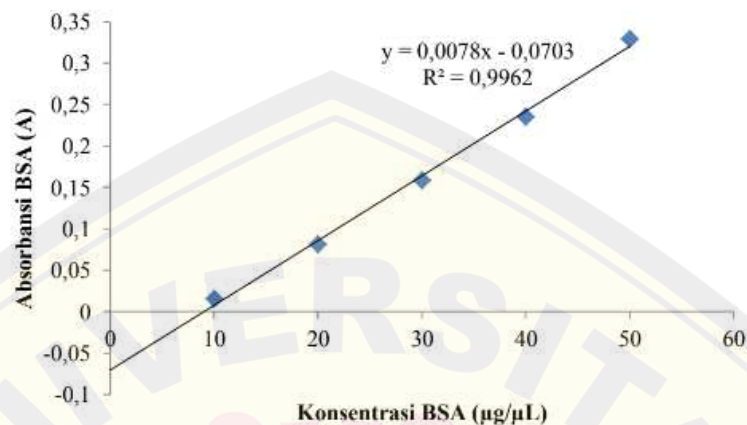


Gambar 4.1 Visualisasi Protein Rekombinan DBL β 2-PfEMP1

4.1.2 Analisis *Bradford Protein Assay*

Protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 yang telah terkonfirmasi kemudian dianalisis menggunakan metode *Bradford Protein Assay* untuk menghitung konsentrasi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 sebelum diinjeksikan pada hewan coba. Konsentrasi yang telah didapatkan kemudian digunakan untuk penentuan

setiap dosis (100 µg/KgBB, 150 µg/KgBB, dan 200 µg/KgBB) yang diinjeksikan pada hewan coba. Konsentrasi protein diukur berdasarkan kurva standard yang dibuat menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Kurva Standar *Bradford Protein Assay*

Persamaan yang diperoleh dari hasil kurva standar diatas adalah $y=0,0078x-0,0703$ dengan nilai R^2 mencapai 0,9962. Persamaan yang telah diperoleh kemudian digunakan mengukur konsentrasi protein rekombinan DBLβ2-PfEMP1 menggunakan hasil elusi konsentrasi *imidazole* 60mM. Pengukuran konsentrasi protein rekombinan DBLβ2-PfEMP1 tercantum pada Tabel 4.1 sebagai berikut.

Tabel 4.1 Pengukuran Konsentrasi Protein Rekombinan DBLβ2-PfEMP1

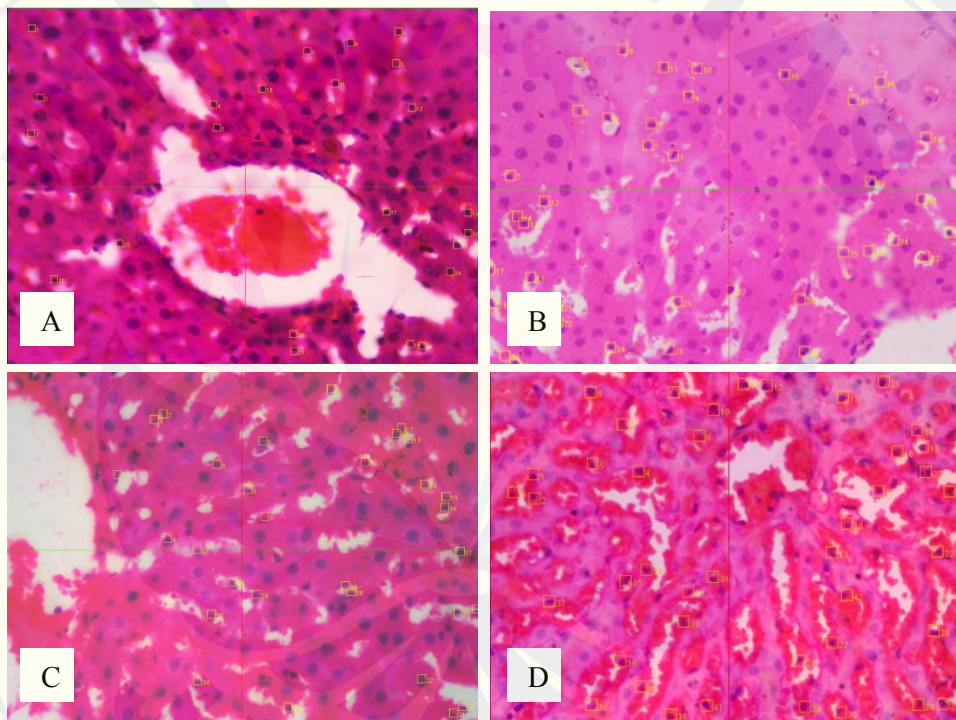
Jumlah Protein yang dimasukkan	Replikasi ke-1	Replikasi ke-2	Replikasi ke-3	Rata-rata
0 µL (blanko)	0,46	0,463	0,47	0,464
15 µL	0,636	0,63	0,625	0,630
15 µL-blanko (y)				0,166
$y=0,0078x-0,0703$			$x=30,294$	
			$x/15=2,019=2$ µg/µL	

Pengukuran absorbansi dengan reagen *Bradford* dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan diambil rata-rata, yaitu 0,166. Replikasi ini bertujuan mengurangi bias ketika melakukan pengukuran absorbansi. Nilai rata-rata yang

didapatkan kemudian dihitung sebagai variabel y pada persamaan hasil kurva standar $y=0,0078x-0,0703$. Nilai dari variabel x yang dihasilkan dari persamaan tersebut kemudian digunakan sebagai konsentrasi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 yang diinjeksikan pada hewan coba, yaitu 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.1.3 Analisis Hasil Hitung Jumlah Sel Kupffer

Penghitungan jumlah sel Kupffer dilakukan pasca terminasi menggunakan preparat histologi hepar hewan coba dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*. Sel Kupffer dihitung dari 10 lapang pandang yaitu lima lapang pandang pada zona I dan lima lapang pandang pada zona III dan dihitung menggunakan perangkat lunak ImageJ. Gambaran hasil hitung jumlah sel Kupffer hepar dapat dilihat pada Gambar 4.3.

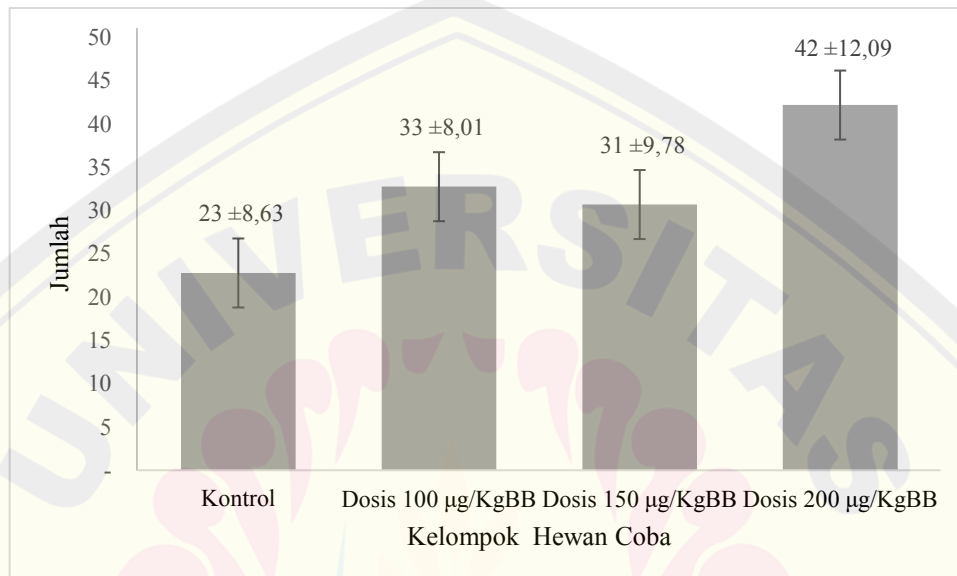


Keterangan: : Sel Kupffer yang teraktivasi. A: Kelompok Kontrol, B: Kelompok Perlakuan Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, C: Kelompok Perlakuan Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$, D: Kelompok Perlakuan Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$ (Perbesaran 400x).

Gambar 4.3 Contoh Gambaran Hasil Hitung Jumlah Sel Kupffer Hepar

Sel Kupffer yang teraktivasi dihitung oleh dua pengamat. Setelah dilakukan penghitungan jumlah sel Kupffer oleh pengamat satu dan pengamat dua, hasilnya

kemudian direrata. Berikut grafik (Gambar 4.4) jumlah rerata sel Kupffer teraktivasi dari kedua pengamat dua tiap kelompok dan standar deviasinya. Untuk mengetahui reliabilitas dari data yang telah dihitung oleh dua pengamat, maka dilakukan uji *Cronbach- α* . Signifikansi dari uji *Cronbach- α* adalah lebih besar dari 0,7 yaitu $p=0,724$ sehingga data reliabel.



Gambar 4.4 Rata-Rata Jumlah Sel Kupffer Hepar pada Setiap Perlakuan

Hasil analisis statistik menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene test* menunjukkan data terdistribusi normal dan bersifat homogen ($p>0,05$). Berdasarkan hal tersebut, syarat melakukan uji parametrik dengan *One-Way ANOVA* terpenuhi. Uji *One-Way ANOVA* dilakukan untuk menilai adanya perbedaan dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Hasil uji parametrik *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 yaitu $p=0,007$. Hasil tersebut mengindikasikan terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata empat kelompok hewan coba. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, maka dilakukan uji *post-hoc Tukey*. Hasil dari uji *post-hoc Tukey* dapat dilihat pada tabel (Tabel 4.2) berikut:

Tabel 4.2 Nilai Signifikansi pada Uji *post-hoc* Tukey

	Kontrol	100 µg/kgBB	150 µg/kgBB	200 µg/kgBB
Kontrol	-	$p=0,187$	$p=0,357$	$p=0,005 *$
100 µg/kgBB	$p=0,187$	-	$p=0,958$	$p=0,130$
150 µg/kgBB	$p=0,357$	$p=0,958$	-	$p=0,058$
200 µg/kgBB	$p=0,005 *$	$p=0,130$	$p=0,130$	-

Keterangan: *Nilai $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan yang bermakna.

Perbedaan yang signifikan terlihat pada perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan dosis 200 µg/kgBB dengan nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 yaitu $p=0,005$. Sedangkan nilai signifikansi pada perbandingan setiap kelompok lain lebih besar dari 0,05, hal ini menginterpretasikan tidak ada perbedaan yang signifikan pada kelompok lain selain kelompok perlakuan dosis 200 µg/kgBB dengan kelompok kontrol.

4.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dosis aman protein rekombinan DBL2β-PfEMP1. Penentuan dosis aman ditentukan berdasarkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar paling sedikit (Hoffman dkk., 2015). Penelitian ini menggunakan preparat hepar dari hewan coba yang telah diberi injeksi protein rekombinan DBL2β-PfEMP1 dengan tiga varian dosis yang berbeda. Preparat hepar diberi pewarnaan menggunakan *hematoxylin* dan *eosin* kemudian dibaca menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Lapang pandang diambil dari lima zona I hepar dan lima zona III hepar. Gambaran histologi sel Kupffer yang teraktivasi berbentuk *amoeboid* dengan sitoplasma yang menjulur kedalam sinusoid dan memiliki nukleus yang tertutup oleh bahan asing yang telah difagosit (Di Fiore, 2013). Rata-rata jumlah sel Kupffer hepar teraktivasi pada kelompok kontrol hingga kelompok perlakuan adalah 23 hingga 42. Hasil rata-rata perhitungan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar pada Gambar 4.4 menunjukkan adanya peningkatan mulai dari kelompok kontrol hingga kelompok perlakuan dosis 200 µg/kgBB. Kelompok perlakuan dengan rata-rata jumlah sel Kupffer teraktivasi paling rendah adalah

kelompok perlakuan dengan dosis 150 µg/kgBB, sedangkan kelompok perlakuan dengan rata-rata jumlah sel Kupffer tertinggi adalah kelompok perlakuan dengan dosis 200 µg/kgBB. Hasil rata-rata perhitungan jumlah sel Kupffer hepar teraktivasi kemudian diuji menggunakan uji ANOVA. Uji statistik menggunakan ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi $p=0,07$. Analisis menggunakan uji *post-hoc Tukey* memperlihatkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan dosis 200 µg/kgBB dengan kelompok kontrol, dan tidak terjadi pada kelompok perlakuan lainnya. Perbedaan tersebut mengindikasikan adanya peningkatan yang signifikan jumlah sel Kupffer teraktivasi pada dosis 200 µg/kgBB dengan nilai signifikansi yaitu $p=0,005$. Berdasarkan Gambar 4.4, peningkatan terjadi pada kelompok perlakuan dosis 100 µg/kgBB dan kelompok perlakuan dosis 150 µg/kgBB. Pada kedua kelompok tersebut terjadi peningkatan namun tidak signifikan dengan uji statistik.

Peningkatan jumlah sel Kupffer hepar yang teraktivasi mengindikasikan adanya respon *innate immunity* pada hepar (Basit dkk., 2018). Respon *innate immunity* merupakan respon imunitas pertama ketika terdapat bahan atau patogen asing memasuki jaringan tubuh (Turvey dkk, 2010). Sel Kupffer merupakan salah satu *innate immunity* yang berada pada jaringan hepar. Sel Kupffer merespon bahan asing yang memasuki jaringan hepar melalui beberapa mekanisme yaitu, pelepasan sitokin, produksi *hepatocyte growth factor* (HGF), apoptosis sel, proliferasi dan aktivasi sel Kupffer, induksi sel T CD8. Proliferasi dan aktivasi sel Kupffer dipengaruhi oleh faktor eksogen dan faktor endogen seperti, debris sel, endotoksin bakteri, mikroorganisme, HGF, *stem cell* (Frevert dkk., 2006; Gonçalves dkk., 2017; Hirako dkk., 2022). Sel Kupffer yang teraktivasi mengeluarkan IL-1 dan TNF-*alpha* yang mengaktifkan leukosit dan sel *sinusoidal endothelial* untuk mengekspresikan ICAM-1. Pada patogenesis malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum*, ICAM-1 mengikat domain yang dimiliki oleh *P. falciparum*, salah satunya domain DBL2β-PfEMP1. Ikatan ini menyebabkan produksi *reactive oxygen species* (ROS), seperti superoksida, yang menyebabkan stres oksidatif di hepar dan menyebabkan inflamasi pada hepar (Basit dkk., 2018; Tweedell dkk., 2018; Suurbaar dkk., 2022).

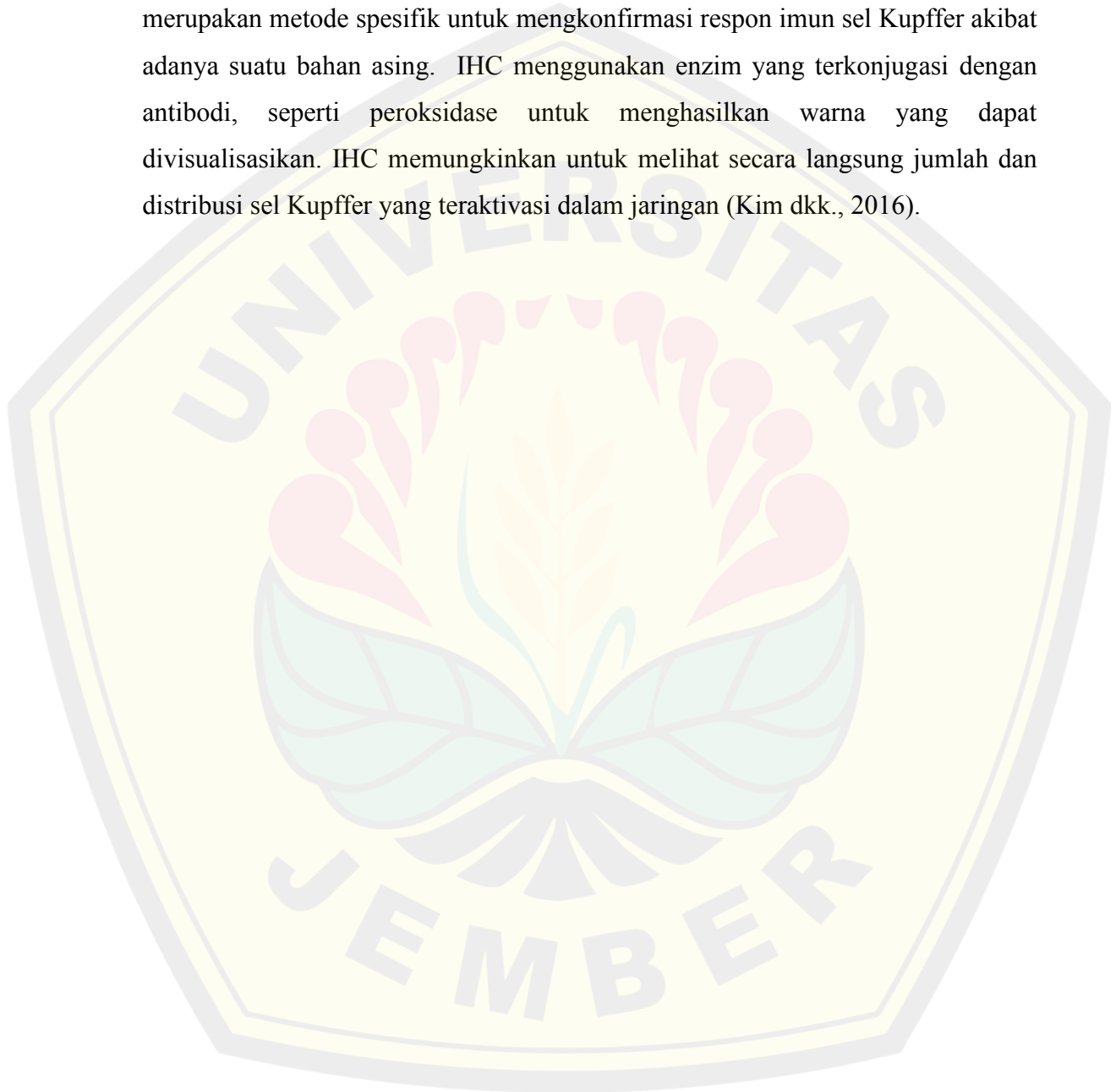
Protein rekombinan yang diambil dari domain DBL2 β -PfEMP1 terdeteksi sebagai protein asing pada tubuh. Protein rekombinan yang masuk mengaktifasi sel Kupffer hepar sebagai respon imun *innate* dan mengekspresikan ICAM-1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suurbaar pada tahun 2022, protein rekombinan spesifik DBL2 β -PfEMP1 juga menyebabkan peningkatan antibodi IgG. Antibodi IgG mampu menghambat ikatan antara domain DBL2 β dengan ICAM-1. Hambatan IgG pada ikatan DBL2 β dengan ICAM-1 mencegah sekuestrasi dan sitoadherensi sehingga prognosis terjadinya kerusakan pada jaringan dapat dihindari (Gullingsrud dkk., 2013; Suurbaar dkk., 2022).

Peningkatan yang tidak signifikan terjadi akibat protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dikenali sebagai bahan asing yang masuk pada jaringan hepar. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang masuk memicu proliferasi dan aktivasi sel Kupffer sebagai respon imun *innate* tubuh dan peningkatan antibodi IgG sebagai respon imun adaptif humoral tubuh (Gullingsrud dkk., 2013; Suurbaar dkk., 2022). Antibodi IgG meningkat pasca imunisasi protein rekombinan DBL2 β *full-length* yang diekspresikan pada bakteri *E. coli*. Antibodi yang terbentuk akibat imunisasi tersebut teraktivasi dan menghambat ikatan antara ICAM-1 dan DBL2 β (Gullingsrud dkk., 2013; Hasanah dkk., 2020).

Hambatan pada ikatan antara ICAM-1 dan DBL2 β menyebabkan menurunnya aktivasi dan proliferasi dari sel Kupffer hepar (Gullingsrud dkk., 2013). Berdasarkan gambar 4.4, peningkatan jumlah sel Kupffer hepar paling sedikit terjadi pada kelompok perlakuan dengan dosis 150 μ g/KgBB. Pada penelitian yang dilakukan oleh Putri pada tahun 2022, antibodi IgG meningkat secara signifikan pada dosis 150 μ g/KgBB. Hal tersebut menunjukkan antibodi IgG menghambat secara efektif ikatan antara ICAM-1 dengan DBL2 β -PfEMP1 pada dosis 150 μ g/KgBB. Data pada penelitian tersebut mendukung data pada penelitian ini, yaitu jumlah aktivasi sel Kupffer yang rendah terdapat pada dosis 150 μ g/KgBB. Jumlah aktivasi sel Kupffer pada dosis 150 μ g/KgBB dapat dikorelasikan antibodi IgG pada dosis 150 μ g/KgBB menghambat ikatan antara protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dengan ICAM-1 (Putri, 2022). Uji statistik *post hoc Tukey* menunjukkan dosis 100 μ g/KgBB dan dosis 150 μ g/KgBB tidak terdapat perbedaan yang

signifikan ($p=0,958$), sehingga dapat disimpulkan dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ dan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ merupakan dosis aman karena menyebabkan jumlah aktivasi sel Kupffer hepar yang sedikit.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yaitu pembacaan dan pewarnaan foto preparat tidak menggunakan metode *immunohistochemistry* yang merupakan metode spesifik untuk mengkonfirmasi respon imun sel Kupffer akibat adanya suatu bahan asing. IHC menggunakan enzim yang terkonjugasi dengan antibodi, seperti peroksidase untuk menghasilkan warna yang dapat divisualisasikan. IHC memungkinkan untuk melihat secara langsung jumlah dan distribusi sel Kupffer yang teraktivasi dalam jaringan (Kim dkk., 2016).



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 aman pada hepar manusia karena menimbulkan aktivasi sel Kupffer hepar sedikit.
- b. Terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok dosis 200 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$, protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 dalam memengaruhi respon sel Kupffer hepar.
- c. Dosis protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 yang paling aman bagi hepar manusia adalah dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ dan dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$ karena memicu aktivasi sel Kupffer hepar paling sedikit.

5.2 Saran

Beberapa saran yang dapat diambil berdasarkan penelitian yang telah dilakukan adalah:

- a. Pemeriksaan foto preparat sebaiknya menggunakan metode *immunohistochemistry* yang merupakan metode spesifik untuk mengkonfirmasi respon imun sel Kupffer akibat adanya suatu patogen.
- b. Perlu adanya penelitian lain mengenai penentuan dosis aman protein rekombinan DBL2 β -PfEMP1 berdasarkan respon ICAM-1 yang merupakan respon spesifik terhadap domain DBL2 β -PfEMP1.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M. 2015. Expression of Ezrin and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Hepatocellular Carcinoma and Non-Neoplastic Liver Lesions of HCV Infected Patients.
- Basit, H., M. L. Tan, dan D. R. Webster. 2018. Histology, kupffer cell
- Bernabeu, M. dan J. D. Smith. 2017. EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. *Trends in Parasitology*. 33(4):295–308.
- Buck, E. dan N. A. Finnigan. 2022. Malaria. StatPearls [Internet]. 2022.
- Czochor, J. dan A. Turchick. 2014. Introduction. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 87(4):401–402.
- Daubenberger, C. A. dan G. Moncunill. 2022. Next-generation malaria subunit vaccines to reduce disease burden in african children. *The Lancet Infectious Diseases*. 22(12):1655–1656.
- Drake, R., R. L. Drake, W. Vogl, dan A. W. M. Mitchell. 2012. *Gray's Basic Anatomy*. Elsevier Health Sciences.
- Duffy, P. E., P. Acharya, dan A. V Oleinikov. 2021. *Cytoadherence BT - Encyclopedia of Malaria*. Editor M. Hommel dan P. G. Kremsner. New York, NY: Springer New York.
- Eroschenko, V. P. dan M. S. H. Di Fiore. 2013. *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Forster, R. 2012. Study designs for the nonclinical safety testing of new vaccine products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 66(1):1–7.
- Frevert, U., I. Usynin, K. Baer, dan C. Klotz. 2006. Nomadic or sessile: can kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular Microbiology*. 8(10):1537–1546.
- Gonçalves, B. P., M. Fried, dan P. E. Duffy. 2016. Malaria pathogenesis. *Recent Advances in Malaria*. 427–464.
- Gonçalves, L. A., J. Rodo, L. Rodrigues-Duarte, L. V. de Moraes, dan C. Penha-Gonçalves. 2017. HGF secreted by activated kupffer cells induces apoptosis of plasmodium-infected hepatocytes. *Frontiers in Immunology*. 8:90.
- Gullingsrud, J., T. Saveria, E. Amos, P. E. Duffy, dan A. V Oleinikov. 2013.

Structure-function-immunogenicity studies of pfemp1 domain dbl2βpf11_0521, a malaria parasite ligand for icam-1. *PloS One*. 8(4):e61323.

Hasanah, F. H., E. Sulistyaningsih, dan W. D. Sawitri. 2020. The expression of the pfemp1-dbl2β recombinant protein of plasmodium falciparum isolated from indonesia. *Jurnal Ilmu Dasar*. 21(1):67–72.

Hirako, I. C., M. M. Antunes, R. M. Rezende, N. S. Hojo-Souza, M. M. Figueiredo, T. Dias, H. Nakaya, G. B. Menezes, dan R. T. Gazzinelli. 2022. Uptake of plasmodium chabaudi hemozoin drives kupffer cell death and fuels superinfections. *Scientific Reports*. 12(1):19805.

Hoffman, S. L., J. Vekemans, T. L. Richie, dan P. E. Duffy. 2015. The march toward malaria vaccines. *Vaccine*. 33 Suppl 4(Suppl 4):D13-23.

Jenner, E., S. Figure, S. Figure, dan V. F. Book. 2012. Vaccine fact book. *Vaccine Fact*. 4–10.

Jensen, A. R., Y. Adams, dan L. Hviid. 2020. Cerebral plasmodium falciparum malaria: the role of pfemp1 in its pathogenesis and immunity, and pfemp1-based vaccines to prevent it. *Immunological Reviews*. 293(1):230–252.

Kalra, A., E. Yetiskul, C. J. Wehrle, dan F. Tuma. 2018. Physiology, liver

Kemendes RI. 2020. Buku saku tatalaksana kasus malaria. *Direktorat Jenderal P2P Kementerian Kesehatan*. 1–44.

Khristian, E., R. Safitri, M. Ghazali, dan M. H. Bashari. 2022. Effect of chronic toxicity studies of sappan wood extract on the kupffer cells number in rats (*rattus novergicus*). *HAYATI Journal of Biosciences*. 29(5):695–700.

Kim, S.-W., J. Roh, dan C.-S. Park. 2016. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 50(6):411–418.

Lestari, B. M. dan S. Wangko. 2012. Peran sel kupffer pada steatohepatitis alkohol. *Jurnal Biomedik: JBM*. 4(2)

Meier, L., G. Casagrande, S. Abdulla, dan H. Masanja. 2022. A brief history of selected malaria vaccine and medical interventions pursued by the swiss tropical and public health institute and partners, 1943-2021. *Acta Tropica*. 225:106115.

Milner, D. A. 2018. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 8(1):1–12.

Mirzaali o'g'li, A. J., M. M. Begzod o'g'li, S. X. Eminjon o'g'li, dan S. A. Ravshan o'g'li. 2022. LIVER anatomy, histology and physiology. *INTELLECTUAL*

EDUCATION TECHNOLOGICAL SOLUTIONS AND INNOVATIVE DIGITAL TOOLS. 1(11):8–11.

Nakhwa, A. 2016. Korelasi antara kadar vitamin a dan il-12 serum. 1:103–108.

Pai, M. P., M. L. Cottrell, A. D. M. Kashuba, dan J. S. Bertino. 2015. *19 - Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents*. Editor J. E. Bennett, R. Dolin, dan M. J. B. T.-M. Blaser Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition). Philadelphia: W.B. Saunders.

PUTRI, D. A. S. tanpa tahun. Determinasi Dosis Optimal Protein Rekombinan DBL2B-PFEMP1 Dalam Menginduksi Respons Imun Tikus (*Rattus Norvegicus*) Sebagai Kandidat Vaksin Malaria. t.t.

Rhodes, S. J., G. M. Knight, D. E. Kirschner, R. G. White, dan T. G. Evans. 2019. Dose Finding for New Vaccines: The Role for Immunostimulation/Immunodynamic Modelling. England: Journal of theoretical biology. March 2019.

Schoch, C. L., S. Ciuffo, M. Domrachev, C. L. Hotton, S. Kannan, R. Khovanskaya, D. Leipe, R. Mcveigh, K. O'Neill, B. Robbertse, S. Sharma, V. Soussov, J. P. Sullivan, L. Sun, S. Turner, dan I. Karsch-Mizrachi. 2020. NCBI taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*. 2020

Sillehu, S. dan T. N. Utami. 2018. *Pengenalan Diagnosis Malaria*. 1. *Forum Ilmiah Kesehatan (FORIKES)*.

SULISTYANINGSIH, E. 2020. Vaksin Malaria: Perkembangan Generasi Vaksin, Kandidat Protein Untuk Vaksin Dan Tantangannya. 2020.

Suurbaar, J., A. Moussiliou, R. Tahar, R. W. Olsen, Y. Adams, N. Dalgaard, E. K. Baafour, S. Adukpo, L. Hviid, K. A. Kusi, J. Alao, M. F. Ofori, N. T. Ndam, dan A. R. Jensen. 2022. ICAM-1-binding plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 variants elicits opsonic-phagocytosis igg responses in beninese children. *Scientific Reports*. 12(1):12994.

Turvey, S. E. dan D. H. Broide. 2010. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2):S24–S32.

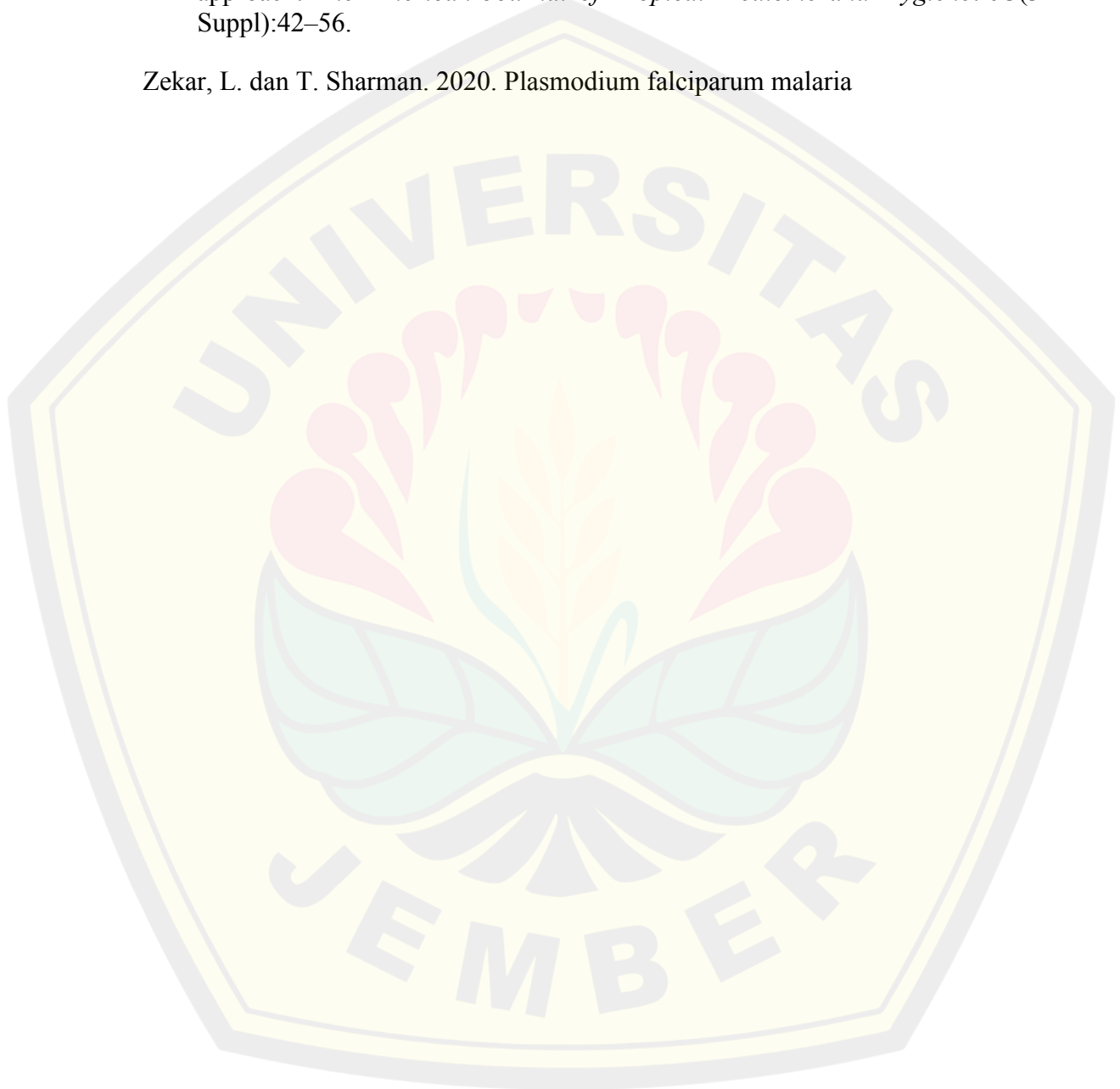
Tweedell, R. E., L. Qi, Z. Sun, dan R. R. Dinglasan. 2018. Kupffer cells survive plasmodium berghei sporozoite exposure and respond with a rapid cytokine release. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 7(4)

Varo, R., C. Chaccour, dan Q. Bassat. 2020. Update on malaria. *Medicina Clinica*. 155(9):395–402.

Viriyavejakul, P., V. Khachonsaksumet, dan C. Punsawad. 2014. Liver changes in severe plasmodium falciparum malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa b expression. *Malaria Journal*. 13(1):106.

Wassmer, S. C., T. E. Taylor, P. K. Rathod, S. K. Mishra, S. Mohanty, M. Arevalo-Herrera, M. T. Duraisingh, dan J. D. Smith. 2015. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 93(3 Suppl):42–56.

Zekar, L. dan T. Sharman. 2020. Plasmodium falciparum malaria



LAMPIRAN

Lampiran 3.1 *Ethical Clearance*

Ethical Clearance Penelitian Kelompok Riset Malaria

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember
68121 – Email : tk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA
Nomor : L-297/H25.1.11/KE/2018

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 :

KONSTRUKSI PROTEIN REKOMBINAN DAN RESPON IMUN PIEMPI DOMAIN DBL2 β SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN MALARIA BERBASIS PEPTIDA

Nama Peneliti Utama : Dr. rer. Biol. Hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si
Name of the principal investigator

NIP : 197702222002122001

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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

Jember, 30 April 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Ethical Clearance Penelitian mahasiswa



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITY OF JEMBER)

No.2168/UN25.8/KEPK/DL/2023

Title of research protocol : " Optimal Dose Determination of Recombinant Protein DBL2B-PFEMP1 as a Malaria Vaccine Candidate Based on Hepatic Kupffer Cell Response"

Document Approved : Research Protocol

Principal investigator : Muhammad Izzuddin Amin

Member of research : -

Physician : -

Date of approval : July 2023

Place of research : 1. Biology and Biotechnology Laboratory, Biomaterials and Bioprocess Engineering Laboratory Center of Development of Advanced Science and Technology (CDAST) University of Jember
2. Parasites and Biochemistry Laboratory, Faculty of Medicine, University of Jember,
3. Experimental Animal Laboratory, Faculty of Dentistry, University of Jember

The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, July 05th 2023

Chairperson of Research Ethics Committee
of Dentistry University of Jember

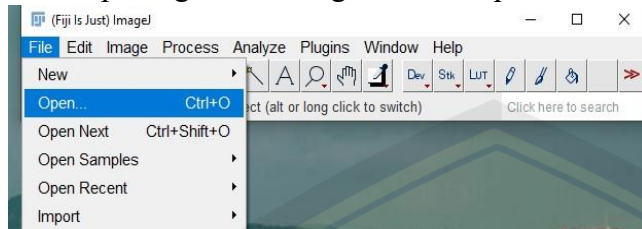


(Drg. Dwi Prijatmoko, Ph.D.)

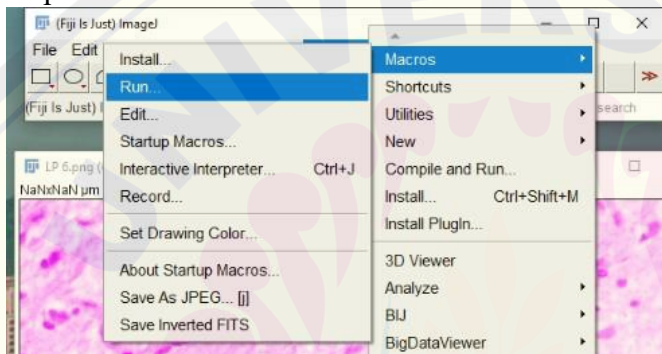
Lampiran 3.2 Prosedur Perhitungan Sel Kupffer Hepar

A. Prosedur Pembuatan Bilik Hitung

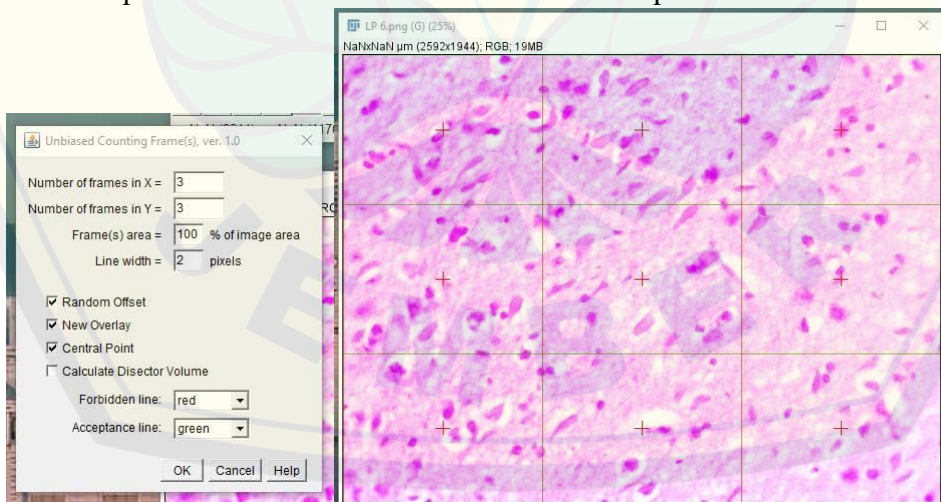
1) Buka aplikasi Fiji ImageJ >> klik “File” >> “Open” >> Pilih gambar yang akan di pasang bilik hitung >> klik “Open”.



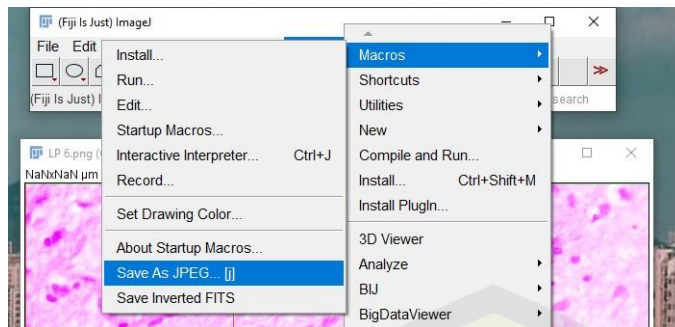
2) Untuk memasang bilik hitung, klik menu “Plugins” >> “Macros” >> “Run...” >> buka folder tempat menyimpan file “macro counting frame” >> pilih file >> klik “Open”.



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



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

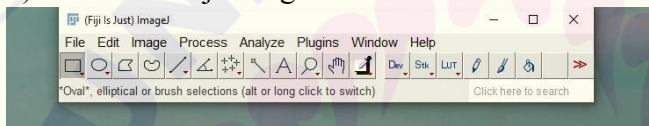


5) Proses pemasangan bilik hitung sudah selesai. Gambar asli dan gambar dengan bilik hitung diletakkan pada satu folder, gambar dengan bilik hitung diberi nomor 1 sedangkan gambar asli nomor 2.

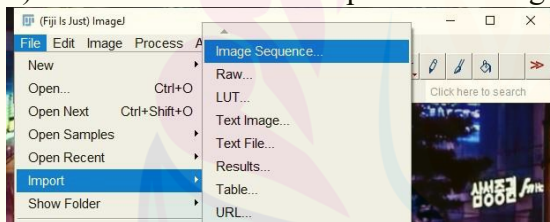
c. Prosedur Penghitungan Jumlah Sel

1) Susun semua pasangan dissector dalam satu folder dan dinamakan sesuai urutannya, misal 1 dan 2.

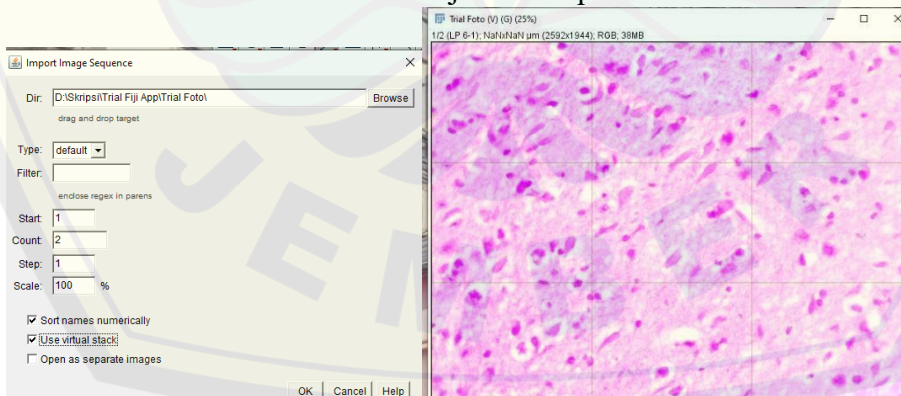
2) Buka Fiji ImageJ.



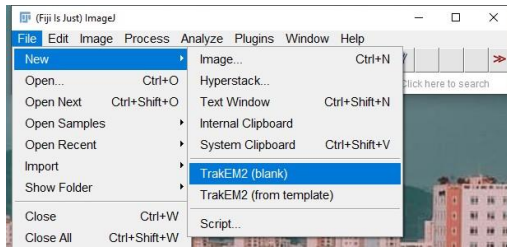
3) Klik "File" >> "Import" >> "Image Sequence".



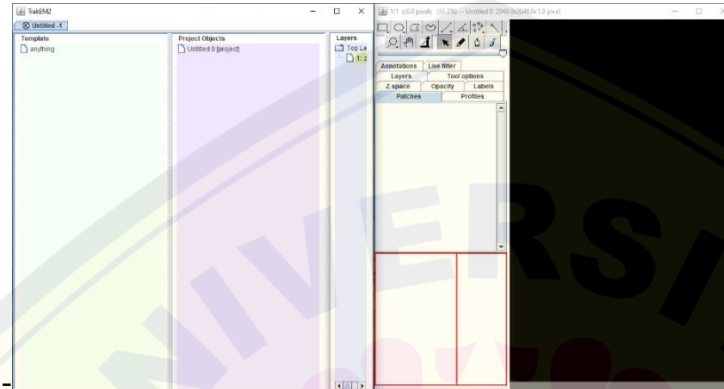
4) Pilih folder yang sudah disusun, dengan klik "Browse" >> pilih folder >> "Open" >> centang pada bagian "Sort Names Numerically" dan "Use Virtual Stack" >> "Ok". Setelah itu akan terbuka jendela seperti dibawah.



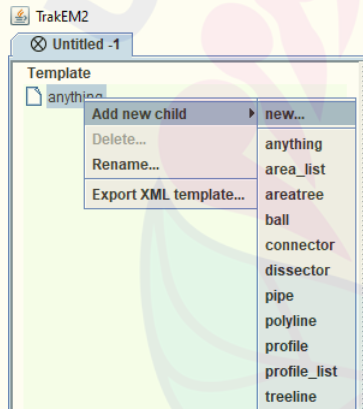
5) Klik "File" >> "New" >> "TrakEM2 (blank)" >> pilih folder yang akan diolah >> "Select".



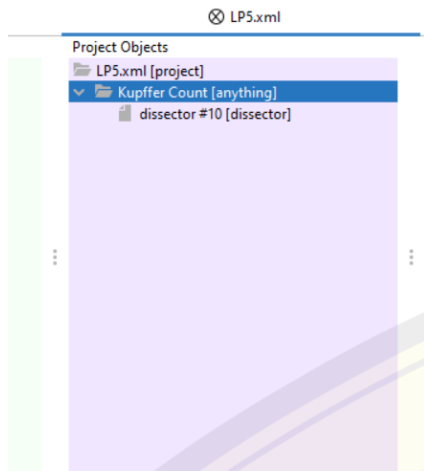
6) Kemudian akan terbuka jendela seperti dibawah.



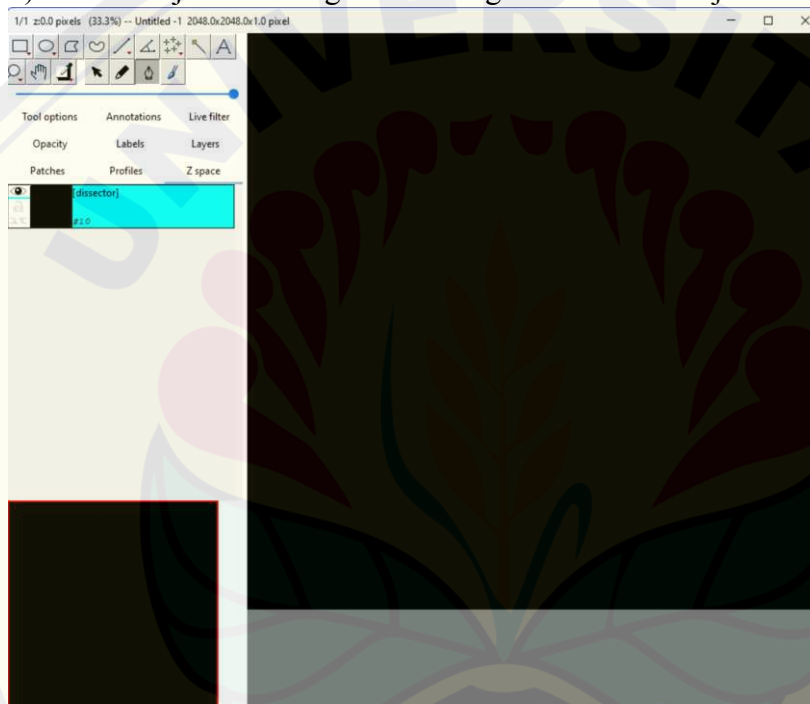
7) Pada kolom template TrakEM2, klik kanan pada bagian “anything” >> “Add new child” >> “Dissector”.



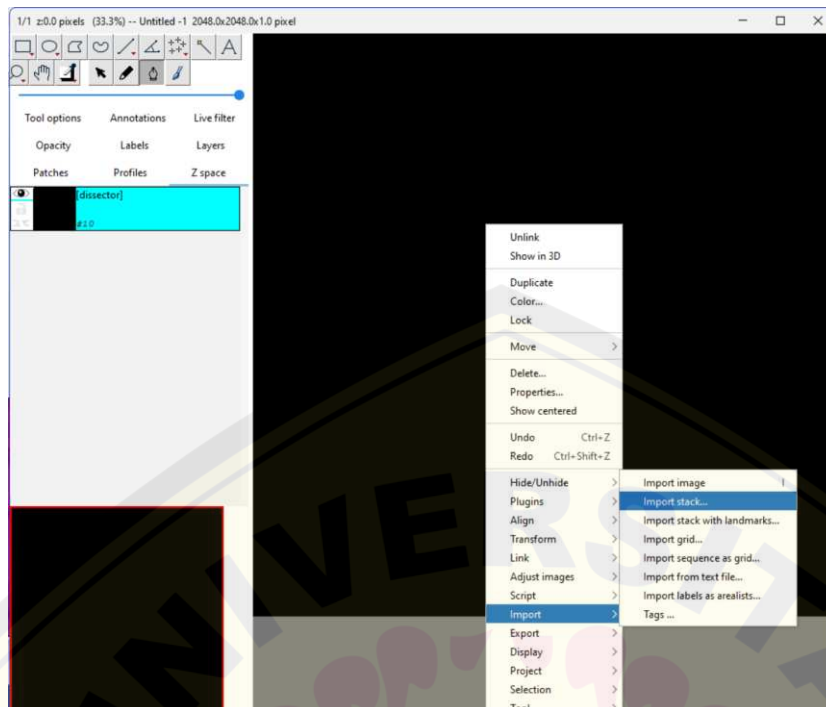
8) Klik kanan pada Project Objects >> “Add...” >> “New Anything” >> ubah nama menjadi “Kupffer count” >> klik kanan pada neuron count >> “Add...” >> “Dissector”.



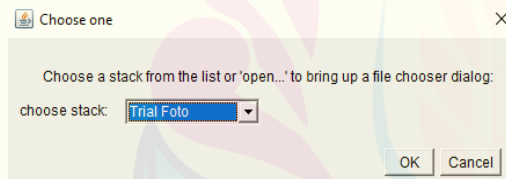
9) Pada jendela Image Processing akan muncul objek dissector



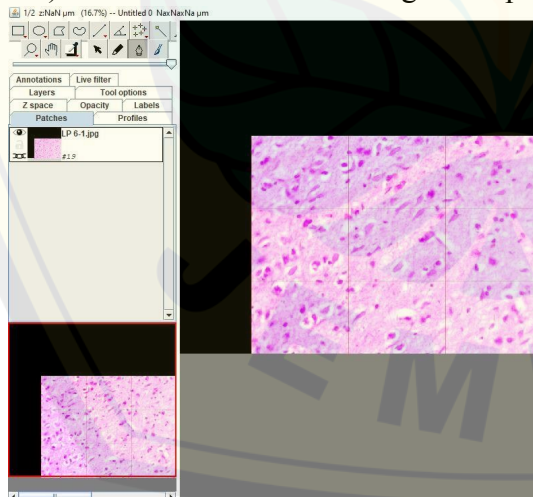
10) Klik kanan pada “Image Processing” >> “Import” >> “Import stack”.



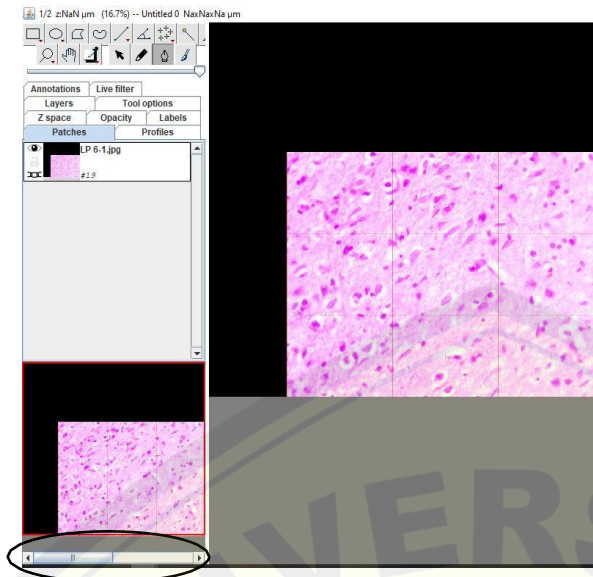
11) Akan muncul seperti gambar dibawah, kemudian pilih folder yang diinginkan. Klik “Ok” >> muncul kolom selanjutnya dan klik “Ok” tanpa memasukkan “Slide Thickness”.



12) Kemudian akan keluar gambar pada Image Processing.

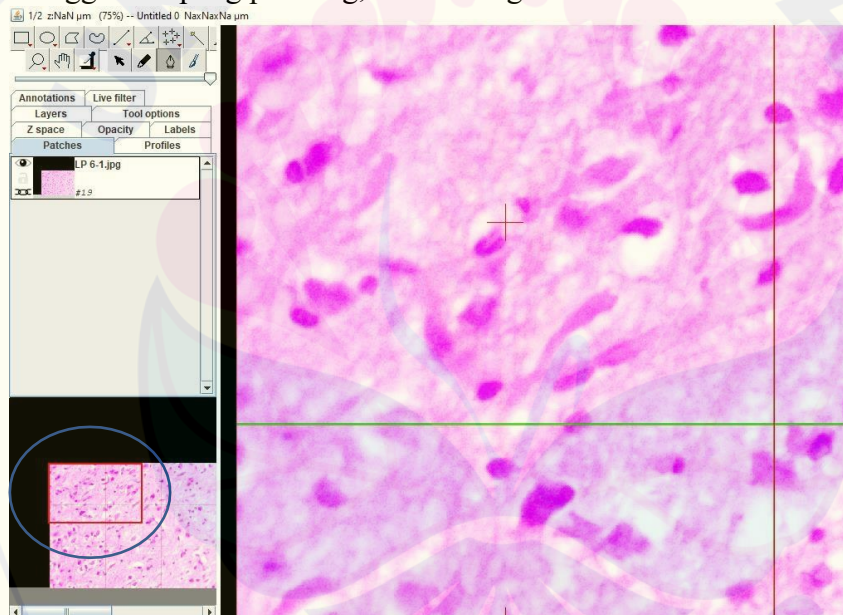


13) Untuk pindah dari gambar pertama ke gambar kedua maka geser ke kanan atau kiri navigation bar di pojok kiri bawah.



14) Beberapa cara untuk navigasi:

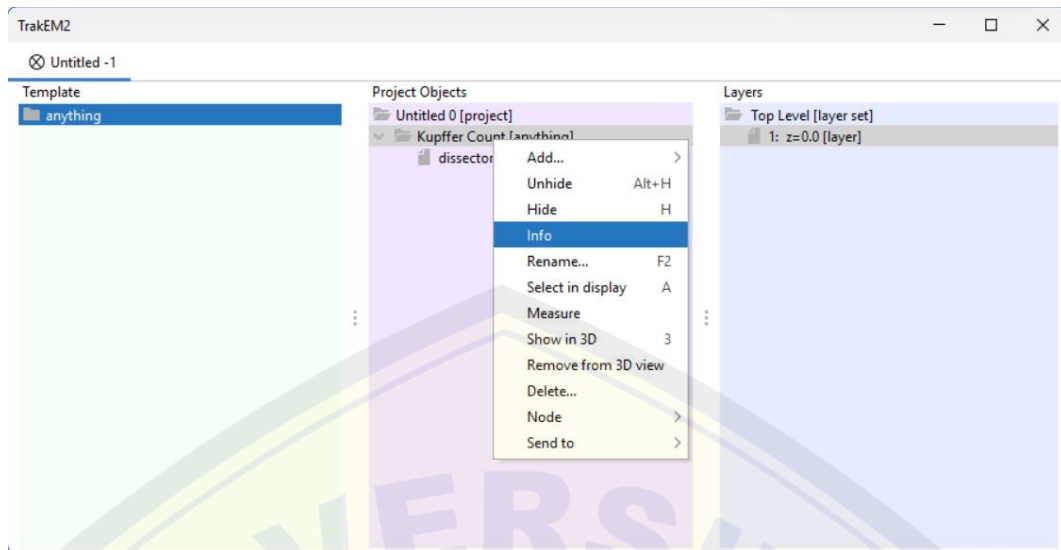
Menggeser lapang pandang, maka “drag” kotak berikut ke lokasi yang diinginkan.



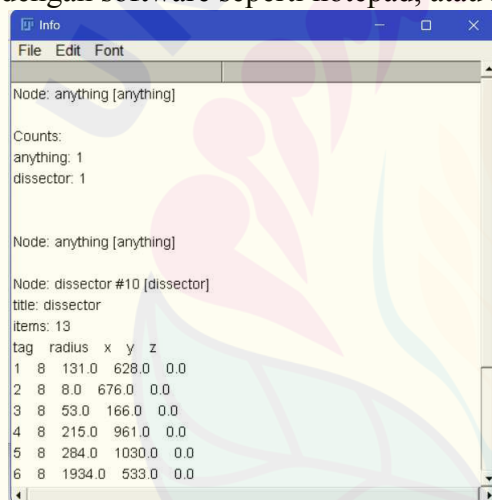
Zoom in, maka klik tombol “+” pada keyboard.

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

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

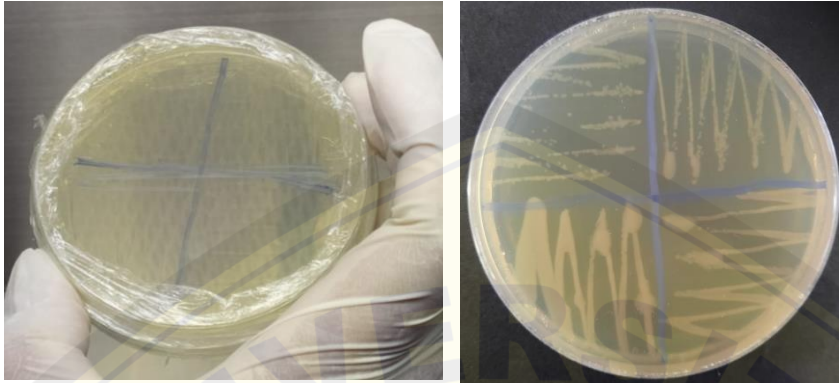


16) Kemudian akan muncul jendela info yang berisi hasil perhitungan yang telah dilakukan. File bisa disimpan dengan format “.txt” sehingga bisa dibuka dengan software seperti notepad, atau Microsoft Word.



Lampiran 3.3 Dokumentasi Penelitian

a. Penumbuhan bakteri



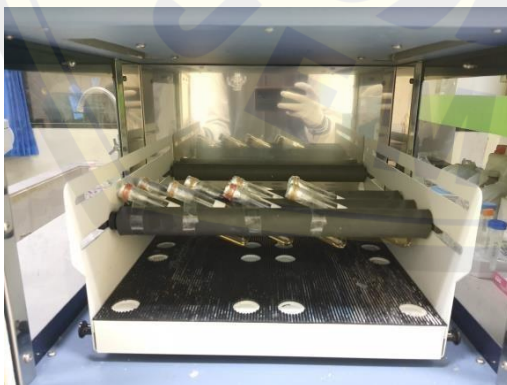
Pertumbuhan koloni bakteri transforman E.-coli strain BL21 (DE3) dari stok gliserol pada media LB padat

b. Pembuatan media LB cair



Pembuatan media LB cair pada tabung erlenmeyer

c. Proses pembuatan starter kultur



Inkubasi starter kultur selama 16 jam di dalam shaker incubator bersuhu 37 °C dengan kecepatan 155 RPM

d. Pemandahan starter kultur ke 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 selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4°C.

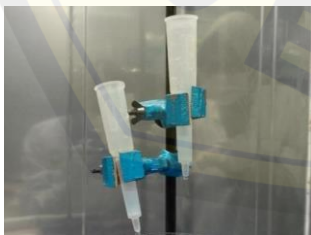


f. Ekstraksi protein rekombinan



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

g. Purifikasi protein rekombinan



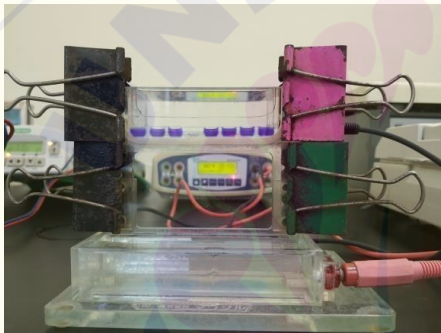
Proses purifikasi protein rekombinan dengan metode kromatografi afinitas

h. Penyimpanan protein rekombinan



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

i. Elektroforesis dengan SDS-PAGE

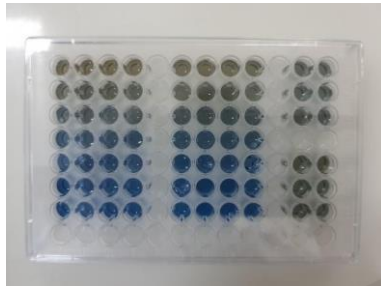


Proses running SDS-PAGE dengan voltase 50 V selama 1 jam untuk stacking/upper gel dan 80 V selama 3 jam untuk separation/lower gel



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

j. Pengukuran konsentrasi protein rekombinan



Proses pembuatan kurva standar *Bradford* protein assay menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA). Proses pengukuran konsentrasi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1

k. Perlakuan pada hewan coba



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

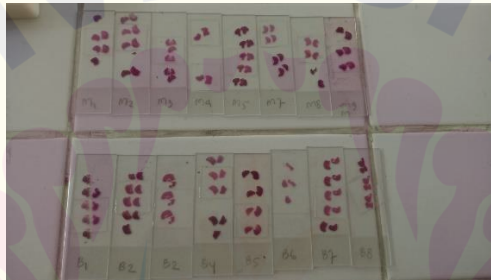


Proses injeksi protein rekombinan DBL β 2-PfEMP1 (kelompok perlakuan) dan NaCl 0,9% (kelompok kontrol) secara subkutan pada hewan coba



Proses terminasi hewan coba pada hari ke-56 pasca imunisasi primer menggunakan kombinasi ketamine-xylazine

- l. Proses pembuatan preparat histologi



Preparat diwarnai dengan menggunakan hematoxylin dan eosin.

- m. Proses penghitungan jumlah sel mikroglia



Proses penghitungan jumlah sel mikroglia menggunakan software Fiji ImageJ

Lampiran 3.4 Tabel Pengukuran Berat Badan Hewan Coba

Kelompok	Hewan Coba	Sebelum Aklimatisasi (g)	Sesudah Aklimatisasi (g)	Saat Injeksi Primer (g)	Saat Injeksi Sekunder 1 (g)	Saat Injeksi Sekunder 2 (g)
Kelompok Kontrol	1	128	121	150	167	208
	2	133	144	182	195	223
	3	127	126	177	177	205
Kelompok Perlakuan1 (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$)	1	113	148	178	228	253
	2	138	160	189	225	252
	3	143	195	222	247	282
	4	134	183	212	231	246
Kelompok Perlakuan2 (Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{KgBB}$)	1	136	171	195	208	230
	2	132	155	182	217	236
	3	119	154	191	195	206
	4	139	183	200	213	236
Kelompok Perlakuan3 (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 Tabel Penghitungan Dosis Setiap Hewan Coba

Kelompok	Hewan Coba	Penghitungan Dosis $\frac{\text{Berat tikus}}{\text{BB ideal}} \times \text{Dosis target}$	$\frac{\text{Dosis } (\mu\text{g})}{\text{Konsentrasi } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$	Jumlah Protein yang Diinjeksikan (μl)
Kelompok Perlakuan 1 (Dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	1	$\frac{178}{200} \times 100 = 89$	$\frac{89}{2}$	44,5
	2	$\frac{189}{200} \times 100 = 94,5$	$\frac{94,5}{2}$	47,25
	3	$\frac{222}{200} \times 100 = 111$	$\frac{111}{2}$	55,5
	4	$\frac{212}{200} \times 100 = 106$	$\frac{106}{2}$	53
Kelompok Perlakuan 2 (Dosis 150 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	5	$\frac{195}{200} \times 150 = 146,25$	$\frac{146,25}{2}$	73,125
	6	$\frac{182}{200} \times 150 = 136,5$	$\frac{136,5}{2}$	68,25
	7	$\frac{191}{200} \times 150 = 143,25$	$\frac{143,25}{2}$	71,625
	8	$\frac{200}{200} \times 150 = 150$	$\frac{150}{2}$	75
Kelompok Perlakuan 3 (Dosis 200 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	9	$\frac{200}{200} \times 200 = 200$	$\frac{200}{2}$	100
	10	$\frac{178}{200} \times 200 = 178$	$\frac{178}{2}$	89
	9	$\frac{234}{200} \times 200 = 234$	$\frac{234}{2}$	117
	10	$\frac{197}{200} \times 200 = 197$	$\frac{197}{2}$	98,5

Lampiran 4.1 Hasil Uji Statistik Jumlah Sel Kupffer

a. Uji normalitas *Saphiro-Wilk*

Tests of Normality

Jumlah Sel Kupffer	Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	Kontrol	.175	3	.	1.000	3	1.000
	Dosis 100	.283	4	.	.863	4	.272
	Dosis 150	.294	4	.	.851	4	.230
	Dosis 200	.218	4	.	.977	4	.881

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji homogenitas *Levene*

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel Kupffer		Levene Statistic			Sig.
		Statistic	df1	df2	
	Based on Mean	1.411	3	11	.292
	Based on Median	1.268	3	11	.333
	Based on Median and with adjusted df	1.268	3	5.259	.376
	Based on trimmed mean	1.391	3	11	.297

c. Uji *ANOVA*

ANOVA

Jumlah Sel Kupffer					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	666.583	3	222.194	6.851	.007
Within Groups	356.750	11	32.432		
Total	1023.333	14			

d. Uji *Post Hoc Tukey*

Jumlah Sel Kupffer

Tukey HSD^{a,b}

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol	3	23.000	
Dosis 150	4	30.500	30.500
Dosis 100	4	32.500	32.500
Dosis 200	4		42.250
Sig.		.165	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel Kupffer

Tukey HSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Dosis 100	-9.5000	4.3495	.187	-22.590	3.590
	Dosis 150	-7.5000	4.3495	.357	-20.590	5.590
	Dosis 200	-19.2500*	4.3495	.005	-32.340	-6.160
Dosis 100	Kontrol	9.5000	4.3495	.187	-3.590	22.590
	Dosis 150	2.0000	4.0269	.958	-10.119	14.119
	Dosis 200	-9.7500	4.0269	.130	-21.869	2.369
Dosis 150	Kontrol	7.5000	4.3495	.357	-5.590	20.590
	Dosis 100	-2.0000	4.0269	.958	-14.119	10.119
	Dosis 200	-11.7500	4.0269	.058	-23.869	.369
Dosis 200	Kontrol	19.2500*	4.3495	.005	6.160	32.340
	Dosis 100	9.7500	4.0269	.130	-2.369	21.869
	Dosis 150	11.7500	4.0269	.058	-.369	23.869

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

e. Uji Cronbach- α

Reliability Statistics	
Cronbach's Alpha	N of Items
.724	2