



IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) GEN THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN (TRAP)* PADA PENDERITA MALARIA *FALCIPARUM* DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG

Muhammad Irfan Adi Shulhan¹, Betta Kurniawan², Gigih Setiawan³

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

²Bidang Ilmu Parasitologi-Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

³Bidang Ilmu Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Corresponding Author: Muhammad Irfan Adi Shulhan, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.

E-Mail: cmsulhan1@gmail.com

Received 27 November 2021; **Accepted** 05 Desember 2021; **Online Published** 28 Januari 2022

Abstrak

Malaria is a disease caused by the *Plasmodium* parasite in erythrocytes as evidenced by positive microscopic examination, there are antigens, and the discovery of *Deoxyribo Nucleid Acid / Ribonucleid Acid (DNA / RNA) Plasmodium* parasite on *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Plasmodium falciparum* is one of the most deadly species of malaria, and there are many genes that support this parasite to infect, so there are so many genetic variations produced by one gene. This type of research uses a survey research design with descriptive method. The study sample was obtained from 18 *Stored Archived Biological Materials (ABM)*. This research was conducted using the PCR method which was analyzed by gel electrophoresis and continued to the sequencing method to detect genetic variations of the *Plasmodium falciparum Thrombospondin-related anonymous protein (PfTRAP)* gene. There were 18 samples that had been carried out nested PCR, then obtained variations in the length of the band in each sample. There are single nucleotide polymorphism in the *Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)* gene.

Keywords: malaria; *plasmodium falciparum thrombospondin-related anonymous protein (PfTRAP)*; *polymerase chain reaction (PCR)*; *sequencing*.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* yang berada di dalam eritrosit dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskopis yang positif, terdapat antigen, serta ditemukannya *Deoxyribo Nucleid Acid/ Ribonucleid Acid*

(DNA/RNA) parasit *Plasmodium* pada pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Infeksi malaria dapat menyebabkan gejala demam, menggigil, anemia, dan splenomegali. Penyakit malaria merupakan masalah kesehatan terbesar pada daerah tropis dan subtropis seperti Brazil, seluruh sub-saharaAfrika dan

Asia Tenggara karena dapat mempengaruhi angka kesakitan pada bayi, balita, dan ibu yang melahirkan.^{1,2}

Menurut laporan *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2016 terdapat 445.000 kematian akibat malaria yang sebelumnya pada tahun 2015 sampai angka 446.000. Serta pada tahun 2016 terdapat negara yang bebas dari penyakit malaria yaitu negara Kyrgyzstan dan Sri Lanka, negara tersebut sudah mendapat sertifikat bebas malaria dari WHO. Komitmen global ingin memberantas malaria yakni dengan cara mensukseskan *Sustainable Development Goals* (SDG's) serta WHO telah mendeteksi negara yang berpotensi untuk dapat menghilangkan kasus malaria di negaranya yang disebut sebagai negara E-2020.³

Angka kasus kejadian malaria ditentukan dengan *Annual parasite incidence* (API) per tahun, API merupakan indikator jumlah kasus positif malaria per 1000 penduduk dalam satu tahun, API pada tahun 2015 yaitu sebesar 0,85. Angka tersebut dari tahun 2011 ke tahun 2015 mengalami penurunan yaitu pada tahun 2011 angka API sebesar 1,75 per 1000 penduduk, sedangkan pada tahun 2012 sebesar 1,69 per 1000 penduduk, lalu pada tahun 2013 sebesar 1,38 per 1000 penduduk, dan menurun tajam pada tahun 2014 sebesar 0,99 per 1000 penduduk. Dengan provinsi Papua menduduki peringkat pertama yaitu 31,93 per 1000 penduduk, sementara provinsi Lampung 0,49 per 1000 penduduk.⁴

Malaria terbagi dalam beberapa spesies yang dapat ditemukan pada tubuh manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*, serta *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium knowlesi* yang selama ini ada pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) kini ditemukan pada tubuh manusia. *Plasmodium falciparum* merupakan

penyebab infeksi terberat pada spesies *Plasmodium* karena dapat menyebabkan manifestasi akut. Bila tidak diobati maka pasien malaria dapat menyebabkan kematian.^{5,6}

Infeksi malaria dimulai pada tahap sporozoit yang terinjeksi ke dalam pembuluh darah manusia oleh nyamuk *Anopheles* betina. Sporozoit secara cepat bergerak ke hati untuk menginfeksi hepatosit atau sel hati, terdapat gen yang berperan yaitu *Thrombospondin-related Anonymous Protein* atau *Thrombospondin-related Adhesive Protein* (TRAP). Antigen tersebut disimpan dalam *miconemes* dan akan muncul ke permukaan ketika *Proboscis* nyamuk sudah menusuk ke dalam kulit sehingga sporozoit dapat menginfeksi hepatosit. TRAP mempunyai peranan penting dalam menginfeksi hepatosit karena dapat memberikan energi ke parasit sporozoit dan dapat mengaku sebagai antibodi tubuh sehingga proses imun tidak bekerja lalu dapat segera menginfeksi hepatosit.⁷

Pencegahan penularan secara endemis dapat digunakan vaksin malaria yang diambil dari gen *Thrombospondin-related Anonymous Protein* atau vaksin TRAP merupakan subunit vaksin setelah *Circumsporozoit Protein* (CSP). Kedua antigen tersebut bekerja pada penyakit malaria pada stadium sporozoit, bila pada darah dalam bentuk merozoit berupa *Merozoit Surface Protein-1* (MSP-1), *Apical Membrane Antigen-1* (AMA-1), dan *Reticulocyte binding like-protein homologue-5* (RH-5). Vaksin TRAP merupakan virus-vektor vaksin atau vaksin dengan perantara virus menggunakan tipe adenovirus, tujuan pembuatan vaksin TRAP yaitu untuk menghambat pergerakan Infeksi *Plasmodium falciparum* pada stadium *sporozoit* menunjukkan peningkatan gen TRAP, sebagai respon vaksin TRAP secara alami dapat memblokir pemberian energi dari gen

TRAP. Antigen TRAP (subunit vaksin) merupakan desain peptida yang berdasarkan gen TRAP.^{8,9}

ISI

METODE PENELITIAN

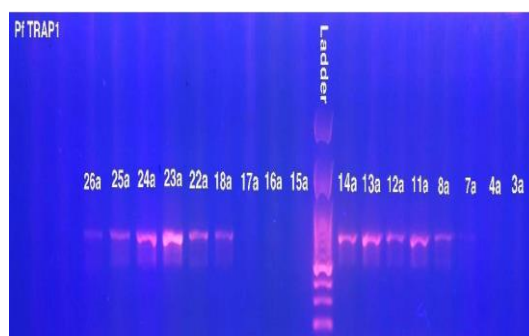
Pengambilan sampel dilakukan di Puskesmas Hanura, Pesawaran pada tahun 2016. Isolasi DNA dan PCR dilakukan di Laboratorium Biokimia Biologi Molekuler dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sekuensing dilakukan pada laboratorium layanan sekuensing di Singapura. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 sampai Maret 2019.

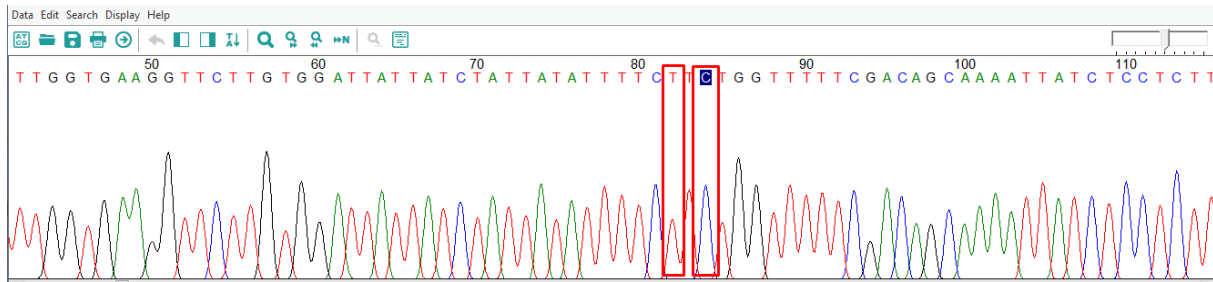
Sampel yang digunakan adalah berupa bahan biologi tersimpan (BBT) dari penelitian sebelumnya yang diambil pada tahun 2016. Dari 53 sampel yang ada, terdapat 18 sampel yang memenuhi kriteria untuk dilanjutkan hingga tahap PCR. Kemudian 2 sampel terbaik dilanjutkan hingga tahap sekuensing. Adapun karakteristik sampel penelitian yang digunakan adalah DNA yang terdapat pada BBT yang dapat diperiksa dengan PCR. Tahap ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan KIT

DNA sesuai dengan protokol pabrikannya (Geneaid; Taiwan) kemudian hasil ekstraksi disimpan dalam aliquot pada suhu -20°C.

Pada tahap amplifikasi dengan PCR, digunakan sepasang primer (*forward* dan *reverse*) yang merujuk dari penelitian Jun Ohasi pada tahun 2014. Pasangan primer digunakan untuk satu kali reaksi, yaitu 5'-GTTGTTGTGTATTTCACT ATAT-3'(*forward*) dan 5'-GAAACAAAGTGACCCCAAA-3'(*reverse*). Suhu pre-denaturasi 95°C/600 detik sebanyak 40 siklus, denaturasi, 95°C/30 detik sebanyak 1 siklus, *annealing* 56°C/30detik sebanyak 1 siklus, *extension* 72°C/45 detik dengan 1 siklus, dan *final extension* 72°C/420 detik dengan 1 siklus.⁹

Setelah tahap amplifikasi dengan PCR, sampel dilanjutkan ke tahap elektroforesis untuk melihat panjang *band* target gen TRAP. Setelah dianalisis dengan elektroforesis, dua sampel terbaik selanjutnya di sekuensing untuk memastikan sekuens sampel target. Hasil sekuensing kemudian dibaca dengan bantuan *software* MEGA X.





Gambar 2. Perbandingan hasil multiple alignment dengan elektroferogram

Didapatkan gambar elektroferogram pada sampel pada urutan basa ke 82 dan 84 dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan gambaran elektroferogram basa Tianin (T) pada urutan 82 yang seharusnya Guanin (G) dan basa Sitosin (C) pada urutan 84 yang seharusnya Tianin (T) dengan dibuktikan tidak konfiden pada gambarannya. Setelah disamakan urutan basa sampel dengan isolat Thailand dan Malaysia memiliki kesamaan perubahan basa dengan *wild-type* pada posisi 82, 84, 144 dan 531. Hal ini menunjukkan bahwa sampel memiliki perubahan basa yang identik dengan isolat Thailand dan Malaysia.

Tabel 1. Posisi perubahan basa pada sampel

No	Posisi	Perubahan Basa Nukleotida
1.	82	G → T
2.	84	T → C
3.	144	C → G
4.	207	A → G
5.	531	C → C

PEMBAHASAN

Kasus malaria merupakan penyakit yang menginfeksi manusia dengan upaya pengendalian menjadi perbincangan dan komitmen global dalam MDGs dan penyakit ini biasanya berada di daerah tropis/subtropis dan mematikan. Di Puskesmas Hanura tercatat 1.915 kasus malaria dengan tidak ada catatan kematian, berarti penanganan kasus malaria di tingkat Puskesmas sudah berjalan dengan baik.¹⁰

Gen TRAP merupakan protein yang dikeluarkan pada sporozoit dan terdapat di semua spesies *Plasmodium*. Peranan gen TRAP sangat penting untuk proses invasi sel dan infektivitas secara *invivo* yaitu untuk bergerakinya sporozoit dengan cara meluncur, gen ini terletak di *micronemes* nyamuk *Anophelesspp*. Bagian ekstraselular dari gen TRAP berisi dua domain pelekat yaitu *von-Willebrand factor A-domain* (A-domain) dan *Thrombospondin type I repeat* (TSR) serta terdapat protein SM1 yang bisa mendeteksi protein pada kelenjar saliva.¹¹

Pada penelitian mengenai mutasi yang terjadi pada PfTRAP dapat dideteksi oleh protein SM1 yaitu gen TRAP di *A-domain* mengandung sebuah motif *Metal ion dependent adhesion site* (MIDAS) merupakan bagian terpenting pada sporozit untuk menginvasi melalui kelenjar saliva. Pada asam amino Thr₁₂₆ dimutasi menjadi alanin, invasi nyamuk melewati kelenjar saliva sangat berperan penting yaitu sekitar 80%, ikatan tersebut dapat membatalkan kemampuan protein untuk berikatan dengan saglin. Hasil tersebut dapat membuktikan interaksi antara gen TRAP *A-domain* dan kelenjar saliva atau saglin rekombinan.¹¹

Pada penelitian tentang mutagenesis dari PfTRAP dengan menggunakan kit dari Stratagene, Amerika Serikat. Mutasi yang ditemukan berada di 11 sampel dari 33 sampel yang letaknya di C42G, C55G, T131A, D162A, C205G, C212G, S251A, S285G, R307G, S416A, dan T479A. dilihat dari tempat mutasinya kebanyakan berada pada region *A-domain* yaitu diantara 38-232 bp, dan ada yang di TSR dan *Repeat region*.⁷

Studi penelitian yang dilakukan di Thailand pada tahun 2014 menemukan bahwa terdapat perubahan urutan asam nukleotida pada PfTRAP dan tersering di *A-domain* dan terdapat enam pengulangan alel P-N-P dan setiap alelnya di kode dengan motif CCAAATCCA. Hal ini juga sesuai dengan penelitian di London mengenai SSP2 yaitu terdapat mutasi di bagian *A-domain* pada tahun 1992 jadi dapat disimpulkan bahwa gen PfTRAP terdapat mutasi tersering di bagian *A-domain*.^{9,12}

Mekanisme infeksi terhadap sel host terkait pergerakan sporozoit yang meluncur membutuhkan hubungan transmembran dengan sitoskeleton parasit dan permukaan sel target. Bagian dalam gen TRAP yang sangat berperan untuk menginfeksi yaitu *A-domain* (*vonWillebrandfactor-A*) dan *thrombospondin-type I repeat* (TSR). Terjadinya mutasi di region *A-domain* dapat berpengaruh terhadap faktor kecepatan sporozit dapat bergerak langsung dan menembus sel hepar serta apabila terdapat konsentrasi yang tinggi atau rendah faktor *von Willebrand-A* dapat berakibat timbulnya gejala yaitu trombositopenia lalu terjadi penurunan platelet dalam darah serta pada mutasi di region *A-domain* dapat terjadi respon imunologis.^{13,14}

Pada penelitian William tahun 1992 didapatkan gen *Plasmodium falciparum Sporozoite Surface Protein-2* (PfSSP2) memiliki kesamaan pasangan basa dengan gen TRAP dengan kemiripan sekuens *N-terminal* atau *A-domain* sebesar 43% pada 281 asam amino serta sekuens *C-terminal* sebesar 56% pada 71 asam amino. PfSSP2 memiliki fungsi sama dengan PfTRAP yaitu sebagai pergerakan motilitas sporozoit dengan cara meluncur.¹²

Gen TRAP dengan gen SSP2 memiliki kesamaan pasang basa yang sama, dari beberapa putar optimisasi didapatkan bahwa heterolog dengan pendukung protokol *Chimpanzee adenovirus 63* (ChAd63) dan modifikasi vaksin anka virus (MVA) yang sudah pada tahap II uji klinis, Pada tahun 2017 vaksin RTS,S/AS01 sudah dalam tahap III uji

klinis diharapkan vaksin ini dapat berguna bagi seluruh dunia dan selesainya vaksin tidak dapat diestimasi untuk diproduksi masalnya.¹⁵

PfSSP2 mempunyai mekanisme yang sama dengan PfTRAP yang mana di keluarkan pada kelenjar saliva nyamuk mengandung urutan peptida pengikat glikonjugat tersulfasi dibutuhkan untuk menginvasi kedalam tubuh *host* oleh parasit *Plasmodium*, gen ini ditempatkan pada *micronemes* nyamuk sama seperti gen PfTRAP.¹²

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat variasi urutan dari basa gen PfTRAP yang diambil dari Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung. Dimana terdapat kemiripan gen diantara PfTRAP dengan PfSSP2 dengan membandingkan dengan isolat lain dari London, Thailand, Malaysia dapat diartikan bahwa terdapat penyebaran yang cukup signifikan dari tahun 1992 ke tahun 2016 dapat mencapai negara Malaysia. Dan sekarang telah diteliti di Indonesia bahwa terdapat persamaan genetik, hal ini merupakan *host* yang terinfeksi oleh *Plasmodium spp.* berpindah-pindah dan dihisap oleh nyamuk sehingga menyebabkan penularan dilokasi penghisapan serta juga berdampak pada kevariasian genetik parasit malaria yang terjadi karena terdapat peningkatan rekombinasi genetik dan polimorfisme parasit *Plasmodium*. Endemisitas infeksi malaria sangat luas dari belahan bumi utara hingga belahan bumi selatan diantara 640 lintang utara sampai 320 lintang selatan dengan penyebaran dalam ketinggian yang sangat bervariasi diantara 400 meter dibawah laut hingga 2.600 meter di atas

permukaan laut. Menurut spesiesnya *Plasmodium vivax* memiliki penyebaran yang sangat luas bahkan mencakup wilayah yang beriklim selain subtropis dan tropis yaitu iklim dingin. Sedangkan *Plasmodium falciparum* jarang ditemukan pada wilayah yang beriklim dingin.¹⁷

Penyakit infeksi malaria dipengaruhi oleh faktor iklim yaitu seperti curah hujan, temperatur, dan kelembapan dari suatu kawasan. Kawasan yang sangat cocok untuk tumbuh kembang nyamuk *Anopheles* yaitu iklim subtropis dan tropis. Temperatur dibawah 20° C (68°F) *Plasmodium falciparum* tidak bisa tumbuh karena tidak sesuai dengan siklus hidupnya, sehingga nyamuk *Anopheles* tidak bisa menularkan penyakit yang disebut malaria. Transmisi di benua Asia berada di bagian Asia Tenggara yaitu Thailand dan Indonesia serta di seluruh sub sahara Afrika. Kebanyakan penularan Thailand dan di Indonesia mempunyai kemiripan genetik sehingga dapat disimpulkan bahwa infeksi di dua negara tersebut disebabkan oleh genetik *Plasmodium* yang sama.¹⁷

Dalam sebuah studi membandingkan ukuran genom antara *Plasmodium falciparum*, dengan *Plasmodium vivax*, serta *Plasmodium knowlesi*. Dikatakan bahwa GC Content *Plasmodium falciparum* lebih kecil yaitu hanya 19,4% dibandingkan dengan *Plasmodium knowlesi* yaitu 37,5%. Hal ini mengakibatkan peneliti lebih banyak meneliti tentang *Plasmodium* ini karena terdapat kesalahan yang minimal serta *Plasmodium vivax* GC Content sebesar 42,3%. Hal ini berakibat para peneliti lebih

meneliti *Plasmodium vivax* dibandingkan dengan *Plasmodium falciparum* dan meneliti gen TRAP yang baru di teliti pada tahun 1992.^{12,16}

SIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah ditemukan *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada gen Thrombospondin-related Anonymous Protein *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi penderita malariadi wilayah kerja Puskesmas Pesawaran Provinsi Lampung yang mengalami mutasi genetik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harijanto PN. Malaria. Dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata, Setiati S, Syam AF. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Ed ke-6. Jakarta: Interna Publishing; 2014: 595-610.
2. Gusra T, Irawati N, Sulastri D. Penelitian gambaran penyakit malaria di Puskesmas Tarusan dan Puskesmas Balai Selasa Kabupaten Pesisir Selatan periode Januari - Maret 2013.2014. 3(2):234-7.
3. World Health Organization. World malaria report 2017. 2017. Switzerland
4. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. InfoDatin Malaria. Infodatin Malaria. 2017. (1)1-7. Jakarta.
5. Lukman H. Malaria: epidemiologi dan diagnosis. Aspirator. 2011. 3(2):107-16.
6. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Buku saku penatalaksanaan kasus malaria, Jakarta, Subdit Malaria Direktorat P2PTVZ. 2017.
7. Akhouri RR, Sharma A, Malhotra, Pawan, Sharma, Amit. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interaction. 2008. Malaria Journal. New Delhi; BioMed Central.
8. Kester KE, Heppner DG, Moris P, Anyinam OO, Krzych U, Tornieporth N, et al. Sequential phase 1 and phase 2 randomized, controlled trials of the safety, immunogenicity and efficacy of combined pre-erythrocytic vaccine antigens RTS,S and TRAP formulated with AS02 adjuvant system in healthy. 2014. Malaria Native Adults. Vaccine 32(49):6683-91.
9. Ohasi J, Suzuki Y, Naka I, Hananantachai H, Patarapotikul J. Diversifying selection on the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* in Thailand. 2014. PLoS ONE 9(2). Thailand; University of Tsukuba.
10. Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran. Profil kesehatan Kabupaten Pesawaran tahun 2016. 2016. Lampung.
11. Ghosh AK, Devenport M, Jethwaney D, Kalume DE, Pandey A, Anderson VE, et al. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the anopheles salivary proteins. 2009. PLoS Pathogens. 5(1):1-13
12. William OR, Anita M, Sylvie M, Kenichiro N, Miriam DR, Ana S, et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. Medical Science* 89(19):9176-180. 1992. University of Pittsburgh. USA
13. Tero P, Tommi K, Juho K, Kaisa H, Amit S, Perttu P. Structure of *Plasmodium falciparum*

- TRAP (thrombospondin related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von willebrand factor A homologues. *Biochem Journal* 450(3):469-73. 2013. New Delhi. India
14. Kathryn JHR, Jennifer RS, Ceri DL, Andrea C, VSH Adrian. EW Thomas. Polymorphism of the TRAP gene of plasmodium falciparum. *Proc. R. Soc. Lond. B* 242(1305). 1990. London
 15. Abdullah E, Idris A. and Saparon A. Vaccines against malaria - still a long way to go. 2017. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*. 12(10):3218-21.
 16. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4(1):1-10. 2012.
 17. Sutarto, Chania E. Faktor lingkungan perilaku dan penyakit malaria. 2014. *Jurnal Agromed Unila* 4(1):1-12. Lampung.