



IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) PADA GEN *CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN Plasmodium falciparum* DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

Diah Balqis Ikfi Hidayati¹, Betta Kurniawan², Hanna Mutiara³

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

^{2,3}Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Corresponding Author: Diah Balqis Ikfi Hidayati, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

E-mail: diahbalqis@gmail.com

Abstrak

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium sp.* Pengobatan penyakit malaria menggunakan *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) dapat menyebabkan resistensi sehingga diperlukan upaya baru untuk menurunkan angka kesakitan malaria. Sebuah metode pencegahan yang lebih baik untuk mencegah kejadian malaria adalah menggunakan vaksin. Vaksin RTS,S/AS01 merupakan vaksin malaria generasi pertama yang telah diterapkan di Ghana, Kenya dan Malawi sejak awal tahun 2018. Vaksin tersebut terdiri dari komponen antigen *circumsporozoite protein* (CSP). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya SNP pada *protein* yang berguna sebagai basis data variasi genetik untuk pengembangan vaksin di Indonesia. Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survey dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) sebanyak 53 sampel yang akan diperiksa dengan menggunakan metode PCR dan dilanjutkan dengan proses sekuensing untuk mendeteksi adanya SNP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya 16 sampel yang memiliki konsentrasi DNA yang tinggi dan hasil sekuensing tidak menunjukkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida dibandingkan dengan referensi pada isolat Pf3D7 dari *Gene Bank*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat SNP pada gen CSP *Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

Keywords: *circumsporozoite protein, single nucleotide polymorphism, Plasmodium falciparum*, vaksin malaria

PENDAHULUAN

Malaria merupakan permasalahan kesehatan yang ada di dunia dan umumnya terjadi di daerah yang beriklim tropis maupun subtropis. Pada tahun 2016, tercatat adanya 216 juta kasus malaria yang terjadi di 91 negara. Angka kematian malaria di dunia pada tahun 2016 mencapai 445.000 jiwa.¹

Malaria juga merupakan salah satu permasalahan kesehatan yang ada di Indonesia. Morbiditas malaria pada suatu daerah di Indonesia ditentukan menggunakan *Annual Parasite Incidence* (API) per tahun. Nilai API berasal dari jumlah kasus positif malaria per 1.000 penduduk dalam satu tahun. Provinsi Lampung merupakan salah satu daerah endemis malaria dengan nilai API 0,49 per 1.000 penduduk per tahun. Morbiditas malaria paling banyak ditemukan di Kabupaten Pesawaran dan jumlah kasus baru terus-menerus menetap dan tidak mengalami penurunan yang signifikan pada kabupaten tersebut.^{2,3}

Upaya untuk menekan angka kesakitan dan kematian malaria dilakukan melalui program pemberantasan malaria yang mencakup diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, serta surveilans dan pengendalian vektor dalam hal pendidikan masyarakat tentang kesehatan lingkungan. Pengobatan anti malaria yang saat ini digunakan dalam program nasional adalah *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) dengan derivat artemisinin dan golongan aminokuinolon.⁴

Namun pengobatan menggunakan obat anti malaria menjadi semakin kompleks karena meningkatnya kejadian resistensi. Maka dari itu perlu adanya pengembangan metode pencegahan yang lebih baik menggunakan vaksin.⁵

Malaria Vaccine Initiative (MVI) telah meluncurkan vaksin malaria generasi pertama yang diberi nama RTS,S/AS01 pada tahun 2015. Kementerian Kesehatan Ghana, Kenya, dan Malawi bersama dengan WHO menerapkan vaksin tersebut pada tahun 2018.⁶

Antigen *circumsporozoite protein* (CSP) sebagai komponen vaksin RTS,S/AS01 berada pada permukaan sporozoit memiliki peran penting dalam proses invasi ke sel hepatosit melalui ikatan dengan heparin sulfat. Protein yang berada pada permukaan sporozoit akan memicu respon imunitas humoral yang mencegah terjadinya infeksi.^{7,8}

Sampai saat ini data mengenai keragaman genotip *Plasmodium falciparum* di Indonesia masih sangat terbatas, khususnya Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung dengan lokasi endemis malaria yang angka kesakitannya tidak bisa ditekan dengan menggunakan obat anti malaria. Mengingat potensi gen CSP sebagai pengembangan vaksin dan agar terdapat basis data variasi genetik pada CSP *Plasmodium falciparum* di Provinsi Lampung maka perlu dilakukan suatu penelitian. Penelitian tersebut mengenai identifikasi SNP pada gen CSP *Plasmodium falciparum* dari penderita

malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Biologi Molekular, dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Desember 2018 sampai Maret 2019.

Subjek yang digunakan dalam penelitian adalah bahan biologi tersimpan (BBT) dari sampel darah penderita positif malaria *falciparum* di wilayah kerja Puskesmas Hanura yang telah diambil pada tahun 2016.

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahapan, yaitu isolasi DNA, amplifikasi gen CSP dengan PCR, pembacaan hasil PCR melalui elektroforesis, dan proses sekuensing. Isolasi DNA menggunakan *GeneAid Extraction Kit* dan amplifikasi PCR menggunakan *MyFi DNA Polymerase*.

Pada tahap PCR terjadi tiga proses utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension* yang dilakukan sebanyak 35. Suhu dan waktu yang dibutuhkan pada tahap predenaturasi yaitu 95°C selama 5 menit; 95°C selama 30 detik untuk denaturasi; 52 °C selama 30 detik untuk *annealing*; 72 °C selama 60 detik untuk tahap *extension*; dan 72 °C selama 10 menit pada tahap *final extension*. Adapun primer yang digunakan adalah GTTGAGGCCTTTTCCAGGAATACCA G sebagai *forward primer* dan

GTACAACTCAAACCTAAGATGTGTTC sebagai *reversed primer*.⁹

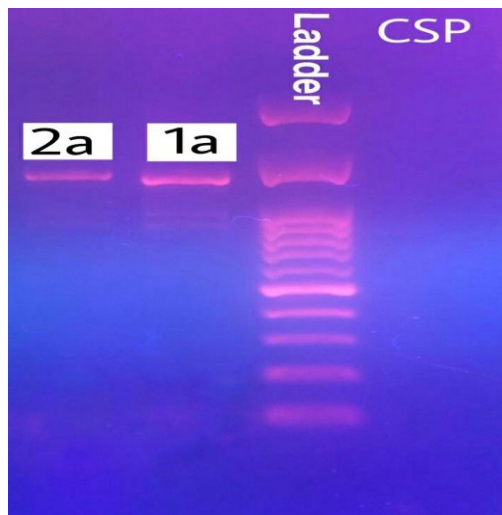
Kemudian hasil produk PCR terbaik dilakukan sekuensing dan dianalisis menggunakan software MegaX.

HASIL PENELITIAN

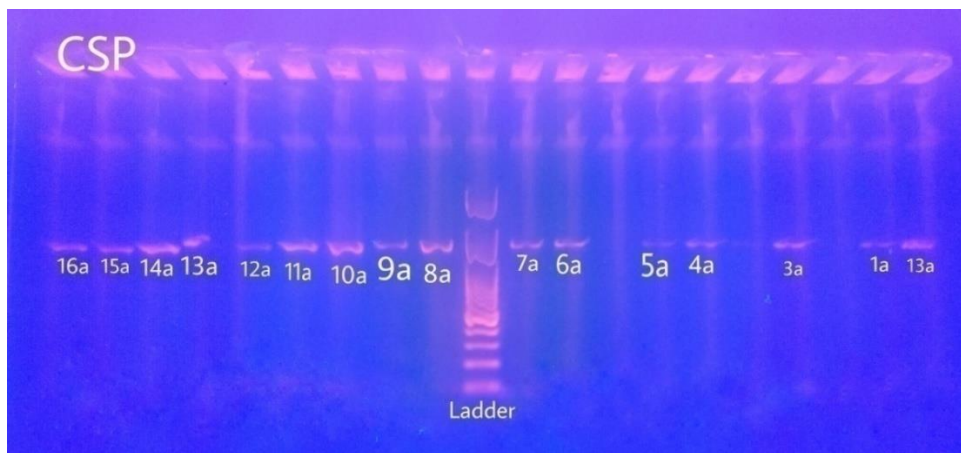
Bahan biologi tersimpan yang berupa 53 *whole blood* telah berhasil diekstraksi dengan volume hasil ekstraksi 50µL per sampel. Kemudian sampel hasil ekstraksi tersebut dicek pada nanofotometer untuk melihat nilai konsentrasi DNA dan rasio absorbansinya, lalu dilakukan visualisasi dengan elektroforesis. Pita yang teridentifikasi dari hasil elektroforesis produk ekstraksi hanya ada pada 16 sampel.

Selanjutnya 16 sampel tersebut diamplifikasi dengan menggunakan PCR dengan diberi tambahan label "a" pada setiap sampel untuk membedakan dari *drop out* sampel sebelumnya. Hasil sampel yang telah diamplifikasi berjumlah 16 buah dengan volume tiap *tube* adalah 25 µL. Kemudian hasil amplifikasi dibaca melalui proses elektroforesis. Panjang pita yang diperoleh dari hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.

Analisis panjang basa dari pita yang muncul pada sampel dibandingkan dengan *DNA marker*. Dari gambar 1 dan 2 terdapat pita DNA berukuran 1335 bp. Maka sampel



Gambar 1. Elektroforesis Hasil Optimasi PCR



Gambar 2. Elektroforesis Hasil Amplifikasi PCR pada Sampel

tersebut memiliki panjang DNA gen CSP. Dari hasil PCR ini semua sampel (16 sampel) terdapat pita DNA berukuran 1335 bp. Setiap pita yang muncul pada sebuah sampel memiliki panjang basa yang spesifik, panjang basa ini menjadi tolak ukur variasi pada gen CSP.

Untuk memastikan target nukleotida yang benar, telah dilakukan sekuensing pada dua sampel terbaik yaitu sampel 1a dan 2a. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan software MegaX. Namun setelah melihat hasil elektroferogram dari

kedua sampel, urutan basa nukleotida tidak seluruhnya terbaca dikarenakan konsentrasi *yield* DNA yang rendah. Pada sampel 1a *forward* hasil sekuens basa hanya dapat terbaca pada urutan basa ke 72-234 sedangkan pada sampel 2a *forward* sekuens basa dapat terbaca pada urutan basa ke 73-340. Dengan panjang basa tersebut, hasil *multiple alignment* tidak menunjukkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida dibandingkan dengan referensi isolat Pf3D7 dari *Gen Bank*. Hasil *multiple alignment* ini dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil *Multiple Alignment* Sampel 1a dan 2a *Forward* dengan Isolat Pf3D7

Pada sampel 1a *reverse* hasil sekuens basa hanya dapat terbaca pada urutan basa ke 798-1196 sedangkan pada sampel 2a *reverse* sekuens basa dapat terbaca pada urutan basa ke 797-1195. Dari hasil *multiple alignment*

kedua sampel tersebut juga tidak menunjukkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida dengan referensi isolat Pf3D7 dari *Gen Bank*. Hasil *multiple alignment* pada sampel *reverse* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil *Multiple Alignment* Sampel 1a dan 2a *Reverse* dengan Isolat Pf3D7

PEMBAHASAN

Enam belas sampel yang terkualifikasi dinilai dari kualitas DNA ekstrak yang diperoleh. Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansinya. Molekul DNA dikatakan murni apabila rasio absorbansinya berkisar antara 1,8-2,0. Hasil pemeriksaan nanofotometer pada seluruh sampel menunjukkan adanya konsentrasi DNA yang rendah dan nilai absorbansi yang tidak berada pada rasio kemurnian DNA yang baik. Hal ini berdampak pada hasil elektroforesis yaitu pita yang muncul hanya ada pada 16 sampel dari 53 sampel. Semakin tinggi konsentrasi DNA yang didapatkan maka pita yang terbentuk akan semakin tebal dan terang.^{10,11}

Kemudian 16 sampel tersebut dilakukan amplifikasi pada PCR dan dilakukan sekuensing pada dua sampel terbaik. Pada penelitian ini diketahui bahwa tidak terdapat adanya perbedaan susunan basa nukleotida pada sekuens isolat Pesawaran setelah dilakukan *multiple alignment* dengan gen referensi isolat Pf3D7. Tidak adanya SNP pada gen CSP isolat Pesawaran dapat terjadi dikarenakan karena kondisi geografis Kabupaten Pesawaran yang dikelilingi perbukitan. Kabupaten Pesawaran juga merupakan wilayah pesisir pantai bagian selatan.¹²

Puskesmas Hanura terletak di Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran. Wilayah kecamatan ini

terbentang di sepanjang pesisir pantai selatan Lampung dengan ketinggian kurang dari lima puluh meter dari permukaan laut hingga daerah perbukitan. Pada bagian utara Kecamatan Teluk Pandan terdapat deretan Bukit Barisan yang menjadikan kecamatan ini terpisah dari kecamatan lainnya.¹²

Kondisi geografis yang dikelilingi perbukitan menjadi *barrier* geografis penyebaran nyamuk *Anopheles sp.* Nyamuk *Anopheles sp.* hanya bisa terbang maksimal sejauh 3 km dan tidak bisa mendaki bukit.¹³

Untuk menuju lokasi ini hanya dapat diakses melalui satu jalur masuk yaitu melalui Kota Bandar Lampung. Hal tersebut telah membatasi mobilitas penduduk maupun pendatang dari luar sehingga kemungkinan terjadinya perkawinan, pembauran gen parasit, dan penyebaran gen yang cepat dan luas sangat jarang terjadi.^{12,14}

Populasi yang dipisahkan oleh geografis akan menyebabkan hambatan penyebaran spesies, maka tidak akan terjadi pertukaran susunan gen dalam sistem populasi. Keadaan fisik ekologis yang mencegah terjadinya perpindahan-perpindahan spesies tertentu melewati batas ini tidak akan menyebabkan terjadinya *gene flow*.¹⁵

Tidak adanya variasi pada gen CSP isolat Pesawaran juga didukung oleh penelitian Bowman *et al.*, yang menyatakan perbandingan variasi gen yang terjadi antara wilayah perkotaan dan wilayah periurban yang menunjukkan perbedaan jarak

pasangan genetik yang lebih tinggi menunjukkan heterozigositas tingkat tinggi (kisaran: 0,78-0,86). Alel lebih banyak terlihat di wilayah perkotaan karena wilayah perkotaan memiliki banyak mutagen (agen mutasi). Sebagian besar mutagen adalah bahan fisika, kimia atau biologi yang memiliki daya tembus yang kuat sehingga dapat mencapai bahan genetika dalam inti sel.¹⁶

SIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu tidak terdapat SNP pada gen *circumsporozite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. World malaria report 2017. Switzerland: WHO Library Cataloguing Data; 2017.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Infodatin malaria. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI; 2016.
3. Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung. Profil kesehatan Provinsi Lampung tahun 2015. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung; 2015.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 5 tahun 2013 tentang pedoman tatalaksana malaria. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
5. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd Edition. Italy: WHO Library Cataloguing Data; 2015.

6. Malaria Vaccine Initiative. First-generation vaccine [internet]. 2017; [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/first-generation-vaccine>.
7. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James AR, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* [internet]. 2011; [diunduh 13 desember 2017]. Tersedia dari: <http://jem.rupress.org>.
8. Swearingen KE, Lindner SE, Shi L, Shears MJ, Harupa A, Hopp CS, et al. Interrogating the plasmodium sporozoite surface: identification of surface-exposed proteins and demonstration of glycosylation on CSP by mass spectrometry-based proteomics. *PLOS Pathogens*. 2016; 12(4):e1005606.
9. Gandhi K, Thera MA, Coulibaly D, Traore K, Guindo AB, Ouattara A, et al. Variation in the circumsporozoite protein of plasmodium falciparum: vaccine development implications. *PLOS ONE*. 2014; 9(7):1-9.
10. Mustafa H, Rachmawati I, dan Udin Y. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA genom nyamuk *Anopheles barbirostris*. *Jurnal Vektor Penyakit*. 2016; 10(1): 7-10.
11. Sambrook J dan Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Edisi ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
12. Pemerintah Daerah Kabupaten Pesawaran. Kecamatan dan Desa [internet]. 2018; [Diakses tanggal 7 April 2019]. Tersedia dari: <http://www.pesawarankab.go.id>.
13. Heelan JS dan Ingersoll FW. *Essential of human parasitology*. Albany (NY): Delmar Thomson Learning, Inc; 2002.
14. Kurniawan B. Hubungan polimorfisme gen Pfk13 dengan respon terapi ACT penderita malaria falciparum di Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung [disertasi]. Padang: Universitas Andalas; 2017.
15. Widodo, Umie L, dan Amin M. *Bahan Ajar Evolusi*. Malang: Departemen Pendidikan Nasional; 2007.
16. Bowman NM, Congdon S, Mvalo T, Patel JC, Escamilla V, Emch M, et al. Comparative population structure of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein NANP repeat lengths in Lilongwe, Malawi. *Sci Rep*. 2013; 3:1-8.