

Identifikasi Gen *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein (Pfglurp) dari Penderita Malaria di Wilayah Kerja Puskesmas Hanura Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung

Rachman Aziz¹, Betta Kurniawan², Hanna Mutiara², Jhons Fatriyadi Suwandi²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Plasmodium falciparum merupakan salah satu jenis Plasmodium pada malaria dan memiliki kecenderungan resisten terhadap obat antimalaria yang disebabkan adanya variasi genetik. *Glutamate Rich Protein (GLURP)* adalah salah satu petanda genetik yang terdapat pada *Plasmodium falciparum*. Pemeriksaan yang dilakukan berbasis biologi molekuler sudah banyak diteliti untuk mendiagnosis malaria secara spesifik dan akurat diantaranya *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survei dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT). Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode PCR untuk mendeteksi adanya variasi genetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel telah berhasil dilakukan *nested PCR* dengan hasil terdapat variasi genetik. Terdapat variasi genetik gen PFGLURP yang ditemukan pada wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.

Kata Kunci: *Plasmodium falciparum*, Variasi Genetik, PCR.

Identification Gene ff *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein (Pfglurp) From Malaria Patients in Working Area Primary Health Care of Hanura Pesawaran Regency Lampung Province

Abstract

Plasmodium falciparum is one type of Plasmodium in malaria and has a tendency to be resistant to antimalarial drugs due to genetic variation. Glutamate Rich Protein (GLURP) is one of the genetic markers found in *Plasmodium falciparum*. Examinations conducted on the basis of molecular biology have been widely studied to diagnose malaria specifically and accurately include Polymerase Chain Reaction (PCR). This type of research uses survey design and descriptive design. The study sample was obtained from Saved Biology Material (BSM). Examination was performed using PCR method to detect genetic variation. The results showed that the sample was successfully performed by nested PCR with the result of genetic variation. There are genetic variations of the PFGLURP gene found in the working area of Puskesmas Hanura, Pesawaran Regency, Lampung Province.

Keywords: Genetic Variation, *Plasmodium falciparum*, PCR.

Korespondensi: Rachman Aziz, alamat Jln. Meranti Gunung No. 11, Gunung camang, Tanjung Gading, Bandar Lampung, HP 082176840167, e-mail rachman.aziz29@gmail.com

Pendahuluan

Di Indonesia, malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat. Malaria tersebar di seluruh pulau dengan endemisitas yang berbeda-beda dan dapat terjadi di daerah dengan ketinggian sampai 1800 meter di atas permukaan laut. Angka kesakitan malaria cukup tinggi, terutama di luar Jawa dan Bali yang disebabkan adanya campuran penduduk yang berasal dari daerah endemis dan non-endemis malaria yang menetap di daerah tersebut.¹

Wilayah Indonesia memiliki nilai *Annual Parasit Incidence* (API) yang berbeda-beda. Pada tahun 2015 peringkat tertinggi terdapat di Papua (31,93) diikuti oleh Papua Barat (31,29), NTT (7,04) dan seterusnya.² Lampung sebagai salah satu daerah di Indonesia bagian barat yang belum terbebas dari penyakit malaria berada di posisi ke-12 (0,49) dari seluruh provinsi di Indonesia.³

Masalah penting yang berhubungan dengan pengobatan malaria adalah resistensi obat. Resistensi obat malaria adalah kemampuan dari parasit untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun dengan dosis yang lebih tinggi yang masih bisa diterima oleh pemakai obat.⁴ Parasit *Plasmodium falciparum* mempunyai kecenderungan menjadi resisten terhadap obat antimalaria dibandingkan spesies yang lain. Efektivitas yang rendah dan gagal pengobatan pada *Plasmodium falciparum* dapat disebabkan oleh parasit yang resisten terhadap obat antimalaria atau infeksi baru.^{4,5}

Plasmodium falciparum memiliki petanda genetik yaitu lokus gen *Plasmodium falciparum* *Merozoit Surface Protein-1* dan (PFMSP1-PFMSP2) dan *Glutamate Rich Protein* (PFGURP). Ketiga lokus gen tersebut memiliki variasi genetik yang mirip dan mungkin dapat memberikan kesamaan sifat, terutama lokus gen GLURP.^{4,6}

PFGURP adalah sebuah ekso-antigen yang telah dipelajari secara ekstensif sebagai kandidat vaksin. PFGURP terdapat dalam tahap perkembangan siklus hidup parasit di *host* manusia, dan diekspresikan pada tahap eritrositik dan pra-eritrositik parasit dan juga pada merozoit yang baru muncul. Gen GLURP memiliki imunogenik yang tinggi dan berfungsi

sebagai target antibodi yang terlibat pada inhibitor seluler pada monosit.⁷

Secara umum diasumsikan bahwa koding gen *Plasmodium falciparum* untuk protein dikenali oleh *host* antibodi yang berada di bawah tekanan seleksi yang kuat akibat mutasi. Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa antibodi spesifik GLURP mungkin berperan dalam pengembangan kekebalan klinis terhadap malaria pada manusia.^{7,8}

Metode

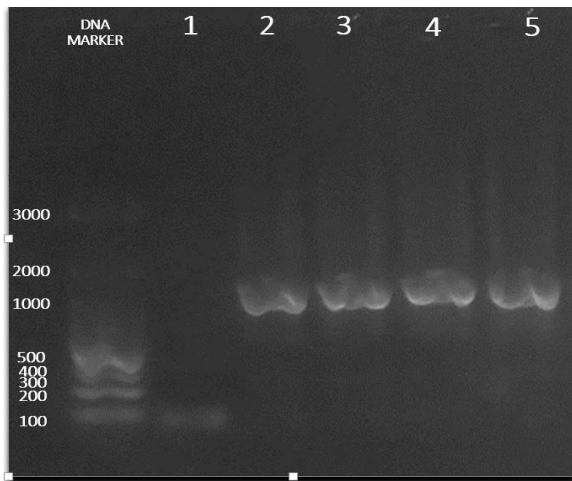
Pada penelitian ini dilakukan berbagai tahapan antara lain isolasi DNA, amplifikasi gen PFGURP dengan menggunakan PCR konvensional dan elektroforesis. Pada tahapan pertama yaitu isolasi DNA dengan menggunakan QIAamp® DNA Kit (Qiagen). Isolasi dilakukan terhadap 23 sampel. Hasil tersebut dilanjutkan dengan tahap berikutnya yaitu amplifikasi DNA.⁹

Amplifikasi menggunakan teknik *nested* PCR. Bahan yang dibutuhkan salah satunya adalah *primer* DNA target yang telah dijelaskan oleh S Snounou dan Färnet, 2013. Alat PCR yang digunakan adalah Rotor-Gene® Q (Qiagen). Pada tahap amplifikasi ini menggunakan dua *merk kit* yaitu menggunakan KAPA HiFi HotStart PCR Kit (*Kapabiosystem*) dan MyFi™ DNA Polymerase (*Bioline*).¹⁰ Kondisi PCR dibagi menjadi tiga yaitu denaturasi, *annealing* dan *extension* dengan optimasi yang telah dijelaskan Snounou dan Färnet, 2013. Selama proses PCR berlangsung, kondisi tersebut diulangi sebanyak 25 siklus pada amplifikasi pertama dan 30 siklus pada amplifikasi kedua. Tahapan terakhir penelitian ini adalah elektroforesis yaitu suatu cara untuk membaca atau menganalisis hasil dari proses PCR. Hasilnya kemudian dibaca dengan menggunakan UV *transilluminator*.⁹⁻¹¹

Hasil

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan November hingga Desember 2017, di Laboratorium Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mengidentifikasi gen PFGURP. Sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 23 BBT dan berhasil di isolasi dengan hasil 200 µl per sampel. Selanjutnya, seluruh sampel di amplifikasi sebanyak dua kali dengan proses amplifikasi DNA dengan metode PCR. Tahap berikutnya dilakukan identifikasi panjang basa PFGURP dengan elektroforesis lalu dibaca menggunakan

UV *transilluminator*. Hasil visualisasi akan dijelaskan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis

Pada gambar 1 menjelaskan tentang hasil analisis dengan menggunakan UV *transilluminator* yang telah dilakukan elektroforesis. Warna putih menandakan adanya hasil *band* pada sampel menunjukkan hasil positif berdasarkan dengan DNA *marker*. Pada tiap sampel didapatkan hasil, sampel nomor 2 (1000 bp), sampel nomor 3 (1100 bp), sampel nomor 4 (1200 bp), sampel nomor 5 (1100 bp). Hasil analisis sampel yang telah diteliti didapatkan variasi panjang basa berkisar 200 – 1200 bp.

Pembahasan

Penelitian yang telah dilakukan didapatkan adanya hasil variasi PFGURP berupa 200 – 1200 bp. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah diidentifikasi sebelumnya di Indonesia tepatnya di daerah Kabupaten Sumba Tengah, Nusa Tenggara Timur memiliki 800-1100 bp, sedangkan di daerah Sulawesi dan Kalimantan yang berhasil diidentifikasi 589-634 bp.^{4,12}

Penelitian di wilayah lain masih dalam benua yang sama, Malaysia. Penelitian ini meneliti di wilayah yang berbeda yaitu di Kalabakan berhasil menganalisis 751-800 bp. Wilayah lain yang diteliti yaitu Marudu didapatkan hasil 651-700 bp. Penelitian ini dapat membuktikan hasil bahwa jarak geografis antara wilayah dapat terjadi frekuensi penyebaran gen.¹³

Pada penelitian lain yang cukup jauh yaitu di Kolombia Barat Laut melakukan penelitian di dua wilayah yaitu Uraba dan Bajo Cauca. Kedua

wilayah tersebut memiliki tingkat migrasi yang tinggi dan transmisi malaria tahunan yang tidak stabil dengan indeks parasit tahunan rata-rata. Frekuensi genotipe GLURP individu tinggi. Secara total, delapan genotipe berbeda terdeteksi. Varian alel berkisar antara 450 dan 1.000 bp. Untuk PFGURP kecenderungan mendiagnosis jumlah alel yang lebih besar telah terdeteksi dari waktu ke waktu dan ini berhubungan langsung dengan endemisitas dan jumlah sampel yang dievaluasi.¹⁴

Hasil mengenai laporan variasi genetik *Plasmodium falciparum* menunjukkan bahwa perbedaan jumlah alel untuk setiap gen berkorelasi positif dengan daerah yang tingkat endemisitas rendah. Di daerah endemisitas yang tinggi seperti Afrika dan Asia, delapan alel GLURP ditemukan di India dan dua puluh alel di Sudan telah berhasil diidentifikasi.

Polimorfisme GLURP melibatkan variasi dari jumlah pengulangan sekuensing genom tertentu yang mempengaruhi suatu ukuran gen dan protein basa. Satu varian gen ditemukan selama siklus hidup parasit. Infeksi multiklonal terjadi apabila terdapat berbagai alel yang terinfeksi.¹⁵

Infeksi multiklonal dapat menyebabkan terjadinya resistensi karena adanya perbedaan *strain* yang berbeda pada *Plasmodium falciparum* yang diakibatkan adanya mutasi pada gen. Resistensi yang terjadi terhadap obat merupakan masalah di daerah endemik. Di wilayah endemik ini, peningkatan resistensi parasit terhadap obat-obatan yang ada merupakan salah satu penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas akibat malaria. Penyebab resistensi terutama adalah karena adanya mutasi pada gen-gen dari *Plasmodium*. Faktor yang mempengaruhi kecepatan terjadinya resistensi adalah faktor operasional yang berupa dosis subterapi dan kepatuhan inang yang kurang. Kemudian faktor farmakologi dan faktor transmisi malaria termasuk intensitas, *drug pressure*, maupun respon imun inang.¹⁶

Penggunaan lokus gen PFGURP selain bermanfaat untuk mengetahui epidemiologi juga dapat digunakan untuk menilai tingkat transmisi malaria dan hubungan faktor-faktor tersebut dengan respon imun. Dengan mengetahui variasi genetik pada *Plasmodium falciparum* maka dapat diidentifikasi adanya infeksi multiklonal yaitu infeksi yang disebabkan

oleh beberapa gen yang terinfeksi.⁴ Pada studi monitoring obat, identifikasi mengenai variasi gen *Plasmodium falciparum* digunakan untuk mengetahui penyebab kasus gagal karena infeksi baru atau karena kambuh kembali dengan membandingkan variasi alel sebelum dan sesudah mendapat pengobatan. Variasi genetik yang berbeda antara sebelum dan sesudah pengobatan menunjukkan gagal pengobatan disebabkan adanya infeksi baru.^{4,15}

Daftar Pustaka

1. Ikatan Dokter Anak Indonesia. Buku ajar infeksi & pediatri tropis. Edisi Ke-2. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI. 2012.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Malaria. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016.
3. Dinas Kesehatan Provinsi Lampung. Profil Provinsi Lampung Tahun 2015. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung. 2016.
4. Handayani S, Salwati E, Tjitra E. Keragaman genetik petanda *Plasmodium falciparum* dari spesimen subyek penelitian monitoring dihidroartemisinin-piperakuin di Kalimantan dan Sulawesi. Media litbang kesehatan. 2012;22(3):120-30.
5. Bannister LH, Sherman IW. *Plasmodium*. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons. 2009.
6. Irawati L. Penelitian hubungan Tumor necrosis factor- α (Tnf- α) dengan kadar hemoglobin dan parasitemia pada infeksi malaria *falciparum*. Jurnal Kedokteran Andalas. 2014;3(2):98-101.
7. Lusingu JP, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, Dkk. Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. Malaria journal. 2005;4(1):48-56.
8. Kumar D, Dhiman S, Rabha B, Goswami D, Deka M, Singh L, Dkk. Genetic polymorphism and amino acid sequence variation in *Plasmodium falciparum* GLURP R2 repeat region in Assam, India, at an interval of five years. Malaria journal. 2014;13(1):1-8.
9. Qiagen. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Edisi Ke-5. Hilden: Qiagen. 2016.
10. Bioline. MyFi TM DNA Polymerase. Singapore: Bioline. 2017.
11. Company TBE. Principles and practice of agarose gel electrophoresis. The Biotechnology Education Company. 2003.
12. Fridolina M, Elsa H. Keragaman genetik dari Msp 1, Msp 2, dan Glurp pada *Plasmodium falciparum* di Kabupaten Sumba Tengah, Nusa Tenggara Timur. Buletin Penelitian Kesehatan. 2016;44(2):77-84.
13. Razak MR, Sastu UR, Norahmad NA, Abdu KA, Muhammad A, Muniandy, Dkk. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* populations in malaria declining areas of Sabah. East Malaysia. PLoS ONE. 2016;11(3):1-22.
14. Maestre A, Arango E, Carmona J. Status of allele frequency and diversity of *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp before implementation of an artemisinin-based combined therapy in Northwestern Colombia. Colombia Médica. 2013;44(2):208-12.
15. Pratt-riccio LR, Perce da silva, Lima JC, Theisen M, Santos F, Daniel R, Dkk. Genetic polymorphisms in the glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* field isolates from malaria-endemic area of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(4):523-8.
16. Simamora D, Fitri LE. Resistensi obat malaria mekanisme dan peran obat antimalaria untuk pencegahan. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2007;23(2):82-91.

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat variasi genetik gen PFGURP dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.