

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MUTASI GEN *PfK13* (PF3D7_1343700)
SEBAGAI PENANDA RESISTENSI ARTEMISININ PADA ISOLAT
Plasmodium falciparum ASAL LAMPUNG**

Basuki Rachmad

Instalasi Laboratorium RSUD Sijunjung – Sumatera Barat

zahra_zaki0308@yahoo.co.id

ABSTRAK

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia termasuk Indonesia. *World Malaria Report* 2016 menyebutkan, malaria terjadi di 106 negara, bahkan 2,74 milyar penduduk dunia tinggal di daerah berisiko tinggi malaria dan sekitar 1,4 milyar ada di Asia Tenggara. Indonesia adalah peringkat ke-5 dari jumlah terbanyak kasus malaria se-Asia Tenggara. *Annual Parasite Incidence* Lampung adalah 0,49 dan sebagai peringkat ke-12 se-Indonesia, dengan daerah endemis tertinggi Kabupaten Pesawaran. Program eliminasi malaria melalui terapi OAM di seluruh dunia ternyata diikuti dengan munculnya resistensi *Plasmodium sp* terhadap OAM tersebut, diantaranya ACT. Artemisinin adalah senyawa seskuipterpen lakton. Struktur molekulnya mengandung jembatan/ikatan peroksida yang bersifat skizontosida darah terhadap *P.falciparum* dan *P.vivax*. Penelitian eksperimental laboratorium deskriptif ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mutasi gen *PfK13* sebagai penanda resistensi artemisinin pada isolat *P.falciparum* asal Lampung. Pemeriksaan mikroskopis dan RDT terhadap darah tepi memperoleh 71 sampel positif malaria. Isolasi DNA terhadap 71 sampel darah EDTA menggunakan kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). Amplifikasi PCR dan *Nested-PCR* menggunakan masing-masing primer yang sesuai, berhasil memperoleh 18 amplicon positif gen *PfK13* pada pita DNA berukuran 836 bp. Dari 18 amplicon dipilih 5 untuk disequensing di 1stBASE Singapura. Elektroforegram di-*contiq* menggunakan *software Geneious seri 8.1.9* dengan sekuen referensi dari *GenBank* No.CP017003.1, lalu di-*align* menggunakan *software MAFFT v7.017* sehingga ditemukan 1 isolat mempunyai mutasi substitusi pada kodon G453W, V454C dan E455K di dalam domain propeller gen *PfK13*. Akhirnya disimpulkan bahwa isolat *P.falciparum* asal Lampung telah resisten terhadap artemisinin. Sekuensing amplicon dalam jumlah lebih banyak disarankan agar hasil lebih valid dalam menyimpulkan pola mutasi pada isolat-isolat tersebut.

Kata kunci : Mutasi gen, *PfK13*, resistensi arteminin, *P.falciparum*

PENDAHULUAN

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia termasuk Indonesia. *World Malaria Report* 2016 melaporkan bahwa malaria terjadi di 106 negara, bahkan 2,74 milyar penduduk dunia tinggal di daerah berisiko tertular malaria dan sekitar 1,4 milyar ada di Asia Tenggara. Dengan total jumlah kasus di dunia sebanyak 211,8 juta, sekitar 14,6 juta ada di Asia Tenggara. Dari total kasus tersebut, sebanyak 426.791 orang meninggal dunia setiap tahun, dimana 26.390 orang yang meninggal berada di Asia Tenggara termasuk Indonesia, dan dengan kematian terbanyak yaitu anak balita (70%). Indonesia menempati urutan ke-5 (9%) dari jumlah kasus malaria terbanyak di Asia Tenggara.⁽¹⁾

Annual Parasite Incidence (API) di Indonesia selama 2011-2015 cenderung menurun. Lampung menempati peringkat ke-12 dengan API sebesar 0,49 secara nasional, dan daerah endemis tertinggi adalah Kabupaten Pesawaran dengan API sebesar 5,6.⁽²⁾ Oleh karena itu untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas serta mencegah KLB malaria, perlu dilakukan upaya komprehensif melalui promotif, preventif dan kuratif. Salah satu upaya kuratif adalah dengan terapi obat anti-malaria (OAM), tetapi ternyata diikuti dengan munculnya resistensi *Plasmodium sp* terhadap OAM itu. Akibatnya terapi kombinasipun diberikan untuk mencegah munculnya resistensi ini. Oleh karena itu sejak 2004, WHO telah merekomendasikan terapi kombinasi berbasis artemisinin (*Artemisinin-based Combination Therapy*) sebagai terapi lini pertama dalam penanganan malaria di daerah yang telah dikonfirmasi resisten terhadap OAM sebelumnya. Sampai saat ini terapi malaria di seluruh dunia masih menggunakan ACT. Di Indonesia, rejimen/sediaan ACT yang digunakan sejak 2008 adalah artemether-lumefantrine/AL, artesunat-amodiaquin/AAQ dan dihydroartemisinin-piperiaquin/DHP.⁽³⁾

Artemisinin merupakan kelompok senyawa seskuiterpen lakton, bukan alkaloid atau amina seperti pada kuinin. Struktur molekulnya mengandung jembatan peroksida yang diyakini ampuh dalam mekanisme kerja obat dan bekerja secara spesifik pada tahap eritrositik serta bersifat skizontosida darah terhadap *P.falciparum* dan *P.vivax*.^(4,5) Mulanya dikembangkan dari obat tradisional Cina untuk penderita demam yang dibuat dari ekstrak tumbuhan *Artemisia annua* L (*Qinghaosu*) yang sudah dipakai sejak ribuan tahun lalu dan ditemukan peneliti Cina tahun 1971.⁽⁴⁾ Tanaman ini termasuk famili *Asteraceae* dan merupakan tumbuhan tropis yang banyak hidup di daerah Amerika Latin, Amerika Tengah, Bulgaria, Perancis, Hungaria, Rumania, Italia, Spanyol hingga Yugoslavia dan Asia Tenggara termasuk Indonesia.⁽⁶⁾ Di Indonesia, daun Artemisinin dikenal dengan istilah Kenikir atau Ganjo Lalai, Randa Midang di Sunda atau Ulam Raja di Malaysia. Daun ini sangat harum dan memiliki kandungan beberapa zat seperti flavonoida polifenol, atsiri, saponin, lemak, kalsium, karbohidrat dan juga protein.

Resistensi *P.falciparum* terhadap artemisinin menjadi masalah di daerah-daerah endemik. Resistensi adalah kemampuan parasit untuk terus bertahan hidup di dalam tubuh manusia, berkembang biak dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun lebih tinggi yang masih bisa ditolerir oleh pasien.⁽⁷⁾ Resistensi ini disebabkan adanya mutasi gen yang terjadi secara spontan, yang mempengaruhi struktur dan aktivitas sasaran obat pada tingkat molekul atau mempengaruhi akses obat terhadap sarannya pada parasit malaria. Implikasi resistensi tersebut adalah penyebaran malaria ke daerah baru atau munculnya kembali malaria di

daerah yang telah bebas malaria. Oleh sebab itu mutasi dari suatu gen *Plasmodium sp* adalah penanda biomolekuler yang penting untuk surveilan parasit malaria, di antaranya mutasi gen *Pfcr1* sebagai penanda resistensi klorokuin dan amodiakuin^(8,9), *Pfmdr1* sebagai penanda resistensi golongan arylaminoalkohol kuinolin, 4-aminokuinolin, klorokuin, amodiakuin, meflokuin, halofantrin dan kuinin^(8,9,10), *Pfmrp* sebagai penanda resistensi klorokuin⁽⁹⁾, *Pfdhps* sebagai penanda resistensi pirimetamin dan *Pfdhfr* sebagai penanda resistensi sulfadoksin^(9,11) dan *PfATPase6* sebagai penanda resistensi artemisinin tetapi mekanismenya belum jelas⁽¹²⁾. Akibat banyaknya variasi dan polimorfisme gen dari *Plasmodium* ini menyebabkan masalah resistensi tidak akan pernah selesai.

Saat ini telah ditemukan suatu gen *P.falciparum* yang bertanggungjawab terhadap munculnya resistensi artemisinin, gen yang pertama dinamakan *Kelch-13* (PF3D7_1343700) yaitu suatu gen *P.falciparum* pada kromosom 13, ekson ke-1 yang menyandi untuk protein *Kelch*; dan gen yang kedua adalah *RPB9* (PF3D7_0110400) yaitu suatu gen *P.falciparum* pada kromosom 1, ekson ke-2 yang menyandi untuk enzim *DNA directed-RNA polymerase II subunit 9*, yakni suatu subunit dari RNA polimerase II yang kecil dan sangat terlindung serta berperan dalam menjamin ketepatan transkripsi di dalam sel.⁽¹³⁾

Berbagai penelitian yang mengungkapkan bahwa resistensi *P.falciparum* terhadap artemisinin berhubungan erat dengan mutasi gen *PfK13*, telah dilaporkan di beberapa negara. Mohon *et al.*,(2014) di Bangladesh melaporkan bahwa mutasi gen *PfK13* pada kodon A578S dapat mempengaruhi fungsi protein *PfK13*. Wang *et al.*,(2015) di Myanmar melaporkan sebanyak 17 (43,1%) dari 180 isolat yang dikumpulkan dari daerah perbatasan China–Myanmar mempunyai mutasi titik, dimana mutasi kodon F446I mendominasi sebanyak 27,1% di dalam gen *PfK13*. Win *et al.*,(2016) di Myanmar melaporkan sebanyak 69 (33,5%) dari 206 isolat memiliki mutasi gen *PfK13* terbanyak di kodon F446I (32 isolat) dan P574I (15 isolat). Mishra *et al.*,(2016) di India melaporkan sebanyak 10 dari 254 isolat memiliki mutasi titik (8 di kodon K189T, 1 di kodon F446I dan 1 di kodon A578S). Arie *et al.*,(2014) di Kamboja melaporkan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara keberadaan alel mutan, tingkat ketahanan hidup parasit (*parasite survival rates*) secara *invitro* dan tingkat bersihan parasit (*parasite clearance rates*) secara *invivo* dengan mutasi gen *K13* yang merupakan penentu penting dari resistensi artemisinin. Arie *et al.*,(2014) juga menjelaskan bahwa sedikitnya ditemukan 2 (dua) mutasi titik, yaitu di kodon M476I pada gen *PfK13* (PF3D7_1343700) dan kodon D56V pada gen *RPB9* (PF3D7_0110400) sudah cukup untuk memberikan bukti telah terjadi resistensi artemisinin. Sementara itu publikasi penelitian tentang isolasi dan identifikasi mutasi gen penanda resistensi artemisinin di dalam isolat *P.falciparum* belum banyak di Indonesia. Penelitian Suwandi (2014) di Lampung

melaporkan bahwa mekanisme resistensi *P.falciparum* terhadap artemisinin tidak sepenuhnya berkaitan dengan gen PfATPase6.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mutasi gen PfK13 sebagai penanda resistensi artemisinin pada isolat *Plasmodium falciparum* yang berasal dari penderita malaria falciparum asal Lampung.

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikroskop, 2 kotak *object glass*, 2 kotak lancet, 1 kotak spuit *Terumo*[®] 3 cc, 1 rak tabung EDTA *Vacutainer*[®] 3 cc, mikropipet (0,5-10 µl, 5-20 µl, 10-100 µl, 100-500 µl dan 100-1000 µl), 1 set *microtip* @ warna putih, kuning dan biru, *shaker*, 1 set tabung *ependorf* @ 1,5 ml dan 2,0 ml; rak tabung *ependorf*, 1 set *PCR tube 0,2 ml*, rak tabung *PCR tube*, *vortex shaker*, mikrosentrifuga suhu dingin, labu ukur 50 dan 100 ml, *beaker glass* 50, 100 dan 500 ml, neraca analitik, kulkas ber-*freezer*, *waterbath*, *microwave*, alat PCR *T100TM Thermalcycler*, alat elektroforesis *BIO-RADTM PowerPac*, alat UV Illuminator *BIO-RADTM UVITEC*, 1 set komputer.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

- a) Sampel darah tepi penderita yang diambil dari ujung jari.
- b) Sampel darah EDTA penderita
- c) *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, 100 Isolations.*⁽¹⁹⁾
- d) Untuk PCR gen *PfK13* (PF3D7_1343700) :

Sepasang primer spesifik (produk Macrogen) untuk amplifikasi gen PfK13 seperti yang ditulis oleh Arie *et al.*(2014) dan Mohon *et al.*(2014) yaitu :

(1) Primer Forward (K13-1) : 5' - CGG AGT GAC CAA ATC TGG GA - 3'

(2) Primer Reverse (K13-4) : 5' - GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC - 3').

- e) Untuk Nested PCR gen *PfK13* (PF3D7_1343700) :

Sepasang primer spesifik (produk Macrogen) untuk amplifikasi dan *sequencing* gen PfK13^(13,14) yaitu :

(1) Primer Forward (K13-2) : 5' - GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG - 3'

(2) Primer Reverse (K13-3) : 5' - GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA - 3'

- f) Bahan-bahan lain yang dibutuhkan :

(1) *Green GoTaq[®] Master Mix Kit* (untuk 100 tes).

(2) Agarose.

(3) TBE Buffer 10X.

(4) Isopropanol.

(5) Alkohol 70% dan alkohol absolut.

(6) Larutan stock Giemsa.

Pemeriksaan Mikroskopis Malaria

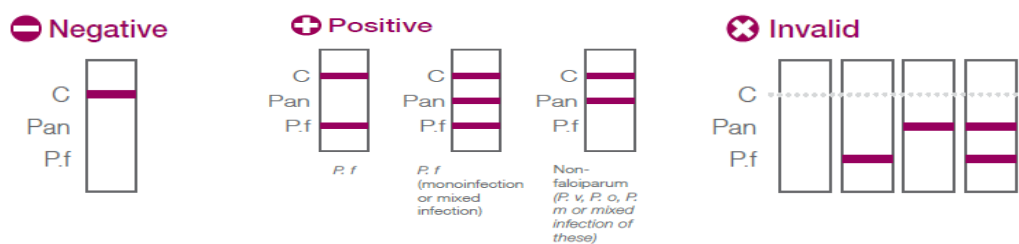
Pemeriksaan SAD tebal dan tipis dilakukan oleh 2 orang analis laboratorium yang berpengalaman dalam 100 lapang pandang dengan pembesaran 10x100 yang setara dengan 0,2 µl darah. Jumlah parasit dihitung secara semi kuantitatif (*parasite count*) pada SAD tebal sebagai :

- Positif 1 = 1 – 10 parasit per lapang pandang
- Positif 2 = 11 – 100 parasit per lapang pandang
- Positif 3 = 1 – 10 parasit per 1 lapang pandang
- Positif 4 = > 10 parasit per 1 lapang pandang.
- Negatif = tidak ditemukan parasit dalam 100 lapang pandang.

Pemeriksaan RDT

Pemeriksaan RDT dilakukan pada sampel darah tepi penderita dengan interpretasi hasil sebagai berikut :

- Negatif : jika hanya terbentuk 1 pita warna (pada garis C).
- Positif : jika terbentuk 2 pita warna (pada garis Pf dan C) atau 3 pita warna (pada garis tes Pf, Pan dan C).
- Invalid : jika tidak terbentuk pita berwarna pada garis C atau terbentuk pita warna pada garis Pf dan/atau Pan.



Isolasi DNA Genom *P.falciparum*

Isolasi DNA genom dari *P.falciparum* menggunakan Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit.⁽¹⁹⁾



- Tabung *eppendorf* yang berisi 900 μ l R/ *Cell Lysis Solution* + 300 μ l sampel darah. Campur dengan membolak-balik tabung 5-6 x.
- Selama inkubasi 10 menit suhu kamar, bolak-balik tabung 5-6 x.



Sentrifugasi 13 – 16.000 x g selama 20 detik pada suhu kamar



- Buang supernatan sebanyak mungkin.
- Vorteks pelet selama 10-15 detik.
- Tambahkan 300 μ l R/ *Nuclei Lysis Solution*. Campur dengan pipetkan campuran 5-6 x.
- Tambahkan 100 μ l R/ *Protein Precipitation Solution*. Vortex selama 10-20 detik.



Sentrifugasi 13 – 16.000 x g selama 3 menit pada suhu kamar.



Pindahkan supernatan ke tabung *eppendorf* yang berisi 300 μ l isopropanol. Campur dengan membolak-balikkan pelan-pelan.



Sentrifugasi 13 – 16.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar.



- Buang supernatan.
- Tambahkan 300 µl etanol. Cuci pelet dengan bolak-balikkan tabung.



Sentrifugasi 13 – 16.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar.



- Aspirasi etanol dengan mikropipet.
- Balikkan tabung. Kering anginkan pelet.
- Tambahkan 100 µl R/ *DNA Rehydration Solution*.
- Inkubasi pada 65 °C selama 1 jam/semalam pada suhu kamar.

Uji-uji Biomolekuler

1) Deteksi PCR untuk Gen Pfk13

- a) Gen diamplifikasi dengan menggunakan Primer *Forward* (K13-1): 5'-CGG AGT GAC CAA ATC TGG GA-3' dan Primer *Reverse* (K13-4): 5'-GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC-3' untuk menghasilkan pita DNA berukuran 848 bp^(13,14).
- b) Program :
 - (1) Denaturasi awal 94 °C selama 5 menit.
 - (2) Siklus amplifikasi diulang 40 kali terdiri dari :
 - (i) Denaturasi 94 °C, 30 detik.
 - (ii) *Annealing* 60 °C, 90 detik.
 - (iii) Ekstensi 72 °C, 90 detik.
 - (3) Perpanjangan langkah terakhir (ekstensi final) 72 °C, 10 menit.
- c) Amplicon PCR pertama ini dipakai sebagai *template* DNA untuk diamplifikasi *Nested-PCR*.

2) Deteksi *Nested-PCR* untuk Gen Pfk13

- a) Gen diamplifikasi dengan menggunakan Primer *Forward* (K13-2): 5'-GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG -3' dan Primer *Reverse* (K13-3) : 5'-GCC TTG TTG AAA

GAA GCA GA-3') untuk menghasilkan pita DNA berukuran 848 bp (Ariey *et al.*, 2014, Mohon *et al.*, 2014).

- b) Sebanyak 5 μ l dari amplicon PCR pertama diampifikasi dalam kondisi sama seperti pada PCR pertama. Hanya saja suhu *annealing* diatur pada 65,5 °C dan waktu *annealing* dikurangi menjadi 45 detik.
- c) Selanjutnya amplicon *Nested-PCR* ini divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% dan pewarnaan etidium bromida.

Elektroforesis Gel Agarosa 2%

- a) Pipet @ sebanyak 5 μ l sampel amplicon PCR (dari dalam *microtube* PCR) dan masukkan ke dalam masing-masing sumur gel tadi. Catatan: urutan pemasukan sampel amplicon ke dalam setiap sumur harus sesuai dengan peta sampel yang telah dibuat.
- b) Pipet 3,5 μ l *marker DNA ladder* dan masukkan ke dalam sumur yang memang disiapkan untuk *marker*. Catatan : *Marker DNA ladder* yang dipakai tergantung dari pita *base pairs* (bp) sampel amplicon yang diharapkan, apakah 100, 200, 500 atau 1000 bp.
- c) Setel alat elektroforesis *BIO-RAD™ PowerPac* pada :
 - Tegangan : 80-100 Volt.
 - Ampere : 400 mA.
 - Waktu : 25-30 menit (jangan lebih dari 30 menit).
- d) Setelah proses elektroforesis selesai, angkat gel lalu masukkan ke dalam alat UV untuk divisualisasi.

Sekuensing Gen Pfk13

Sekuensing untai ganda dari amplicon dilakukan di *IstBASE* Singapura menggunakan alat *sequencing* metoda Sanger (*Applied Biosystems®*). Analisis contig dari hasil elektroforegram menggunakan *software Geneious* seri 8.1.9. dengan mengambil urutan gen K13 dari klon 3D7 (PF3D7_1343700) yang diperoleh dari *GenBank Accession Number* CP017003.1 sebagai sekuen referensi. Penentuan mutasi, setelah proses *align* sekuen menggunakan *software MAFFT v7.017* (Katoh, Misawa, Kuma, Miyata 2002) (*Nucleic Acids Res.* 30:3059-3066).

HASIL PENELITIAN

Secara RDT dari total 71 sampel darah tepi penderita tersangka malaria, memberikan hasil (+) *mono-infection P.falciparum* sebanyak 45 sampel (berupa 2 garis: C dan Pf) dan (+) *mixed-infection P.falciparum + Plasmodium* lainnya sebanyak 26 sampel (berupa 3 garis: C, Pf dan Pan). Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi frekuensi hasil RDT positif malaria

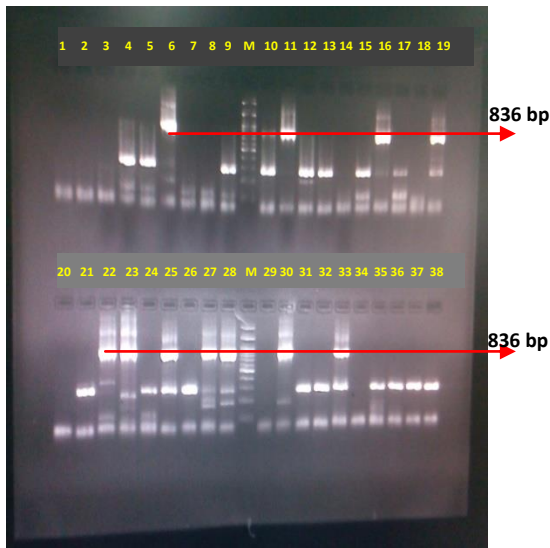
KETERANGAN	RDT (+)
Infeksi Tunggal <i>P.falciparum</i>	45
Infeksi Campuran <i>P.falciparum + Plasmodium</i> lainnya (<i>Pan</i>)	26
TOTAL	71

Secara mikroskopis dari total 71 sampel darah kapiler penderita malaria memberikan hasil (+) *mono-infection P.falciparum* sebanyak 45 sampel dan (+) *mixed-infection P.falciparum + P.vivax* sebanyak 26 sampel (Tabel 2).

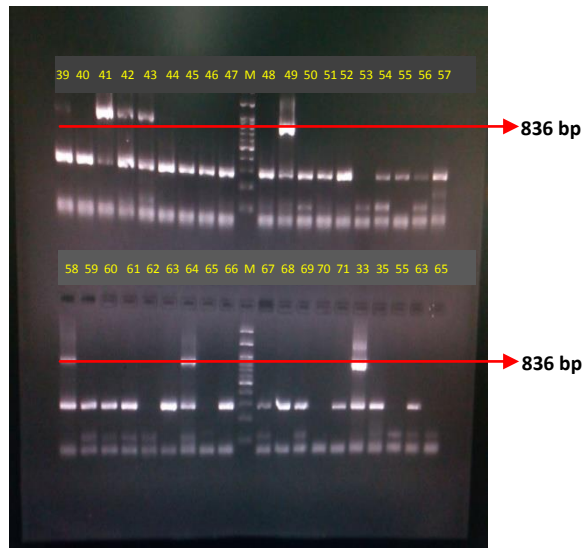
Tabel 2. Distribusi Frekuensi Stadium dalam Darah dari 71 Sampel

	Ring	Trofozoit	Gametosit	Total (N)
Infeksi Tunggal <i>P.falciparum</i>	40	-	5	45
Infeksi Campuran <i>P.falciparum + P.vivax</i>	-	21	5	26
Total				71

Amplifikasi pertama gen *PfK13* dari 71 *template* DNA sampel secara PCR menggunakan sepasang primer spesifik yakni *Primer Forward* (K13-1): 5'-CGG AGT GAC CAA ATC TGG GA-3' dan *Primer Reverse* (K13-4): 5'-GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC-3'. Lalu amplifikasi kedua gen *PfK13* secara *Nested-PCR* dari 71 amplikon PCR pertama menggunakan sepasang primer spesifik yakni primer *Forward* (K13-2): 5'-GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG-3' dan primer *Reverse* (K13-3): 5'-GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA-3', menghasilkan pita DNA dari fragmen gen *PfK13* dengan ukuran sekitar 836 bp. Besaran fragmen gen tersebut ternyata mencocoki/mendekati hasil penelitian dari Ariey *et al.*(2014) dan Mohon *et al.*(2014), bahwa ukuran gen *PfK13* sebesar 848 bp. Fragmen gen ini terdeteksi di dalam 18 isolat, yaitu isolat nomor 6, 11, 16, 19, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 33, 39, 41, 42, 43, 49, 58 dan 64 (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR gen Pfk13 pada sampel No. 6, 11, 16, 19, 22, 23, 25, 27, 28, 30 dan 33 pada pita DNA di kisaran 836 bp.



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR gen Pfk13 pada sampel No. 39, 41, 42, 43, 49, 58 dan 64 pada pita DNA di kisaran 836 bp.

PEMBAHASAN

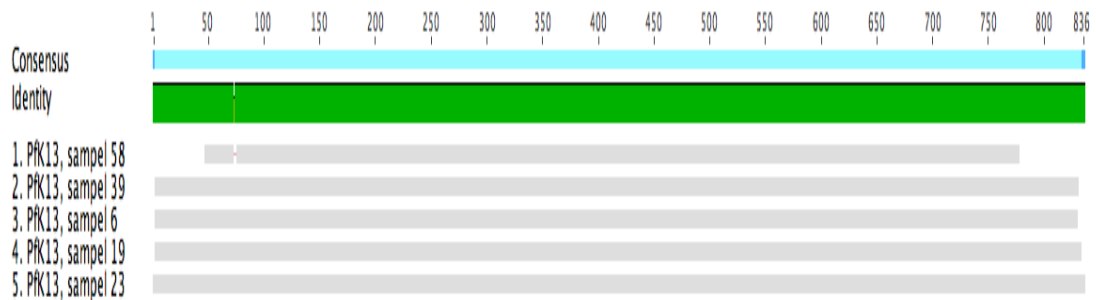
Amplifikasi secara *Nested-PCR* terhadap isolat sampel dilakukan setelah hasil pemeriksaan skrining RDT dan mikroskopis ternyata menemukan infeksi tunggal dan campuran antara *P.falciparum* dengan *P.vivax*. Sehingga digunakanlah uji *Nested-PCR*, karena uji ini mempunyai hasil resolusi yang lebih baik terhadap infeksi campuran dibandingkan dengan PCR biasa maupun *Real-time PCR* (Snounou *et al.*,1993). Hasil visualisasi di dalam elektroforesis gel agarosa 2% dari 71 amplikon *Nested-PCR* yang menggunakan sepasang primer spesifik untuk gen Pfk13 yakni *Forward* (K13-2): 5'-GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG-3' dan *Reverse* (K13-3) : 5'-GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA-3' ternyata menghasilkan pita DNA dari fragmen gen Pfk13 berukuran sekitar 836 bp. Ukuran fragmen gen tersebut ternyata mencocoki/mendekati hasil penelitian dari Arie *et al.*(2014) dan Mohon *et al.*(2014), yang menyatakan panjang gen *Pfk13* sebesar 848 bp.

Analisis mutasi gen Pfk13 (lihat gambar), terhadap 5 sampel pasien (isolat no 6, 19, 23, 39 dan 58) sebagai berikut :

- 1) Kelima sampel disekuen dalam keadaan baik, salah satu hasilnya agak kurang baik tapi menurut GenBank masih termasuk amplifikasi gen Pfk13.
- 2) Panjang produk PCR menggunakan primer adalah 836 *nucleotide*.
- 3) Kelima sampel di-*contiq* menggunakan *software Geneious* seri 8.1.9 lalu di-*align* (diselaraskan/disejajarkan urutan/sekuen basa-basa nukleotidanya) menggunakan *software MAFFT v7.017* dengan urutan gen K13 dari *GenBank Accession Number CP017003.1* sebagai sekuen referensi untuk mencari mutasi titik dalam isolat.

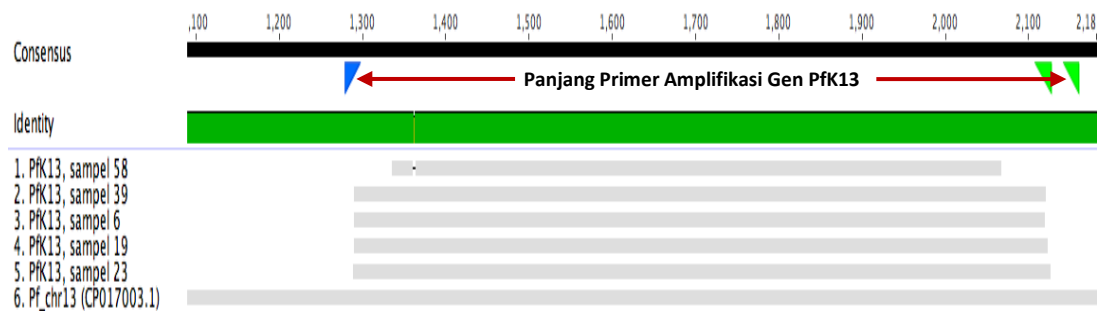
([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1060142114?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=PTENDTXT014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1060142114?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=PTENDTXT014)).

- 4) Salah satu sampel (no.58) diketahui mengalami mutasi substitusi, kesimpulan ditarik setelah di-align dengan *tool software* MAFFT v7.017 (Kato, Misawa, Kuma, Miyata 2002) (Nucleic Acids Res. 30:3059-3066).



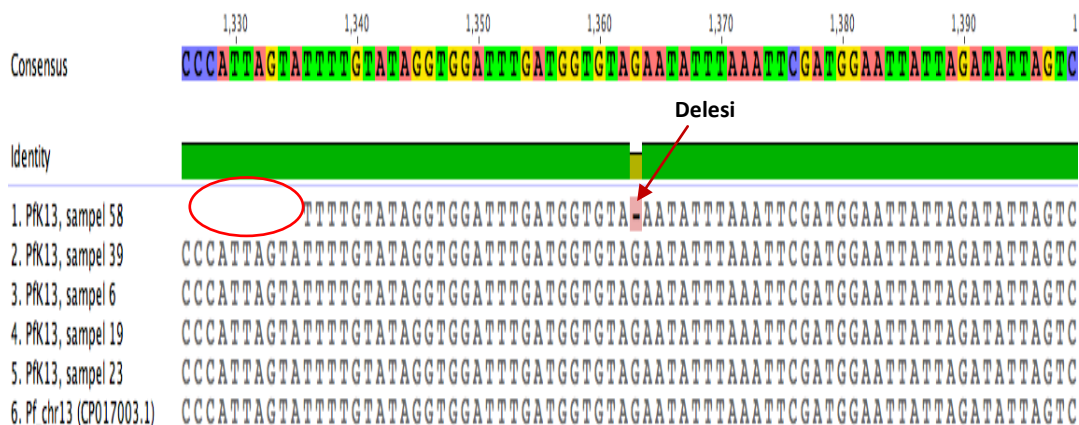
Gambar 3. Panjang PCR *product* adalah 836 bp.

Pada Gambar 3 ditampilkan bahwa ternyata panjang PCR *product* setelah diproses dengan software *Geneious* seri 8.1.9 adalah 836 bp. Ini artinya sampel-sampel yang positif teramplifikasi gen Pfk13-nya dan divisualisasi pada pita DNA berukuran sekitar 836 bp.



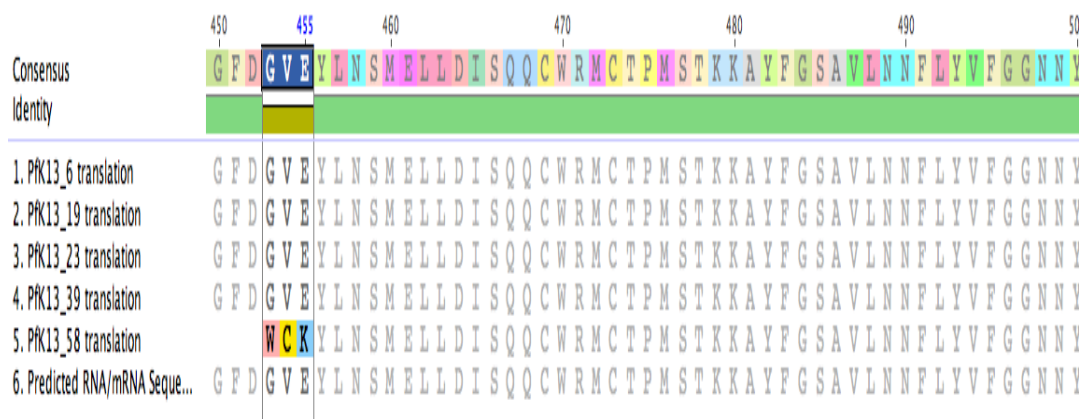
Gambar 4. Posisi panjang PCR *product* dari 1344 bp sampai dengan 2180 bp.

Pada Gambar 4 ditampilkan posisi panjang PCR *product* setelah diproses dengan software *Geneious* seri 8.1.9 adalah dari 1344 bp sampai dengan 2180 bp (836 bp).



Gambar 5. Delesi satu *nucleotide* pada sampel No. 58, di titik nomor 1363.

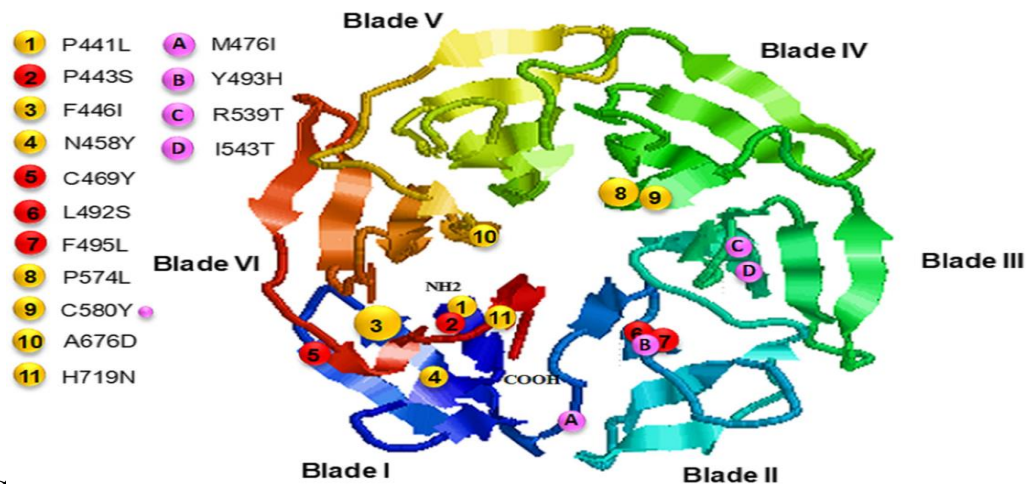
Pada Gambar 5 di sampel 58, terdapat urutan basa nukleotida yang kosong pada permulaan urutannya (ditunjukkan oleh lingkaran warna merah). Hal ini kemungkinan disebabkan kualitas persiapan proses sekuensing yang kurang baik, jadi ada variasi *basepairs* (bp) produk PCR ketika diproses pada mesin Sanger. Terdapat juga delesi pada titik 1363 (sampel No.58), dimana basa nukleotida G (Guanin) hilang, dan akan digantikan dengan basa berikutnya A (Adenin) untuk mengisi kekosongan posisi G yang hilang tadi. Pergeseran basa-basa ini akan menyebabkan perubahan susunan asam aminonya. Akibatnya terjadi mutasi substitusi asam amino pada kodon G453W (*glycine/G* → *tryptophan/W*), V454C (*valine/V* → *cysteine/C*) dan E455K (*glutamic acid/E* → *lysine/K*). Lihat Gambar 6. Sedangkan ke-4 sampel lainnya masih sesuai dengan referen/*wildtype*.



Gambar 6. Tiga mutasi substitusi di kodon G453W, V454C dan E455K pada sampel No.58.

Mutasi ke-3 kodon tersebut terjadi di *blade* ke-1 pada domain *Propeller* gen Pfk13 dan mencocoki dengan hasil penelitian dari Wang *et al.*(2015), yang melaporkan 11 mutasi di dalam domain gen Pfk13 yaitu 5 di *blade 1* (P441L, P443S, F446I, N458Y, C469Y), 2 di

blade II (L492S dan F495L), 2 di *blade IV* (P574L, C580Y) dan 2 di *blade VI* (A676D, H719N). Mutasi pada kodon G453W, V454C dan E455K pada sampel no.58 juga mencocoki hasil penelitian dari Ashley *et al.*(2014), yang melaporkan bahwa mutasi-mutasi yang terjadi secara bersama-sama pada kodon 440 ke atas di dalam domain *Propeller* gen Kelch13, berhubungan dengan peningkatan waktu paruh bersihan parasit (*increased parasite clearance half-life*).



Gambar 7. Distribusi mutasi dalam struktur 3D domain gen Pfk13. Lokasi dari berbagai mutasi ditunjukkan dengan bola; warna merah merupakan mutasi baru, oranye untuk mutasi yang dilaporkan sebelumnya, dan pink untuk mutasi yang berhubungan dengan resistensi artemisinin (dilaporkan oleh Arie *et al.*, 2014). Frekuensi relatif dari mutasi tercermin dengan ukuran bola⁽¹⁵⁾.

Penelitian kami menemukan adanya mutasi titik baru pada gen Pfk13 sebagai penanda resistensi artemisinin pada 1 (satu) isolat dari 5 (lima) isolat terpilih yang disekuensing. Oleh karena itu masih perlu dilanjutkan dengan sekuensing isolat sisanya (18 – 5 = 13 isolat) yang mungkin akan menemukan lebih banyak variasi polimorfisme dari mutasi gen Pfk13. Peneliti menduga kuat telah terjadi resistensi artemisinin pada isolat-isolat *P.falciparum* asal Lampung dikarenakan beberapa alasan yakni :

- 1) Telah terdapat mutasi delesi di titik 1363 yang menyebabkan substitusi asam amino di kodon G453W, V454C dan E455K pada sampel No 58. Mutasi ini akan menyebabkan terjadinya perubahan struktur dan fungsi biologis protein Kelch13 dari *P.falciparum* sehingga akan mengekspresikan gen penyandi antioksidan untuk melepaskan antioksidan lebih banyak guna menetralsir (melalui mekanisme donor proton-elektron) radikal bebas/ROS yang dilepaskan oleh senyawa artemisinin.
- 2) Setelah dikonfirmasi ke buku register laboratorium, sampel-sampel yang positif mengandung gen Pfk13, terutama sampel No.58, adalah ternyata pasien-pasien lama (sudah pernah berobat) yang melakukan pemeriksaan ulang laboratorium dan juga

mendapat terapi pengobatan berulang dengan obat ACT yang sama, yaitu Dihydroartemisinin-Piperaquine (DHP).

- 3) Meskipun ditemukan 1 (satu) isolat yang mengalami mutasi substitusi dari 5 (lima) isolat yang dipilih untuk sekuensing, tetapi alel mutan gen Pfk13 ini dapat diwariskan oleh parasit *P.falciparum* kepada generasi berikutnya di dalam tubuh manusia dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung *P.falciparum* di dalam kelenjar ludahnya.
- 4) Mutasi gen pada dasarnya adalah adaptasi dari setiap makhluk hidup terhadap stresor lingkungan agar organisme tersebut mampu "*survive*". Paparan artemisinin pertama kali pada *P.falciparum* (pengobatan pertama pasien) adalah merupakan stres oksidatif dan menjadi sinyal untuk memunculkan respon yang berulang sehingga meningkatkan adaptasi *P.falciparum* (dengan melakukan mutasi gen). Terlepas mutasi gen itu ada di kodon mana dan di titik mana, yang jelas akibat mutasi itu maka *P.falciparum* akan menangkal dan meredam dampak radikal bebas di dalam tubuh parasit, dengan cara parasit *P.falciparum* mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas sehingga aktivitas artemisinin pada paparan selanjutnya dapat dihambat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa :

- 1) Sebanyak 18 sampel (n=71) berhasil diamplifikasi gen Pfk13-nya (PF3D7_1343700) sebagai marker resistensi artemisinin yaitu isolat nomor 6, 11, 16, 19, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 33, 39, 41, 42, 43, 49, 58 dan 64.
- 2) Isolat-isolat *P.falciparum* asal Lampung diduga kuat telah resisten terhadap artemisinin karena ditemukan 1 (satu) sampel dari 5 (lima) sampel terpilih, yang mengalami mutasi substitusi asam amino pada kodon G453W, V454C dan E455K di dalam domain *propeller* gen Pfk13.

Saran

- 1) Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan memperbanyak jumlah amplicon PCR yang positif gen Pfk13 untuk disekuensing.
- 2) Perlu dilakukan penelitian lanjutan apakah ada gen-gen lain yang ikut terlibat terhadap munculnya resistensi artemisinin ini.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) World Health Organization. 2016. *World Malaria Report 2016*. Global Malaria Programme, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- 2) Dinas Kesehatan Provinsi Lampung. 2016. *Profil Kesehatan Lampung*. Bidang P2PL. Dinkes Provinsi Lampung.
- 3) Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria Di Indonesia*. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, Depkes RI, Jakarta.
- 4) Meshnick, S.R., Taylor, T.E., Kamchonwongpaisan. 1996. *Artemisin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy*. Am Sos for Micro 1996; 301-315.
- 5) Schmuck, G., Roehrdanz, E., Haynes, R.K., Kahl, R. *Neurotoxic Mode of Action of Artemisinin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002; 821–827.
- 6) Ferreira, J.F.S., Janick, J. 1996. *Distribution of artemisinin in Artemisia annua*. p. 579-584. In : J. Janick (ed.), Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA.
- 7) Talisuna, A.O., Bloland, P., D'Alessandro, U. 2004. *Hystory, dynamics, and public health importance of malaria parasitic resistance*. Clin Microbiol Rev ; 17 (1) : 235 – 45.
- 8) Warhurst, D.C. 2001. *A molecular marker for chloquinine resistant falciparum malaria*. N Engl J Med; 344(4):299-302.
- 9) Petersen, I., Eastman, R., Lanzer, M. 2011. *Drug-resistant malaria : Molecular mechanism and implications for public health*. FEBS Letters ; 585:1551-62.
- 10) Saliba, K.J., Folb, P.I, Smith, P.J. 1998. *Role for the Plasmodium falciparum Digestivevacuole in Klorokuin Resistance*. Biochem Pharmacol ; 56:313-320.
- 11) Bloland, P.B. 2001. *Drugs resistance in malaria*. WHO, Switzerland.
- 12) Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV. 2006. *Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes atp6 (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), tctp, mdr1 and cg10*. Antimicrob Agents Chemother, 50(2):480-9.
- 13) Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, et al. 2014. *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. International weekly journal of science, Nature, Jan 505 (7481):50–5.
- 14) Mohon AN, Alam MS, Bayih AG, Folefoc A, Shahinas D, Haque R, et al. 2014. *Mutations in Plasmodium falciparum K13 propeller gene from Bangladesh (2009–2013)*. Malaria Journal, 13(431):1-6. Diakses dari <http://www.malariajournal.com/content/13/1/431>.
- 15) Wang, Z., Shrestha, S., Li, X., Miao, J., Yuan, L., Cabrera, M., et al. 2015. *Prevalence of K13-propeller polymorphisms in Plasmodium falciparum from China-Myanmar border in 2007-2012*. Malaria Journal, 14(168):1-6.
- 16) Win, A.A., Imwong, M., Kyaw, M.P., Woodrow, C.J., Chotivanich, K., Hanboonkunupakarn, B., et al. 2016. *K13 mutations and pfmdr1 copy number variation in Plasmodium falciparum malaria in Myanmar*. Malar J, 15(110):1-7.
- 17) Mishra, N., Bharti, R.S., Mallick, P., Singh, O.P., Srivastava, B., Rana, R., et al. 2016. *Emerging polymorphisms in falciparum Kelch 13 gene in Northeastern region of India*. Malar J, 15(583):1-6.
- 18) Suwandi, J.F. 2014. *Polimorfisme gen PfMDR1 dan PfATP6 pada isolat Plasmodium dari penderita malaria falciparum di Kabupaten Pesawaran*. Disertasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- 19) Promega Inc, 2016. *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit : Instruction for Use of Product*. Promega Corp, Madison, USA. Technical Manual:1-17.

- 20) Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P. 1993. *High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction*. Mol Biochem Parasitol, 61:315-320.