

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 307/Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis

**ABSTRAK DAN EXECUTIVE SUMMARY
PENELITIAN FUNDAMENTAL**

**TAHUN ANGGARAN 2014
(Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun)**



**KLONING DAN ANALISIS SEKUEN DBL β C2-VAR GENE *Plasmodium falciparum*
SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN DAN TARGET TERAPI PENCEGAH MALARIA
BERAT**

**Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si
dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc**

**0022027701
0022097606**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Jember TA 2014
Nomor DIPA 023.04.2.414995/2014
Tanggal 24 Maret 2014**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
DESEMBER 2014**

ABSTRAK

Penelitian ini merupakan penelitian dasar mengenai gen fungsional yang berperan penting dalam patogenesis terjadinya malaria berat. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik dari sekuen nukleotida DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal. Metode yang digunakan meliputi pengambilan sampel di lapangan yang dilanjutkan dengan kegiatan murni di laboratorium meliputi identifikasi spesies Plasmodium, isolasi DNA (Deoxyribo Nucleic Acid), analisis hasil isolasi, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis hasil PCR. Penelitian ini direncanakan untuk dilaksanakan dalam waktu dua tahun (2014 dan 2015). Pada tahun pertama dilakukan pengumpulan sampel sampai analisis hasil PCR yang didapatkan. sedangkan pada tahun kedua direncanakan kloning hasil PCR dan sekuensing. Pada tahun pertama telah berhasil dikumpulkan sebanyak 17 sampel darah penderita malaria dari dua buah puskesmas di Kabupaten Jember, yaitu Puskesmas Sumberjambe dan Puskesmas Ledokombo. Pemeriksaan mikroskopi dengan hapusan dan pengecatan Giemsa menunjukkan 4 sampel yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*, 4 sampel yang terinfeksi *Plasmodium vivax* dan 9 sampel terinfeksi campuran. Isolasi DNA berhasil didapatkan dari semua sampel. Pemeriksaan PCR menggunakan primer yang spesifik berhasil mendapatkan empat sampel yang positif didapatkan bands/pita-pita, dengan satu sampel yang menghasilkan satu band berukuran sekitar 1700 bp, dan 3 sampel lainnya menghasilkan 3 band berukuran 1700 bp, 600 bp dan 500 bp. Di mana amplicon berukuran 1700 bp ini sesuai dengan sekuen target dari beberapa sekuen referensi yang telah dilaporkan di Genbank.

Kata kunci: malaria, DBL β C2-*var gene, Plasmodium falciparum, PCR*

EXECUTIVE SUMMARY

KLONING DAN ANALISIS SEKUEN DBL β C2-VAR GENE *Plasmodium falciparum* SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN DAN TARGET TERAPI PENCEGAH MALARIA BERAT, Erma Sulistyaningsih, Wiwien Sugih Utami, Penelitian Fundamental Tahun Anggaran 2014, 37 halaman

Malaria masih merupakan masalah kesehatan utama di dunia, termasuk Indonesia dengan angka kejadian yang dinyatakan dengan *Annual Parasite Incidence* (API) 1,96 per 1000 penduduk dan dilaporkan 432 kematian pada tahun 2010, dimana hampir separuh disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. Berbagai hal diupayakan untuk pengendalian malaria, meliputi diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, surveilans, pengendalian vector dan pengembangan vaksin. Tetapi, penelitian-penelitian yang intensif untuk pengembangan vaksin malaria terhambat oleh kompleksitas parasit. Banyak protein yang terlibat dalam pathogenesis malaria, salah satu protein penting yang banyak diteliti adalah *P.falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1), yang dikode oleh *var gene family*. PfEMP-1 terdiri dari beberapa domain, salah satu yang penting adalah DBL β C2 domain, yang berfungsi sebagai ligand pengikat *host receptor* ICAM-1, dimana ikatannya diduga mendasari patologi malaria berat.

Masalah yang diajukan dalam penelitian ini adalah bagaimana karakteristik sekuen DBL β C2 domain *var gene Plasmodium falciparum* dari isolat lokal Indonesia, bagaimana jika dibandingkan dengan sekuen-sekuen DBL β C2 domain *var gene* yang telah dilaporkan dalam Genebank, sehingga nantinya diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar untuk mendesain vaksin berbasis DNA maupun menentukan regimen terapi yang mampu mencegah malaria berat.

Sesuai dengan rumusan masalah tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik dari sekuen nukleotida DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal, dengan beberapa tujuan khusus antara lain: (1) mengklon DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal dan referensi, (2) sekuensing pDBL β C2- *var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal dan referensi, (3) menganalisis karakteristik sekuen nukleotida DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal dan (4) membandingkan sekuen nukleotida DBL β C2-*var gene* antara *Plasmodium falciparum* isolate lokal dengan *Plasmodium falciparum* referensi.

Penelitian ini merupakan suatu *exploratory study* dimana akan dilakukan eksplorasi tentang karakteristik sekuen nukleotida DBL β C2 *var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal. Sampel pada penelitian ini adalah penderita malaria yang dirawat di beberapa Puskesmas di Kabupaten Jember, yaitu di Puskesmas Ledokombo dan Puskesmas Sumberjambe yang bersedia untuk mengikuti penelitian. Semua sampel penelitian menerima *informed consent* sebelum diikutkan ke dalam penelitian. Perijinan *ethical clearance* diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Secara umum, sampel darah penderita malaria diambil untuk dianalisis secara mikroskopis dan diisolasi DNANYa, selanjutnya sekuen nukleotida target DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* diamplifikasi dengan menggunakan primer yang telah didesain secara spesifik untuk target sekuen. Produk PCR dipurifikasi untuk dapat digunakan sebagai bahan klon pada tahapan penelitian berikutnya.

Sebanyak 17 sampel darah penderita malaria dikumpulkan dari 2 puskesmas di Kabupaten Jember. Karakteristik sampel adalah sebagai berikut: sebanyak 16 orang (94, 1%) dari sampel berjenis kelamin laki-laki dan sisanya 1 orang (5,9%) berjenis kelamin perempuan. Hasil ini sesuai dengan karakteristik bahwa sebagian besar penderita adalah pekerja yang bekerja di luar daerah, antara lain di Kalimantan dan Nusa Tenggara, mereka terinfeksi di sana selanjutnya pada saat pulang masih menderita infeksi malaria. Bahkan beberapa pasien terpaksa pulang ke kampung halaman karena menderita sakit dan harus berobat di sini.

Dari 17 sampel yang didapatkan, semua sampel dilakukan pemeriksaan mikroskopis hapusan darah dengan pengecatan Giemsa. Sebanyak 4 sampel (23,5%) ditemukan *Plasmodium falciparum* pada sediaan, 4 sample (23,5%) didiagnosis mikroskopis sebagai infeksi *Plasmodium vivax*, dan sisanya 9 sampel (53%) merupakan *mixed infection* (infeksi campuran) *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Selanjutnya 5 sampel infeksi *Plasmodium vivax* dikeluarkan dari penelitian ini. Gambaran klinis sampel adalah sebagai berikut: seorang pasien (sampel 2) menderita malaria berat dengan gejala klinis yang menonjol adalah anemia, 6 orang pasien menderita malaria sedang dan sisanya 10 orang adalah penderita malaria ringan.

DNA diisolasi dari darah penderita malaria menggunakan kit isolasi DNA (TIANamp Blood DNA kit, Tiangen Biotech) sesuai dengan prosedur. Hasil isolasi DNA didapatkan dari semua sampel *Plasmodium falciparum* dan infeksi campuran, berupa band dengan intensitas cukup sampai sangat tebal untuk sampel 15, 16 dan 17. Pada penelitian ini DNA yang diisolasi berasal dari darah penderita malaria, dimana parasit *Plasmodium falciparum* yang

menginfeksi berada di dalam sel darah merah (eritrosit). Sehingga DNA yang didapatkan pada hasil ekstraksi ini adalah keseluruhan DNA dari komponen darah penderita dan DNA dari *Plasmodium falciparum*. Hal ini dapat kita lihat dari ukuran pita DNA yang sangat besar, >10 kb.

PCR dilakukan terhadap semua sampel yang diekstraksi DNANYa, menggunakan sepasang primer spesifik untuk mengamplifikasi sekuen DBL β C2-var gene *Plasmodium falciparum*, yaitu pasangan primer DBL2F1 (5'-AGT GTG TTG AAG GAC GTA TGT-3') dan DBL2R3 (5'-CCA AAC ATA TAT CTC TAT AAT CTC C-3') untuk mengamplifikasi keseluruhan domain DBL β C2-var gene dari *Plasmodium falciparum* sepanjang \pm 1700 bp serta pasangan primer DBL2F1 (5'-AGT GTG TTG AAG GAC GTA TGT-3') dan DBL2R1 (5'-CAT TTC ATG GCT TCC CAT ACT T-3) untuk mengamplifikasi sebagian dari domain DBL β C2-var gene dari *Plasmodium falciparum* sepanjang \pm 650 bp. Hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer DBL2F1 dan DBL2R3 didapatkan pada empat sampel, dengan satu sampel hanya menghasilkan satu band berukuran sekitar 1700 bp dan sisanya menghasilkan 3 buah band yaitu 1700 bp, 600 bp dan 500 bp. Dimana amplicon berukuran 1700 bp ini sesuai dengan sekuen target dari beberapa sekuen referensi yang telah dilaporkan di Genebank, sehingga kami menduga bahwa band tersebut adalah DBL β C2 domain. Sedangkan dua band lainnya dari ketiga sample ini (600 bp dan 500 bp), kami menduga bahwa pita tersebut merupakan bagian dari DBL domain PfEMP-1, tetapi tidak spesifik DBL β C2 domain. Kita ketahui bahwa PfEMP-1 ini mempunyai beberapa subclass DBL domain yaitu DBL α , β , γ , δ , ζ , ϵ , dan χ . Untuk membuktikan dugaan ini produk PCR perlu disekuensing guna mengetahui sekuen nukleotid penyusunnya. Kita ketahui bahwa keadaan klinis sampel 2 (dengan band 1700 bp) adalah malaria berat. Selain itu, gambaran band 1700 bp juga ditemui pada sampel 15, 16 dan 17. Pada pemeriksaan mikroskopis menunjukkan mixed infection dengan gambaran klinis malaria sedang.

Pada penelitian ini sampel juga diamplifikasi menggunakan pasangan primer DBL2F1 dan DBL2R1. Didapatkan band yang multiple berukuran 750 bp, 525 bp, 450 bp, 425 bp, 400 bp dan 225 bp. Tiga pasang sampel mempunyai pola pita yang sama. Pasangan primer DBL2F1 dan DBL2R1 disusun berdasarkan sekuen DBL β C2 yang telah dilaporkan dalam GeneBank, dan akan mengamplifikasi bagian N-terminal dari domain tersebut sebanyak 610-650 bp. Multiple band yang dihasilkan pada proses PCR ini diduga karena spesifisitas primer yang digunakan belum optimal, karena setelah melewati proses optimasi PCR dengan mencoba suhu annealing yang berbeda-beda serta optimasi konsentrasi Mg²⁺, hasil yang didapatkan tetap multiple band. Peneliti menduga band yang merupakan bagian dari DBL β C2

domain adalah band yang berukuran 525 bp atau 750 bp. Tentunya diperlukan sekuensing untuk mengetahui dengan pasti termasuk sekuen nukleotidanya.

Analisis lanjutan terhadap amplicon sedianya dilakukan pada tahun kedua, namun sayangnya penelitian ini tidak mendapatkan dana lanjutan. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui karakteristik sekuen DBL β C2-*var gene* sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang vaksin berbasis DNA dan/atau menemukan regimen terapi yang mampu mencegah terjadinya malaria berat serta dapat membantu mengendalikan malaria.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sekuen DBL β C2-*var gene Plasmodium falciparum* isolate lokal berukuran \pm 1700 bp pada 4 sampel penelitian ini, dimana 3 diantaranya adalah mixed infection *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* dan sisanya adalah infeksi *Plasmodium falciparum* murni. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan sekuensing terhadap amplicon sehingga dapat dianalisis lebih lanjut sekuen nukleotidanya.