

**VARIASI GENETIK *Plasmodium falciparum* GLUTAMATE RICH
PROTEIN (GLURP) DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH
KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG**

(Skripsi)

**Oleh
Rachman Aziz**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

**VARIASI GENETIK *Plasmodium falciparum* GLUTAMATE RICH
PROTEIN (GLURP) DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH
KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG**

Oleh

Rachman Aziz

Proposal Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Lulus Sarjana Kedokteran

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

GENETIC VARIATIONS of *Plasmodium falciparum* GLUTAMATE RICH PROTEIN (GLURP) FROM MALARIA PATIENTS IN WORKING AREA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

By

Rachman Aziz

Background: *Plasmodium falciparum* is one type of Plasmodium which found in malaria and has a tendency be resistant to antimalarial drugs due for 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 extensively studied to diagnose malaria specifically and accurately, namely *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The number of cases of malaria patients in Lampung Province is the largest in the working area of Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

Method: This type of research use survey research design and is descriptive. The sample of research was obtained from Biological Saved Materials (BSM) as many as 23 samples. The examination was performed using by PCR method to detect genetic variation.

Result: The results showed that there were allele variation of R0 positive one from 14 samples (7,14%), and on allele R2 ten positive from 14 samples (71,42%). In the variation with the two allele types obtained results from 14 samples (7.14%).

Conclusion: There are genetic variations of the PfGLURP gene from malaria patients in the working area of Puskesmas Hanura, Pesawaran District, Lampung and found genetic variation of the PfGLURP gene that is allele R0, R1 and R2. The dominant allele in the PfGLURP gene is R2 (54.2%).

Keyword: Glutamate Rich Protein (GLURP), *Plasmodium falciparum*, Polymerase Chain Reaction (PCR).

ABSTRAK

VARIASI GENETIK *Plasmodium falciparum* *Glutamate Rich Protein* (GLURP) DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

Oleh

Rachman Aziz

Latar Belakang: *Plasmodium falciparum* merupakan salah satu jenis *Plasmodium* yang terdapat 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 yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Angka kasus penderita malaria di Provinsi Lampung terbesar terdapat di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

Metode: Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survey dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) sebanyak 23 sampel. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode PCR untuk mendeteksi adanya variasi genetik.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat variasi alel yaitu R0 satu positif dari 14 sampel (7,14%), dan pada alel R2 sepuluh positif dari 14 sampel (71,42%). Pada variasi dengan dua jenis alel didapatkan hasil dari 14 sampel (7,14%).

Simpulan: Terdapat variasi genetik gen PfGLURP yang berasal dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Lampung dan ditemukan adanya variasi genetik dari gen PfGLURP yaitu alel R0, R1 dan R2. Alel yang dominan pada gen PfGLURP adalah R2 (54,2%).

Kata Kunci: *Glutamate Rich Protein* (GLURP), *Plasmodium falciparum*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Judul Skripsi

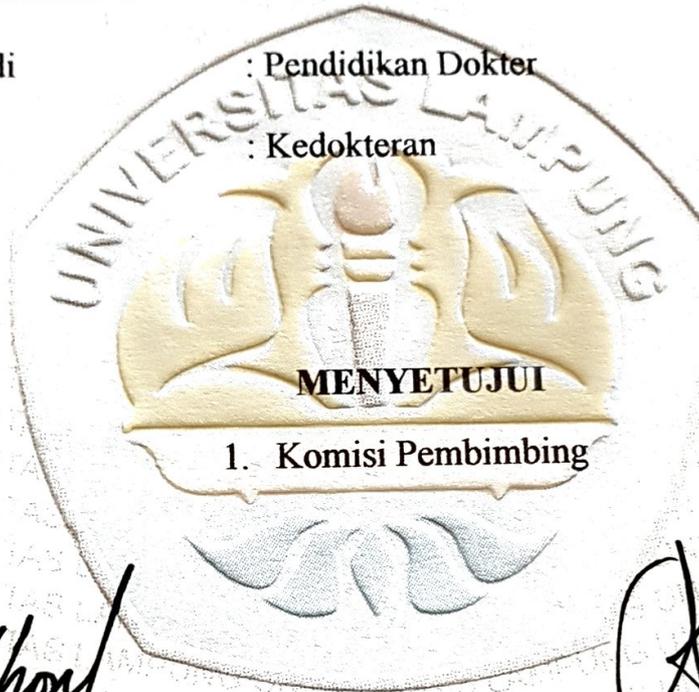
: VARIASI GENETIK Plasmodium falciparum
GLUTAMATE RICH PROTEIN (GLURP)
DARI PENDERITA MALARIA DI
WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA,
KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI
LAMPUNG

Nama Mahasiswa : Rachman Aziz

No. Pokok Mahasiswa : 1418011168

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran



Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi,
S.Ked., M.Kes.
NIP 197608312003121003

Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked.,
M.Kes.
NIP 197810092005011001

2. Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp. PA
NIP 197012082001121001

MENGESAIKAN

1. Tim Penguji

Ketua

: **Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi,**
S.Ked., M.Kes.

Jhons
.....

Sekretaris

: **Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked.,**
M.Kes.

Betta
.....

Penguji

Bukan Pembimbing

: **dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes.**

Hanna
.....

2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhtarono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP.197012082001121001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 29 Januari 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“VARIASI GENETIK *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein (GLURP) DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG”** adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Januari 2018

Pembuat pernyataan



Rachman Aziz

NPM 1418011168

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Pangkal Pinang, Bangka Belitung pada 29 Maret 1995, sebagai anak pertama dari dua bersaudara, dari Bapak Rismunandar, S.I.P, M.M. dan Ibu Dra. Ratnawati.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Taman Kanak-kanak (TK) Tunas Muda Bandar Lampung pada tahun 2001, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 1 Sukarame, Bandar Lampung pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 5 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2010, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 10 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2013.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa pada Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (FK Unila). Pada masa perkuliahan penulis mengikuti lembaga kemahasiswaan yaitu Forum Studi Islam Ibnu Sina (FSIIS) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai kardiak periode 2014-2015 dan sebagai kepala bidang media dan syiar periode 2015-2016, serta menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Negara Bumi Ilir, Kecamatan Anak Tuha, Lampung Tengah pada tahun 2017.

PERSEMBAHAN

Segala puji kehadiran Allah SWT yang telah memberikan Karunia, Rahmat dan Ampunan-Nya kepada penulis. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Rasulullah SAW beserta keluarga dan para sahabat beliau

Karya ini hanya sebagian kecil dari perjalanan hidup ku, semoga karya ini dapat menjadi jembatan perjalanan hidupku agar bisa menjadi manusia yang bermanfaat bagi orang lain.

Dengan penuh syukur kupersembahkan lembaran-lembaran sederhana ini untuk

"Bapak, Ibu, dan Adikku yang tersayang"

Yang selalu memberi nasihat, mendoakan, memberi dukungan, dan memberi kebahagiaan dalam hidupku serta mengajarkan arti hidup yang bermanfaat kepadaku

SANWACANA

Puji dan syukur Penulis ucapkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad S.A.W.

Skripsi dengan judul "*Variasi Genetik Plasmodium falciparum Glutamate Rich Protein (GLURP) dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung*" adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Dr. dr. Muhartono, M.Kes, Sp.PA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Utama yang selalu bersedia menyempatkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberi masukan dan nasihat selama proses penyelesaian penelitian serta ilmu yang begitu bermanfaat selama penelitian skripsi ini.
4. Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Kedua atas kesabaran dan kesediaan memberikan bimbingan, ilmu, saran, dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
5. dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes., selaku Penguji Utama untuk masukan dan saran-saran yang telah diberikan pada pada proses penyelesaian skripsi ini.
6. dr. Roro Rukmi Windi Perdani, M.Kes., Sp.A., selaku pembimbing akademik atas motivasi, perhatian, saran dan masukan selama ini.

7. Terima kasih kepada relawan yang telah bersedia ikut serta dalam penelitian ini dengan memberikan darahnya untuk dijadikan sampel penelitian.
8. Terima kasih kepada keluarga Laboratorium Biomolekular FK Unila, Ibu Nuriyah dan Mbak Yani, atas seluruh bantuan serta bimbingan dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih atas ilmu dan kesabaran yang selalu diberikan kepada kami selama ini.
9. Seluruh staf dosen dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu dan waktu yang telah diberikan selama perkuliahan.
10. Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Ibu (Dra. Ratnawati) dan Bapak (Rismunandar, S.I.P., MM.) dan Adikku (Rini Rachmawati) yang selama ini yang telah memberikan segala kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi dan nasihat serta setiap doa yang telah dipanjatkan selama ini. Terima kasih atas perjuangan kalian selama ini yang telah diberikan yang terbaik untukku. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan dan lindungan dan menjadikan ladang pahala.
11. Seluruh Keluarga Besar yang telah membantu dalam berbagai hal, doa, dukungan dan motivasi.
12. Terima kasih kepada teman seperjuangan, Ade Triajayanti dan Devi Aprilani atas perjalanan dan pengalaman penelitian selama ini. Terima kasih untuk doa, waktu, tenaga dan seluruh dukungan serta semangat yang telah diberikan.
13. Terima kasih kepada Karina Azlia Amanda selaku adik, sahabat terbaik yang tidak henti-hentinya menemani dan memberikan semangat, doa, dukungan dan bantuan selama ini.
14. Terima kasih kepada sahabatku, temen seperjuangan, keluarga LDG, Dina,

Dinah, Dirga, Elma, Fadlan, Helimawati, Nandya, Tassya, Tiwi, Ulima, Yuwandita, Zur'an atas segala doa, perhatian, dukungan serta semangat yang telah diberikan selama ini.

15. Seluruh sahabat dari kecil hingga saat ini yang telah membantu dalam berbagai hal dan mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
16. Seluruh tim dari Aorta.med yang telah membantu proses lancarnya penyusunan skripsi ini.
17. Keluarga Besar FK Unila 2014 (Cran14l) yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas kekompakan, canda, tawa, proses pembelajaran yang telah memberikan warna serta makna tersendiri. Semoga kebersamaan dan kekompakan selalu terjalin baik sekarang maupun ke depan nanti.
18. Kakak-kakak dan adik-adik tingkat saya (angkatan 2002-2017) yang sudah memberikan semangat kebersamaan dalam satu kedokteran.

Penulis menyadari skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Namun, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan pengetahuan baru kepada setiap orang yang membacanya. Semoga segala perhatian, kebaikan dan keikhlasan yang diberikan selama ini mendapat balasan dari Allah SWT. Aamiin.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis,

Rachman Aziz

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| DAFTAR ISI | i |
| DAFTAR TABEL | iii |
| DAFTAR GAMBAR | iv |
| BAB 1_PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 6 |
| | |
| BAB 2_TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| 2.1 Malaria Secara Umum | 8 |
| 2.2 Variasi Gen pada Malaria <i>Plasmodium falciparum</i> | 18 |
| 2.3 Metode Deteksi Gen GLURP <i>Plasmodium falciparum</i> | 24 |
| 2.4 Kerangka Teori | 29 |
| 2.5 Kerangka Konsep..... | 29 |
| | |
| BAB 3 METODE PENELITIAN..... | 30 |
| 3.1 Rancangan Penelitian..... | 30 |
| 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 30 |
| 3.3 Subjek Penelitian dan Sampel..... | 30 |
| 3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi | 31 |
| 3.5 Definisi Operasional | 31 |
| 3.6 Alat dan Bahan..... | 32 |
| 3.7 Prosedur Penelitian | 34 |
| 3.8 Alur Penelitian | 41 |
| 3.9 Etik Penelitian..... | 41 |

| | |
|----------------------------------|----|
| BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 42 |
| 4.1 Hasil Penelitian | 42 |
| 4.2 Pembahasan | 45 |
| | |
| BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN | 49 |
| 5.1 Kesimpulan | 49 |
| 5.2 Saran | 49 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| | |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 1. Taxonomi Plasmodium | 10 |
| 2. Masa inkubasi penyakit malaria..... | 14 |
| 3. Definisi Operasional..... | 31 |
| 4. Sekuensing Primers GLURP | 33 |
| 5. Suhu Amplifikasi Pertama dan Kedua | 38 |
| 6. Variasi alel pada tiap sampel..... | 43 |
| 7. Penyebaran band tiap alel pada gen PfGLURP..... | 44 |
| 8. Hasil analisis univariat | 44 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. API malaria per 1000 penduduk di Kabupaten Pesawaran..... | 9 |
| 2. Siklus hidup Plasmodium..... | 12 |
| 3. Kerangka Teori..... | 29 |
| 4. Kerangka Konsep..... | 29 |
| 5. Alur Penelitian | 41 |

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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 (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

Penyakit Malaria sangat dominan terjadi di daerah tropis dan subtropis. *Annual Parasite Incidence* (API) atau Angka Parasit Malaria per 1.000 penduduk merupakan angka kesakitan yaitu jumlah penderita positif malaria di suatu wilayah dibandingkan dengan jumlah penduduk yang berisiko terkena malaria pada suatu wilayah. Di wilayah Indonesia memiliki nilai 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. 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 (Kementrian Kesehatan RI, 2016).

Angka kasus penderita malaria di Provinsi Lampung pada tahun 2011 yaitu 4,76 per 1.000 penduduk, kemudian menurun kembali menjadi 1 per 1.000 penduduk pada tahun 2012. Pada tahun 2013 meningkat menjadi 4,77 per 1000 penduduk, tahun 2014 meningkat menjadi 7,26 per 1000 penduduk, dan tahun 2015 menurun menjadi 6,36 per 1000 penduduk. Kasus Malaria tahun 2015 sebanyak 2.712 kasus dengan 2 kematian yang berada di wilayah kerja Puskesmas Pedada (1 orang) dan Puskesmas Hanura (1 orang) (Dinas Kesehatan Provinsi Lampung, 2016).

Agen penyebab penyakit malaria adalah parasit yang berasal dari genus *Plasmodium* familia *plasmodiidae*. Sampai saat ini dikenal ada lima macam *Plasmodium*, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi* (Pain *et al.*, 2008). *Plasmodium falciparum* adalah yang terpenting karena penyebarannya luas, angka kesakitan tinggi serta bersifat ganas, hingga sering menyebabkan malaria berat dan menimbulkan lebih dari 2 juta kematian tiap tahun diseluruh dunia (Irawati, 2014).

Faktor penentu yang utama untuk terjadinya penularan malaria adalah angka sporozoit pada siklus hidup nyamuk, kebiasaan menggigit nyamuk, lamanya hidup nyamuk dan rapatnya populasi vektor nyamuk. Umumnya angka

penularan malaria berbanding langsung dengan (1) densitas vektor, (2) pangkat dua dari jumlah gigitan pada manusia per hari per nyamuk, dan (3) sepersepuluh probabilitas nyamuk yang hidup selama 1 hari. Penularan manusia disebabkan siklus ekstrinsik dari mulai masuknya gametosit hingga inokulasi sporozoit yang memerlukan waktu minimum 7 hari (dengan interval yang pasti bergantung pada suhu lingkungan) serta lamanya hidup pada nyamuk (Isselbacher *et al.*, 2014).

Plasmodium falciparum saat ini di dunia sudah ditemukan lebih dari 14 *strain*. *Plasmodium falciparum* terdiri dari lebih kurang 5.300 gen dan 211 gen berfungsi sebagai imunogen pada tubuh manusia. Perbedaan pada *strain Plasmodium falciparum* akan memberikan gejala klinik, patologi, sifat transmisi, maupun respons terhadap pengobatan yang berbeda pula pada tubuh manusia. Perbedaan *strain* pada *Plasmodium falciparum* akan memberikan gejala klinik, patologi, sifat transmisi, maupun respons terhadap pengobatan yang berbeda (Irawati, 2014).

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 ditolerir oleh pemakai obat. Dalam konteks malaria dikenal *multidrug resistant* (MDR) yaitu resistensi terhadap lebih dari satu jenis obat

antimalaria yang sehari-hari dipakai dalam pengobatan malaria. Multi drug resistant merupakan fenomena resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria. Di seluruh provinsi di Indonesia, parasit *Plasmodium falciparum* telah resisten terhadap klorokuin. Di beberapa provinsi juga telah terjadi resisten terhadap sulfadoksin-pirimetamin (SP). Sejak tahun 2004, terapi lini pertama malaria falciparum tanpa komplikasi adalah kombinasi artesunat dengan amodiakuin (Simamora dan Fitri, 2007). Parasit *Plasmodium falciparum* mempunyai kecenderungan menjadi resisten terhadap obat antimalaria dibandingkan spesies yang lain. Efikasi yang rendah dan gagal pengobatan pada *Plasmodium falciparum* dapat disebabkan oleh parasit yang resisten terhadap obat antimalaria atau infeksi baru (Handayani, Salwati and Tjitra, 2012).

Penelitian tentang malaria saat ini banyak yang menghubungkan tentang pengendalian penyebaran dengan vaksin malaria. Beberapa gen pada malaria sebagai kandidat untuk vaksin telah diteliti untuk mengetahui adanya variasi genetik. Parasit *Plasmodium falciparum* mempunyai kecenderungan untuk menjadi resisten terhadap obat antimalaria dibandingkan spesies yang lain (Simamora dan Fitri, 2007). *Plasmodium falciparum* memiliki petanda genetik yaitu lokus gen *Merozoit Surface Protein 1 dan 2 (MSP1–MSP2)* dan *Glutamate Rich Protein (GLURP)*. Ketiga lokus gen tersebut memiliki variasi genetik yang mirip dan mungkin dapat memberikan kesamaan sifat, terutama lokus gen GLURP (Handayani, Salwati dan Tjitra, 2012).

Glutamate Rich Protein (GLURP) adalah antigen *Plasmodium falciparum* yang telah dipelajari secara ekstensif. Protein pada GLURP bisa dibagi menjadi *N-terminal non repetitive region* (R25-500 atau R0), *a central repeat region* (R1) dan *C-terminal repetitive region GLURP* (R2). Gen GLURP adalah kandidat vaksin malaria yang telah mengalami uji coba fase pertama di Eropa dan Indonesia, persidangan direncanakan berlangsung di Afrika dalam waktu dekat (Lusingu *et al.*, 2005).

Gen GLURP terdapat selama kedua fase yaitu fase pre-eritrositik dan eritrositik pada siklus hidup parasit termasuk pada merozoit yang baru pecah. Sebuah studi imunologi yang dilakukan di daerah penularan malaria yang tinggi dan rendah menunjukkan prevalensi antibodi GLURP yang tinggi pada orang dewasa, serta hubungan signifikan antara tingkat spesifik antibodi GLURP yang tinggi dengan kepadatan parasit berjumlah rendah dan perlindungan klinis terhadap malaria. Selain itu, infeksi *Plasmodium falciparum* sering menunjukkan produksi antibodi sebagai respon ke GLURP yang secara alami dapat menghambat pertumbuhan *in vitro* dari *Plasmodium falciparum* dengan atau tidak adanya kerjasama dengan monosit yang menjadikan GLURP untuk dapat menjadi pengontrolan parasitemia (Pratt-riccio *et al.*, 2013).

Berdasarkan penjelasan tersebut, diperlukan penelitian terkait identifikasi adanya gen PfGLURP untuk mendapatkan gambaran variasi genetik pada

gen PfGLURP yang terdapat di daerah endemis, seperti Pesawaran, Lampung, untuk menilai adanya infeksi multigenotip yang dapat terjadi. Adanya variasi genetik dapat membantu dalam pengobatan malaria.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah berdasarkan latar belakang, didapatkan beberapa poin permasalahan sehingga dapat dirumuskan sebagai berikut:

- a) Apakah terdapat variasi genetik PfGLURP pada penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung?
- b) Alel dominan apakah yang terdapat pada variasi genetik PfGLURP?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian, didapatkan beberapa tujuan yaitu:

- a) Mengetahui variasi genetik PfGLURP pada penderita malaria *falciparum* di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.
- b) Mengetahui alel dominan yang ditemukan pada PfGLURP yang berasal dari penderita malaria *falciparum* di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai *baseline* data variasi genetik gen PfGLURP yang terdapat di Pesawaran, Lampung.
2. Penelitian ini dapat meningkatkan keterampilan peneliti dalam melakukan penelitian khususnya dalam bidang parasitologi molekuler

tentang *Plasmodium falciparum*, dan menjadi pengalaman yang berguna dalam dalam penerapan ilmu yang telah didapatkan selama perkuliahan

3. Penelitian ini juga dapat dijadikan referensi pustaka mengenai variasi genetik bagi penelitian selanjutnya.
4. Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar bagi pemerintah untuk mengambil langkah dalam pengendalian malaria khususnya malaria *falciparum* di daerah Pesawaran, sehingga membantu menurunkan angka kejadian malaria.

BAB 2

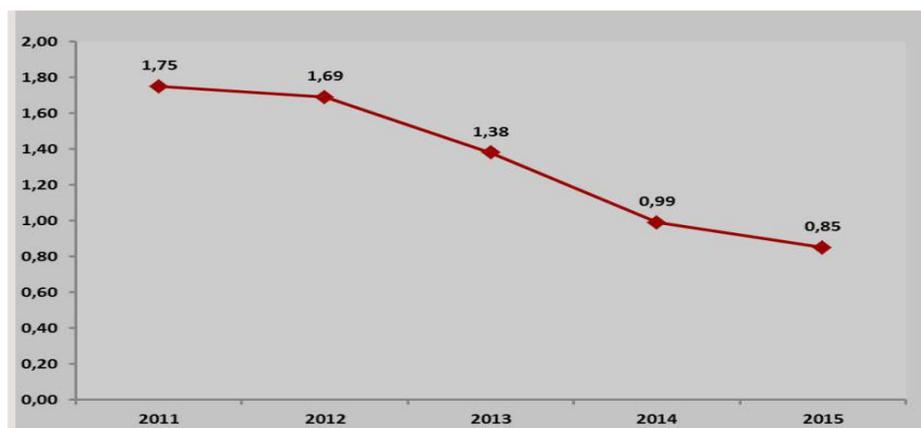
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria Secara Umum

Malaria merupakan penyakit yang mengancam jiwa dan banyak menyebabkan kematian. Penyakit ini disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang ditularkan kepada manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles sp.* yang juga berfungsi sebagai inang parasit ini. Penyakit ini ditandai dengan ditemukannya bentuk aseksual di dalam darah dan parasit ini menyerang eritrosit (Gusra, Irawati dan Sulastri, 2014).

World Malaria Report 2015 menyebutkan bahwa malaria telah menyerang 106 negara di dunia. *World Health Organization (WHO)* melaporkan sebanyak 149-274 juta kasus malaria dan 537.000-907.000 kematian akibat malaria terjadi pada tahun 2010 (Nindela, 2015). Komitmen global pada *Millenium Development Goals (MDGs)* menempatkan upaya pemberantasan malaria ke dalam salah satu tujuan bersama yang harus dicapai sampai dengan tahun 2015. Morbiditas malaria pada suatu wilayah ditentukan dengan *Annual Parasite Incidence (API)* per tahun (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2016).

Kasus Malaria merupakan penyakit menular yang upaya pengendaliannya menjadi komitmen global dalam MDGs. Penyakit Malaria sangat dominan di daerah tropis subtropis dan mematikan. *Annual Parasite Incidence* (API) atau Angka Parasit Malaria per 1.000 penduduk merupakan angka kesakitan yaitu jumlah penderita positif malaria di suatu wilayah dibandingkan dengan jumlah penduduk berisiko terkena malaria pada wilayah tersebut. API malaria di Kabupaten Pesawaran dapat dilihat pada gambar 1. (Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran, 2015).



Sumber: (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2016)

Gambar 1. API malaria per 1000 penduduk di Kabupaten Pesawaran.

Penyebaran malaria berkaitan dengan adanya tiga faktor utama yang saling berhubungan yaitu *host* (manusia/nyamuk), *agent* (parasit Plasmodium) dan *environment* (lingkungan). Penyebaran malaria terjadi apabila ketiga komponen saling mendukung. Sebagai *host intermediate*, manusia dapat terinfeksi oleh *agent* dan merupakan tempat berkembang biaknya *agent*. Cara hidup juga berpengaruh terhadap penularan, misalnya tidur dengan kelambu relatif lebih aman dari infeksi parasit. Sedangkan faktor

lingkungan yang cukup memberi pengaruh antara lain lingkungan fisik seperti suhu udara, kelembaban, hujan, angin, sinar matahari, arus air, lingkungan kimiawi, lingkungan biologi (mikroorganisme patogen) dan lingkungan sosial budaya. Tumbuhan bakau, lumut, ganggang dan berbagai jenis tumbuhan lain dapat mempengaruhi kehidupan larva nyamuk karena ia dapat menghalangi sinar matahari dari infeksi parasit (Ari Krisna, 2013).

Parasit malaria merupakan protozoa yang dapat menginfeksi darah target infeksinya. Parasit ini menyerang tidak hanya pada manusia, tetapi juga mamalia lain seperti kera, burung, reptil, bahkan hewan pengerat. Parasit malaria termasuk ke dalam genus *Plasmodium*. Penjelasan secara *taxonomi* dari *Plasmodium* dijelaskan pada tabel 1 (Bannister dan Sherman, 2009).

Tabel 1. *Taxonomi Plasmodium*

| Klasifikasi | Jenis Klasifikasi |
|--------------------|--------------------------|
| <i>Kingdom</i> | <i>Protozoa</i> |
| <i>Subkingdom</i> | <i>Baciliata</i> |
| <i>Phylum</i> | <i>Myzozoa</i> |
| <i>FSubphylum</i> | <i>Apicomplexa</i> |
| <i>Class</i> | <i>Aonoidasida</i> |
| <i>Ordo</i> | <i>Haemosporina</i> |
| <i>Genus</i> | <i>Plasmodium</i> |

Sumber: (Bannister dan Sherman, 2009; Igweh, 2012)

Secara parasitologi dikenal lima spesies *Plasmodium* dengan karakteristik klinis yang berbeda bentuk demamnya, yaitu :

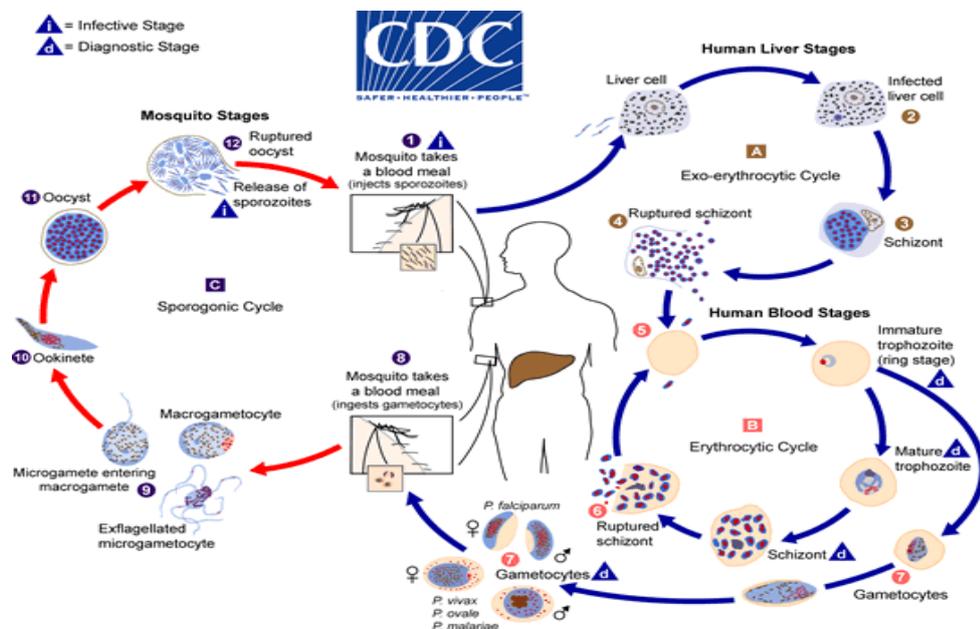
1. *Plasmodium vivax*, secara klinis dikenal sebagai malaria tertiana karena serangan demamnya terjadi setiap tiga hari sekali

2. *Plasmodium malariae*, secara klinis juga dikenal juga sebagai malaria quartana karena serangan demamnya terjadi setiap empat hari sekali
3. *Plasmodium ovale*, secara klinis dikenal juga sebagai malaria ovale dengan pola demam yang terjadi tidak khas setiap satu sampai dua hari sekali
4. *Plasmodium falciparum*, secara klinis dikenal sebagai malaria tropicana atau malaria tertiana maligna sebab serangan demamnya yang biasanya timbul setiap tiga hari sekali dengan gejala yang lebih berat dibandingkan infeksi oleh jenis Plasmodium lainnya
5. *Plasmodium knowlesi* yang selama ini dikenal hanya ada pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), ditemukan pula ditubuh manusia (Putra, 2011).

Terjadinya infeksi oleh parasit Plasmodium ke dalam tubuh manusia dapat terjadi melalui dua cara yaitu dapat secara alami melalui gigitan nyamuk *Anopheles sp.* betina yang mengandung parasit malaria dan dapat juga melalui induksi yaitu jika stadium aseksual dalam eritrosit masuk ke dalam darah manusia melalui transfusi darah, suntikan, atau pada bayi yang baru lahir melalui plasenta ibu yang terinfeksi (*congenital*) (Rahmawan, 2008).

Siklus hidup Plasmodium mempunyai dua hospes, yaitu vertebrata (manusia) dan nyamuk. Siklus aseksual di dalam hospes vertebrata dikenal sebagai skizogoni sedangkan siklus seksual yang membentuk tropozoit di dalam nyamuk sebagai sporogoni. Sporozoit yang aktif dapat ditularkan ke

dalam tubuh manusia melalui ludah nyamuk kemudian menempati jaringan parenkim hati dan tumbuh sebagai skizon (stadium ekso-eritrositer atau stadium pra-eritrositer). Sebagian trophozoit tidak tumbuh dan tetap tidur (*dormant*) yang disebut hipnozoit. Sel hati yang berisi parasit akan pecah dan terjadilah merozoit. Setelah proses pembelahan eritrosit akan hancur; merozoite, pigmen dan sel sisa akan keluar dan berada di dalam plasma. Parasit akan di fagositosis oleh *Reticuloendothelial System* (RES). Plasmodium yang akan menghindar akan masuk kembali ke eritrosit lain untuk mengulang stadium skizogoni. Beberapa merozoit tidak membentuk skizon tetapi memulai dengan bagian gametogoni yaitu membentuk mikro dan makro gametosit (stadium seksual). Siklus tersebut disebut masa tunas intrinsik. Siklus hidup Plasmodium dijelaskan pada gambar 2 (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).



Gambar 2. Siklus hidup Plasmodium.

Nyamuk *Anopheles sp.* betina yang menghisap darah individu yang terinfeksi malaria, maka gametosit jantan dan betina akan menuju ke dalam usus nyamuk. Perubahan molekuler dan seluler pada gametosit membantu parasit untuk cepat menyesuaikan ke vektor serangga dari inang manusia dan kemudian untuk memulai siklus sporogoni. Gamet jantan dan betina dalam usus nyamuk akan membentuk zigot yang kemudian berkembang menjadi ookinet yang aktif bergerak masuk ke dalam dinding nyamuk untuk berkembang menjadi ookista. Pertumbuhan dan pembelahannya masing-masing menghasilkan ribuan ookista bentuk haploid aktif yang disebut sporozoit. Setelah fase sporogoni dari 8-15 hari, sporozoit pecah kemudian masuk ke dalam rongga tubuh nyamuk, dan menuju kelenjar ludah nyamuk. Ketika nyamuk terinfeksi dengan sporozoit tersebut menghisap darah, sporozoit bisa berpindah dari kelenjar ludah ke dalam aliran darah manusia yang menyebabkan infeksi malaria di inang manusia (Widoyono, 2011).

Berbagai studi menunjukkan pada infeksi *Plasmodium knowlesi*, siklus reproduksi aseksual (pembelahan diri dalam tubuh manusia atau hewan) terjadi dalam waktu 24 jam. Lebih cepat dibandingkan siklus 48 jam pada *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium falciparum*, sedangkan 72 jam pada *Plasmodium malariae*. Masa inkubasi penyakit malaria bisa dilihat pada tabel 2 (Putra, 2011).

Tabel 2. Masa inkubasi penyakit malaria

| Plasmodium | Masa Inkubasi (Hari) |
|------------------------------|----------------------|
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 9-14 Hari (12) |
| <i>Plasmodium vivax</i> | 12-17 Hari (15) |
| <i>Plasmodium ovale</i> | 16-18 Hari (17) |
| <i>Plasmodium knowlesi</i> | 16-18 Hari (17) |
| <i>Plasmodium malariae</i> | 18-40 Hari (28) |

Sumber: (Putra, 2011)

Patofisiologi malaria sangat kompleks dan mungkin berhubungan dengan hal-hal sebagai berikut:

1. Penghancuran eritrosit

Fagositosis tidak hanya pada eritrosit yang mengandung parasit tapi juga terhadap eritrosit yang tidak mengandung parasit sehingga menimbulkan anemia dan anoksia jaringan. Pada hemolisis intravaskuler yang berat dapat terjadi hemoglobinuria (*black water fever*) dan menyebabkan gagal ginjal

2. Pelepasan mediator Endotoksin-makrofag

Pada saat skizogoni, eritrosit yang mengandung parasit memicu makrofag yang sensitif endotoksin untuk melepaskan berbagai mediator. Endotoksin mungkin berasal dari saluran pencernaan dan parasit malaria sendiri dapat melepaskan *Tumor Necrosis factor* (TNF), suatu sitokin yang ditemukan dalam peredaran darah manusia dan hewan yang terinfeksi parasit malaria. Gejalanya dapat menimbulkan demam, hipoglikemia dan sindrom penyakit pernafasan pada orang dewasa (Rahmawan, 2008).

3. Sekuestrasi eritrosit

Eritrosit yang terinfeksi dengan stadium lanjut *Plasmodium falciparum* dapat membentuk tonjolan-tonjolan (*knobs*) pada permukaannya. Akibat dari proses ini terjadilah obstruksi (penyumbatan) pembuluh kapiler yang menyebabkan terjadinya iskemia jaringan. Terjadinya sumbatan ini juga didukung oleh proses terbentuknya *rosette*, yaitu bergerombolnya sel darah merah yang berparasit dengan sel darah merah lainnya. Pada proses sitoadherensi ini juga terjadi proses imunologik yaitu terbentuknya mediator-mediator antara lain sitokin (TNF, IL-6 dan lain lain), dimana mediator tersebut mempunyai peranan dalam gangguan fungsi pada jaringan tertentu (Buffet *et al.*, 2013).

Sitokin terbentuk dari sel endotel, monosit dan makrofag setelah mendapat stimulasi dari toksin malaria. Sitokin ini antara lain TNF α , *Interleukin-1* (IL-1), IL-6, IL-3, *lymphotoxin* (LT) dan *Interferon gamma* (INF γ) (Akhyar, 2008). Pengeluaran sitokin terjadi saat siklus eritrositik *Plasmodium* di dalam tubuh manusia akan menimbulkan gejala yang khas yang disebut *trias malaria* (P.N.Harijanto, Nugroho dan A.Gunawan, 2010).

Secara klinis, gejala malaria infeksi tunggal pada pasien non imun terdiri atas beberapa serangan demam dengan interval tertentu (paroksisme), yang diselingi oleh suatu periode (periode laten) bebas demam. Sebelum demam pasien biasanya merasa lemah, nyeri kepala, tidak ada nafsu makan, mual ataupun muntah. Periode paroksisme biasanya terdiri dari tiga stadium yang

berurutan yakni stadium dingin (*cold stage*), stadium demam (*hot stage*) dan stadium berkeringat (*sweating stage*) (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

Serangan demam yang khas pada malaria terdiri dari tiga stadium, yaitu :

1. Stadium menggigil

Dimulai dengan perasaan kedinginan hingga menggigil. Penderita sering membungkus badannya dengan selimut atau sarung. Pada saat menggigil seluruh tubuhnya bergetar, denyut nadi cepat tetapi lemah, bibir dan jari-jari tangan biru, serta kulit pucat. Pada anak-anak sering disertai kejang-kejang. Stadium ini berlangsung 15 menit – 1 jam dan meningkatnya suhu badan.

2. Stadium puncak demam

Penderita berubah menjadi panas tinggi. Wajah memerah, kulit kering dan terasa panas seperti terbakar, frekuensi napas meningkat, nadi penuh dan berdenyut keras, sakit kepala semakin hebat, muntah-muntah, kesadaran menurun, sampai timbul kejang (pada anak-anak). Suhu badan bisa mencapai 41°C. Stadium ini berlangsung selama 2 jam atau lebih diikuti dengan keadaan berkeringat.

3. Stadium berkeringat

Seluruh tubuhnya berkeringat banyak, sehingga tempat tidurnya basah. Suhu badan turun dengan cepat, penderita merasa sangat lelah, dan sering tertidur. Setelah bangun dari tidur, penderita akan merasa sehat dan dapat melakukan tugas seperti biasa. Padahal, sebenarnya penyakit ini masih bersarang dalam tubuhnya. Stadium ini berlangsung 2-4 jam. Serangan

demam yang khas ini sering dimulai pada siang hari dan berlangsung selama 8 – 12 jam. Lamanya serangan demam berbeda untuk tiap spesies malaria (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinis, 2008).

Pada daerah endemis diagnosis malaria tidak sulit, biasanya diagnosis ditegakkan berdasarkan gejala serta tanda klinis. Tetapi walaupun di daerah endemis malaria, diagnosis banding malaria harus dipikirkan pada riwayat demam tinggi berulang, apalagi disertai gejala trias yaitu demam, splenomegali dan anemia (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

Beberapa pemeriksaan penunjang yang dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis malaria antara lain:

1. Pemeriksaan sediaan darah tepi tebal dan tipis.

Pemeriksaan mikroskopik darah tepi untuk menemukan adanya parasit malaria sangat penting untuk menegakkan diagnosa. Pemeriksaan satu kali dengan hasil negatif tidak menyampingkan diagnosa malaria. Pemeriksaan darah tepi tiga kali dan hasil negatif maka diagnosa malaria dapat disampingkan (Rahmawan, 2008). Untuk dapat melihat adanya parasit di dalam darah penderita, perlu dibuat sediaan darah malaria (SD). Selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Pemeriksaan SD ditetesi minyak imersi dan diperiksa di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif 100x. Jika ditemukan parasit pada pemeriksaan, penderita dinyatakan positif malaria (Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit, 2011).

2. Tes Antigen : *rapid test*

Mendeteksi adanya antigen dari *Plasmodium falciparum* (*Histidine Rich Protein II*). Deteksi sangat cepat hanya 3-5 menit, tidak memerlukan latihan khusus, sensitivitasnya baik, tidak memerlukan alat khusus. Mekanisme kerja tes ini berdasarkan deteksi antigen parasit malaria, dengan menggunakan metoda *imunokromatografi*, dalam bentuk dipstik (Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinis, 2008).

3. Tes Serologi

Tes serologi mulai diperkenalkan sejak tahun 1962 dengan memakai teknik *indirect fluorescent antibody test*. Tes ini berguna mendeteksi adanya spesifik antibodi terhadap malaria atau pada keadaan dimana parasit sangat minimal. Tes ini kurang bermanfaat sebagai alat diagnostik sebab antibodi baru terjadi setelah beberapa hari parasitemia. Manfaat tes serologi terutama untuk penelitian epidemiologi atau alat uji saring donor darah. Titer > 1:200 dianggap sebagai infeksi baru dan test >1:20 dinyatakan positif. Metode-metode tes serologi antara lain *indirect haemagglutination test*, *immunoprecipitation techniques*, *ELISA test*, *radio-immunoassay* (Rahmawan, 2008).

2.2 Variasi Gen pada Malaria *Plasmodium falciparum*

Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* hingga kini tetap menjadi ancaman kesehatan yang utama, khususnya bagi anak-anak dan ibu hamil di daerah yang endemik. *Plasmodium falciparum* merupakan spesies yang berbahaya karena penyakit yang ditimbulkannya dapat menjadi berat. Perkembangan aseksual dalam hati hanya terjadi satu kali pada stadium fase

pra-eritrosit, tidak ada fase ekso-eritrosit yang dapat menimbulkan relaps seperti pada infeksi dari spesies lain yang mempunyai hipnozoit dalam sel hati (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

Perbedaan yang paling penting antara *Plasmodium falciparum* dan lainnya adalah dapat memodifikasi permukaan eritrosit yang terinfeksi sehingga stadium aseksual dan gametosit dapat melekat ke endotel kapiler. Permukaan eritrosit yang terinfeksi trofozoit dan skizon *Plasmodium falciparum* akan diliputi dengan tonjolan yang merupakan tempat parasit melekat dengan sel hospes. Bila parasit mendekati pada sel endotel, maka parasit tersebut tidak akan dibawa oleh aliran darah ke limfa yang merupakan tempat terjadinya eliminasi parasit. Reseptor endotel pada hospes sangat bervariasi dan parasit yang berbeda dapat melekat pada berbagai kombinasi reseptor (Sutanto *et al.*, 2010).

Beberapa gen *Plasmodium falciparum* menunjukkan polimorfisme genetik yang ekstensif. Fenomena ini dimanfaatkan untuk mengkode genetik dan untuk menilai dinamika populasi parasit. Sebagai contoh, tingginya polimorfisme ditampilkan dalam lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP dalam lokasi geografis yang berbeda di daerah endemik malaria. Kemungkinan pasien di dalam area transmisi baru terinfeksi dengan sebuah parasit yang memiliki genotipe identik dengan infeksi yang rendah. Oleh karena itu, membandingkan genotipe dari tiga lokus di *baseline* diharapkan

dapat membedakan antara infeksi baru ataupun timbulnya kembali infeksi (Mwingira *et al.*, 2011).

Polimorfisme GLURP terutama melibatkan variasi di dalam jumlah tertentu dan mengulangi urutan genom yang ada. Urutan genom mempengaruhi besarnya gen dan produk protein. Satu varian dari gen yang dijumpai dalam darah tahap parasit terhadap lebih dari satu alel tidak mewakili adanya infeksi multiklonal (Pratt-riccio *et al.*, 2013).

Terdapat banyak keragaman genetik pada *Plasmodium falciparum* dan merupakan salah satu faktor dimana parasit dapat lolos dari respon imun yang dihasilkan oleh tubuh. Hasilnya ialah dari polimorfisme alel, rekombinasi, penyusunan ulang kromosom dan variasi antigen. Eksperimen *crossing of genetically distinct* oleh Walliker (1987) menetapkan rekombinasi genetik terjadi selama meiosis, membuat genotip dari parasit. Keragaman genetik dari parasit malaria menunjukkan permasalahan besar yang harus dipahami dari beberapa aspek infeksi malaria dan transmisi dinamik penyakit dan penanganannya berupa vaksin (Kidima dan Nkwengulila, 2015).

Keanekaragaman parasit malaria berdasarkan genotip dan fenotip dapat meningkatkan kemampuan untuk melawan upaya pengendalian seperti pengobatan secara terapeutik. Di daerah yang endemik, setiap *host* pada individu memiliki banyak *strain* dengan genotip yang berbeda termasuk

strain yang dapat memberikan terjadinya resistensi obat. Perbedaan genotip yang berbeda bisa terjadi ketika seekor nyamuk menggigit seseorang yang sudah terinfeksi malaria yang memiliki beberapa *strain* parasit. Keanekaragaman genetik dapat terjadi dengan riwayat demografi malaria dan faktor lainnya di wilayah tertentu yang dapat mencerminkan intensitas transmisi, efektivitas pengendalian malaria, dan potensi munculnya resistensi pada parasit (Soe *et al.*, 2017).

Glutamate Rich Protein (GLURP) adalah sebuah ekso-antigen yang terdapat di *Plasmodium falciparum*. Gen GLURP mempunyai panjang basa 600 bp-1,2 kbp yang mempunyai 220 kDa protein yang terdapat dalam tahap perkembangan siklus hidup parasit di *host* manusia. Gen GLURP memiliki imunogenik yang tinggi dan berfungsi sebagai target antibodi yang terlibat pada inhibitor seluler pada monosit (Kumar *et al.*, 2014).

Gen GLURP berisi region protein rekombinan yaitu *N-terminal non-repetitive region* (R0) yang memiliki panjang basa 94-489, *Central repetitive region* (R1) yang memiliki panjang basa 489-705, dan *An immunodominant C-terminal repetitive region* (R2) yang memiliki panjang basa 705-1178. Protein rekombinan yang berbeda pada panjang basa dapat membedakan pembagian dari gen GLURP. Sebuah studi pada *Naive Volunteer* bahwa level antibodi melawan R2 GLURP di dalam plasma ditemukan lebih lebih tinggi R1 daripada R0. Studi selanjutnya menunjukkan bahwa R2 itu memerankan peran penting dalam menstimulasi

perlindungan imunitas untuk melawan *Plasmodium falciparum* malaria. Alel R2 sudah terbukti genetik yang baik sebagai penanda untuk genotip *Plasmodium falciparum* dan juga perbedaan infeksi baru dari infeksi berulang (Kumar *et al.*, 2014).

Plasmodium falciparum Glutamate Rich Protein (PfGLURP) diekspresikan pada tahap eritrositik dan pra-eritrositik parasit dan juga pada merozoit yang baru dirilis. Variasi gen GLURP memiliki antigen yang tinggi tetapi kurang polimorfik di wilayah geografis yang berbeda. Dalam program pengendalian dan eliminasi malaria yang sedang berlangsung, sebuah kandidat vaksin penularan transmisi yang menargetkan tahap seksual perkembangan parasit memainkan peran penting. Di antara berbagai target, antigen tahap seksual *Plasmodium falciparum* (pfs25) adalah protein permukaan yang dominan dan ada bukti substansial dari induksi aktivitas penghambatan transmisi atau pengurangan dengan keuntungan polimorfisme terbatas atau tidak ada (Kaur, Hargobinder Sehgal, Rakesh Goyal *et al.*, 2017).

Pentingnya antibodi GLURP untuk kekebalan terhadap penyakit lebih lanjut. Studi kasus yang terdapat di Ghana menunjukkan antibodi IgG terhadap GLURP dapat menguatkan inhibitor yang dimediasi dengan monosit tergantung pada pertumbuhan parasit secara *in vitro*. Antibodi R0 secara konsisten lebih tahan daripada antibodi terhadap R2 GLURP. 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 (Amoah *et al.*, 2017).

Gen GLURP mempunyai imunogenik dengan tinggi dan mempersiapkan target untuk antibodi termasuk di dalam *antibody dependent cellular inhibition* (ADCI) di dalam monosit. Di dalam ADCI, antibodi sitofilik (terutama IgG3 dan IgG1) yang beraksi dan sinkronisasi dengan monosit untuk mengontrol multiplikasi Plasmodium. Beberapa studi tentang imuno-epidemiologi menggunakan data klinis dari berbagai variasi secara konsisten diidentifikasi tingkat imunoglobulin G (IgG) anti R0 GLURP yang tinggi signifikan dari tingkat perlindungan terhadap tingkat parasitemia yang tinggi dan episode demam malaria. perlindungan antibodi dianggap memperoleh *antibody dependent cytotoxic inhibition* (ADCI) melalui ikatan untuk permukaan merozoit (Lusingu *et al.*, 2005). Studi tentang epidemiologi imunologi menimbulkan perbedaan area endemik yang menunjukkan level tinggi dari antibodi GLURP di dalam malaria yang menginfeksi manusia yang ditemukan ke penyediaan perlindungan sebagai mekanisme perlawanan dengan parasitemia yang tinggi dan penyakit klinis (Kumar *et al.*, 2014).

2.3 Metode Deteksi Gen GLURP *Plasmodium falciparum*

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan salah satu metode biomolekuler yang telah dikembangkan untuk mendeteksi penyakit infeksi seperti malaria. PCR bekerja dengan memperbanyak suatu sekuens gen yang diinginkan dan kemudian dibaca pada *agarose gel* yang telah di elektroforesis (Bernadus, 2013). Pemeriksaan ini dapat dilakukan pada fasilitas yang tersedia. Pemeriksaan ini penting untuk membedakan antara re-infeksi dan rekrudensi pada *Plasmodium falcifarum*. Selain itu dapat digunakan untuk identifikasi spesies Plasmodium yang jumlah parasitnya rendah atau di bawah batas ambang mikroskopis (Rezeki, 2014).

Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA
2. *Inverse-PCR*, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen

3. *Nested-PCR*, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut *primer inner* disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai *outer primer*. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan *outer primer*, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan *inner primer* atau *nested primer* menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. *Nested primer* akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama
4. *Quantitative-PCR*; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel
5. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*; metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan
6. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan

teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom (Zuhriana K.Yusuf, 2010).

Metode PCR dapat dilakukan menggunakan bahan DNA murni tanpa kontaminasi bahan lainnya. Oleh karena itu dibutuhkan proses ekstraksi DNA atau isolasi DNA untuk mendapatkan DNA murni. Ekstraksi ini dapat dilakukan secara konvensional atau dengan *kit*. Secara konvensional, ekstraksi DNA dapat dilakukan menggunakan CTAB/ NaCl, metode SDS dan metode fenol kloroform. Seiring berkembangnya zaman, ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *kit* dengan berbagai merek, salah satu *kit* yang sering digunakan adalah *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) (Fitriya, Ibrahim dan Lisdiana, 2011).

Bahan ekstraksi DNA yang digunakan dalam metode PCR akan melalui tiga tahapan penting, yaitu denaturasi, *annealing* dan pemanjangan. Pada ketiga tahapan tersebut, tidak hanya hasil dari ekstraksi DNA (sebagai cetakan DNA) yang digunakan, melainkan membutuhkan oligonukleotida *primer* (*amplimers*) untuk mengawali sintesis DNA target, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang berfungsi untuk membantu menempel di ujung rantai 3' pada *primer* saat terjadinya pemanjangan, DNA polimerase untuk melakukan katalisasi reaksi pada rantai DNA dan yang terakhir adalah komponen pendukung lain yaitu *buffer* (Zuhriana K.Yusuf, 2010).

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat :

a. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim *Taq* polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim *Taq polymerase*. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

b. Annealing (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai

dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

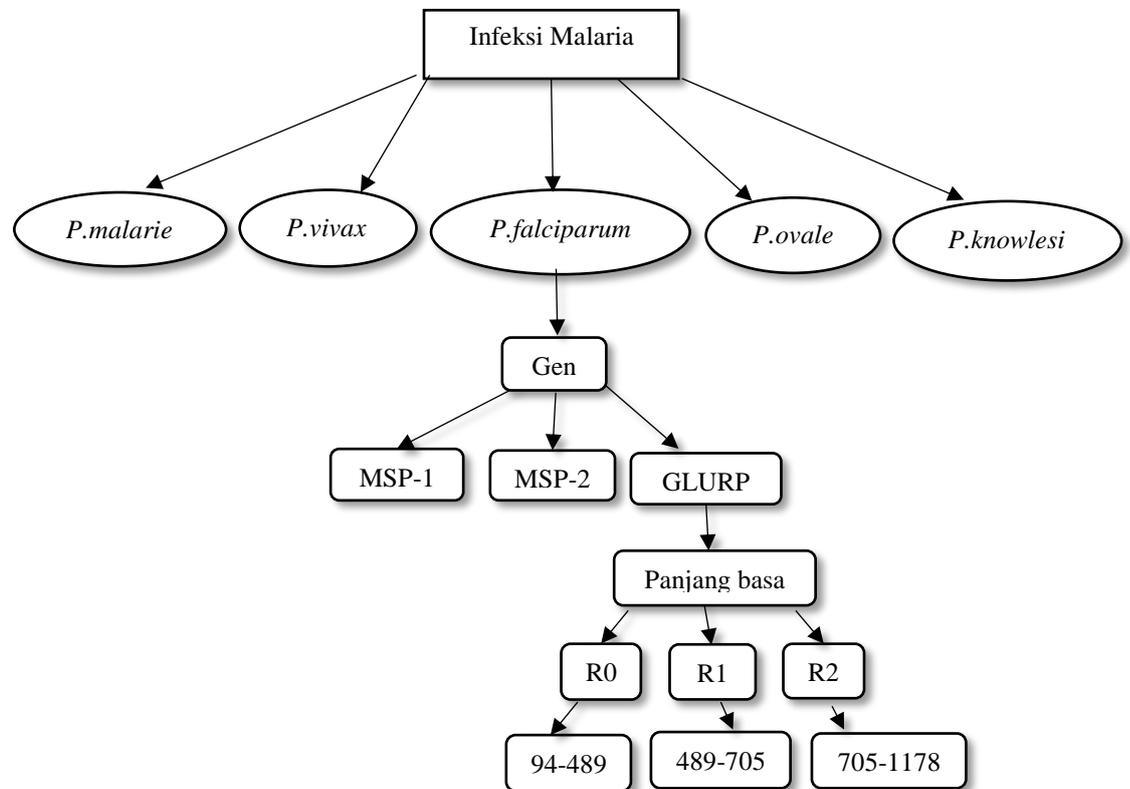
c. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini *Taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35–100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Zuhriana K.Yusuf, 2010).

Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil yang positif (Zuhriana K.Yusuf, 2010).

2.4 Kerangka Teori

Kerangka teori pada penelitian ini dijelaskan pada gambar 3.

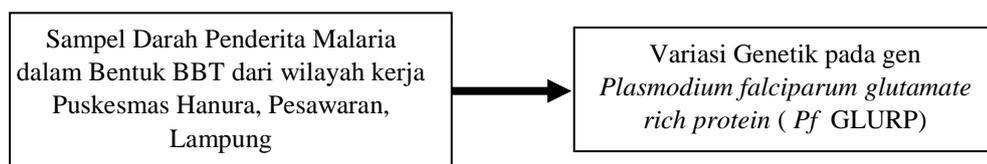


Sumber: (Pratt-riccio *et al.*, 2013)

Gambar 3. Kerangka Teori.

2.5 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dijelaskan pada gambar 4



Sumber: (Pratt-riccio *et al.*, 2013)

Gambar 4. Kerangka Konsep.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Survey* yang bersifat deskriptif untuk mendeteksi adanya variasi genetik *Plasmodium falciparum* *Glutamate Rich Protein* (PfGLURP) pada sampel darah positif malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan dilaksanakan pada bulan November sampai Desember 2017.

3.3 Subjek Penelitian dan Sampel

Subjek penelitian adalah warga di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran yang menderita malaria berdasarkan pada mikroskopis. Pengambilan sampel darah pada tahun 2013-2015. DNA dari sampel telah diisolasi dan saat ini tersimpan dalam ruangan Bahan Biologi Tersimpan (BBT). Jumlah BBT yang tersedia sebanyak 23 sampel DNA. Semua BBT yang tersedia akan dilakukan pemeriksaan PCR untuk mendeteksi adanya gen GLURP.

3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

BBT yang akan digunakan mengikuti kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan.

Kriteria Inklusi :

1. Sampel BBT yang masih dapat digunakan untuk PCR
2. Jumlah volume sampel mencukupi

Kemudian kriteria sampel yang eksklusi adalah :

1. Terkontaminasi bahan kimia lain

3.5 Definisi Operasional

Pada penelitian ini didapatkan satu variabel, yaitu gen *Plasmodium falciparum* *Glutamate Rich Protein* (Pf GLURP). Variabel ini yang akan dijadikan indikator dalam penentuan adanya variasi genetik. Penjelasan variabel penelitian akan dijelaskan pada tabel 3.

Tabel 3. Definisi Operasional

| Variabel | Definisi | Alat Ukur | Cara Ukur | Hasil Ukur | Skala |
|------------------|--|------------------------|------------------------------|--|--------------------|
| Gen GLURP | Gen <i>marker</i> dalam infeksi multigenotip pada <i>Plasmodium falciparum</i> | PCR dan elektroforesis | Amplifikasi segmen gen GLURP | Fragmen DNA dengan panjang basa 600 bp-1,2 kbp | Kategorik (Nomina) |

Sumber: (Handayani, Salwati dan Tjitra, 2012).

3.6 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dilakukan dengan melalui dua tahapan yaitu isolasi DNA dan amplifikasi gen PfGLURP menggunakan PCR konvensional. Alat dan bahan yang digunakan dibedakan sesuai dengan tahapan yang akan dilakukan. Tahapan tersebut meliputi isolasi DNA, amplifikasi PfGLURP menggunakan PCR dan elektroforesis.

Pada tahapan isolasi DNA, Molekul DNA dalam suatu sel dapat diekstraksi atau diisolasi untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis. Isolasi DNA merupakan suatu prosedur yang bertujuan untuk memisahkan materi genetik suatu makhluk hidup dari materi yang ada disekitarnya. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan dua cara yaitu bahan-bahan yang digunakan didapatkan secara terpisah atau dengan menggunakan bahan yang sudah ada dalam satu kemasan atau lebih dikenal dengan sebutan *kit*. Di dalam *kit* seluruh prosedur serta bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA sudah tersedia termasuk penggunaan setiap bahan, baik pengenceran dan cara penggunaan (Qiagen, 2016).

Pada penelitian ini isolasi DNA menggunakan QIAamp® DNA *Kit* (Qiagen). Bahan-bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA adalah QIAamp® DNA *Kit* yang terdiri dari; Proteinase K; *Buffer* AL; *Buffer* AW1;

Buffer AW2; dan *Buffer AE*, Etanol (100%), sampel darah, dan air murni (aquabidest). Adapun alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah *pulse-vortexing*, *spindown*, *QIAamp spin column*, *collection tube 2 ml*, *centrifuge*, *microcentrifuge tube*, makropipet berukuran 100-1000 μ l maupun mikropipet berukuran 10-100 μ l, *blue tips*, *yellow tips*, *stopwatch*, dan *waterbath 56°C* (Qiagen, 2016).

Setelah melakukan tahapan isolasi DNA. Hasil dari isolasi DNA dari akan dilanjutkan dengan tahapan berikutnya yaitu amplifikasi. Proses amplifikasi ini bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA target yang telah diisolasi. Proses amplifikasi pada penelitian ini menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara konvensional. Alat PCR yang digunakan adalah Rotor-Gene® Q (Qiagen). Penelitian ini menggunakan dua merk kit untuk dilakukan proses amplifikasi yaitu menggunakan KAPA HiFi HotStart PCR Kit (*Kapabiosystem*) dan MyFi™ DNA Polymerase (*Bioline*). Amplifikasi bahan yang dibutuhkan adalah *aqua for Injection*, DNA *template*, *primer* DNA target (*forward* dan *reverse primer*) akan dijelaskan pada tabel 4 (KapaBiosystems, 2013; Bioline, 2017).

Tabel 4. Sekuensing Primers GLURP

| Primers | Sekuensing |
|------------------------|--|
| First Reaction | G-OF 5'- TGAATTTGAAGATGTTCCACTGAAC -3' G-OR 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3' |
| Second Reaction | G-NF 5'- TGTTCCACTGAACAATTAGATTTAGATCA -3' G-OR 5'- GTGGAATTGCTTTTTCTTCAACTAA -3' |

Sumber: (Kirsten Moll, Akira Kaneko, 2013).

Adapun alat yang dibutuhkan dalam proses amplifikasi adalah rotor-Gene® Q (Qiagen), mikropipet 0,5-10 μ l dan mikropipet 10-100 μ l, *small tips* dan *yellow tips* ukuran 0,2 μ l, *microcentrifuge tube*, nampan, rak dingin, *ice box* ataupun lemari pendingin, *vortex*, dan *spindown*.

Tahapan berikutnya adalah elektroforesis. Elektroforesis merupakan suatu cara untuk membaca atau menginterpretasikan hasil dari proses PCR. Prinsip elektrofor esis agarose adalah teknik pemisahan asam nukleat/ protein berdasarkan perbedaan medan listrik, molekul dan partikel bermuatan akan bergerak ke arah elektrode yang memiliki muatan berlawanan di bawah pengaruh medan listrik.

Bahan yang diperlukan untuk melakukan elektroforesis adalah agarose gel 1% (agarose 1 gr dengan TBE 1 \times 100 ml), loading dye 6 \times , TBE 1 \times , *red gel*, *aquabidest*. Adapun alat yang digunakan dalam elektroforesis pada penelitian ini yaitu berupa satu set alat elektroforesis, solatip atau parafilm, tabung erlenmayer, *hot plate*, *stabillizer*, mikropipet berukuran 0,5-10 μ l, *small tips*, dan *uv transluminator*.

3.7 Prosedur Penelitian

Terdapat beberapa tahapan untuk melakukan prosedur *Genotyping* Gen PFGLURP. Tahapan tersebut meliputi isolasi DNA, amplifikasi PfGLURP menggunakan PCR dan elektroforesis.

a. Isolasi DNA

1. Memasukan 20 μ l QIAGEN Protease (atau K Proteinase) ke dalam 1.5 ml *microcentrifuge tube*;
2. Menambahkan 200 μ l sampel ke *microcentrifuge tube*;
3. Menambahkan 200 μ l *buffer* AL ke dalam sampel, kemudian di *vortex* selama 15 detik;
4. Menginkubasi selama 10 menit dalam suhu 56°C pada *waterbath*;
5. Melakukan *spindown* 1.5 ml *microcentrifuge tube* untuk menghilangkan cairan yang terdapat pada tutup *tube*;
6. Menambahkan 200 μ l etanol (100%) ke dalam sampel, kemudian di *vortex* menggunakan *pulse-vortexing* selama 15 detik. Setelah itu, kembali melakukan *spindown* untuk menghilangkan cairan yang terdapat pada tutup *tube*;
7. Campuran larutan tersebut dipindahkan ke *QIAamp Spin Column* (2 ml *collection tube*) tanpa membasahi pinggiran *tube*, menutup *tube*, lalu di *centrifuge* dalam 6000 x g (8000 rpm) selama satu menit. Kemudian membuang hasil *filter* yang terdapat pada *collection tube*;
8. Menambahkan 500 μ l *buffer* AW1 pada *QIAamp Spin Column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam 6000 x g (8000rpm) selama satu menit. Membuang hasil *filter* yang terdapat pada *collection tube*;

9. Menambahkan 500µl *buffer* AW2 pada *QIAamp Spin Column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam kecepatan penuh 20000 x g (14000rpm) selama tiga menit;
 10. Meletakkan *QIAamp Spin Column* kedalam 1.5ml *microcentrifuge tube* dan menyingkirkan *collection tube* yang terdapat *filter*. menambahkan 200µl *buffer* AE pada *QIAamp Spin Column*. Menginkubasi dalam suhu ruangan (15-25°C) selama satu menit, lalu melakukan *centrifuge* dalam 6000 x g (8000rpm) selama satu menit;
 11. Membuang *QIAamp Spin Column* dan menutup 1,5 ml *microcentrifuge tube*, hasil ekstraksi dapat disimpan pada lemari pendingin.
- b. Persiapan amflipikasi pertama PfGLURP menggunakan PCR
1. Membuat campuran reaksi dengan perhitungan: 25 µL per reaksi × (total nomor reaksi + 1);
 2. Menghitung jumlah setiap bahan yang dibutuhkan pada setiap reaksi, volume setiap bahan dikalikan dengan reaksi (total nomor reaksi + 1). Volume yang dibutuhkan pada setiap *kit*, berikut rincian volume pada masing-masing *kit*:
 3. KAPA *HotStart* PCR *Kit* (Kapabiosystem) :

| | |
|---|-----------|
| 5X KAPA HiFi <i>Buffer</i> (MgCl ₂) | : 5 µL |
| 10 mM KAPA dNTP <i>Mix</i> | : 0,75 µL |
| 10 µM <i>Forward Primer</i> | : 0,75 µL |

| | |
|--|------------------|
| 10 μ M <i>Reverse Primer</i> | : 0,75 μ L |
| <i>DNA Template</i> | : 1 μ L |
| 1 U/ μ l KAPA HiFi Hotsrat <i>DNA Polymerase</i> | : 0,5 μ L |
| <i>Aqua for Injection</i> | : 16,25 μ L; |

4. MyFi™ *DNA Polymerase (Bioline)* :

| | |
|----------------------------------|---------------|
| 5X MyFi <i>Reaction Buffer</i> | : 5 μ L |
| 20 μ M <i>Forward Primer</i> | : 0,5 μ L |
| 20 μ M <i>Reverse Primer</i> | : 0,5 μ L |
| <i>DNA Template</i> | : 1 μ L |
| MyFi <i>DNA Polymerase</i> | : 1 μ L |
| <i>Aqua for Injection</i> | : 17 μ L; |

5. Mencampurkan setiap bahan dengan volume sesuai dengan perhitungan total reaksi ke dalam *microcentrifuge tube*, kecuali *DNA template*. Selama pengerjaan, seluruh bahan diletakkan pada nampan dan rak dingin, untuk menjaga suhu;
6. Melakukan aliquot campuran reaksi tersebut sebanyak 24 μ L pada setiap 0,2 ml *microcentrifuge tube*;
7. Menambahkan *DNA template* sebanyak 1 μ L pada setiap *tube*
8. Menempatkan *tube* ke dalam *rotor*, kemudian memasukkan *rotor* ke dalam Rotor-Gene® Q (Qiagen);
9. Menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

- c. Persiapan amflifikasi kedua (*Nested*) PfGLURP menggunakan PCR
1. Melakukan kembali langkah satu sampai empat seperti pada amplifikasi pertama;
 2. Menambahkan 1 μ L hasil amplifikasi pertama pada setiap *tube*;
 3. Menempatkan *tube* ke dalam *rotor*, kemudian memasukkan *rotor* ke dalam Rotor-Gene® Q (Qiagen);
 4. Menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.
- d. *Cycling parameter* pada PCR

Pada tahap ini, terjadi tiga proses utama yaitu denaturasi, *annealing* dan *extension* dari materi genetik sampel. Setiap tahapan pada PCR ini membutuhkan suhu tertentu yang berbeda-beda. Suhu serta waktu yang dibutuhkan pada setiap tahapan, baik pada amplifikasi pertama dan kedua dijelaskan pada tabel kelima.

Tabel 5. Suhu Amplifikasi Pertama dan Kedua

| No | Proses | Suhu (°C) | Waktu |
|----|-----------------|-----------|---------|
| 1 | Prendenaturasi | 95 | 5 menit |
| 2 | Denaturasi | 94 | 1 menit |
| 3 | Anneling | 58 | 2 menit |
| 4 | Extention | 72 | 2 menit |
| 5 | Final Extention | 72 | 5 menit |

Sumber: (Snounou dan Färnet, 2013).

Tahap denaturasi, *anneling* dan *extension* diulangi sebanyak 25 siklus pada amplifikasi pertama dan 30 siklus pada amplifikasi kedua dengan

menggunakan *KAPA HotStart PCR Kit*. Pada penggunaan MyFi™ DNA *Polymerase Bioline*, dilakukan pengulangan sebanyak 30 siklus baik pada amplifikasi pertama ataupun amplifikasi kedua. Setelah selesai seluruh tahapan, hasil dapat didiamkan pada suhu ruangan atau disimpan pada lemari pendingin (Snounou dan Färnet, 2013).

e. Pembuatan Gel Agarose untuk elektroforesis

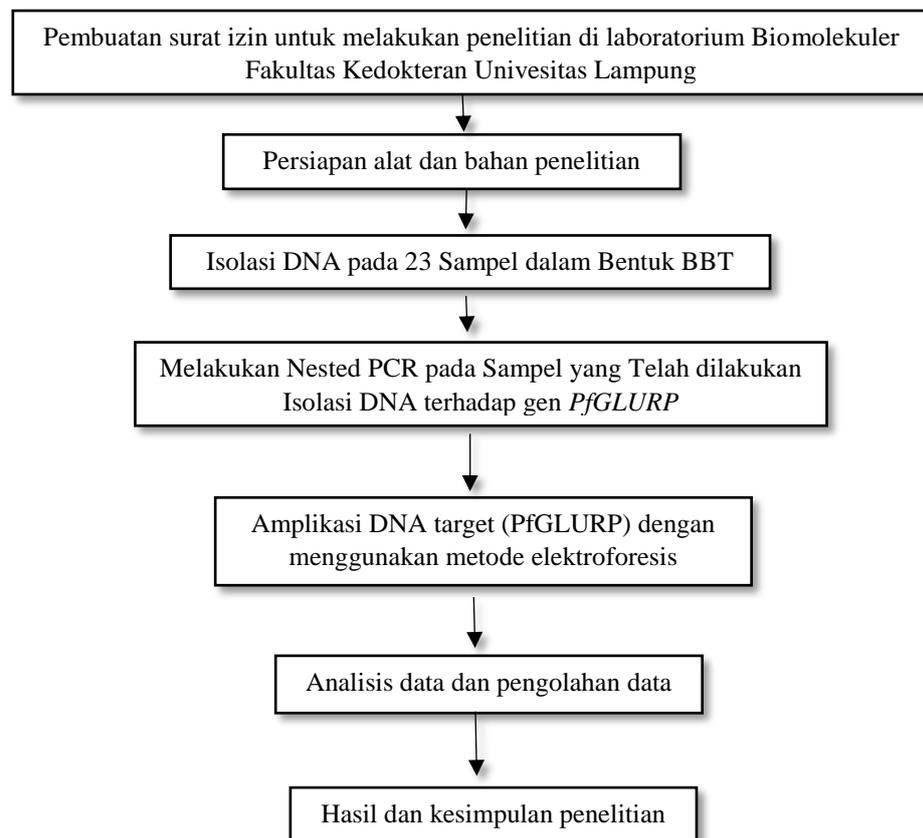
1. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 2%.
2. Pembuatan gel dimulai dengan mencampurkan 2 gram gel agarose dengan 100 ml 1 × TAE
3. Kemudian campuran dididihkan dalam *microwave* selama 25 menit pada $\pm 80^{\circ}\text{C}$. Campuran dibiarkan hingga suhunya turun sampai dengan 55°C .
4. Selagi menunggu turunnya suhu agarose, dipersiapkan bilik elektroforesis dengan memasang pembatas pada setiap sisi baki sebagai pencetak agarose.
5. Setelah mencapai suhu yang sesuai, agarose dituangkan ke dalam baki tersebut dan di letakkan *comb* pada salah satu ujung sisi baki (pada kutub negatif). Agarose dibiarkan hingga mengeras menjadi gel yang padat. Setelah mengeras sempurna, *comb* lalu dicabut.
6. Kemudian pembatas baki pada setiap sisi dilepaskan dan baki diletakkan ke dalam bilik elektroforesis yang telah terisi larutan *buffer* (The biotechnology education company, 2003; Lucchi *et al.*, 2012).

f. Elektroforesis

1. Menyiapkan kertas parafilm atau solatip pada meja;
2. Meletakkan 2 μL *loading dye* pada parafilm atau solatip;
3. Mengambil 3 μL hasil amplifikasi kedua, kemudian mencampurkannya dengan *loading dye*;
4. Mengambil 5 μL hasil campuran tersebut, kemudian memasukkannya ke dalam sumur pada *gel agarose*;
5. Menyambungkan alat elektroforesis dengan sumber listrik dengan pengaturan pada alat elektroforesis, yaitu 100 V, 50 Watt dan 250 mA selama 55 menit;
6. Setelah selesai, didiamkan beberapa saat dan mengangkat agarose dari bilik elektroforesis dan meletakkannya pada alat UV *transilluminator* untuk divisualisasikan (Snounou dan Färnet, 2013).

3.8 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan sesuai alur yang dijelaskan pada gambar lima



Gambar 5. Alur Penelitian

3.9 Etik Penelitian

Etik penelitian ini akan diajukan kepada bagian etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Etik penelitian ditunjukkan dalam penggunaan BBT yang berasal dari penderita malaria pada wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran dalam identifikasi gen PfGLURP.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu:

1. Terdapat adanya variasi genetik gen PfGLURP yang berasal dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Lampung.
2. Alel yang dominan pada gen PfGLURP yang berhasil diidentifikasi di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Lampung adalah R2 (54,2%).

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan terkait penelitian ini yaitu:

1. Sampel yang digunakan sebaiknya dari daerah yang berbeda-beda untuk mengetahui demografis perbandingan variasi gen di setiap wilayah.
2. Penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan dengan *sequencing* untuk mengetahui perbedaan susunan basa nukleotida pada hasil amplifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Amoah LE, Nuvor SV, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. 2017. Natural antibody responses to Plasmodium falciparum MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Parasites & Vectors*. 10(1):395.
- Ari Krisna S. 2013. Faktor yang berhubungan dengan kejadian penyakit malaria di Desa Bobalo Kecamatan Palasa Kabupaten Parigi Moutong Tahun 2013.
- Bannister LH, Sherman IW. 2009. Plasmodium. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Bernadus JB. 2013. Polymerase chain reaction di daerah Likupang dan Bitung.
- Bioline. 2017. MyFi™ DNA Polymerase. Singapore:Bioline.
- Buffet P, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Turner GD, et al. 2013. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 117(2):381-92.
- Company TBE. 2003. Principles and practice of agarose gel electrophoresis. The Biotechnology Education Company.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran. 2015. Profil Kesehatan Kabupaten Pesawaran tahun 2015.
- Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinis. 2008. Pelayanan kefarmasian untuk penyakit malaria.
- Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. 2011. Pedoman teknis pemeriksaan parasit malaria.
- Fitriya RT, Ibrahim M, Lisdiana L. 2011. Keefektifan metode isolasi DNA kit dan CTAB / NaCl yang dimodifikasi pada Staphylococcus aureus dan Shigella dysenteriae.
- Fridolina Mau, Elsa HM. 2016. Keragaman genetik dari Msp 1, Msp 2, dan Glurp pada Plasmodium falciparum di Kabupaten Sumba Tengah, Nusa Tenggara Timur. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 44(2):77-84.

- Gusra T, Irawati N, Sulastri D. 2014. Penelitian gambaran penyakit malaria di Puskesmas Tarusan dan Puskesmas Balai Selasa Kabupaten Pesisir Selatan periode Januari-Maret 2013. 3(2):234–7.
- Handayani S, Salwati E, Tjitra E. 2012. Keragaman genetik petanda Plasmodium falciparum dari specimen subyek penelitian monitoring dihidroartemisinin-piperakuin di Kalimantan dan Sulawesi. 22(1):120–30.
- Harijanto PN, Nugroho A dan Gunawan C. 2010. Malaria dari molekuler ke klinis. edisi ke 2. Jakarta: EGC.
- Igweh JC. 2012. Biology of malaria parasites. Malaria Parasites.
- Ikatan Dokter Anak Indonesia. 2012. Buku Ajar Infeksi dan Pediatri Tropis. Edited . Edisi 2. Edited by Soedarmo H. Garna SR. Hadinegoro dan Satari I. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI.
- Irawati L. 2014. Penelitian hubungan Tumor necrosis factor-Alfa (Tnf-A) dengan kadar hemoglobin dan parasitemia pada infeksi Falciparum. 3(2):98–101.
- Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fauci dan Kasper. 2014. Prinsip-Prinsip Ilmu Penyakit Dalam Harrison. Edisi 13. Edited by Prof. dr. Ahmad H, Asdie. Jakarta:EGC.
- KapaBiosystems. 2013. KAPA HiFi HotStart technical data Sheet. Boston.
- Kaur, Hargobinder Sehgal, Rakesh Goyal KN, MaKkar Yadav, Richa K, Bharti, et al. 2017. Genetic diversity of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (block 2), glutamate rich protein and sexual stage antigen Pfs25 from Chandigarh, North India. Trop Med Int Health.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Malaria. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementrian Kesehatan RI. 2016. InfoDatin Malaria. Jakarta: Pusat Data an Informasi Kementrian Kesehatan RI.
- Kidima W dan Nkwengulila G. 2015. Multiplicity of infections among children under five years with uncomplicated malaria in Kibaha, Tanzania. Journal of Parasitology Research. 2015.
- Kirsten Moll, Akira Kaneko AS, dan Mahtz Walgren. 2013. Methods in malaria research.
- Kumar D, Dhiman S, Rabha B, Goswami D, Deka M, dan Singh L. 2014. Genetic polymorphism and amino acid sequence variation in Plasmodium falciparum GLURP R2 repeat region in Assam, India.

- Dinas Kesehatan Provinsi Lampung. 2016. Profil Provinsi Lampung Tahun 2015. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Pemerintah Povinsi Lampung.
- Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, Debarry J, Srinivasamoorthy G, Goldman I, et al. 2012. A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. PLoS ONE. 7(2):1–7.
- Lusingu JP, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, et al. 2005. Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. Malaria journal. 4(1):48.
- Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. 2011. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. Malaria journal. 10(1):79.
- Nindela R. 2015. Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) dan Merozoite Surface Protein-2 (MSP-2) *Plasmodium falciparum* sebagai kandidat vaksin malaria. 1(1):67–3.
- Pain A, Böhme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP, et al. 2008. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. Nature. 455(7):799–803.
- Pratt-riccio LR, Perce da silva, Lima junior JC, Theisen M, Santos F, Daniel ribeiro, et al. 2013. Genetic polymorphisms in the glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* field isolates from a malaria endemic area of Brazil. 108(6):523–8.
- Putra R. 2011. Malaria dan permasalahannya. 11(2):103–14.
- Qiagen. 2016. QIAamp DNA mini and blood mini handbook. Edisi Ke-5. Hilden: Qiagen.
- Rahmawan A. 2008. Malaria Serebral. 2(1):7–25.
- Razak MR, Sastu UR, Norahmad NA, Abdu Karim A, Muhammad A, Muniandy, et al. 2016. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* populations in malaria declining areas of Sabah, East Malaysia. PLoS ONE. 11(3):1–22.
- Rezeki S. 2014. Imunopatogenesis Malaria Serebral.
- Rianta P. 2001. Mengenal metode elektroforesis. Oseana. 26(1):25–31.
- Simamora D. dan Fitri LE. 2007. Resistensi obat malaria: mekanisme dan peran obat kombinasi obat antimalaria untuk pencegahan. 10(3):10.
- Soe TN, Wu Y, Tun MW, Ruan Y, Nyunt MH, Morris J, et al. 2017. Genetic

diversity of *Plasmodium falciparum* populations in southeast and western Myanmar. *Parasites and Vectors*. 2(2):1–6.

Sutanto I, Ismid IS, Sjarifuddin PK. and Sungkar S. 2010. *Parasitologi Kedokteran*. Edisi keempat. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Widoyono. 2011. *Penyakit Tropis: epidemiologi, penularan, pencegahan & pemberantasannya*. Edisi kedua. Jakarta: Erlangga.

Zuhriana K Yusuf. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.