

**IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN  
*THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN* (TRAP)  
PADA PENDERITA MALARIA *falciparum* DI WILAYAH KERJA  
PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN,  
PROVINSI LAMPUNG**

**Skripsi**

**Oleh**

**MUHAMMAD IRFAN ADI SHULHAN**



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) OF THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN GEN FROM MALARIA *falciparum* PATIENTS IN WORKING AREA PRIMARY HEALTH CARE OF HANURA, PESAWARAN REGENCY LAMPUNG PROVINCE

By

Muhammad Irfan Adi Shulhan

**Background:** Malaria is a disease caused by the *Plasmodium* parasite in erythrocytes as evidenced by positive microscopic examination, there are antigens, and the discovery of Deoxyribo Nucleid Acid / Ribonucleid Acid (DNA / RNA) Plasmodium parasite on Polymerase Chain Reaction (PCR). *Plasmodium falciparum* is one of the most deadly species of malaria, and there are many genes that support this parasite to infect, so there are so many genetic variations produced by one gene.

**Method:** This type of research uses a survey research design with descriptive method. The study sample was obtained from 18 Stored Archived Biological Materials (ABM). This research was conducted using the PCR method which was analyzed by gel electrophoresis and continued to the sequencing method to detect genetic variations of the *Plasmodium falciparum Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP) gene.

**Result:** There were 18 samples that had been carried out nested PCR, then obtained variations in the length of the band in each sample

**Conclusion:** There are genetic variation in the *Thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) gene.

**Keyword:** Malaria, *Plasmodium Falciparum Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Sequencing.

## ABSTRAK

### IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN *THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN* (TRAP) PADA PENDERITA MALARIA *falciparum* DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG

Oleh

Muhammad Irfan Adi Shulhan

**Latar Belakang:** Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* di dalam eritrosit dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskopis yang positif, terdapat antigen, serta ditemukannya *Deoxyribo Nucleid Acid/ Ribonucleid Acid* (DNA/RNA) parasit *Plasmodium* pada pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Plasmodium falciparum* adalah salah satu spesies yang paling banyak menyebabkan kasus malaria dan paling mematikan, serta terdapat banyak gen yang mendukung parasit ini untuk menginfeksi, sehingga banyak sekali variasi genetik yang dihasilkan oleh satu gen.

**Metode:** Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survey dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) sebanyak 18 sampel. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR yang dianalisis dengan gel elektroforesis serta dilanjutkan ke metode sekuensing untuk mendeteksi variasi genetik gen *Plasmodium falciparum Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP).

**Hasil:** Terdapat 18 sampel yang telah dilakukan nested PCR, kemudian diperoleh variasi panjang pita pada setiap sampel.

**Kesimpulan:** Terdapat variasi genetik gen *Thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP).

**Kata Kunci:** Malaria, *Plasmodium Falciparum Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Sekuensing.

**IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN  
*THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN* (TRAP)  
PADA PENDERITA MALARIA *falciparum* DI WILAYAH KERJA  
PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN,  
PROVINSI LAMPUNG**

Oleh

**MUHAMMAD IRFAN ADI SHULHAN**

**Skripsi**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar  
**SARJANA KEDOKTERAN**

Pada

Program Studi Pendidikan Dokter  
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**



Judul Skripsi

: **IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE  
POLYMORPHISM (SNP) GEN THROMBOSPONDIN-  
RELATED ANONYMOUS PROTEIN (TRAP) PADA  
PENDERITA MALARIA *falciparum* DI WILAYAH  
KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN  
PESWARAN, PROVINSI LAMPUNG**

Nama Mahasiswa

: **Muhammad Irfan Adi Shulhan**

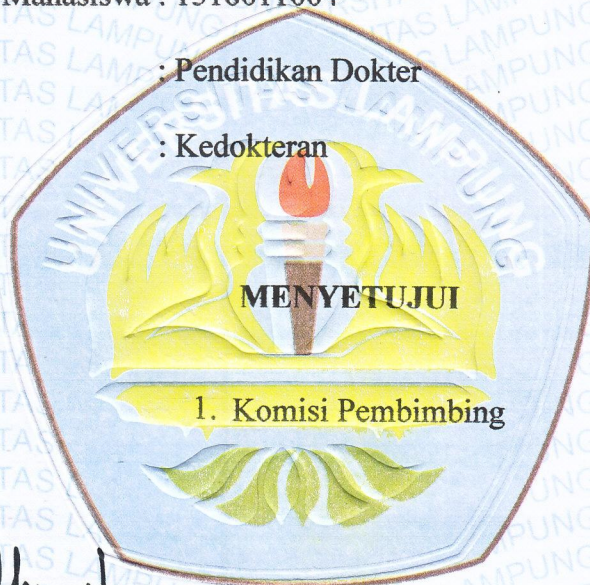
Nomor Pokok Mahasiswa : 1518011004

Program Studi

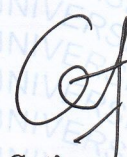
: Pendidikan Dokter

Fakultas


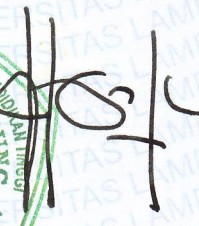
: Kedokteran



  
**Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes.**  
NIP 19781009 200501 1 001

  
**dr. Gigih Setiawan, S.Ked.**  
NIK 231609880228101

1. Dekan Fakultas Kedokteran

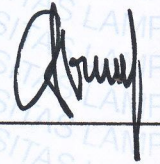
  
  
**Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.KM., M.Kes.**  
NIP 19720628 199702 2 00



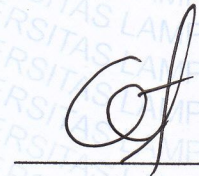
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

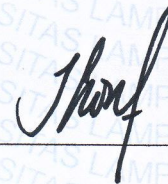
**Ketua : Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes.**



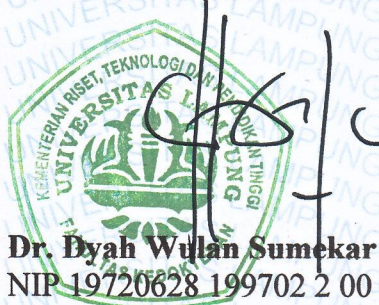
**Sekretaris : dr. Gigih Setiawan, S.Ked.**



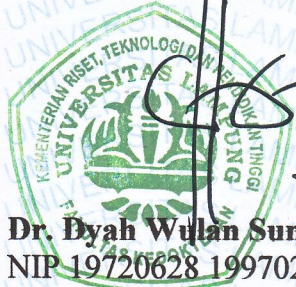
**Penguji : Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes.**



**2. Dekan Fakultas Kedokteran**



**Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.KM., M.Kes.**  
NIP. 19720628 199702 2 00



**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 29 Mei 2019**



## LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul “**IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) GEN *THROMBOSPONDIN-RELATED ANONYMOUS PROTEIN* (TRAP) PADA PENDERITA MALARIA *falciparum* 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, 29 Mei 2019

Pembuat pernyataan



Muhammad Irfan Adi Shulhan

NPM 1518011004

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, Provinsi Lampung pada 08 Juli 1997, sebagai anak pertama dari satu saudara, dari Bapak Suharsono S. dan Ibu Sri Sukaesih.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Playgroup Tadika Puri pada tahun 2001, Taman Kanak-kanak (TK) Al-Kautsar pada tahun 2003, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Swasta Al-kautsar pada tahun 2009, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 25 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2012, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 3 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2015.

Pada tahun 2015, 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), Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM), dan Lampung University Medical Research (LUNAR) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, serta menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Argomulyo, Kecamatan Sumberejo, Kabupaten Tanggamus pada tahun 2018.



## **PERSEMBAHAN**

“Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang bingung, lalu Dia memberikan petunjuk.

Dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang kekurangan, lalu Dia memberikan kecukupan.”

**(Q.S Ad-Dhuha: 7-8)**

Dengan penuh rasa syukur kupersembahkan karya ini untuk

**“Kedua Orangtua dan Om serta Bibiku”**

Atas dukungan, motivasi, serta doa yang tiada henti untukku

## SANWACANA

Puji dan syukur Penulis ucapkan kehadiran 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 "*Identifikasi Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Gen Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) Pada Penderita Malaria Plasmodium falciparum Di Wilayah Kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi 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. Dyah Wulan Sumekar RW, S.KM., M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Utama yang selalu bersedia menyempatkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberi masukan, nasihat, dan motivasi selama proses penyelesaian penelitian untuk skripsi ini.
4. dr. Gigih Setiawan, S.Ked selaku Pembimbing Kedua yang selalu bersedia menyempatkan waktu untuk membimbing, mengkritik, memberi saran dalam proses penyelesaian skripsi ini



5. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes., selaku Penguji Utama untuk masukan dan saran serta nasihat yang telah diberikan pada pada proses penyelesaian skripsi ini.
6. Terima kasih kepada relawan yang telah bersedia ikut serta dalam penelitian ini dengan memberikan darahnya untuk dijadikan sampel penelitian.
7. Terima kasih kepada para laboran Laboratorium Biomolekular dan Fisiologi (Lab Biomol) FK Unila terutama untuk 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.
8. Seluruh staf dosen dan civitas akademik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu dan waktu yang telah diberikan selama proses perkuliahan.
9. Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Bapak saya (Drs. Suharsono S., M.Si., M.Sc., Ph.D), Ibu (Sri Sukaesih, S.Pd) dan Om saya (Yofi M. Syah, S.P) serta Bibi saya (Furaidah Aprianingsih, S.T.P) yang selama ini memberikan dukungan, dorongan, perhatian, motivasi, nasihat serta doa yang telah dipanjatkan. Terima kasih atas perjuangannya yang telah diberikan untukku. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan jasmani dan rohani serta selalu dalam perlindungan-Nya
10. Seluruh Keluarga Besar Sulaeman di Bogor yang telah membantu dalam berbagai hal, doa, dukungan dan motivasi.
11. Terima kasih kepada teman seperjuangan penelitian gen, Sri Janahtul Hayati, Diah Balqis Ikfi Hidayati, Puji Indah Permata Sari, Syfa Dinia Putri dan Fitria Putridewi Abidin atas kerjasamanya untuk menyelesaikan penelitian selama ini. Terima kasih untuk tenaga, waktu, semangat dan doa yang telah

dipanjatkan untuk menyelesaikan skripsi ini.

12. Kepada sahabatku 4 People yaitu Nyoman Mupu Murtane, Pramastha Candra S., Mustofa George yang selama ini selalu menemani, menyemangati, dan doa yang telah diberikan
13. Seluruh sahabat Elite team yaitu Geri, Alvin, Bagas, Pridho, Rohim, Leo, Thare, Sukma, dan Thoriq yang telah memberikan semangat dan doa
14. Seluruh sahabat geng K yaitu Rozzak Ruwandi, Agung Satria P., Daryanto, Afif Muslimin, M. Tri Andeni, Romi Gunaevy, Putri Pertama Sari, Monica Adinda Pricilya, dan Titis Aditya atas motivasi yang diberikan selama ini.
15. Teman semasa SD Al-Kautsar yaitu Oriza Syahputra dan Yogi Sulistyio
16. Keluarga Besar Forum Studi Ibnu Sina dan khususnya yaitu Geri, Kesumayudha, Reandy, Alvin, Mustofa, Fauziah, Anis, Vani, Sonia, Ilma, dll.
17. Keluarga Besar FK Unila 2015 (Endom15ium) canda, tawa, proses pembelajaran yang telah memberikan warna tersendiri. Semoga kebersamaan dan kekompakkan selalu terjalin baik sekarang maupun dihari nanti.
18. Sahabat sepermainan kecil yaitu Kristiana atas semangat dan motivasinya

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, 29 Mei 2019

Penulis,

Muhammad Irfan Adi Shulhan  
1518011004



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat bagi Penulis .....	5
1.4.2 Manfaat bagi Peneliti Selanjutnya.....	5
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat .....	5
1.4.4 Manfaat bagi Pemerintah .....	6
1.4.5 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan.....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Malaria .....	7
2.2 <i>Thrombospondin-related Anonymous Protein Plasmodium falciparum</i> ...	20
2.3 Teknik analisis biologi molekuler .....	26
2.3.1. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	27
2.4 Kerangka Teori.....	34
2.5 Kerangka Konsep .....	35
2.6. Hipotesis.....	35

<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>36</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	36
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	36
3.3 Subjek Penelitian dan Teknik Sampling .....	36
3.4 Rancangan penelitian .....	37
3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	37
3.6 Identifikasi variable.....	37
3.7 Definisi Operasional.....	38
3.8 Alat dan Bahan.....	38
3.9 Prosedur Penelitian.....	40
3.9.1. Isolasi DNA .....	40
3.9.2. Persiapan amplifikasi pertama.....	40
3.9.3. <i>Cycling</i> parameters.....	43
3.9.4. Pembuatan Gel Agarose .....	44
3.9.5. Elektroforesis.....	44
3.10 Analisis data .....	45
3.11 Alur Penelitian .....	46
3.12 Etik Penelitian .....	46
 <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	 <b>47</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	47
4.2 Pembahasan Hasil Penelitian .....	54
4.3 Keterbatasan penelitian .....	59
 <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	 <b>60</b>
5.1 Kesimpulan .....	60
5.2 Saran.....	60
 <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	 <b>61</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>65</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
<b>Tabel 1.</b> Taxonomy <i>Plasmodium</i> .....	10
<b>Tabel 2.</b> Lama siklus ekso-eritrositik .....	16
<b>Tabel 3.</b> Lama siklus eritrositik.....	16
<b>Tabel 4.</b> Masa inkubasi penyakit malaria .....	17
<b>Tabel 5.</b> Oligonukleotida <i>Thrombospondin-related anonymous protein</i> .....	30
<b>Tabel 6.</b> Definisi Operasional.....	38
<b>Tabel 7.</b> Primer <i>Sequences</i> TRAP .....	40
<b>Tabel 8.</b> Pengaturan amplifikasi .....	43
<b>Tabel 9.</b> Posisi dan perubahan basa yang terjadi pada sampel yang diteliti.....	51

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
<b>Gambar 1.</b> API malaria per1000 penduduk tahun 2011-2015 di Indonesia .....	8
<b>Gambar 2.</b> Peta endemis penyakit malaria .....	9
<b>Gambar 3.</b> Siklus hidup malaria .....	12
<b>Gambar 4.</b> Gambaran Plasmodium falciparum .....	14
<b>Gambar 5.</b> Struktur Sporozoite Plasmodium sp. ....	15
<b>Gambar 6.</b> Letak gen TRAP pada Plasmodium falciparum .....	22
<b>Gambar 7.</b> Struktur gen TRAP pada Plasmodium falciparum .....	22
<b>Gambar 8.</b> Variasi gen TRAP pada Plasmodium falciparum.....	24
<b>Gambar 9.</b> Proses denaturasi pada PCR .....	28
<b>Gambar 10.</b> Proses annealing pada PCR .....	29
<b>Gambar 11.</b> Proses ekstensi pada PCR.....	30
<b>Gambar 12.</b> Kerangka Teori .....	34
<b>Gambar 13.</b> Kerangka Konsep.....	35
<b>Gambar 14.</b> Alur Penelitian.....	46
<b>Gambar 15.</b> Pengujian kelayakan sampel BBT .....	48
<b>Gambar 16.</b> Hasil elektroforesis dibaca di transiluminator UV .....	49
<b>Gambar 17.</b> Hasil Analisis Sekuensing Basa Nukleotida Gen PfTRAP .....	51
<b>Gambar 18.</b> Elektroferogram nukleotida basa sampel.....	52
<b>Gambar 19.</b> Perbandingan hasil multiple alignment dengan elektroferogram ...	53

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Laporan WHO pada tahun 2016, terdapat 216 juta kasus malaria dengan angka kematian 445.000 orang di seluruh dunia. Kasus malaria terbanyak terdapat di Afrika (90%), yang kedua terdapat di Asia Tenggara (3%), dan negara di daerah Mediterania Timur. Pada banyak kasus *Plasmodium falciparum* adalah jenis yang sering mengakibatkan malaria terutama di Afrika (90%) (World Health Organization, 2017).

Insiden dan prevalensi malaria di Indonesia pada tahun 2015 yaitu sebesar 0,85. Angka tersebut diperoleh dengan menggunakan indikator *Annual Paracite Incidence* (API) per 1000 penduduk. Angka tersebut dari tahun 2011 ke tahun 2015 mengalami penurunan yaitu pada tahun 2011 angka API sebesar 1,75 per 1000 penduduk, sedangkan pada tahun 2012 sebesar 1,69 per 1000 penduduk, lalu pada tahun 2013 sebesar 1,38 per 1000 penduduk, dan menurun tajam pada tahun 2014 sebesar 0,99 per 1000 penduduk. Dengan provinsi Papua menduduki peringkat pertama yaitu 31,93 per 1000 penduduk, sementara provinsi Lampung 0,49 per 1000 penduduk (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI 2016).

Pada tahun 2012 API di provinsi Lampung sebesar 0,22 per 1000 penduduk. API di provinsi Lampung mengalami kenaikan pertahun sampai tahun 2015 ke tahun 2016 mengalami penurunan yaitu 0,51 ke 0,47. Angka ini berada dibawah target yang ditetapkan yaitu sebesar 1,00 per 1000 penduduk dengan populasi 8.205.141 jiwa yang diduga positif malaria sebanyak 24.793 jiwa, maka dilakukan pemeriksaan mikroskopik dan *rapid diagnostic test* dengan hasil positif sebanyak 3.298 jiwa (Kementerian kesehatan RI, 2013; Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran, 2016; Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2017).

Data terbaru mengenai API Malaria per 1000 penduduk di kabupaten Pesawaran pada tahun 2011-2016 terjadi kenaikan. Pada tahun 2011 sebesar 4,76 per 1000 penduduk, kemudian menurun sebesar 1,00 per 1000 penduduk tahun 2012. Tahun 2013 meningkat tinggi sebesar 4,77 per 1000 penduduk, pada tahun 2014 terjadi peningkatan sebesar 7,26 per 1000 penduduk, tahun 2015 mulai mengalami penurunan menjadi 6,36 per 1000 penduduk, dan tahun 2016 mengalami penurunan menjadi 4,63 per 1000 penduduk (Dinas Kesehatan Provinsi Lampung, 2016).

Penyakit malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium* yang dibawa oleh nyamuk *Anopheles sp.* Penularan malaria terjadi bila terdapat interaksi antara parasit *Plasmodium sp.*, *host-definitive* (nyamuk *Anopheles*) dan manusianya sendiri. Keberadaan penyakit malaria tergantung dari populasi *host-definitive* yang meningkat,



dipengaruhi oleh intensitas hujan tinggi, sumber parasit, dan imunitas manusia yang menurun (Lukman, 2011; Gusra T *et al.*, 2014; Sir O *et al.*, 2015).

Malaria terbagi dalam beberapa spesies yang dapat ditemukan pada tubuh manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*, serta *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium knowlesi* yang selama ini ada pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) kini ditemukan pada tubuh manusia. *Plasmodium falciparum* merupakan penyebab infeksi terberat pada spesies *Plasmodium* karena dapat menyebabkan manifestasi akut. Bila tidak diobati maka pasien malaria dapat menyebabkan kematian (Lukman, 2011; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Infeksi malaria dimulai pada tahap sporozoit yang terinjeksi ke dalam pembuluh darah manusia oleh nyamuk *Anopheles* betina. Sporozoit secara cepat bergerak ke hati untuk menginfeksi hepatosit atau sel hati, terdapat gen yang berperan yaitu *Thrombospondin-related Anonymous Protein* atau *Thrombospondin-related Adhesive Protein* (TRAP). Antigen tersebut disimpan dalam *micronemes* dan akan muncul ke permukaan ketika *Proboscis* nyamuk sudah menusuk ke dalam kulit sehingga sporozoit dapat menginfeksi hepatosit. TRAP mempunyai peranan penting dalam menginfeksi hepatosit karena dapat memberikan energi kepada sporozoit dan dapat mengaku sebagai antibodi tubuh sehingga proses imun tidak bekerja lalu dapat segera menginfeksi hepatosit (Akhouri RR *et al.*, 2008).

Terdapat vaksin malaria yaitu *Thrombospondin-related Adhesive Protein* atau vaksin TRAP merupakan subunit vaksin setelah *Circumsporozoit Protein* (CSP). Kedua antigen tersebut bekerja pada penyakit malaria pada stadium sporozoit, bila pada darah dalam bentuk merozoit berupa *Merozoit Surface Protein-1* (MSP-1), *Apical Membrane Antigen-1* (AMA-1), dan *Reticulocyte binding like-protein homologue-5* (RH-5). Vaksin TRAP merupakan virus-vektor vaksin atau vaksin dengan perantara virus menggunakan tipe adenovirus, tujuan pembuatan vaksin TRAP yaitu untuk menghambat pergerakan Infeksi *Plasmodium falciparum* pada stadium sporozoit menunjukkan peningkatan gen TRAP, sebagai respon vaksin TRAP secara alami dapat memblokir pemberian energi dari gen TRAP. Antigen TRAP (subunit vaksin) merupakan desain peptida yang berdasarkan gen TRAP (Kester KE, 2014; Ohasi J *et al.*, 2014).

Berdasarkan penjelasan di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terkait gen TRAP untuk memperoleh gambaran *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) karena di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran merupakan wilayah yang endemis penyakit malaria dan menilai adanya infeksi multigenotip yang dapat terjadi serta dapat membantu pengobatan malaria sejak dini serta sampai saat ini data mengenai keragaman genotip *Plasmodium falciparum* di Indonesia masih sangat sedikit, khususnya di Provinsi Lampung merupakan wilayah endemis penyakit malaria. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi basis data mengenai variasi genetik *Plasmodium falciparum*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang didapatkan berdasarkan latar belakang, permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut “Apakah terdapat *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) gen *Plasmodium falciparum* *Thrombospondin-related Anonymous Protein* (PfTRAP) pada penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura?”.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada gen PfTRAP penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat bagi Penulis

Penelitian ini diharapkan dapat melatih keterampilan dan mendapatkan pengalaman yang berguna dalam menerapkan ilmu yang didapatkan selama perkuliahan serta dapat memenuhi syarat kelulusan pendidikan dokter.

### 1.4.2 Manfaat bagi Peneliti Selanjutnya

Penelitian ini diharapkan dapat membantu peneliti selanjutnya jika membutuhkan referensi terkait penelitian dengan topik bahasan yang sama.

### 1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan kepada masyarakat umum bahwa terdapat variasi antigen pada penyakit malaria

spesies *Plasmodium falciparum* yang dapat menghambat pertumbuhan parasit dalam tubuh manusia.

#### 1.4.4 Manfaat bagi Pemerintah

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pemerintah berkaitan dengan variasi dari antigen pada *Plasmodium falciparum* sehingga pemerintah dapat melakukan peningkatan usaha dalam pengobatan pasien malaria.

#### 1.4.5 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat menerapkan ilmu kedokteran dengan kekhususan dalam bidang parasitologi dan biomolekular mengenai variasi genetik PfTRAP.



## **BAB II** **TINJAUAN PUSTAKA**

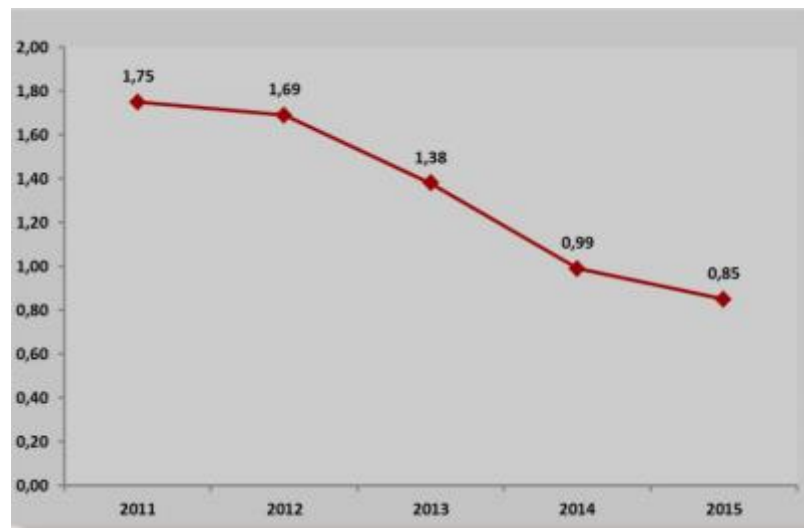
### **2.1 Malaria**

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* di dalam eritrosit dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskopis yang positif, terdapat antigen, serta ditemukannya *Deoxyribo Nucleid Acid/ Ribonucleid Acid* (DNA/RNA) parasit *Plasmodium* pada pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Infeksi malaria dapat menyebabkan gejala demam, menggigil, anemia dan splenomegali. Penyakit malaria merupakan masalah kesehatan terbesar pada daerah tropis dan subtropis seperti Brazil, seluruh sub-sahara Afrika dan Asia Tenggara karena dapat mempengaruhi angka kesakitan pada bayi, balita, dan ibu yang melahirkan (Harijanto, 2014; Gusra T *et al.*, 2014).

Laporan WHO pada tahun 2016 diestimasikan terdapat 445.000 kematian akibat malaria, angka ini telah menurun dari data sebelumnya pada tahun 2015 sebesar 446.000. Pada tahun 2016 juga terdapat negara yang telah dinyatakan bebas dari malaria yakni negara Kyrgyzstan dan Sri Lanka, negara tersebut telah mendapatkan sertifikat bebas malaria dari *World Health Organization* (WHO). Komitmen global yang ingin mensukseskan *Sustainable Development Goals* (SDG's) yaitu dengan upaya memberantas malaria yang harus dicapai pada tahun 2030 dan WHO telah mendeteksi 21 negara yang berpotensi untuk

menghilangkan penyakit malaria dari negara tersebut disebut sebagai negara E-2020 (WHO, 2017)

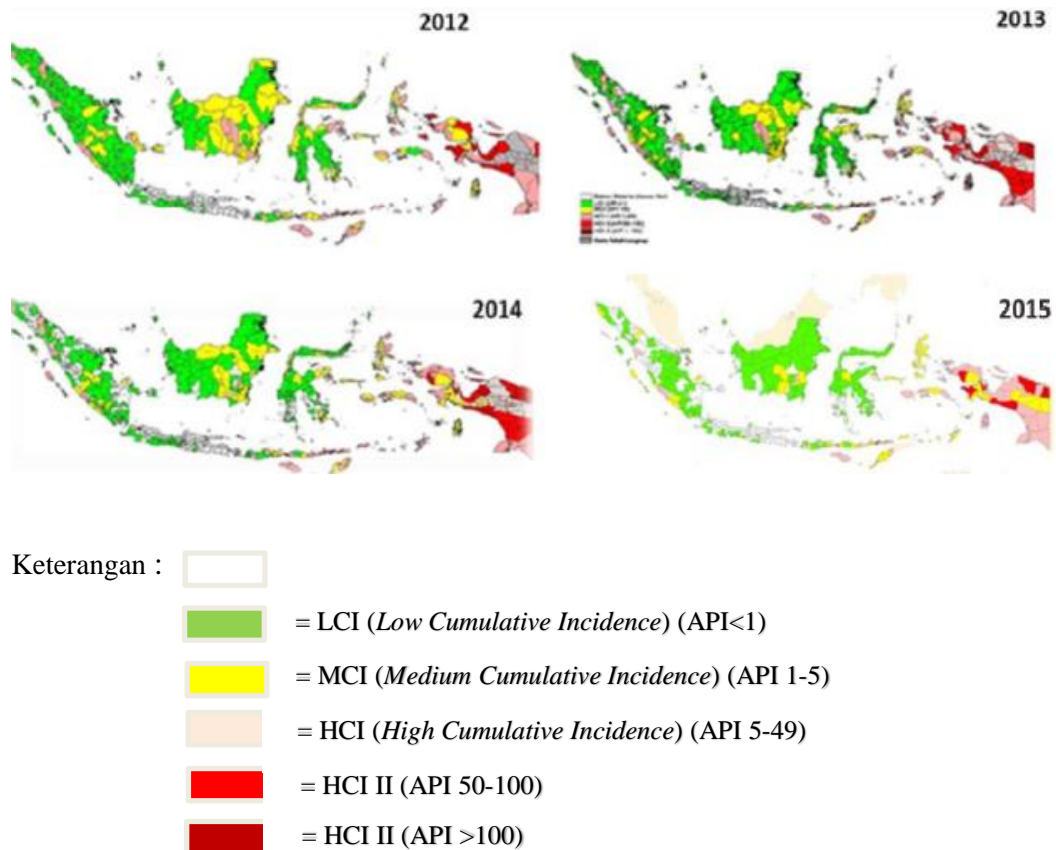
Kasus malaria di Indonesia sudah mengalami penurunan hal ini ditentukan dengan *Annual Parasite Incidence* (API) per tahun. API merupakan indikator jumlah kasus positif malaria per 1000 penduduk dalam satu tahun. Pada tahun 2011 sampai tahun 2015 terus mengalami penurunan, hal ini menunjukkan bahwa program pemerintah mengalami keberhasilan dalam menurunkan angka malaria di Indonesia (Kemenkes RI, 2016).



**Gambar 1.** API malaria per1000 penduduk tahun 2011-2015 di Indonesia (Kemenkes RI, 2016)

Kasus positif malaria di kabupaten Pesawaran tahun 2015 berjumlah 2712 kasus dengan 2 kematian (CFR 0,07 %). Angka tersebut diperoleh dari puskesmas yang berada di kabupaten pesawaran yang kasus paling besar berada di puskesmas Hanura sebanyak 2276 kasus, selanjutnya di puskesmas Pedada

sebanyak 320 kasus serta puskesmas Padang Cermin sebanyak 116 kasus. Sedangkan puskesmas lainnya yang berada di kabupaten pesawaran tidak ada data kasus positif malaria karena bukan wilayah endemik malaria (Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran, 2015).



**Gambar 2.** Peta endemis penyakit malaria (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2016)

Dalam teori epidemiologi, terdapat tiga faktor yang mempengaruhi kejadian penyakit malaria yaitu *host*, *agent*, dan *environment*. Terdapat dua macam *host* yaitu manusia disebut juga *intermediate host* dan nyamuk malaria disebut *definitive host*. Faktor lingkungan yang mempengaruhi yakni lingkungan fisik,

klimatologis, kimawi, dan biologis. Penjelasan taksonomi dari parasit *Plasmodium* akan dijelaskan pada tabel 1 (Antinori S *et al.*, 2012; Putra TRI, 2011; Notobroto HB, Hidajah AC, 2009).

**Tabel 1.** *Taxonomy Plasmodium* (Antinori S *et al.*, 2012; Putra TRI, 2011)

Klasifikasi	Jenis Klasifikasi
<i>Domain</i>	<i>Eukaryota</i>
<i>Kingdom</i>	<i>Chromalveolata</i>
<i>Phylum</i>	<i>Apicomplexa</i>
<i>Class</i>	<i>Aonoidasida</i>
<i>Ordo</i>	<i>Haemosporina</i>
<i>Genus</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>Species</i>	<i>Plasmodium falciparum; Plasmodium malariae; Plasmodium ovale; Plasmodium vivax; Plasmodium knowlesi</i>

Terdapat lima *host* infeksi atau spesies yang diadaptasi dari *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia dan menyebabkan penyakit malaria yaitu : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium malariae*, serta *Plasmodium knowlesi*.

1. *Plasmodium falciparum*

Merupakan penyebab infeksi malaria tertinggi didunia , bagian khas pada *Plasmodium* ini adalah pada karakteristik dari skizogoni eritrositik yang berbentuk cincin yang melingkari retikulosit biasanya mengandung 8-32 merozoit. Secara klinis serangan demam terjadi setiap 3 hari sekali.

2. *Plasmodium vivax*

Secara klinis serangan demam terjadi 3 hari sekali, oleh sebab itu disebut juga demam *tertian benign*. Pada skizogoni yang matang terdapat 12-18 merozoit.



3. *Plasmodium ovale*

Secara klinis serangan demam tidak khas dan dapat berubah sekitar 1-2 hari sekali. Hampir sama dengan *Plasmodium malariae* bedanya pada sitoplasma lebih tebal dan warna lebih terang

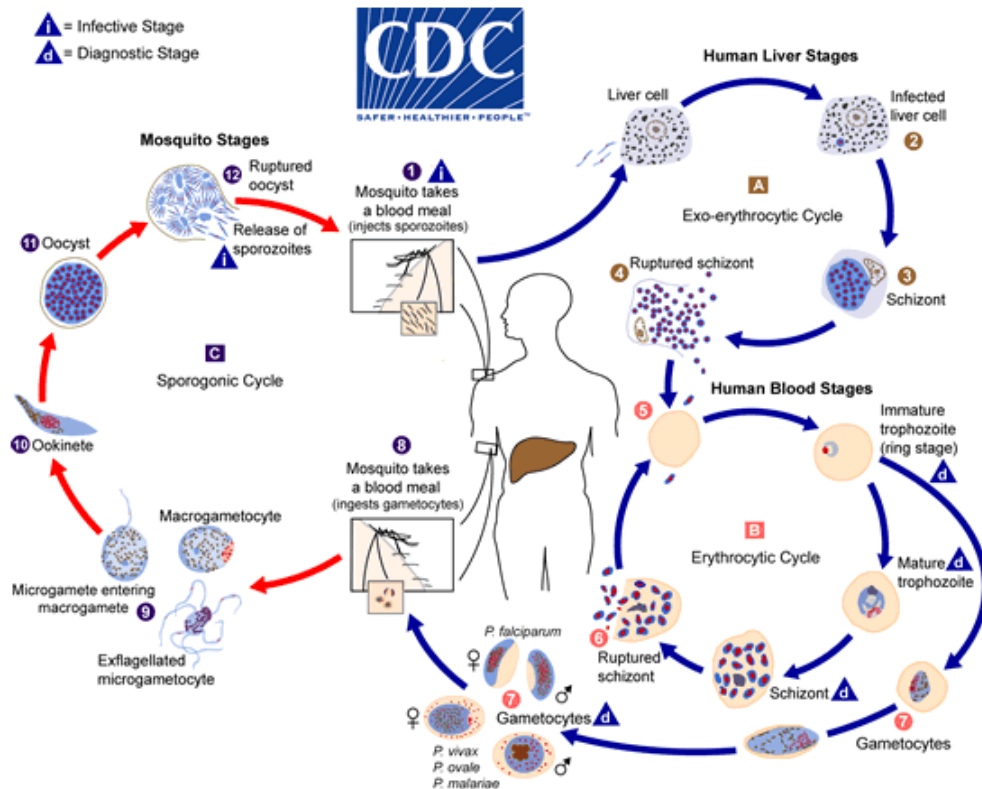
4. *Plasmodium malariae*

Secara klinis serangan demam terjadi setiap 4 hari sekali. Hampir sama dengan *Plasmodium ovale*, bedanya pada sitoplasma lebih tipis dan warnanya lebih gelap.

5. *Plasmodium knowlesi*

Selama ini ada pada monyet ekor panjang, tetapi sekarang sudah ditemukan pada tubuh manusia. Bentuk cincin pada retikulosit mirip dengan *Plasmodium falciparum*, sedangkan bila sudah pada tahap yang sudah matang akan sama dengan *Plasmodium malariae*.

(Antinori S *et al.*, 2012; Putra TRI, 2011; Luchi NW *et al.*, 2012)

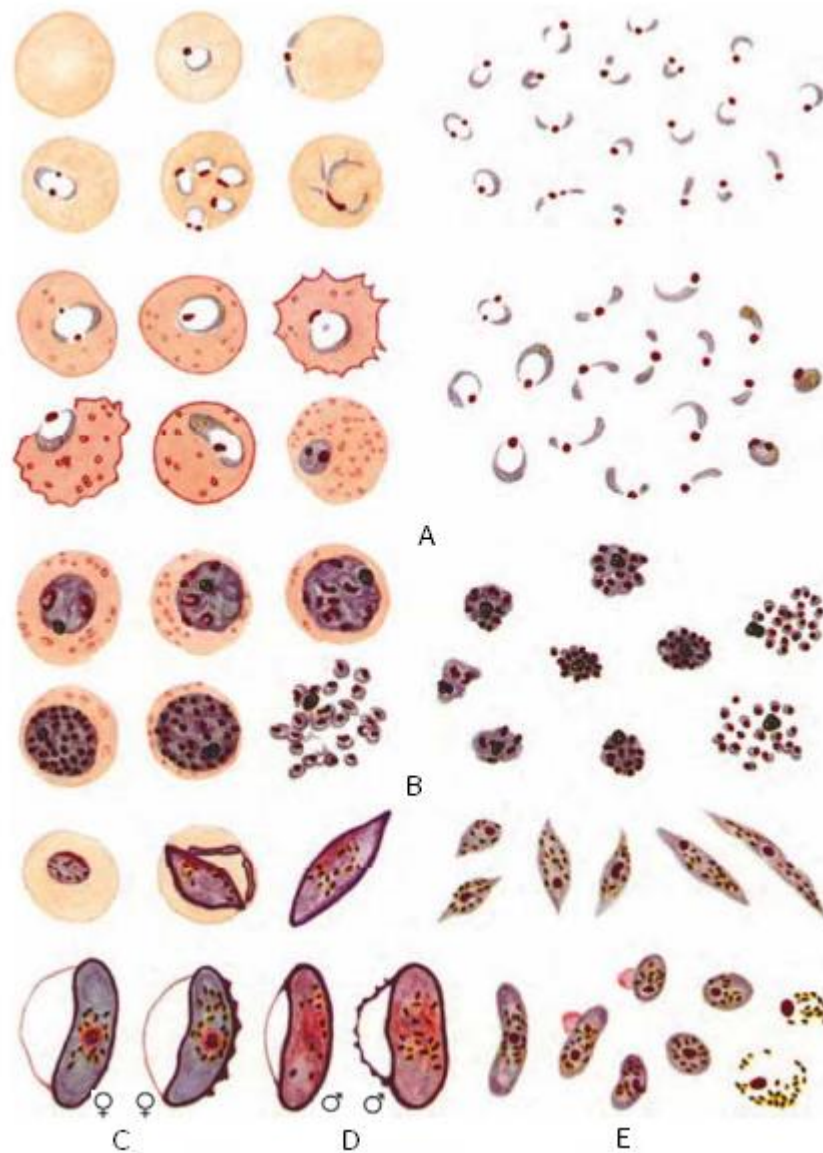


**Gambar 3.** Siklus hidup malaria (CDC, 2016)

Siklus hidup dari *Plasmodium* terdiri dari dua siklus, yaitu yang pertama siklus sporogoni (siklus seksual) pada nyamuk dan siklus skizogoni (siklus aseksual) pada manusia. Siklus dimulai dari siklus sporogoni yakni ketika nyamuk (*Anopheles sp.*) mengisap darah manusia yang terkena malaria mengandung *Plasmodium* sudah pada stadium gametosit. Setelahnya gametosit akan membelah menjadi mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Keduanya mengadakan fertilisasi menjadi ookinet. Ookinet akan masuk ke lambung pada nyamuk dan membentuk ookista. Ookista akan membentuk ribuan sporozoit yang nantinya akan lisis dan sporozoit keluar dari ookista. Sporozoit

akan menyebar ke seluruh tubuh nyamuk, salah satunya di kelenjar ludah nyamuk (*Probocis*).

Siklus skizogoni terdiri dari dua siklus yakni siklus ekso-eritrositik dan siklus eritrositik. Siklus ekso-eritrositik dimulai ketika nyamuk menggigit manusia sehat. Sporozoit akan masuk kedalam tubuh manusia melewati tusukan nyamuk. Sporozoit akan mengikuti aliran darah dan menuju ke hati, sehingga sporozoit dapat menginfeksi sel hati atau *hepatosit* dan akan matang menjadi skizon. Pada *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae* hanya mempunyai satu siklus ekso-eritrositik, sedangkan *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* mempunyai bentuk hipnozoit (fase dormant) sehingga siklus eksoeritrositik dapat berulang kali. Selanjutnya, skizon akan lisis atau pecah mengeluarkan merozoit yang akan masuk ke aliran darah sehingga menginfeksi eritrosit dan di mulai siklus eritrositik. Merozoit akan berubah menjadi tropozoit belum matang lalu menjadi matang dan membentuk skizon lagi yang lisis atau pecah dan menjadi merozoit. Diantara bentuk tropozoit ada yang menjadi gametosit dan nantinya akan dihisap oleh nyamuk dan mengulang kembali siklusnya. (Natadisastra D, Agoes R, 2009; Soedarto, 2012)

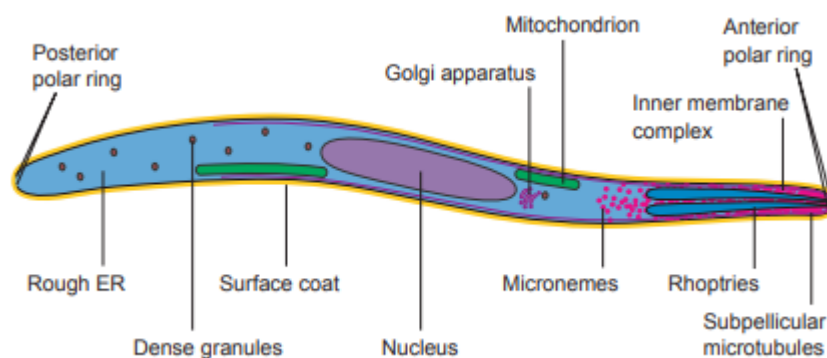


**Gambar 4.** Gambaran *Plasmodium falciparum* (WHO, 2010)

Pada gambar 4 terlihat gambaran dari *Plasmodium falciparum*, gambar A menunjukkan stadium trofozoit, gambar B menunjukkan stadium skizont, gambar C menunjukkan *thin film*, gambar D menunjukkan stadium gametosit, serta gambar E menunjukkan *thick film*. *Plasmodium falciparum* mempunyai ciri khas tersendiri yang dilihat melalui mikroskop pada sediaan pulasan *Romanowsky*. Pada sel darah merah tidak terjadi pembesaran, tetapi terdapat bintik kasar

(celah Maurer) serta menginfeksi semua sel darah merah tanpa mengetahui usia sel tersebut. Pada tahap trofozoit stadium cincin, *Plasmodium falciparum* mempunyai cincin kecil halus dengan diameter 1/5 dari eritrosit mengandung dua granula dan dapat melekat pada eritrosit serta terjadi infeksi multiple. Karakteristik pigmen di dalam trofozoit yaitu kasar, berwarna hitam. Pada tahap skizon tua (segmenter) biasanya lebih dari 12 merozoit (antara 8-32 *merozoit*) dan sering dijumpai ketika pada darah perifer. Pada tahap gametosit berbentuk seperti bulan sabit atau pisang (Jawetz, Melnick, Adelberg, 2010)

Setiap kali penusukan *Probocis* nyamuk *Anopheles sp.* sekiranya terdapat 0 sampai 100 lebih sporozoit yang masuk kedalam pembuluh darah. Struktur dari *Plasmodium sp.* tahap sporozoit digambarkan pada gambar 5.



**Gambar 5.** Struktur *Sporozoite Plasmodium sp.* (Frevert U, 2004)

**Tabel 2.** Lama siklus ekso-eritrositik (Irianto K, 2013)

Spesies	Lama siklus eksoeritrositik (hari)	Diameter skizon matur eksoeritrositik ( $\mu\text{m}$ )	Jumlah merozoit dalam skizon eksoeritrositik
<i>Plasmodium vivax</i>	6-8	45	10.000
<i>Plasmodium falciparum</i>	5-7	60	30.000
<i>Plasmodium malariae</i>	14-16	55	15.000
<i>Plasmodium ovale</i>	9	60	15.000

Berdasarkan data pada tabel 2, *Plasmodium falciparum* merupakan parasit yang mempunyai siklus ekso-eritrositik yang paling cepat dan dapat menghasilkan merozoit yang sangat banyak diantara spesies *Plasmodium* yang lain serta pada *Plasmodium malariae* memiliki waktu paling lama yaitu selama 14-16 hari dengan merozoit sebanyak 15.000 (Irianto K, 2013).

**Tabel 3.** Lama siklus eritrositik (Irianto K, 2013)

Lamanya Daur	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
Masa prepaten	9-10 hari	11-13 hari	10-14 hari	15-16 hari
Masa inkubasi	9-14 hari	12-17 hari	16-18 hari	18-40 hari
Daur eritrositik	48 jam	48 jam	50 jam	72 jam
Merozoit skizon	20-30 hari	18-24 hari	8-14 hari	8-10 hari

Siklus eritrositik dimulai ketika merozoit memasuki sel darah merah. Masa prepaten, inkubasi paling cepat ialah parasit *Plasmodium falciparum* dengan daur eritrositik 48 jam (Irianto K, 2013).

Dalam patofisiologi malaria yang pertama muncul ialah gejala seperti demam bersamaan dengan pecahnya skizon dalam darah yang mengeluarkan antigen dan merangsang makrofag, monosit atau limfosit serta mengeluarkan berbagai

macam sitokin diantaranya *Tumor Nekrosis Faktor* (TNF) yang akan dibawa aliran darah ke hipotalamus, merupakan pusat dari pengatur suhu tubuh dan menyebabkan demam. Akibat demam terjadi vasodilatasi perifer disebabkan oleh bahan vasoaktif parasit. Terjadi pembesaran limpa akibat peningkatan jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit, teraktifasinya sistem retikuloendotel membuat fagositosis eritrosit yang telah terinfeksi parasit dan sisa eritrosit hemolisis menyebabkan anemia. Pada hemolisis yang kuat dapat terjadi hemoglobinuria (*black water fever*), infeksi *Plasmodium malariae* atau malaria tropika dapat menyebabkan hipoksia jaringan karena kelainan sel darah merah yang menjadi lengket sehingga terjadi pelekatan di dalam pembuluh kapiler membuat penonjolan pada dinding endotel kapiler.

Tabel 4. Masa inkubasi penyakit malaria (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

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 malariae</i>	18-40 Hari (28)

Gejala malaria infeksi tunggal pada pasien non-imun secara klinis terdiri dari beberapa serangan demam dengan interval tertentu (paroksisme), yang diselingi oleh suatu periode bebas demam (periode laten). Sebelum pasien merasakan demam pasien biasanya merasa nyeri kepala, lemah, mual, muntah, dan tidak nafsu makan. Periode paroksisme terdiri dari tiga stadium yakni :



1. Stadium dingin (*cold stage*)

Diawali dengan gejala menggigil atau perasaan yang sangat dingin, gigi gemeretak dan penderita merasa ingin menutupi tubuhnya dengan segala macam pakaian, Nadi teraba cepat tapi lemah, bibir, dan jari-jari pucat atau sianosis, kulit kering, dan pucat. Pasien juga merasa ingin muntah dan pada anak sering kejang. Stadium dingin atau *cold stage* berlangsung selama 15-60 menit (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

2. Stadium demam (*hot stage*)

Setelah pasien merasa dingin, penderita akan merasa kepanasan terlihat dari muka merah, kulit kering dan terasa sangat panas, nyeri kepala, mual, muntah, nadi menjadi kuat. Pasien akan merasa sangat haus dan suhu dapat mencapai 41°C bahkan lebih. Stadium demam atau *hot stage* berlangsung selama 1-12 jam (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

3. Stadium berkeringat (*sweating stage*)

Setelah pasien merasa dingin lalu merasa panas, pasien akan berkeringat banyak sekali, tempat tidurnya basah, kemudian suhu badan akan menurun dengan cepat bahkan dibawah normal. Pada stadium ini terjadi kematian paling banyak, gejala khas pada stadium ini adalah *black water fever* yakni komplikasi terberat berupa warna urin bewarna tua atau hitam, ikterus, muntah berwarna empedu. *Black water fever* sering dijumpai pada kasus parasit *Plasmodium falciparum* (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012).

Dalam menegakkan diagnosis penyakit malaria perlu adanya pemeriksaan penunjang berupa :

## 1. Pemeriksaan Mikroskopis Darah

Terdapat dua pemeriksaan sediaan mikroskopis darah yaitu pemeriksaan sediaan darah tipis dan pemeriksaan sediaan darah tebal.

Pada pemeriksaan ini kita dapat melihat jenis *Plasmodium* dan stadiumnya, untuk melihat kepadatan parasit, terdapat dua metode yaitu semi-kuantitatif dan kuantitatif.

Metode yang biasa digunakan ialah metode semi-kuantitatif dengan interpretasi :

- (-) : Sediaan Darah (SD) negatif (tidak ditemukan parasit dalam Lapang Pandang Besar (LPB))
- (+) : SD positif 1 (ditemukan 1-10 parasit dalam 100 LPB)
- (++) : SD positif 2 (ditemukan 11-100 parasit dalam 100 LPB)
- (+++)
- (++++)
- (+++++) : SD positif 3 (ditemukan 1-10 parasit dalam 1 LPB)
- (+++++) : SD positif 4 (ditemukan >10 parasit dalam 1 LPB)

Untuk metode kuantitatif, SD tebal menghitung jumlah parasit/200 leukosit dan SD tipis penghitungannya jumlah parasit/1000 eritrosit (Harijanto, 2014).

## 2. Tes diagnostik cepat

Tes ini dinamakan tes diagnostik cepat karena hanya memerlukan waktu sekitar 3-5 menit, tidak memerlukan keahlian khusus, tidak memerlukan alat khusus. Tes ini menggunakan 2 jenis antigen yaitu *Histidine Rich Protein II* (HRP-II) untuk mendeteksi antigen dari *Plasmodium falciparum* dan antigen terhadap *Laktate Dehydrogenase* (LDH) yang terdapat pada *Plasmodium* lainnya. Sensitivitas dan spesivitasnya tinggi

dan sangat bermanfaat untuk tes deteksi parasit pada pemberian obat malaria *Artemisinin-based combination therapy* (ACT) (Harijanto, 2014).

### 3. Tes Serologi

Tes ini berguna untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik terhadap malaria atau keadaan parasit sangat sedikit jumlahnya. Tes ini dapat dilakukan bila terdapat antibodi baru yang terjadi setelah 2 minggu infeksi dan menetap selama 3-6 bulan. Tes ini sangat spesifik dan sensitive terutama digunakan pada penelitian epidemiologi atau alat uji saring donor darah (Harijanto, 2014).

### 4. Tes Diagnosis Molekular

Pemeriksaan yang dianggap sangat sensitif terhadap teknologi amplifikasi DNA, waktu yang cukup cepat serta spesifitasnya tinggi. Keunggulannya tidak memerlukan jumlah parasit yang banyak untuk memberikan hasil positif. Contoh tes yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) (Harijanto, 2014).

## **2.2 *Thrombospondin-related Anonymous Protein Plasmodium falciparum***

Penyakit malaria yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium falciparum* hingga kini tetap menjadi ancaman kesehatan yang utama, khususnya bagi golongan anak-anak dan ibu hamil di daerah yang endemik. Parasit *Plasmodium falciparum* merupakan spesies yang paling berbahaya karena penyakit ini dapat menjadi memberat dan menyebabkan manifestasi yang lebih berat.

Perkembangan aseksual dalam hati hanya terjadi satu kali pada stadium fase pre-eritrositik, tidak ada fase ekso-eritrosit yang dapat menimbulkan relaps seperti infeksi dari spesies parasit *Plasmodium* yang lain. (Ikatan Dokter Anak Indonesia, 2012)

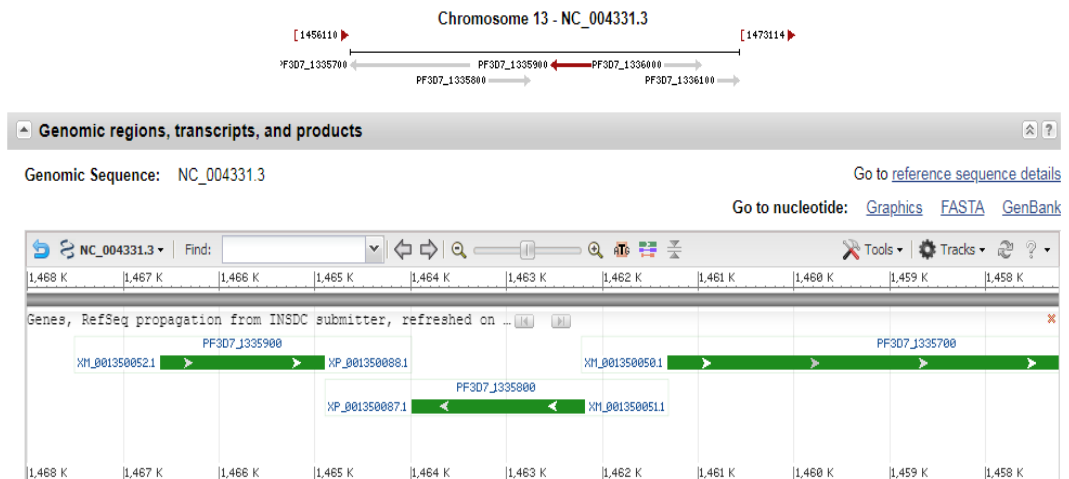
Gen *Plasmodium falciparum* menunjukkan adanya polimorfisme genetik ekstensif. Fenomena ini dimanfaatkan untuk mengkode genetik dan menilai dinamika populasi parasit. Sebagai contoh, tingginya polimorfisme ditampilkan pada lokus gen *Merozoit Surface Protein-1* atau *-2* (MSP-1/-2) dan *Glutamate Rich Protein* (GLURP) pada tahap ekso-eritrositik 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. Pada *Plasmodium falciparum* tahap sporozoit pre-eritrositik ditemukan gen *Circumsporozoit Protein* (CSP) dan *Thrombospondin-related Anonymous Protein* (TRAP). Gen TRAP berfungsi untuk motilitas dari sporozoit agar sampai ke sel hati dan menginfeksi sel hati (Mwingira *et al.*, 2011).

Location: chromosome: 13

See PF3D7\_1335900 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 1

Sequence: Chromosome: 13; NC\_004331.3 (1464895..1466619, complement)



**Gambar 6.** Letak gen TRAP pada *Plasmodium falciparum* (NCBI, 2018)

Genom dari *Plasmodium falciparum* mempunyai kromosom sebanyak empat belas dengan 23-25 juta panjang basa. Sedangkan *Thrombospondin-related anonymous protein* atau TRAP pada *Plasmodium falciparum* terdapat dalam kromosom 13, dan gen ini merupakan gen transmembran protein (Bannister dan Sherman, 2009).



Sumber:

**Gambar 7.** Struktur gen TRAP pada *Plasmodium falciparum* (Ghosh KA., 2009)

TRAP adalah transmembran protein tipe I yang mempunyai 4 bagian yang dapat diidentifikasi, berupa tiga ekstraselular domain yang beradhesi (I, II, IV) dan variable tinggi pada bagian III yang mempunyai domain sitoplasmik asam aktif fungsional. Domain tipe A1 mempunyai karakteristik sama dengan faktor *von-*

*Willebrand* (vWF), dan juga ditemukan thrombospondin repeat tipe-1 pada bagian domain yang kedua (NCBI, 2018; Patarroyo ME *et al.*, 2008).

Pada gambar 7 menunjukkan panjang basa dari gen TRAP sepanjang 606bp, dan dijelaskan secara spesifik bagian-bagiannya yaitu terdapat *N-terminal* sepanjang 1-37 bp, *A-domain* posisi 38-232 bp, *Thrombospondin type-I repeat* (TSR) posisi 233-280 bp, *repeat region* posisi 281-534 bp, *Thrombospondin membrane* (TM) posisi 535-562bp, dan bagian yang terakhir merupakan *cytoplasmic-domain* (CD) dengan posisi 563-606 bp (Ghosh KA *et al.*, 2009).

Dalam menginvasi sel hepatosit terdapat dua bagian yang sangat berperan yaitu *A-domain* dan *Thrombospondin type-I repeat*. TSR bertujuan untuk mengikat proteoglikan heparin sulfat pada permukaan sel hepatosit, *A-domain* berfungsi sebagai reseptor permukaan gen TRAP yang bermediasi pertama pada hepatosit. Jika kita mengukur afinitas dua bagian tersebut, sebaiknya tidak mengukur bagian secara terpisah karena dapat menurunkan afinitas sebanyak dua kali lipat. Lokasi tepatnya pada permukaan sel hepatosit HepG2 serta mengandung urutan sel RGD dan motif ikatan sulfat. Pada bagian ekstraseluler gen TRAP terdapat *cytoplasmic tail domain* (CTD) yang kaya asam residu dan mengandung sub-terminal residu *tryptophan* serta *hydrophobic* residu atau YXX. CTD mempunyai fungsi yaitu sebagai *actin-myosin* motor dari parasit (Morahan, 2009; Muller HM *et al.*, 1993).



**Gambar 8.** Variasi gen TRAP pada *Plasmodium falciparum* (Akhouri, 2008)

Pada penelitian Reteesh Raj tahun 2008, ditemukan variasi gen TRAP yang paling banyak ditemukan pada bagian II yaitu *A-domain* berupa C43.G, C55.G, T131.A, D162.A, C205.G, C212.G. Pasangan primer yang digunakan yaitu primer yang sangat spesifik, karena mengidentifikasi mutasi harus sesuai dengan struktur region panjang pasangan basa, untuk *A-domain* memiliki pasangan primer yaitu forward primer 5'GCACATACCGGTAGAGATGTGC AAAACAATATAGTG-3' dan reverse primer 5'GCACCCTCGAGACTATCC ACTACCACTACCACTACCTTTGCTGTCCATGCAGAATCAGCATACT-3', sedangkan untuk region RII (TSR) memiliki perbedaan di reverse primer yaitu 5' GCACCCTCGAGACTATCCACTACCACTACCACTACCTTAAC ATCTAATGGTTCCCATTTTGG-3', untuk *repeat region (proline-rich region)* memiliki reverse primer 5'GCACCCTCGAGACTATCCACTACC ACTACCACTACCTTTGGTTTTTGGACAGAAGAATTATC-3', dan yang terakhir region CD memiliki reverse primer 5'GCACCCTCGAGACTAT CCACTACCACTACCACTACCTTTTTATATTTATTATTTTTTTT-3' (Akhouri RR, 2008).

*Plasmodium falciparum* *Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP) adalah satu dari beberapa pelekatan protein. Kandidat dari beberapa vaksin yang di dukung dari berbagai kondisi. Pertama, karena seperti



Circumsporozoit yang spesifitasnya untuk *sulfated glycoconjugates* dalam sel hati atau hepatosit. Menunjukkan peranan penting dalam infektivitas sporozoit, hasil ini dikonfirmasi dengan adanya pengguguran parasit oleh vaksin PfTRAP. Kedua, dilakukan percobaan dengan memberikan imunisasi analog PfTRAP saja atau dikombinasikan dengan CSP ke hewan pengerat dan menunjukkan hasil imunisasi dapat melindungi mereka terhadap parasitemia setelah terinfeksi oleh sporozoit (Kester KE *et al.* 2014)

Vaksin yang dibuat dari gen TRAP mempunyai struktur glikosilasi yang sama dengan gen CSP terjadi pada domain *Thrombospondin type I repeat* (TSR). Pada TSR terdapat residu Trp dan Thr yang identik, yang membuat gen TRAP dan CSP dapat berkaitan dan membuat vaksin yang lebih baik (Abdullah, Idris and Saparon, 2017)

RTS,S/TRAP adalah vaksin malaria terdiri dari protein rekombinan yang diproduksi dan dimurnikan dari kultur sel serangga supernatant (*Spodoptera frugiperda* Sf9 sel) yang terinfeksi dengan baculovirus rekombinan (AcMNPV). Baculovirus mengekspresikan bentuk terpotong dari gen TRAP yang berasal dari strain *Plasmodium falciparum* NF54 (*Clone 3D7*). Tahap akhir dari dimurnikannya antigen berasal dari 493 pasangan basa dengan panjang yang terdiri dari basa 26 (*arginine/R*) sampai 511 (*lysine/K*) dari protein TRAP asli dan diperpanjang pada ujung terminal karboksit dengan penambahan 7 residu histidin. Antigen TRAP (RTS,S/TRAP atau TRAP) dibuat dalam bentuk pil *lyophilized* dalam dosis tunggal (Kester KE *et al.* 2014).

Vaksin *Plasmodium falciparum* pre-eritrositik RTS,S merupakan pelepasan dari Circumsporozoit Protein (CSP), namun vaksin ini tidak cukup untuk memberikan perlindungan terhadap malaria dan relative singkat. Analisis korelasi imunologis yang di induksi oleh RTS,S memberikan kesan kontribusi yang kecil dari rendahnya Sel T CD4+ antibodi terhadap antigen CS pada sporozoit. Data yang diperoleh dalam percobaan menggunakan hewan pengerat, mengatakan bahwa vaksin malaria dengan vektor adenovirus yang diberikan dalam regimen dorongan utama heterolog dengan *Modified vaccine virus Ankara* (MVA) telah mampu mendorong respon humoral dan respon sel T yang didukung oleh tingginya sel T CD8+. TRAP secara klinis merupakan gen yang induksinya memiliki potensi terhadap sel T CD8+ dalam manusia dan vaksin paling efektif disamping diberikan RTS,S tanpa vektor (Hodgson SH *et al.*, 2015)

### **2.3 Teknik analisis biologi molekuler**

Teknik dasar analisis biologi molekuler untuk DNA diantaranya adalah hibridasi. Pada metode hibridasi dibuat pelacak atau *Probe* yang merupakan untaian asam yang diperkirakan sesuai dengan DNA yang dideteksi dengan akurasi sebesar 80%. Teknologi yang paling akurat untuk mendeteksi asam nukleat adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang akurasinya 100%, pada metode ini menjelaskan suatu segmen asam nukleat yang diperbanyak atau diamplifikasi menggunakan paduan primer yaitu batasan sekuen basa nitrogen hulu ke hilir segmen. PCR merupakan suatu teknik yang memperbanyak (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan suatu organisme. Dengan menggunakan teknik PCR dapat dihasilkan jumlah yang banyak dan

waktu relative singkat karena sebelum menggunakan PCR, peneliti masih menggunakan teknik kloning yang membutuhkan waktu hingga berhari-hari (Nurhayati B, Darmawati S, 2017).

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) pada tahun 2017, PCR diartikan sebagai suatu teknik atau metode atau cara perbanyak (replikasi/amplifikasi) fragmen DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme atau secara invitro, yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda sampai jutaan kopi fragmen DNA. Dalam prosesnya, terdapat komponen PCR yang direaksikan yang diantaranya : enzim DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTPs),  $MgCl_2$ , dan primer (potongan pendek DNA untai tunggal) yang mengawali sintesis DNA. Setelah larutan tersebut disatukan menjadi homogen, maka larutan tersebut siap direaksikan dalam mesin PCR.

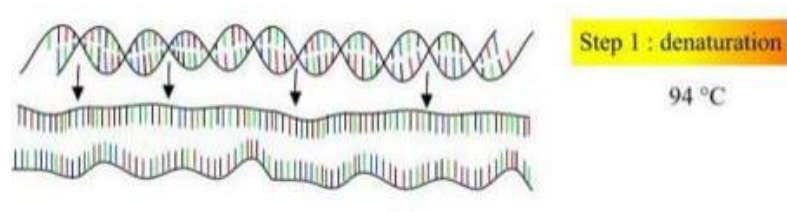
### 2.3.1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Terdapat tiga tahapan dalam proses PCR yang berulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat, yaitu denaturasi ( $95^{\circ}C$ ), *annealing* ( $55-60^{\circ}C$ ) dan ekstensi ( $72^{\circ}C$ ).

#### 2.3.1.1. Denaturasi untai ganda

Merupakan tahap pertama pada amplifikasi PCR dengan menaikkan suhu dalam tabung reaksi sampai  $95^{\circ}C$ . Tabung ini berisi DNA target, dua primer oligonukleotida dalam jumlah

berlebih, *Taq DNA polymerase* yang tahan panas, keempat *deoksiribonukleotida* dan *buffer* yang mengandung Mg. Selama proses denaturasi, proses untai ganda DNA (dsDNA) mencair dan ikatan menjadi terbuka sehingga terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA (ssDNA) atau *single stranded* biasanya berlangsung selama 1-2 menit. Denaturasi yang tidak sempurna mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk dsDNA lagi) secara cepat, dan ini dapat mengakibatkan gagalnya proses PCR. Jika terlalu lama maka dapat mengurangi aktivitas enzim *Taq DNA Polymerase* yang mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, dan 5 menit masing-masing pada suhu 92,5°C, 95°C, dan 97,5°C biasanya peneliti menggunakan suhu standar yaitu 94°C.



**Gambar 9.** Proses denaturasi pada PCR (Zuhriana KY, 2010)

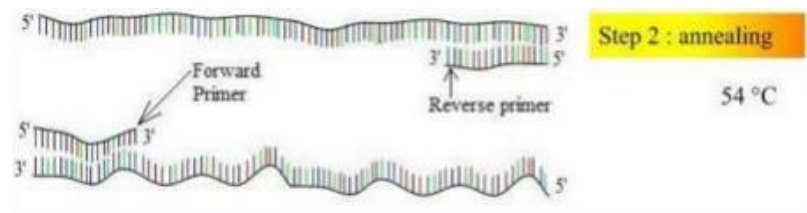
#### 2.3.1.2. Primer *annealing*

Tahapan yang kedua dalam amplifikasi PCR yaitu *annealing* merupakan pengenalan (*annealing*) primer terhadap DNA target yang tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer sendiri. Waktu yang biasa digunakan yaitu 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, maka

semakin tinggi suhu yang diperlukan. Umumnya suhu penempelan yaitu 37°C sampai 60°C.

Proses amplifikasi akan lebih efisien apabila suhu *annealing* tidak kurang dari 37°C supaya tidak terjadi *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang salah). Apabila digunakan suhu 55°C maka akan dihasilkan produk yang mempunyai spesifisitas tinggi yang menempel pada posisi ujung-5' dari untai DNA target yang telah terurai pada tahap denaturasi.

Pada umumnya untuk merancang primer yang baik adalah primer yang berukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% G+C dan sebaiknya kedua primer tersebut sama.

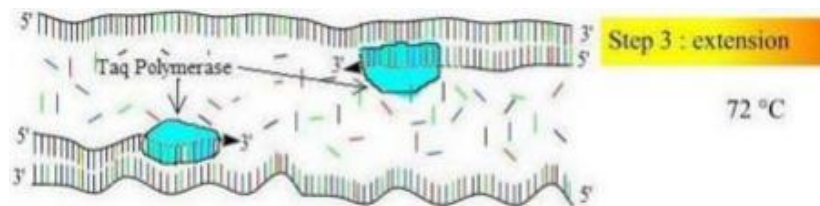


**Gambar 10.** Proses *annealing* pada PCR (Zuhriana KY, 2010)

#### 2.3.1.3 Ekstensi

Pada tahapan yang ketiga dalam sistem amplifikasi PCR adalah *DNA Polymerase extension*. Terjadi proses pemanjangan untai baru DNA yang bermula dari posisi primer menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung 5'

menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses ekstensi atau elongasi DNA yang diinginkan yaitu sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida target. Setiap satu kilobase (1 kbp atau 1000 bp) memerlukan waktu sekitar 1 menit, apabila kurang dari 500 bp memerlukan waktu sekitar 30 detik dan pada kisaran 500 bp memerlukan waktu 45 detik serta lebih dari 1 kbp akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya dengan temperature berkisar 70-72°C (Kementerian Kesehatan RI, 2017).



**Gambar 11.** Proses ekstensi pada PCR (Zuhriana KY, 2010)

**Tabel 5.** Oligonukleotida *Thrombospondin-related anonymous protein* (Ohasi J, 2014)

Reaksi	Sekuensi Basa
<i>First reaction</i>	5'-GTTGTTGTGTATTTCACTATAT-3' 5'-GAAACAAAGTGACCCCAAAA-3'
<i>Second reaction</i>	5'-TTCAGGATGTTTTGGAGTATCG-3' 5'-GTTCCACAAGAACCCGAAGA-3'

Terdapat berbagai teknik PCR yang dimodifikasi kedalam beberapa jenis yaitu:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Metode ini bertujuan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA tersebut (Zuhriana KY, 2010).

2. *Inverse-PCR*

Metode ini dipakai ketika terdapat hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi memotong bagian luar yang akan di amplifikasi, fragmen yang dihasilkan akan ditempelkan dengan ligase dan diamplifikasi menggunakan sekuen primer. Titik ujung amplifikasi memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal. Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi sekuen antara dari beragam gen (Zuhriana KY, 2010).

3. *Nested-PCR*

Metode ini memungkinkan mengurangi kontaminasi produk selama amplifikasi dari penyatuan kedua primer. Kedua primer digunakan untuk menamplifikasi target selama proses berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set disebut *primer inner* dan set lainnya atau set kedua disebut *outer primer*. *Nested*-primer akan menyatu dengan produk pertama serta menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk pertama (Zuhriana KY, 2010).



#### 4. *Quantitative-PCR*

Metode ini digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil PCR, tidak secara langsung digunakan untuk mengukur kuantitas. Metode ini dimulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasilnya menampilkan copy dari sampel (Zuhriana KY, 2010).

#### 5. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*

Metode ini dapat digunakan digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau RNA. Metode ini dibantu oleh enzim *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan (Zuhriana KY, 2010).

#### 6. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Metode ini digunakan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer-primer dengan sekuen acak untuk keperluan amplifikasi fokus acak dari genom (Zuhriana KY, 2010).

#### 7. PCR-ELISA

Metode ini digunakan untuk menangkap asam nukleat yang prinsipnya mirip u *Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)* yang terkait, dilakukan dapat digunakan untuk pengukuran sekuen internal pada produk PCR. Metode ini lebih dipilih dibandingkan metode *Quantitative-PCR* karena lebih murah (Kemenkes RI, 2017).

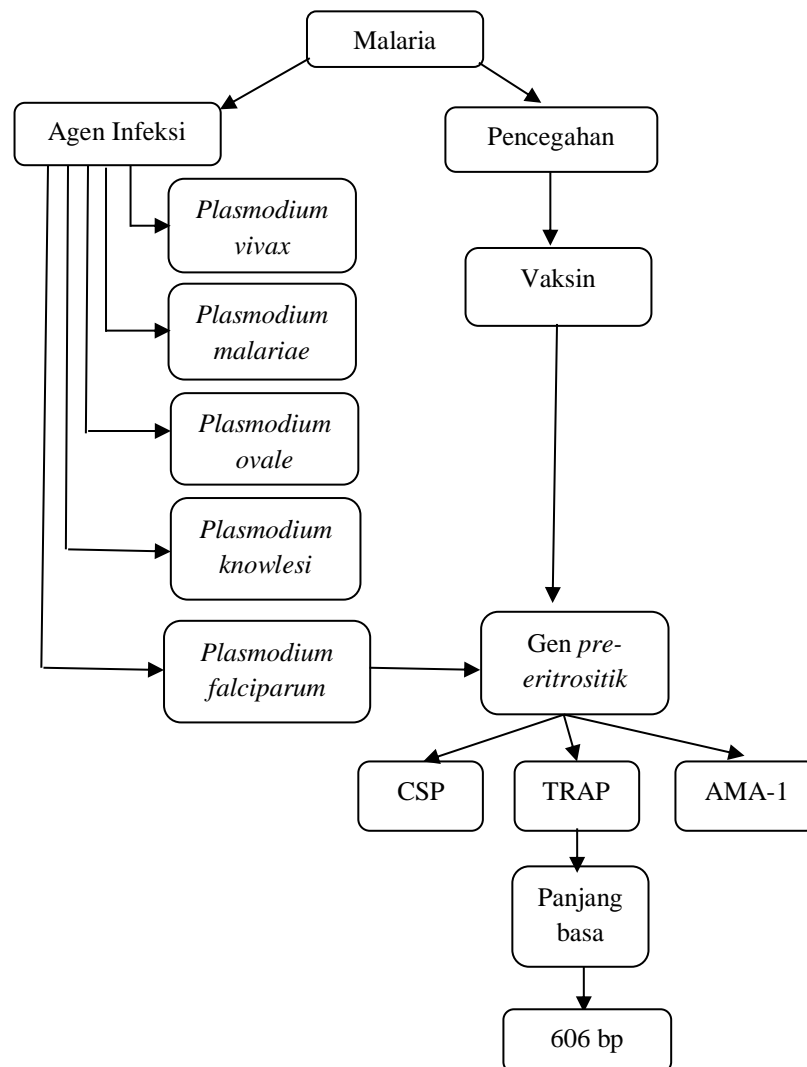
## 8. *Touchdown* PCR

Metode ini merupakan sebuah modifikasi PCR yang mencegah amplifikasi sekuen nonspesifik dengan memvariasikan suhu *annealing* yang bertujuan untuk mengurangi latar belakang spesifik secara bertahap menurunkan suhu *annealing* selama proses berlangsung (Kemenkes RI, 2017).

Keunggulan PCR adalah kemampuannya untuk melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga dapat mencapai  $10^9$  kali lipat. Oleh karena itu, kontaminasi fragmen DNA dalam jumlah sedikit dapat menyebabkan kesalahan yaitu didapatkannya produk yang gagal atau amplifikasi yang tidak sesuai. Peneliti harus memperhatikan deoksiribonukleotida triphosphate (dNTP), oligonukleotida primer, cetakan DNA, komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan dan faktor teknis maupun non teknis (contohnya kontaminasi) (Kemenkes RI, 2017).

## 2.4 Kerangka Teori

Kerangka teori merupakan kerangka yang dibuat untuk menghubungkan antar konsep berdasarkan studi dan berlandaskan teori asal. Kerangka teori pada penelitian ini dijelaskan pada gambar dibawah.

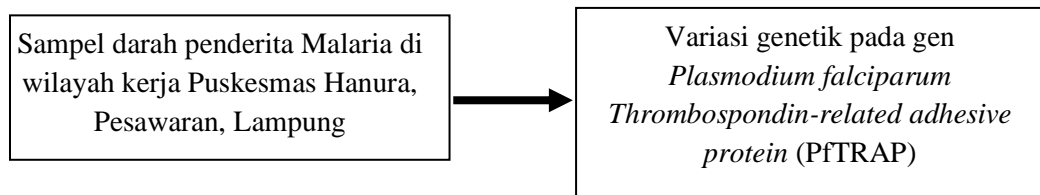


Sumber: (Antinori S *et al.*, 2012; Putra TRI, 2011; Akhouri RR, 2008)

**Gambar 12.** Kerangka Teori

## 2.5 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dijelaskan pada gambar dibawah.



Sumber: (Antinori S *et al.*, 2012; Putra TRI, 2011)

**Gambar 13.** Kerangka Konsep

## 2.6. Hipotesis

Pada sebuah penelitian diperlukan sebuah jawaban sementara terhadap penelitian yang akan dilakukan, hal tersebut adalah hipotesis. Hipotesis dapat dibuat menurut teori-teori yang sudah dijelaskan sebelumnya. Hipotesis pada penelitian ini, yaitu "Terdapat *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada gen *Plasmodium falciparum* Thrombospondin related anonymous protein (PfTRAP) di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Lampung".

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian kuantitatif dengan metode *survey* deskriptif dipilih dalam melakukan penelitian ini. Penelitian akan dilakukan dengan mengidentifikasi variasi genetik dari sampel darah penderita malaria *Plasmodium falciparum* di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Desember 2018 sampai bulan Maret 2019.

### **3.3 Subjek Penelitian dan Teknik Sampling**

Subjek penelitian adalah warga yang terdapat di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran yang menderita positif malaria berdasarkan pemeriksaan mikroskopis. Pengambilan sampel darah pada tahun 2016. DNA dari sampel telah diisolasi dan saat ini tersimpan dalam ruangan Bahan Biologi Tersimpan (BBT). Jumlah BBT yang tersedia sebanyak 53 sampel DNA. Semua BBT yang tersedia akan dilakukan uji pemeriksaan PCR untuk mendeteksi gen TRAP. Teknik pengambilan sampel penelitian ini adalah *consecutive sampling*

yaitu pengambilan sampel dilakukan secara berurutan dan sampel yang memenuhi kriteria akan dimasukkan dalam sampel penelitian.

### **3.4 Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *survey* bersifat deskriptif untuk mendeteksi adanya variasi genetik *Plasmodium falciparum thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP) pada sampel darah positif malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

### **3.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

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

Kriteria Inklusi :

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

Kemudian kriteria sampel yang eksklusi adalah :

1. Terkontaminasi bahan kimia lain
2. DNA sampel BBT telah rusak

### **3.6 Identifikasi variable**

Penelitian ini memiliki satu variabel, yaitu gen *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP)

### 3.7 Definisi Operasional

Pada penelitian ini didapatkan satu variabel, yaitu gen *Plasmodium falciparum* *Thrombospondin-related anonymous protein* (PfTRAP). Variabel ini yang akan dijadikan indikator dalam penentuan adanya variasi genetik. Penjelasan variabel penelitian akan dijelaskan pada tabel 6.

**Tabel 6.** Definisi Operasional (Ohasi J *et al.*, 2014)

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur
<b>Gen TRAP</b>	Gen <i>marker</i> dalam infeksi multigenotip pada <i>Plasmodium falciparum</i>	PCR dan elektroforesis	Amplifikasi segmen gen TRAP	Fragmen DNA dengan panjang basa 606 bp

### 3.8 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dilakukan dengan melalui tiga tahapan yaitu isolasi DNA, amplifikasi gen PfTRAP menggunakan Nested-PCR dan elektroforesis. Alat dan bahan yang digunakan dibedakan sesuai dengan tahapan yang akan dilakukan.

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 *Genomic DNA Mini Kit* dari *Geneaid*. Bahan-bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA adalah *Genomic DNA Mini Kit* yang terdiri dari : *RBC Lysis Buffer*; *GT Buffer*; *GB Buffer*; *W1 Buffer*; *Wash Buffer*; *Elution Buffer*, 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*, *GD Columns centrifuge*, *microcentrifuge tube*, makropipet berukuran 100-1000µl maupun mikropipet berukuran 10-100 µl, *blue tips*, *yellow tips*, *stopwatch*, dan *waterbath 56°C* (Geneaid, 2017).

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 *nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara konvensional. Alat PCR yang digunakan adalah Rotor-Gene® Q (Qiagen). Penelitian ini menggunakan *merk kit* untuk dilakukan proses amplifikasi yaitu menggunakan *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 7 (Bioline, 2017)

**Tabel 7.** Primers Sequences TRAP (Ohasi J *et al.*, 2014)

Primer	Sekuensi basa
<b>First Primer</b>	5'- GGATTTGGTGGATTTTCTGG -3' (forward)
	5'- GAACAAACTTAAGTGATGCACTGTT -3' (reverse)
<b>Second Primer</b>	5'- TTCAGGATGTTTTGGAGTATCG -3' (forward)
	5'- GTTCCACAAGAACCCGAAGA -3' (reverse)

### 3.9 Prosedur Penelitian

Terdapat beberapa tahapan untuk melakukan prosedur *Genotyping* Gen PfTRAP, yaitu sebagai berikut :

#### 3.9.1. Isolasi DNA

1. Menambahkan 300µl sampel ke microcentrifuge tube
2. Menambahkan 900µl lysis buffer (3 x jumlah RBC)
3. Menginkubasi dalam suhu ruang selama 10 menit.
4. Melakukan sentrifuge dengan kecepatan 7700 rpm selama 5 menit.  
Kemudian memisahkan hasil sentrifuge dengan supernatant.
5. Menambahkan 100µl buffer AL ke dalam sampel, kemudian di vortex selama 15 detik.
6. Menambahkan GB buffer 200µl kedalam sampel
7. Menambahkan 30µl Proteinase K, kemudian melakukan inkubasi dalam waterbath dengan suhu 60°. Sampel diperiksa setiap 3 menit dan dikocok dengan cara dibolak balikkan secara perlahan.

8. Mengganti tube dengan GD column, kemudian menambahkan 200µl etanol absolut kedalam sampel
9. Melakukan sentrifuge dengan kecepatan 14-16.000G selama 5 menit
10. Menambahkan 400µl Wash Buffer, kemudian melakukan sentrifuge dengan kecepatan 14-16.000G selama 1 menit
11. Menambahkan 600µl wash buffer, kemudian melakukan sentrifuge dengan kecepatan 14-16.000G selama 1 menit.
12. Mengganti GD column kemudian menambahkan 100µl Elution buffer pre-heated
13. Melakukan inkubasi pada suhu ruang selama 3 menit
14. Melakukan sentrifuge dengan kecepatan 14-16.000G selama 1 menit
15. Membuang QIAamp Spin Column dan menutup 1,5 ml microsentrifuge tube, hasil ekstraksi dapat disimpan pada lemari pendingin.

### 3.9.2. Uji Kuantitas DNA

1. Menghidupkan nanofotometer sesuai dengan protokolnya (IMPLEN NanoPhotometer P-Class; Germany)
2. Memilih program yang sesuai dengan sampel DNA (dsDNA = *Double Stranded DNA*) dan memilih satuan yang akan digunakan, yaitu µg/ml.
3. Meneteskan permukaan *cell holder* dengan *buffer*, kemudian membersihkannya dengan *tissue*

4. Meneteskan 1 $\mu$ l sampel DNA yang telah di ekstraksi pada *cell holder* kemudian meletakkan *lid 10* pada permukaan *cell holder*. Hasil purifikasi ( $\lambda = A260/A280$ ) dan konsentrasi DNA akan secara otomatis tertera pada layar.
5. Mencatat nilai konsentrasi dan purifikasi DNA

### 3.9.3. Persiapan amplifikasi

1. Membuat campuran reaksi dengan perhitungan: 25  $\mu$ L per reaksi  $\times$  (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. MyFi™ DNA Polymerase (Bioline) :

5X MyFi Reaction Buffer	: 5 $\mu$ L
20 $\mu$ M Forward Primer	: 0,4 $\mu$ L
20 $\mu$ M Reverse Primer	: 0,4 $\mu$ L
DNA Template	: 1 $\mu$ L
MyFi DNA Polymerase	: 1 $\mu$ L
Aqua for Injection	: 17,2 $\mu$ L;

4. 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;

5. Melakukan aliquot campuran reaksi tersebut sebanyak 25  $\mu\text{L}$  pada setiap 0,2 ml *microcentrifuge tube*;
6. Menambahkan DNA template sebanyak 1  $\mu\text{L}$  pada setiap *tube*
7. Menempatkan *tube* ke dalam *rotor*, kemudian memasukkan *rotor* ke dalam Rotor-Gene® Q (Qiagen);
8. Menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

#### 3.9.4. *Cycling parameters*

Pada tahap ini terjadi 3 proses yaitu : *denaturasi*, *annealing* dan *extension* yang diatur pada alat PCR yang peneliti gunakan. Tahapan, siklus, suhu, serta waktu amplifikasi dijelaskan pada tabel 8.

**Tabel 8.** Pengaturan amplifikasi (Ohasi J *et al.*, 2014)

No	Tahapan	Siklus	Suhu	Waktu
1	<i>Initial denaturation</i>	40 siklus	95°C	600 detik
2	<i>Denaturation</i>	1 siklus	95°C	30 detik
3	<i>Annealing</i>	1 siklus	56°C	30 detik
4	<i>Extension</i>	1 siklus	72°C	45 detik
5	<i>Final Extension</i>	1 siklus	72°C	420 detik

Setelah selesai seluruh tahapan, hasil dapat didiamkan pada suhu ruangan atau disimpan pada lemari pendingin (Snounou dan Färnet, 2013).

### 3.9.5. Pembuatan Gel Agarose

1. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 0,5% (*Tray* kecil) dan 1% (*Tray* besar).
2. Pembuatan gel dimulai dengan mencampurkan 1 gram gel agarose dengan 100 ml 1 × TBE
3. Kemudian campuran dididihkan dalam *microwave* selama 25 menit pada  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ . Campuran dibiarkan hingga suhunya turun sampai dengan  $55^{\circ}\text{C}$ .
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* 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).

### 3.9.6. Elektroforesis

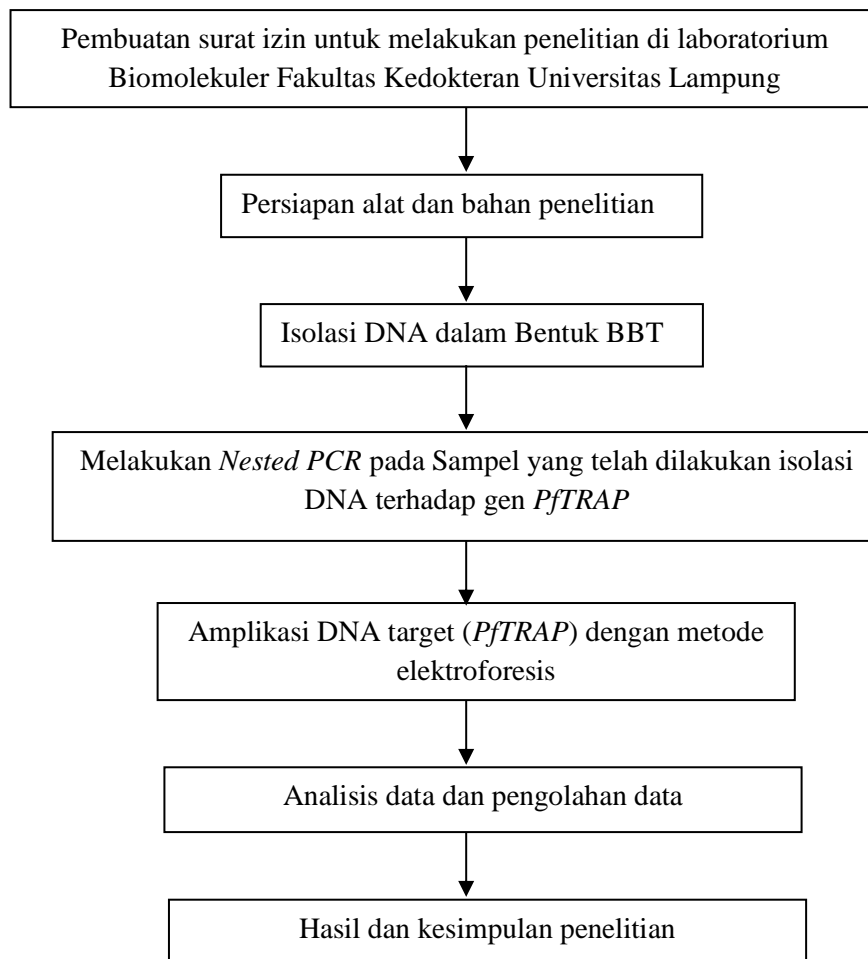
1. Menyiapkan kertas parafilm atau solatip pada meja;
2. Meletakkan 2  $\mu\text{L}$  *loading dye* pada parafilm atau solatip;

3. Mengambil 3  $\mu\text{L}$  hasil amplifikasi, kemudian mencampurkannya dengan *loading dye*;
4. Mengambil 5  $\mu\text{L}$  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).

### **3.10 Analisis data**

Penelitian ini akan menghasilkan sejumlah data mengenai susunan alel gen PfTRAP pada sampel yang diujikan. Data yang didapatkan dari penelitian ini merupakan jenis data kategori, yaitu nominal. Data tersebut telah dianalisis menggunakan *software* bernama MEGA-X, untuk melihat *sequence* yang muncul pada setiap sampel.

### 3.11 Alur Penelitian



**Gambar 14.** Alur Penelitian

### 3.12 Etik Penelitian

Etik penelitian ini telah disetujui oleh bagian etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat No. 3962/UN26.18/PP.05.02.00/2018. Bukti persetujuan etik berada pada lampiran.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah terdapat *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) gen *Thrombospondin-related Anonymous Protein* (TRAP) pada penderita malaria *falciparum* di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.

#### **5.2 Saran**

Adapun saran yang diberikan terhadap penelitian yang dialami peneliti yaitu :

1. Sampel seharusnya diukur terlebih dahulu menggunakan nanofotometer agar sampel yang di uji memiliki konsentrasi yang sama
2. Sekuensing dilakukan pada seluruh sampel agar dapat melihat perubahan basa yang terjadi
3. Sampel yang akan diuji sebaiknya diambil dari daerah yang berbeda-beda untuk mengetahui demografis perbandingan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) di setiap wilayah sehingga akan beragam hasilnya,
4. Harus dilakukan analisis lanjutan dengan menggunakan pilogenetik agar hubungan genetik yang berbeda dapat terlihat.
5. Peneliti ini sebaiknya dilanjutkan dengan harapan dapat membahas fenotip dan genotip lebih dalam dari gen PfTRAP



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah E, Idris A. and Saparon A. 2017, Vaccines against malaria - still a long way to go. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*. 12(10):3218-3221.
- Akhouri RR, Sharma A, Malhotra, Pawan, Sharma, Amit. 2008. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interaction. *Malaria Journal*. New Delhi; BioMed Central.
- Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. 2012. Biology of human malaria *Plasmodia* Including *Plasmodium Knowlesi*. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*: 4(1).
- Bauza, K., Atcheson, E., Malinauskas, T., Blagborough, A. M., Reyes-Sandoval, A. 2016. Tailoring a combination preerythrocytic malaria vaccine. *Infection and Immunity Journal*. United Kingdom; University of Oxford.
- Bannister LH, Sherman IW. 2009. *Plasmodium*. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Bioline. 2017. MyFi™ DNA Polymerase. Singapore.
- Nurhayati B, Darmawati S. 2017. Bahan ajar teknologi laboratorium medis Biologi sel dan molekuler. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016, *Malaria*. Georgia: CDC.
- The Biotechnology Education Company. 2003. Principles and practice of agarose gel electrophoresis. The Biotechnology Education Company.
- Dinas Kesehatan Provinsi Lampung. 2013. Profil kesehatan Provinsi Lampung tahun 2012. Lampung.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran. 2016. Profil kesehatan Kabupaten Pesawaran tahun 2016. Lampung.

- Frevert U. 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stage. *Trend in Parasitology* 20(9):417-424.
- 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):234–237.
- Ghosh AK, Devenport M, Jethwaney D, Kalume DE, Pandey A, Anderson VE, et al. 2009. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the anopheles saglin proteins. *PLoS Pathogens*. 5(1):1–13.
- Geneaid. 2017, Genomic DNA Mini Kit, GeneAid Biotech Ltd.
- Hodgson SH, Ewer KJ, Bliss CM, Edwards NJ, Rampling T, Anagnostou NA, et al. 2015. Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naive individuals, *Journal of Infectious Diseases*, 211(7), pp. 1076–1086.
- Harijanto PN. Malaria. Dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata, Setiati S, Syam AF, 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Ed ke-6. Jakarta: Interna Publishing; 2014: 595-610.
- Ikatan Dokter Anak Indonesia. 2012. *Buku ajar infeksi & Pediatri tropis*. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI.
- Irianto K. 2013. *Parasitologi Medis*, Bandung: Alfabeta CV.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2010. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: Penerbit Kedokteran EGC.
- Kathryn JHR, Jennifer RS, Ceri DL, Andrea C, VSH Adrian. EW Thomas. 1990. Polymorphism of the TRAP gene of plasmodium falciparum. Vol 242. *Proc. R. Soc. Lond. B. London*
- Kester KE, Heppner DG, Moris P. Anyinam OO, Krzych U, Tornieporth N, et al. 2014. Sequential phase 1 and phase 2 randomized, controlled trials of the safety, immunogenicity and efficacy of combined pre-erythrocytic vaccine antigens RTS,S and TRAP formulated with AS02 adjuvant system in healthy, Malaria Native Adults. *Vaccine* 32(49):6683–91.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017, *Buku saku penatalaksanaan kasus malaria*, Jakarta, Subdit Malaria Direktorat P2PTVZ.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Riset kesehatan dasar. Jakarta. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Luchi 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.
- Lukman H. 2011. Malaria: epidemiologi dan diagnosis. Aspirator. 3(2):107-116.
- Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, J.H.Robson K, Crisanti A. 1993. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. Embo journal. 12(7):2881-89.
- Morahan BJ, Wang L, Coppel RL,. 2009. No TRAP, No Invasion. Trends in Parasitology 25(2):77–84.
- 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.
- Natadisastra D, Agoes R. 2009. Parasitologi Kedokteran Ditinjau Dari Organ Tubuh Yang Diserang. Jakarta: EGC.
- National Center for Biotechnology (NCBI). 2018. Thrombospondin related anonymous protein [internet]. [Diakses tanggal 14 Agustus 2018]. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/814170>.
- Nurhayati, Betty, Darmawati, Sri. 2017. Biologi sel dan molekul. Edisi I. Kementerian Kesehatan R. Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Notobroto HB, Hidajah AC. 2009. Faktor risiko penularan malaria di daerah berbatasan. Med. Eksata. 8(2):143-51.
- Ohasi J, Suzuki Y, Naka I, Hananantachai H, Patarapotikul J. 2014. Diversifying selection on the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* in Thailand. PLoS ONE Vol 9 No 2. Thailand; University of Tsukuba.
- Patarroyo ME, Cifuentes G, Rodríguez R. 2008. Structural characterisation of sporozoite components for a multistage, multi-epitope, anti-malarial vaccine. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 40(3):543–57.

- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. 2016. InfoDatin Malaria. Infodatin Malaria 1–7. Jakarta.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. 2017. Profil kesehatan Indonesia. Jakarta.
- Putra TRI. 2011. Malaria dan permasalahannya. 11(2):103–14.
- Qiagen. 2016. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Edisi Ke-5. Hilden : Qiagen.
- Sir O, Arsin A, Syam I, Despitasaki M. 2015. Faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian malaria di kecamatan kabola, kabupaten Alor, Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) tahun 2014, 334–41.
- Soedarto. 2012. Protozoologi Kedokteran. Bandung; Karya Putra Darwati.
- Snounou, Georges. Anna Färnet. 2013. Genotyping of Plasmodium falciparum parasites. edited by K. Moll, A. Kaneko, A. Scherf, and M. Wahlgren. Manassas: EviMalaR.
- Sutarto, Chania E. 2017. Faktor lingkungan perilaku dan penyakit malaria. Jurnal Agromed Unila Vol 4(1). Lampung.
- Tero P, Tommi K, Juho K, Kaisa H, Amit S, Perttu P. 2013. Structure of plasmodium falciparum TRAP (thrombospondin related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von willebrand factor A homologues. Biochem Journal. New Delhi; India
- Wahyu Setiani. N, R,. 2014. Gambaran klinis dan tatalaksana pasien rawat inap malaria falciparum di rsup dr kariadi Semarang periode 2009-2013, Universitas Diponegoro; Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- William OR, Anita M, Sylvie M, Kenichiro N, Miriam DR. Ana S, et al. 1992. Characterization of Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. Medical Science*. University of Pittsburgh; USA
- World Health Organization. 2017. World malaria report 2017. Switzerland.
- World Health Organization. 2010. Basic malaria microscopy part 1 learner guide. 2nd edition, Switzerland.
- Zuhriana KY, 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Saintek. 5(6):1-6.