

**IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) PADA
GEN *CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN Plasmodium falciparum* DARI
PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA,
PESAWARAN, LAMPUNG**

(Skripsi)

**Oleh:
Diah Balqis Ikfi Hidayati**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

**IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) PADA
GEN *CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN Plasmodium falciparum* DARI
PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA,
PESAWARAN, LAMPUNG**

Oleh

Diah Balqis Ikfi Hidayati

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Lulus Sarjana Kedokteran

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IDENTIFICATION of CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN GENE in Plasmodium falciparum FROM MALARIA PATIENTS IN WORKING AREA of PRIMARY HEALTH CARE HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

By

Diah Balqis Ikfi Hidayati

Background: Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium sp.* *Plasmodium falciparum* is the most deadly cause. The treatment for malaria with Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) can cause resistance, so a new effort is needed to reduce the morbidity of malaria. A better prevention method for preventing malaria is to use vaccine. The RTS,S/AS01 vaccine is the first generation of malaria vaccine that has been applied in Ghana, Kenya and Malawi since early 2018. The vaccine consists of circumsporozoite protein antigen and hepatitis B antigen. This vaccine has been shown to provide partial protection to children and has reached efficacy by 80%.

Method: This type of research is a descriptive research with survey design. The sample of research was obtained from Biological Saved Materials (BSM) as many as 53 samples. The examination was performed using PCR method and followed by a sequencing process to detect SNP.

Result: The results showed that only 16 samples had high DNA concentration and were successfully performed by PCR with the results of electrophoresis showing that the samples had the same base pair length according to the target length of the circumsporozoite protein gene and the sequencing results showed there is no difference in nucleotide base sequences compared to references on Pf3D7 isolates from Gene Bank.

Conclusion: There is no SNP on the circumsporozoite protein gene in *Plasmodium falciparum* from malaria patients in the working area of Primary Health Care Hanura, Pesawaran, Lampung.

Keyword: Circumsporozoite protein, *Plasmodium falciparum*.

ABSTRAK

IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) GEN PADA *CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN Plasmodium falciparum* DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

Oleh

Diah Balqis Ikfi Hidayati

Latar Belakang: Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium sp. Plasmodium falciparum* adalah penyebab yang paling mematikan. Pengobatan penyakit malaria menggunakan *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) dapat menyebabkan resistensi sehingga diperlukan upaya baru untuk menurunkan angka kesakitan malaria. Sebuah metode pencegahan yang lebih baik untuk mencegah kejadian malaria adalah menggunakan vaksin. Vaksin RTS,S/AS01 merupakan vaksin malaria generasi pertama yang telah diterapkan di Ghana, Kenya dan Malawi sejak awal tahun 2018. Vaksin tersebut terdiri dari komponen antigen *circumsporozoite protein* dan hepatitis B. Vaksin ini telah terbukti memberikan perlindungan parsial kepada anak-anak dan memiliki efikasi sebesar 80%.

Metode: Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survey dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) sebanyak 53 sampel. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode PCR yang dilanjutkan dengan proses sekuensing untuk mendeteksi adanya SNP.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya 16 sampel yang memiliki konsentrasi DNA yang tinggi, selanjutnya sampel tersebut dilakukan PCR dengan hasil elektroforesis menunjukkan bahwa seluruh sampel memiliki panjang basa yang sama sesuai target panjang gen *circumsporozoite protein* dan hasil sekuensing tidak menunjukkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida dibandingkan dengan referensi pada isolat Pf3D7 dari *Gene Bank*.

Kesimpulan: Tidak terdapat SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

Kata Kunci: *Circumsporozoite protein, Plasmodium falciparum*.

Judul Skripsi

: **IDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) PADA GEN *CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN Plasmodium falciparum* DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG**

Nama Mahasiswa

: **Diah Balqis Iki Hidayati**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1518011076

Program Studi

: Pendidikan Dokter

Fakultas

: Kedokteran

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



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



dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes.
NIP 19820715 200812 2 004

2. Dekan Fakultas Kedokteran

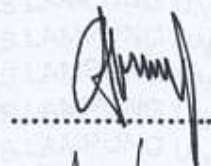


Dr. Dyah Wulan SRW, S.KM., M.Kes.
NIP 19720628 199702 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji


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



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



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



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Dyah Wulan SRW, S.KM., M.Kes.
NIP 19720628 199702 2 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 13 Mei 2019

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul “**IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) PADA GEN CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN *Plasmodium falciparum* DARI PENDERITA MALARIA DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, PESAWARAN, 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, Mei 2019

Pembuat pernyataan



Diah Balqis Ikfi Hidayati

NPM 1518011076

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Terbanggi Besar, Lampung Tengah pada 14 Mei 1999, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, dari Bapak Hidayatulloh, S.Ag. dan Ibu Tati Sumiyati, S.Ag., M.Pd.I.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Taman Kanak-kanak (TK) Permata Hati, Lempuyang Bandar, Way Pengubuan, Lampung Tengah pada tahun 2005, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 5 Lempuyang Bandar, Way Pengubuan, Lampung Tengah pada tahun 2011, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 3 Way Pengubuan, Lampung Tengah diselesaikan pada tahun 2013, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 2 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 Perhimpunan Mahasiswa Pecinta Alam Tanggap Darurat (PMPATD) Pakis Rescue Team sebagai anggota muda periode 2015-2016, sebagai anggota divisi pendidikan dan latihan periode 2016-2017, sebagai sekretaris divisi satuan tugas dan logistik periode 2017-2018, dan sebagai Dewan Pertimbangan Organisasi (DPO) PMPATD Pakis Rescue Team periode 2018-2019. Penulis juga aktif di organisasi luar kampus, yaitu Perhimpunan Tim Bantuan Medis Mahasiswa Kedokteran Indonesia (PTBMMKI) sebagai koordinator wilayah 1 yang meliputi regio Pulau Sumatera periode 2016-2017 dan sebagai DPO fungsional PTBMMKI periode 2017-2018. Penulis merupakan asisten dosen anatomi, Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas

Lampung periode 2017-2018. Penulis menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sukaraja, Cukuh Balak, Tanggamus pada tahun 2018.

Bismillahirrahmanirrahim....

*Kupersembahkan karya sederhana ini
sebagai bentuk rasa syukur kepada Allah SWT
atas segala limpahan karunia-Nya.*

*Kepada Umi, Abi, dan kedua adikku
yang selalu mengiringi setiap langkahku dengan doa
dan penuh kasih sayang.*

*Semoga karya ini dapat menjadi jembatan
perjalanan hidupku agar bisa menjadi manusia
yang bermanfaat bagi orang lain.*

*“Dan perumpamaan-perumpamaan ini Kami buat untuk manusia; dan tiada yang
memahaminya kecuali orang-orang yang berilmu”
(QS. Al-An'kaabut: 43)*

*“... dan aku belum pernah kecewa dalam berdoa kepada Engkau-“
(QS. Maryam: 4)*

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) pada Gen Circumsporozoite Protein Plasmodium falciparum 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. Dyah Wulan SRW, 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 ilmu yang bermanfaat selama proses penelitian skripsi ini, serta sebagai Pembimbing Akademik yang selalu ada untuk setiap keluhan dari semester awal hingga akhir, terimakasih untuk segala nasihat dan motivasi yang diberikan agar tetap menjaga semangat dalam berproses di kampus tercinta ini.
4. dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Kedua atas kesabaran dan kesediaan memberikan bimbingan, ilmu, saran, dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.

5. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes., selaku Penguji Utama untuk masukan dan saran yang telah diberikan pada proses penyelesaian skripsi ini.
6. Terima kasih kepada para laboran Laboratorium Biomolekular FK Unila, Mbak Yani dan Ibu Nuriah, atas seluruh bantuan serta bimbingan dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih atas ilmu dan kesabaran yang selalu diberikan kepada kami selama ini.
7. Seluruh staf dosen dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu dan waktu yang telah diberikan selama perkuliahan, turtorial, dan *Clinical Skills Lab*.
8. Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Umi (Tati Sumiyati, S.Ag., M.Pd.I) dan Abi (Hidayatulloh, S.Ag) serta Adikku (Achnaf Habibullah dan Adhwa Hayati Nufus) yang selama ini telah memberikan segala kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi dan nasihat serta setiap doa yang telah dipanjatkan untukku. Terima kasih atas perjuangan kalian selama ini yang selalu mengupayakan untuk memberikan yang terbaik untukku. Terimakasih telah mendidik putri sulungmu menjadi sosok yang mandiri, berani, dan pantang menyerah. Terimakasih telah mengajarkan keindahan di dalam kesederhanaan. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan dan perlindungan untuk kalian dan dijadikan-Nya ladang pahala.
9. Seluruh Keluarga Besar yang telah membantu dalam berbagai hal, doa, dukungan, dan motivasi.
10. Terima kasih kepada teman seperjuangan penelitian, Sri Janahtul Hayati dan M. Irfan Adi Shulhan atas perjalanan dan pengalaman penelitian selama ini. Terima kasih untuk doa, waktu, tenaga, dan seluruh dukungan serta semangat yang telah diberikan. Ingatlah selalu bahwa kita sedang ada di

jalan menuju kesuksesan dengan zona waktunya masing-masing.

11. Terima kasih kepada sahabatku yang selalu ada di setiap perjalanan selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Sonia Anggraini, Luthfi Aulia, Dhea Novita, Karimah Khitami, Alfia Nikmah, Amalia Widya, Arinda Stefani, Betari Ariefia, Ulfiah Fairuz, Divian Ozaza, dan Farhandika Muhammad atas segala doa, waktu, perhatian, dukungan serta semangat yang telah diberikan selama ini. Segenap penguatan dari kalian membuat segalanya menjadi lebih mudah untuk dijalani. Tetap semangat untuk kalian, sudah saatnya kita menggulung lengan baju dan berjibaku menata masa depan karena ada tangga kesuksesan yang menunggu kita agar bisa berjumpa di atasnya.
12. Terimakasih kepada sahabat PMPATD Pakis Rescue Team yang telah memberikan arti rumah dan keluarga, tempat melepas segala penat selama dunia perkuliahan. Keluarga SC10, Reandy Ilham, Thare Pratama, Sukma Nugroho, Andhika Yuda, Hendro Sihaloho, Ghalib Abdunnasser, Aldi Setia, Cut Bahesty, Nikom Sonia, Rachmatia Ramadanti, Lidya Angelina, dkk.
13. Seluruh sahabat dari kecil hingga saat ini yang telah membantu dalam berbagai hal dan mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
14. Keluarga Besar FK Unila 2015 (Endom15ium) yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas kekompakan, canda, dan tawa selama proses pembelajaran yang telah memberikan warna serta makna tersendiri. Semoga kebersamaan dan kekompakan selalu terjalin baik hingga ke depan nanti.
15. Kakak-kakak dan adik-adik tingkat saya (angkatan 2012-2018) 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, Mei 2019

Penulis,

Diah Balqis Ikfi Hidayati

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan	5
1.4. Manfaat	5
1.4.1. Bagi Keilmuan.....	5
1.4.2. Bagi Penulis.....	6
1.4.3. Bagi Penulis Lain	6
1.4.4. Bagi Masyarakat.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Malaria	7
2.1.1. Definisi.....	7
2.1.2. Etiologi.....	7
2.1.3. Epidemiologi	8
2.1.4. Patogenesis	10
2.1.5. Manifestasi Klinis	11
2.2. <i>Plasmodium falciparum</i>	12
2.2.1. Siklus Hidup <i>Plasmodium falciparum</i>	13
2.2.2. Morfologi <i>Plasmodium falciparum</i>	15
2.2.3. Gen <i>Circumsporozoite Protein Plasmodium falciparum</i>	17
2.3. Vaksin Malaria.....	25
2.4. Metode Biologi Molekuler.....	27
2.4.1. Isolasi DNA.....	27
2.4.2. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	29
2.4.3. Elektroforesis	32

2.5. Kerangka Teori	34
2.6. Kerangka Konsep.....	36
2.7. Hipotesis	36
BAB III. METODE PENELITIAN	37
3.1. Jenis Penelitian	37
3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	37
3.3. Subjek Penelitian	37
3.3.1. Populasi Penelitian	38
3.3.2. Jumlah Sampel dan Teknik <i>Sampling</i>	38
3.4. Rancangan Penelitian.....	39
3.5. Identifikasi Variabel	39
3.6. Definisi Operasional Variabel	39
3.7. Instrumen Penelitian	40
3.7.1. Isolasi DNA.....	40
3.7.2. Amplifikasi Gen <i>Circumsporozoite Protein</i> dengan PCR	41
3.7.3. Elektroforesis	42
3.8. Prosedur Penelitian	43
3.8.1. Isolasi DNA.....	43
3.8.2. Amplifikasi Gen <i>Circumsporozoite Protein</i> dengan PCR	44
3.8.3. Elektroforesis	46
3.9. Teknik Analisis Data	47
3.10. Alur Penelitian	48
3.11. Etik Penelitian.....	48
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1. Hasil Penelitian	50
4.2. Pembahasan.....	53
4.3. Keterbatasan Penelitian.....	53
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	65
5.1. Kesimpulan.....	65
5.2. Saran.....	65

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Taksonomi <i>Plasmodium</i>	13
2. Daftar <i>Sporozoite Surface Protein</i> yang Teridentifikasi pada Kelenjar Liur <i>Anophelessp.</i> Terinfeksi.	19
3. Kode Asam Amino Esensial.	24
4. Oligonukleotida <i>Primer Circumsporozoite Protein</i>	30
5. Suhu Amplifikasi PCR.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Distribusi API per-Kabupaten Kota se-Provinsi Lampung Tahun 2015.	9
2. Penyebaran Kasus Malaria Menurut Wilayah Kerja Puskesmas di Kabupaten Pesawaran Tahun 2014.....	10
3. Daur Hidup <i>Plasmodium sp.</i>	15
4. <i>Ring form</i> Trofozoit <i>Plasmodium falciparum.</i>	16
5. Skizon pada <i>Plasmodium falciparum.</i>	16
6. Gametosit pada <i>Plasmodium falciparum.</i>	17
7. Letak Gen <i>Circumsporozoite Protein</i> pada Kromosom di <i>Plasmodium falciparum.</i>	22
8. Morfologi <i>Circumsporozoite Protein.</i>	23
9. Tahap-Tahap PCR.....	31
10. Kerangka Teori Penelitian.	35
11. Kerangka Konsep Penelitian.	36
12. Alur penelitian.....	48
13. Elektroforesis Hasil Optimasi Amplifikasi PCR	51
14. Elektroforesis Hasil Amplifikasi PCR pada Sampel.....	52
15. Hasil <i>Multiple Alignment</i> Sampel 1a dan 2a <i>Forward</i> dengan Isolat Pf3D7..	52
16. Hasil <i>Multiple Alignment</i> Sampel 1a dan 2a <i>Reverse</i> dengan Isolat Pf3D7 ...	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Malaria merupakan permasalahan kesehatan yang ada di dunia dan umumnya terjadi di daerah yang beriklim tropis maupun subtropis. Pada tahun 2016, tercatat adanya 216 juta kasus malaria yang terjadi di 91 negara. Angka kematian malaria di dunia pada tahun 2016 mencapai 445.000 jiwa (World Health Organization, 2017).

Malaria juga merupakan salah satu permasalahan kesehatan yang ada di Indonesia. Morbiditas malaria pada suatu daerah di Indonesia ditentukan menggunakan *Annual Parasite Incidence* (API) per tahun. Nilai API berasal dari jumlah kasus positif malaria per 1.000 penduduk dalam satu tahun. Tren API di Indonesia menunjukkan penurunan dari tahun 2011 (1,75) hingga tahun 2015 (0,85). Hal ini menunjukkan adanya keberhasilan program pemerintah pusat, daerah, masyarakat, dan mitra terkait. Tetapi tingkat penurunan kasus malaria belum mencapai target eradikasi malaria dan masih menjadi kejadian luar biasa. Kasus malaria di Indonesia lebih banyak terkonsentrasi di wilayah timur, yaitu Papua, yang kemudian disusul oleh Papua Barat, NTT, Maluku, dan Maluku Utara. Lampung menduduki

peringkat ke-12 dari seluruh provinsi yang ada di Indonesia berdasarkan nilai API tahun 2015 (Kementrian Kesehatan RI, 2016).

Provinsi Lampung merupakan salah satu daerah endemis malaria dengan nilai API 0,49 per 1.000 penduduk per tahun. Desa endemis malaria di Provinsi Lampung berjumlah 223 desa atau 10% dari total jumlah desa yang ada. Dinas Kesehatan Provinsi Lampung pada tahun 2015 menyatakan bahwa angka kesakitan malaria tertinggi di kabupaten/kota terdapat pada Kabupaten Pesawaran, Kota Bandar Lampung, dan Pesisir Barat. Morbiditas malaria paling banyak ditemukan di Kabupaten Pesawaran dan jumlah kasus baru terus-menerus menetap, tidak mengalami penurunan yang signifikan pada kabupaten tersebut (Dinas Kesehatan Provinsi Lampung, 2015).

Upaya untuk menekan angka kesakitan dan kematian malaria dilakukan melalui program pemberantasan malaria yang mencakup diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, serta surveilans dan pengendalian vektor dalam hal pendidikan masyarakat tentang kesehatan lingkungan. Ketiga hal tersebut ditujukan untuk memutus rantai penularan malaria. Pengobatan yang diberikan adalah pengobatan radikal malaria yang dapat membunuh semua stadium parasit dalam tubuh manusia. Pengobatan anti malaria yang saat ini digunakan dalam program nasional adalah *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) dengan derivat artemisinin dan golongan aminokuinolon (Peraturan Menteri Kesehatan RI, 2013).

Malaria dapat dicegah dengan menggunakan obat anti malaria sebagai kemoprofilaksis yang menghambat perkembangan stadium hati (pre-eritrositik) atau yang membunuh parasit pada stadium aseksual di darah. Profilaksis digunakan saat mengunjungi daerah endemik dan terus dikonsumsi setelah meninggalkan daerah tersebut selama empat minggu. Namun penggunaan kemoprofilaksis dan pengobatan menggunakan obat anti malaria menjadi semakin kompleks karena meningkatnya kejadian resistensi. Maka dari itu perlu adanya pengembangan metode pencegahan yang lebih baik menggunakan vaksin (World Health Organization, 2015).

Sebuah pendekatan yang menjanjikan untuk pencegahan malaria adalah dengan menggunakan vaksin. Dewasa ini banyak penelitian yang mengarah pada pengembangan vaksin malaria melihat urgensi dari penyakit malaria yang mematikan. *Malaria Vaccine Initiative* (MVI) telah meluncurkan vaksin malaria generasi pertama yang diberi nama RTS,S/ AS01 pada tahun 2015. Vaksin RTS,S/ AS01 ini berguna untuk mencegah invasi parasit malaria pada stadium eritrositik, namun tingkat efikasi yang dimiliki hanya sebesar 50%. Kementerian Kesehatan Ghana, Kenya, dan Malawi menerapkan vaksin tersebut pada tahun 2018. Calon kandidat terbesar sebagai bakal vaksin malaria generasi kedua masih tetap berasal dari antigen *circumsporozoite protein* yang diperkirakan memiliki efikasi sebesar 80% untuk pencegahan invasi parasit pada stadium pre-eritrositik (Malaria Vaccine Initiative, 2017).

Sporozoit merupakan hasil dari stadium perkembangan seksual *Plasmodium falciparum* pada tubuh vektor. Perjalanan sporozoit dimulai pada *midgut* *Anopheles sp.* dan berakhir di dalam hepatosit mamalia. Sporozoit berkembang dari ookista dalam *midgut* yang kemudian akan dibawa oleh hemolimfe ke seluruh tubuh nyamuk, termasuk pada kelenjar liur nyamuk. Nyamuk yang menggigit *host* akan menyuntikkan sporozoit ke kulit dan menembus pembuluh darah untuk memasuki sirkulasi darah. *Circumsporozoite protein* yang berada pada permukaan sporozoit memiliki peran penting dalam proses invasi ke hepatosit melalui ikatan dengan heparin sulfat (Coppi, *et al.*, 2011).

Uji coba vaksin *circumsporozoite protein* dilakukan dengan radiasi imunisasi menggunakan sporozoit yang dilemahkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlindungan yang didapat akan semakin kuat apabila menggunakan vaksin protein. Protein yang berada pada permukaan sporozoit akan memicu respon imunitas humoral yang mencegah terjadinya infeksi (Swearingen, *et al.*, 2015).

Sampai saat ini data mengenai keragaman genotip *Plasmodium falciparum* di Indonesia masih sangat terbatas, khususnya Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung dengan lokasi endemis malaria yang angka kesakitannya tidak bisa ditekan dengan menggunakan profilaksis. Mengingat potensi gen *circumsporozoite protein* sebagai pengembangan vaksin dan agar terdapat basis data variasi genetik pada *circumsporozoite protein Plasmodium*

falciparum di Provinsi Lampung maka perlu dilakukan suatu penelitian. Penelitian tersebut mengenai identifikasi SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut: “Apakah terdapat SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung?”

1.3. Tujuan

Adapun tujuan yang diharapkan pada penelitian ini adalah mengetahui SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

1.4. Manfaat

Berikut ini manfaat yang dapat diambil pada penelitian ini.

1.4.1. Bagi Keilmuan

Penelitian ini diharapkan dapat menerapkan ilmu kedokteran, khususnya dibidang parasitologi dan biomolekular mengenai gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum*, serta menambah referensi pustaka basis data SNP dan pengembangan vaksin.

1.4.2. Bagi Penulis

Penelitian ini diharapkan dapat melatih keterampilan dalam pelaksanaan penelitian dan dapat menjadi pengalaman yang berguna dalam menerapkan ilmu yang didapat selama perkuliahan.

1.4.3. Bagi Penulis Lain

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan referensi bagi penelitian selanjutnya.

1.4.4. Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat mencegah angka kejadian malaria karena adanya pengembangan sistem pengobatan khususnya pencegahan menggunakan vaksin terhadap infeksi *Plasmodium falciparum*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Malaria

2.1.1. Definisi

Malaria merupakan penyakit infeksi dengan angka kejadian cukup tinggi yang disebabkan oleh adanya *Plasmodium sp.* di dalam darah atau jaringan yang dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskopik yang positif. Malaria berasal dari bahasa Italia (*mala + aria*) yang artinya udara yang jelek/salah. Malaria dapat memberikan gejala berupa demam, menggigil, anemia, dan splenomegali (Harijanto, 2014).

2.1.2. Etiologi

Penyebab infeksi malaria ialah *Plasmodium sp.* Selain dapat menginfeksi manusia, *Plasmodium sp.* juga dapat menginfeksi binatang golongan burung, reptil, dan mamalia. *Plasmodium* pada manusia menginfeksi eritrosit dan mengalami pembiakan aseksual di jaringan hati dan eritrosit. Pembiakan seksual terjadi di tubuh nyamuk anopheles betina. Terdapat lima jenis plasmodium yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium*

knowlesi (Departemen Parasitologi FK UI, 2015; Harijanto, 2014; Leventhal R dan Cheadle RF, 2012; Widoyono, 2011).

2.1.3. Epidemiologi

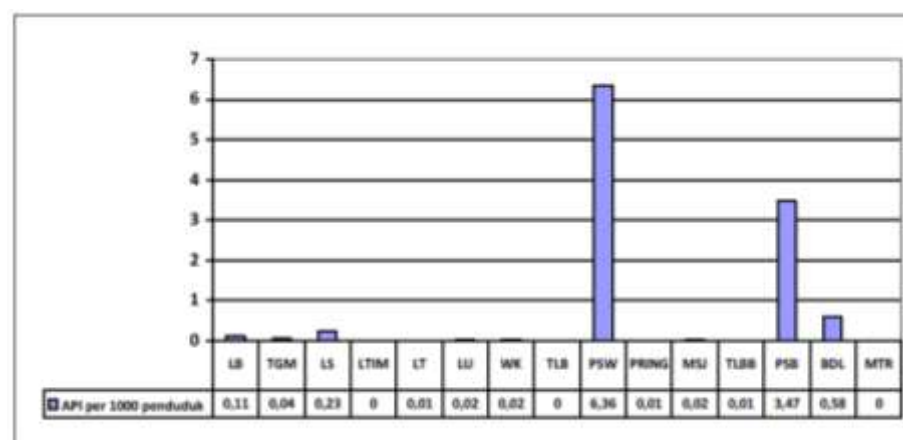
World Health Organization mencatat bahwa pada tahun 2016 terdapat 216 juta kasus baru terkait infeksi malaria. Angka tersebut menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan pada tahun 2015 yang terdapat 211 juta kasus malaria (World Health Organization, 2017).

Lokasi penyebaran dari tiap jenis *Plasmodium* berbeda-beda. *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae* tersebar hampir diseluruh negara. *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* umumnya ditemukan di wilayah Amerika Selatan, Asia Tenggara, India dan Negara Oceania. Di Indonesia sendiri, khususnya Indonesia bagian timur, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, Irian Jaya, dan Nusa Tenggara Timur banyak disinggahi oleh *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* (Harijanto, 2014).

Malaria merupakan salah satu permasalahan kesehatan yang tak kunjung usai di Indonesia. Penyakit malaria masih ditemukan di seluruh provinsi di Indonesia, khususnya wilayah bagian timur. Nilai API tertinggi pada tahun 2015 terdapat di provinsi Papua, Papua Barat, NTT, Maluku, dan Maluku Utara. Provinsi Lampung menduduki

peringkat ke-12 di Indonesia dengan nilai API 0,49 (Kementerian Kesehatan RI, 2016).

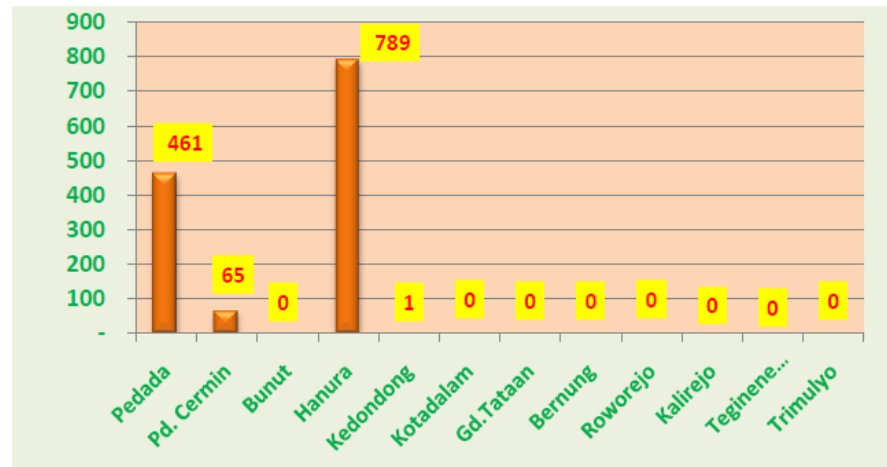
Angka kesakitan malaria tertinggi di Provinsi Lampung pada tahun 2015 terletak di Kabupaten Pesawaran, Kota Bandar Lampung, dan Pesisir Barat seperti yang terlihat pada gambar 1.



Sumber: (Dinas Kesehatan Provinsi Lampung, 2015).

Gambar 1. Distribusi API per-Kabupaten Kota se-Provinsi Lampung Tahun 2015.

Kasus malaria di Kabupaten Pesawaran pada tahun 2014 berjumlah 3.033 kasus dengan tiga kematian yang berada di wilayah kerja Puskesmas Padada (2 orang) dan Puskesmas Hanura (1 orang) (Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran, 2015). Penyebaran kasus malaria berdasarkan wilayah kerja puskesmas yang ada di Kabupaten Pesawaran dapat dilihat pada gambar 2.



Sumber: (Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran, 2015).
 Gambar 2. Penyebaran Kasus Malaria Menurut Wilayah Kerja Puskesmas di Kabupaten Pesawaran Tahun 2014.

2.1.4. Patogenesis

Patogenesis penyakit malaria sangat erat kaitannya dengan siklus hidup *Plasmodium*. Siklus hidup *Plasmodium sp.* dapat dilihat pada gambar 3. Setelah melalui jaringan hati, *Plasmodium falciparum* melepaskan merozoit ke sirkulasi. Merozoit yang dilepaskan akan masuk ke dalam sel RES di limpa dan mengalami fagositosis serta filtrasi. Merozoit yang lolos akan menginvasi eritrosit dan berkembang biak secara aseksual. Bentuk aseksual parasit dalam eritrosit yang berpotensi (EP) inilah yang bertanggung jawab dalam patogenesis terjadinya malaria pada manusia (Harijanto, 2014).

Perlekatan antara EP stadium matur pada permukaan endotel vaskular disebut sitoaderensi. Sitoaderensi menyebabkan EP matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. Parasit dalam eritrosit matur yang tinggal di dalam jaringan mikrovaskuler disebut EP matur yang

mengalami sekuestrasi. Hanya *Plasmodium falciparum* yang mengalami sekuestrasi sedangkan pada plasmodium lainnya seluruh siklus terjadi di pembuluh darah perifer. Sekuestrasi ini diduga memiliki peranan utama dalam patofisiologi malaria berat (Harijanto, 2014).

Eritrosit berpotensi yang matur akan berkelompok dan diselubungi sepuluh atau lebih eritrosit yang tidak mengandung parasit (*Rosetting*). *Rosetting* menyebabkan obstruksi aliran darah lokal/dalam jaringan sehingga mempermudah terjadinya sitoaderensi. Selanjutnya bila EP matur menjadi merozoit akan melepaskan toksin malaria berupa glikosilfosfatidilinositol (GPI) yang merangsang pelepasan TNF- α dan IL-1 dari makrofag (Harijanto, 2014).

2.1.5. Manifestasi Klinis

Plasmodium sp. yang masuk ke tubuh manusia akan menimbulkan berbagai gejala klinis. Gejala klinis biasanya akan timbul setelah masa inkubasi yang berlangsung 9-14 hari. Gejala yang timbul diawali dengan gejala prodromal berupa demam, nyeri kepala, punggung dan ekstremitas, malaise, anoreksia, perasaan dingin, mual, muntah atau diare ringan. Penegakan diagnosis malaria pada stadium ini tergantung dari anamnesis riwayat bepergian ke daerah endemis malaria (Departemen Parasitologi FK UI, 2015).

Demam pada malaria terjadi secara periodik dalam kurun waktu beberapa hari. Demam yang terjadi pada malaria adalah demam episodik yang diselingi oleh periode bebas demam. Gejala klasik “Trias Malaria” yaitu terjadinya episode demam yang terdiri dari fase menggigil, panas, dan berkeringat yang berlangsung 6-8 jam. Hepatosplenomegali dan ikterus juga dapat terjadi pada sepertiga kasus malaria (Harijanto, 2014; Mandal,*et al.*, 2006).

Pada periode dingin penderita mulai menggigil menutupi diri dengan selimut, seluruh badan akan bergetar dan gigi saling terantuk, setelah itu diikuti dengan periode panas. Saat periode panas, penderita akan merasakan nadi yang cepat dan temperatur tubuh yang tetap tinggi dalam beberapa jam. Selanjutnya pada periode berkeringat penderita merasa sehat karena sudah mulai mengeluarkan banyak keringat dan temperatur tubuh mulai menurun (Harijanto, 2014).

2.2. *Plasmodium falciparum*

Parasit malaria merupakan protozoa yang dapat menginfeksi darah target infeksinya. Parasit malaria termasuk dalam genus *Plasmodium* (Soedarto, 2011). Penjelasan secara taksonomi dari *Plasmodium* dijelaskan pada tabel 1.

Tabel 1. Taksonomi *Plasmodium*.

Klasifikasi	Jenis Klasifikasi
<i>Kingdom</i>	<i>Protista</i>
<i>Subkingdom</i>	<i>Protozoa</i>
<i>Phylum</i>	<i>Apicomplexa</i>
<i>Class</i>	<i>Sporozoasida</i>
<i>Ordo</i>	<i>Eucoccidiorida</i>
<i>Family</i>	<i>Plasmodiidae</i>
<i>Genus</i>	<i>Plasmodium</i>

Sumber: (Keas, 1999).

2.2.1. Siklus Hidup *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum dibawa oleh suatu vektor untuk dapat masuk ke dalam tubuh manusia. Vektor pembawa adalah nyamuk *Anopheles* sp. betina. Saat nyamuk *Anopheles* betina menggigit manusia, nyamuk akan melepaskan sporozoit ke pembuluh darah. Dalam waktu 45 menit, sebagian besar sporozoit akan menuju ke hati dan sebagian kecilnya akan mati. Sporozoit didalam hati akan mengalami perkembangan aseksual didalam sel parenkim hati. Di dalam sel parenkim hati yang terinfeksi akan terbentuk skizon hasil perkembangbiakan aseksual *Plasmodium* sp. Skizon berukuran ± 30 mikron setelah empat hari pasca infeksi. Apabila terjadi ruptur, maka skizon tersebut akan mengeluarkan merozoit yang akhirnya menyebar ke pembuluh darah. Merozoit pada skizon yang matang kira-kira berjumlah 40.000 buah (Departemen Parasitologi FK UI, 2015; Harijanto, 2014).

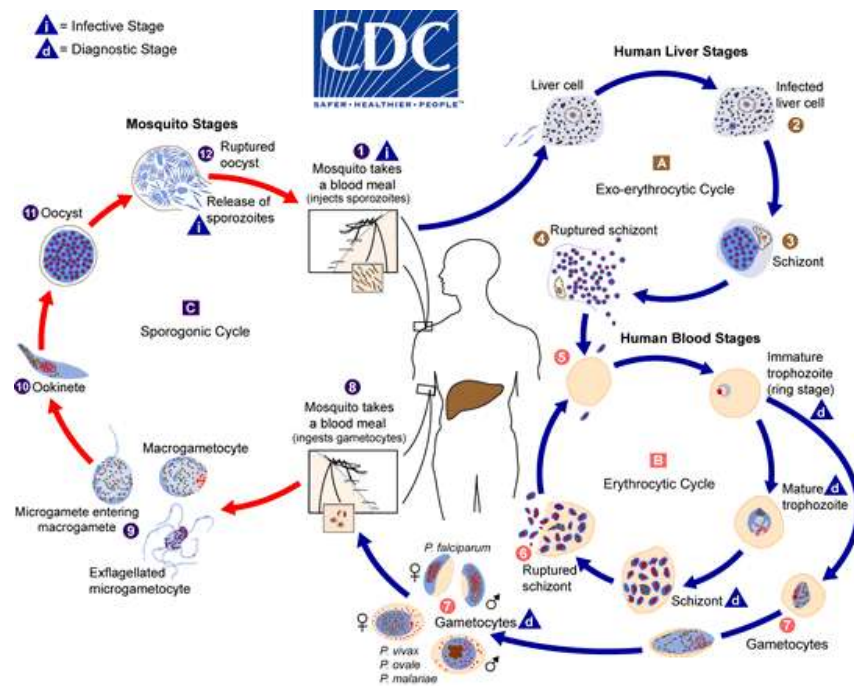
Merozoit yang bebas akan beredar di dalam pembuluh darah dan menginfeksi eritrosit dengan masuk kedalam eritrosit melalui reseptor

permukaan eritrosit. Di dalam eritrosit, merozoit akan berkembang menjadi trophozoit muda berbentuk cincin yang sangat kecil dan halus, kira-kira berukuran seperenam diameter eritrosit. Dalam waktu 24 jam, parasit di dalam kapiler akan berkembangbiak secara skizogoni. Jika eritrosit ruptur maka akan mengeluarkan merozoit kembali. Derajat infeksi pada jenis malaria ini memiliki angka lebih tinggi dibanding spesies lainnya, kadang-kadang dapat melebihi 500.000/ μ L darah (Departemen Parasitologi FK UI, 2015; Harijanto, 2014).

Parasit hasil ruptur dalam darah akan mengalami perkembangbiakan seksual (gametosit). Gametosit muda berbentuk agak lonjong kemudian menjadi lebih panjang atau berbentuk elips yang pada akhirnya mencapai bentuk khas seperti sabit atau pisang sebagai gametosit matang. Parasit dalam bentuk ini dapat kembali terambil jika nyamuk menggigit manusia terinfeksi (Departemen Parasitologi FK UI, 2015; Harijanto, 2014).

Di dalam tubuh nyamuk, parasit akan melanjutkan siklus seksualnya. Pada saat nyamuk *Anopheles sp.* betina menggigit manusia terinfeksi, mikrogametosit dan makrogametosit akan ikut terbawa ke tubuh nyamuk. Pertemuan antara mikrogametosit dan makrogametosit dalam *midgut* nyamuk selanjutnya akan membentuk ookinet yang kemudian berubah menjadi ookista. Apabila ookista ruptur akan mengeluarkan sporozoit yang selanjutnya bermigrasi ke kelenjar liur

nyamuk sehingga siap menginfeksi manusia kembali (CDC, 2017).
Proses perjalanan hidup *Plasmodium sp.* dapat dilihat pada gambar 3.

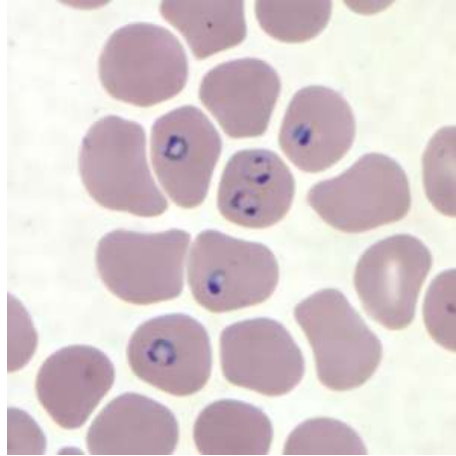


Sumber: (CDC, 2017).

Gambar 3. Daur Hidup *Plasmodium sp.*

2.2.2. Morfologi *Plasmodium falciparum*

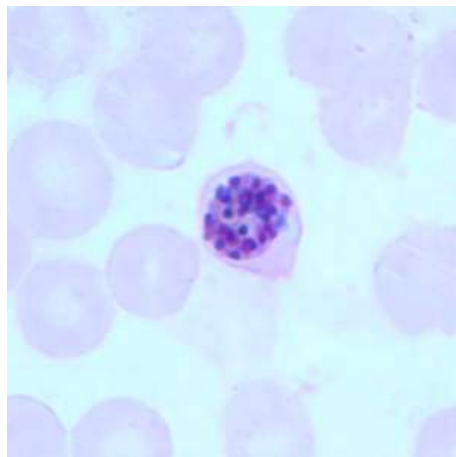
Morfologi *Plasmodium falciparum* terbagi menjadi beberapa bentuk, yaitu trofozoit, skizon, dan gametosit. Trofozoit muda berbentuk cincin halus yang memiliki 1-2 butir kromatin, terlihat bentuk pinggir (marginal), dan bentuk *accolé* yang juga sering ditemukan. Bentuk cincin *Plasmodium falciparum* kemudian akan menjadi lebih besar hingga berukuran seperempat atau bahkan hampir setengah diameter eritrosit dan memiliki bentuk tidak teratur yang disebut trofozoit tua (Departemen Parasitologi FK UI, 2017; Zeibig, 2013). Bentuk trofozoit *Plasmodium falciparum* dapat dilihat pada gambar 4.



(Sumber: CDC, 2017).

Gambar 4. Ring form Trofozoit *Plasmodium falciparum*.

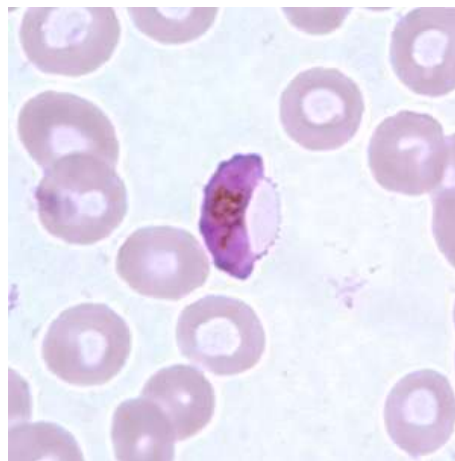
Selanjutnya trofozoit akan berkembang menjadi skizon. Skizon *Plasmodium falciparum* biasanya hanya dapat terdeteksi pada apusan darah tepi apabila telah terjadi infeksi yang berat. Skizon ditandai dengan adanya titik-titik kromatin yang banyak di sekeliling sitoplasma. Skizon matang akan mengisi dua per tiga eritrosit dan membentuk 8-36 buah merozoit (Zeibig, 2013). Bentuk skizon dapat dilihat pada gambar 5.



(Sumber: CDC, 2017).

Gambar 5. Skizon pada *Plasmodium falciparum*.

Jika skizon ruptur akan mengeluarkan merozoit yang selanjutnya mengalami perkembangan seksual membentuk gametosit. Gametosit pada *Plasmodium falciparum* berbentuk seperti bulan sabit dengan ciri khas mikrogametosit (jantan) terlihat agak kemerah-merahan dengan kromatin difus, sedangkan makrogametosit (betina) terlihat kebiru-biruan dengan kromatin padat (Zeibig, 2013). Bentuk gametosit dapat dilihat pada gambar 6.



Sumber: (CDC, 2017).

Gambar 6. Gametosit pada *Plasmodium falciparum*.

2.2.3. Gen *Circumsporozoite Protein Plasmodium falciparum*

Genom *Plasmodium* memiliki empat belas kromosom dengan 23-25 juta pasang basa. Setidaknya terdapat 6000 gen yang terkode di sepanjang genom tersebut. Genom pada *Plasmodium* merupakan *single set chromosome* dengan panjang kromosom bervariasi, mulai dari 500 Kba sampai 3 megabasa. Terdapat variasi dari ekspresi genetik pada *Plasmodium* yang dipengaruhi oleh pola waktu berbeda

pada setiap siklus hidupnya (Bannister dan Sherman, 2009; Igweh, 2012).

Sintesis protein yang terjadi pada *Plasmodium* memiliki sedikit perbedaan dengan makhluk eukariotik lainnya. Asam nukleat *Plasmodium falciparum* kaya akan basa adenosin dan timin. Perbedaan sintesis protein ini dapat menyebabkan gen polimorfik pada protozoa, sehingga dapat menghambat pengenalan sistem imun terhadap protein parasit (Bannister dan Sherman, 2009; Igweh, 2012).

Terdapat dua gen yang dapat dijadikan penanda dalam variasi genetik pada gen *Plasmodium falciparum*, yaitu gen *sporozoite surface protein* dan *merozoite surface protein*. Diantara kedua gen tersebut, terdapat gen yang berperan dalam proses invasi pada fase pre-eritositik dan dapat dijadikan antigen dalam vaksin malaria, yaitu gen *circumsporozoite protein* yang termasuk golongan *sporozoite surface protein* (Gandhi, et al., 2014).

Gen *circumsporozoite protein* berfungsi untuk mempermudah invasi parasit ke sel-sel hepatosit pada *host* (Plessmeyer, et al., 2009). Sebanyak 349 *sporozoite surface protein Plasmodium* dapat diidentifikasi melalui kelenjar liur *Anopheles* betina yang terinfeksi, termasuk gen *circumsporozoite protein*. Berikut ini daftar protein yang teridentifikasi pada kelenjar liur vektor (Tabel 2).

Tabel 2. Daftar *Sporozoite Surface Protein* yang Teridentifikasi pada Kelenjar Liur *Anopheles sp.* Terinfeksi.

Accession Number	Description	Observed (of 6 replicates)	Cellular Function	Labeled ^a	SP/TM/GPI ^b
PF3D7_0304600	Circumsporozoite (CS) protein (CSP)	6	Invasion & Migration	YES	Signal, GPI
PF3D7_0818600	BEM46-like protein, putative (PBLP)	6	Invasion & Migration	YES	TM
PF3D7_0104000	Thrombospondin-related sporozoite protein (TRSP)	6	Invasion & Migration	YES	Signal, TM
PF3D7_1335900	Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)	6	Invasion & Migration	YES	Signal
PF3D7_0919500	Sugar transporter, putative	6	Transporter	YES	12 TMs
PF3D7_1222300	Endoplasmic, putative (GRP94)	6	Chaperone	YES	Signal
PF3D7_0511400	Conserved Plasmodium protein, unknown function	4	Hypothetical	YES	Signal, TM
PF3D7_0812300	Sporozoite surface protein 3, putative (SSP3)	6	Invasion & Migration	NO	Signal, TM
PF3D7_0204700	Hexose transporter (HT)	6	Transporter	NO	12 TMs
PF3D7_1446900	Glutaminyl-peptide cyclotransferase, putative	6	Metabolism	NO	TM
PF3D7_1324900	L-lactate dehydrogenase (LDH)	6	Metabolism	NO	TM
PF3D7_1133400	Apical membrane antigen 1 (AMA-1)	6	Invasion & Migration	NO	Signal, TM
PF3D7_0408600	Sporozoite invasion-associated protein 1 (SIAP-1)	5	Invasion & Migration	NO	Signal
PF3D7_0508000	6-Cys protein (P38)	5	Invasion & Migration	NO	Signal, GPI
PF3D7_0620000	Conserved Plasmodium protein, unknown function	4	Hypothetical	NO	Signal, GPI
PF3D7_0918000	Glideosome-associated protein 50 (GAP50)	4	Motility	NO	Signal, GPI
PF3D7_0917900	Heat shock protein 70 (HSP70-2)	4	Chaperone	NO	Signal
PF3D7_1406800	Glideosome associated protein with multiple membrane spans-3 (GAPM3)	4	Motility	NO	6 TMs

PF3D7_1028900	Inner membrane complex protein 1m, putative (IMC1m)	3	Cytoskeleton	NO	TM
PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase (M1AAP)	3	Protease	NO	TM
PF3D7_0828800	GPI-anchored micronemal antigen (GAMA)	3	Invasion & Migration	NO	Signal, GPI
PF3D7_0827900	Protein disulfide isomerase (PDI8)	3	Chaperone	NO	Signal
PF3D7_1430700	NADP-specific glutamate dehydrogenase (GDH2)	3	Metabolism	NO	Signal
PF3D7_1411100.1/2	Conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	3	Hypothetical	NO	8 TMs
PF3D7_0506900	Rhomboid protease (ROM4)	3	Protease	NO	6 TMs
PF3D7_0423500	Glideosome associated protein with multiple membrane spans 2 (GAPM2)	3	Motility	NO	6 TMs
PF3D7_1323700	Glideosome associated protein with multiple membrane spans 1(GAPM1)	3	Motility	NO	6 TMs
PF3D7_1237700	Conserved protein, unknown function	3	Hypothetical	NO	5 TMs
PF3D7_1238000	COPI associated protein, putative	3	Vesicular Trafficking	NO	4 TMs
PF3D7_1011500	Conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	3	Hypothetical	NO	4 TMs
PF3D7_1409400	Conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	3	Hypothetical	NO	4 TMs
PF3D7_0316700	HVA22/TB2/DP1 family protein, putative	3	Hypothetical	NO	3 TMs
PF3D7_1037300	ADP/ ATP transporter on adenylate translocase (ADT)	3	Transporter	NO	3 TMs
PF3D7_0408700	Sporozoite micronemal protein essential for cell traversal (PLP1)	3	Invasion & Migration	NO	2 TMs
PF3D7_0515700	Glideosome associated protein40	3	Motility	NO	10 TMs

PF3D7_1326000	Conserved Plasmodium protein, unknown function	2	Hypothetical	NO	TM
PF3D7_1252100	Rhoptry neck protein 3 (RON 3)	2	Invasion & Migration	NO	Signal, 3 TMs
PF3D7_1457000	Signal peptide peptidase (SPP)	2	Signalling	NO	8 TMs
PF3D7_0508200	Longevity-assurance (LAG1) protein, putative	2	Stress response	NO	7 TMs
PF3D7_1132800	Aquaglyceroporin (AQP)	2	Transporter	NO	6 TMs, Signal
PF3D7_0316600	Formate-nitrite transporter (FNT)	2	Transporter	NO	6 TMs
PF3D7_1146300	Conserved Plasmodium protein, unknown function	2	Hypothetical	NO	2 TMs

Sumber: (Swearingen, *et al.*, 2016).

Anopheles sp. terinfeksi akan melepaskan sporozoit ke kulit mamalia pada saat menggigit untuk menyari makan. Kemudian sporozoit akan bergerak aktif menuju dermis dan menembus pembuluh darah. Sporozoit yang beredar di pembuluh darah kemudian akan masuk ke sel-sel hati dengan melintasi *barrier* sinusoid. *Circumsporozoite protein* membentuk lapisan padat pada permukaan protein yang menyerang sel hepatosit sebagai interaksi awal. Terminal C pada *circumsporozoite protein* dapat secara spesifik berikatan dengan sel hepatosit. Parasit yang berhasil masuk ke dalam sel hepatosit akan membentuk fase eksoeritrositik, yang apabila pecah akan melepaskan merozoit ke pembuluh darah (Coppi, *et al.*, 2011).

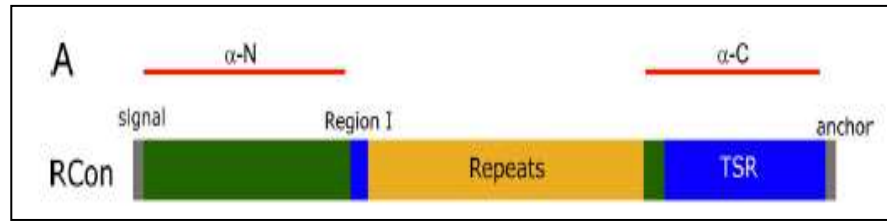
Secara genetik, lokasi gen *circumsporozoite protein* terletak pada kromosom ketiga dari empat belas kromosom yang dimiliki oleh *Plasmodium*. Lokasi tersebut dijelaskan pada gambar 7 (NCBI, 2017).



Sumber: (NCBI, 2017).

Gambar 7. Letak Gen *Circumsporozoite Protein* pada Kromosom di *Plasmodium falciparum*.

Circumsporozoite protein memiliki panjang basa 1335 bp yang terdiri dari tiga komponen, yaitu terminal N yang berikatan dengan membran proteoglikan heparin sulfat, empat regio pengulangan asam amino, dan terminal C yang mengandung *trhombospondin-like type I repeat* (TSR). Komponen *circumsporozoite protein* dapat dilihat pada gambar 8. Regio pengulangan membentuk struktur seperti batang dengan panjang 21-25 nm dan lebar 1,5 nm. *Circumsporozoite protein* meyerupai *glycosylphosphatidylinositol*, protein batang fleksibel yang menempel pada permukaan sporozoit (Plessmeyer, *et al.*, 2009).



Sumber: (Coppi, *et al.*,2011).

Gambar 8. Morfologi *Circumsporozoite Protein*.

Sampai saat ini, sebagian vaksin malaria yang dikembangkan ada pada stadium pre-eritrositik yang berfokus pada *circumsporozoite protein*. Perkembangan vaksin *circumsporozoite protein* difokuskan pada pusat regio pengulangan asam amino yang mengandung imunodominan epitop sel B. Namun konstruksi vaksin mengalami perkembangan yang cepat hingga menggabungkan regio pengulangan asam amino dengan terminal C yang mengandung TSR, epitop sel B, dan epitop sel T. Epitop-epitop tersebut tidak hanya bersifat imunogenik, melainkan dapat membentuk antibodi yang menghambat invasi sporozoit (Plessmeyer, *et al.*,2009).

Circumsporozoite protein memiliki *protein sequence* sebagai berikut:

MMRKLAILS VSSFLFVEALFQEYQCYGSSNTRVLNELNYDNA
 GTNLYNELEMNYYGKQENWYSLKKNSRSLGENDDGNNNG
 DNGREGKDEDKRDGNNEKLRKPKHKKLKQPGDGNPDPN
 ANPNVDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNANPNA
 NPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN
 PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANP
 NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN

ANPNANPNANPNKNNQGNGQGHNMPNDPNRNVDENANANN
 AVKNNNNEEPSDKHIEQYLKKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQV
 RIKPGSANKPKDEL DYENDIEKKICKMEKCSSVFNVVNSSIGLI
 MVLSFLFLN (VIOLA, 2017). Asam amino yang terkode dalam
 protein tersebut dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Kode Asam Amino Esensial.

Asam Amino	Kode Tiga Huruf	Kode Satu Huruf
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asam aspartat	Asp	D
Sistein	Cys	C
Asam Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleusin	Ile	I
Leusin	Leu	L
Lisin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Sumber: (DDBJ, 2018).

Pengulangan NANP yang ada pada regio pengulangan *circumsporozoite protein* merupakan target antibodi protektif. Epitop T1 pada daerah pengulangan minor terdiri dari pengulangan NANPNVDP, yang pada awalnya diidentifikasi oleh sel CD4+ manusia yang di imunisasi radiasi dengan sporozoit *Plasmodium falciparum*. Beberapa epitop sel CD4+ dan CD8+ yang telah diidentifikasi di daerah terminal C dikenali oleh molekul HLA kelas II.

CD4+ tersebut disebut juga sebagai epitop T atau T2. Epitop T dapat diidentifikasi pada asam amino 326-345 menggunakan klon sel T CD4+ yang berasal dari orang yang telah diimunisasi radiasi dan mendapatkan gigitan vektor yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* (Tucker, *et al.*, 2016).

2.3. Vaksin Malaria

Malaria Vaccine Initiative (MVI) telah mengembangkan vaksin malaria generasi pertama yang disebut RTS,S/AS01 yang resmi diluncurkan pada tahun 2015. Vaksin ini memiliki efikasi sebesar 50% terhadap perlindungan penyakit malaria dan dapat bertahan selama lebih dari satu tahun. Nama RTS,S menunjukkan komposisi dari vaksin itu sendiri. R berarti *repeat region* dari *circumsporozoite protein*, T menunjukkan *T-cell epitopes* pada *circumprorozoite protein* dan S berarti *surface antigen* dari hepatitis B (HbsAg). RTS,S/AS01 merupakan partikel mirip virus yang terdiri dari fragmen (regio pengulangan pusat, fragmen terminal C, dan asam amino 207-395) *circumsporozoite protein* yang berfusi dengan antigen permukaan virus hepatitis B (Malaria Vaccine Initiative, 2017; Tucker,*et al.*, 2016).

Menariknya, orang yang diimunisasi menggunakan vaksin RTS,S/AS01 akan membentuk antibodi yang berfokus pada regio pengulangan sehingga terbentuk regio imunodominan protein. Namun pada orang dewasa yang tinggal di daerah endemik dan secara natural mendapat gigitan vektor terinfeksi dapat kebal dari penyakit malaria karena telah memiliki tingkat

antibodi yang tinggi terhadap terminal C dan regio non-berulang lainnya. Individu yang tidak diimunisasi dengan vaksin RTS,S/AS01 mendapat perlindungan yang bergantung dari sel CD4+ dan CD8+ terhadap terminal C *Plasmodium falciparum*. Secara keseluruhan, efikasi protektif dari vaksin RTS,S/AS01 dapat memberikan perlindungan parsial pada manusia sebesar 30-50%, maka dari itu jelas terdapat ruang untuk perbaikan vaksin RTS,S/AS01 (Tucker, *et al.*, 2016).

World Health Organization telah menerbitkan proposal permohonan untuk melakukan uji coba vaksin ini sebagai sarana evaluasi yang kuat terhadap vaksin malaria RTS,S/AS01. Kementerian Kesehatan Ghana, Kenya, dan Malawi bekerjasama menerapkan vaksin tersebut untuk pengaturan transmisi malaria moderat hingga tinggi pada tahun 2018 (World Health Organization, 2017).

Selain memperjuangkan lisensi vaksin malaria generasi pertama, MVI juga memikirkan pengembangan vaksin jangka panjang untuk eradikasi malaria. Dengan adanya pemikiran tersebut, MVI mencanangkan dua program dengan target pengembangan vaksin generasi kedua pada tahun 2020. Dua prioritas utama MVI adalah *Anti-Infection Vaccine* (AIV) yang bertujuan untuk mencegah infeksi pada orang yang terkena gigitan nyamuk terinfeksi dan *Transmission-Blocking Vaccine* (TBV) yang bertujuan untuk mencegah nyamuk terinfeksi parasit malaria setelah menggigit orang yang terinfeksi (Malaria Vaccine Initiative, 2017).

Pencegahan infeksi pada manusia difokuskan pada pengembangan antigen sporozoit stadium pre-eritrositik. Kandidat utama antigen sebagai vaksin generasi kedua ialah *circumsporozoite protein* yang diperkirakan akan memiliki efikasi sebesar 80%. Pendekatan AIV didukung oleh konsep bahwa mencegah infeksi malaria pada *host* manusia melalui imunisasi akan memberi manfaat klinis langsung kepada orang yang diimunisasi (Malaria Vaccine Initiative, 2017).

2.4. Metode Biologi Molekuler

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini tidak lepas dari analisis tingkat molekuler yang melibatkan asam nukleat (DNA). Analisis tingkat molekuler dengan DNA diawali dengan proses ekstraksi DNA untuk mendapatkan DNA yang murni dengan konsentrasi yang tinggi sehingga dapat digunakan pada tahapan analisis molekuler selanjutnya, seperti PCR, elektroforesis, RLFP, dan RAPD. Perkembangan ilmu pada tingkatan molekuler ini sedang berkembang pesat, sehingga diharapkan dapat meningkatkan kinerja dalam bidang kesehatan dan bidang ilmu lainnya (Fatchiyah, *et al.*, 2015).

2.4.1. Isolasi DNA

Identifikasi molekuler memerlukan tahapan pertama yaitu isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Proses ini dapat dilakukan

secara konvensional atau dengan *kit*. Secara konvensional, prinsip utama isolasi DNA ada tiga, yaitu tahapan lisis menggunakan CTAB/NaCl atau metode SDS, tahapan ekstraksi metode fenol kloroform, dan tahapan pemisahan. Seiring berkembangnya zaman, ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *kit* dengan berbagai merek, salah satu *kit* yang sering digunakan adalah *Geneaid DNA Extraction Kit* (Murtiyaningsih, 2017; Yusuf, 2010).

Tahapan lisis merupakan tahap penghancuran sel untuk mengeluarkan isi sel. Metode yang digunakan pada tahap ini dapat berupa metode fisik atau kimia. Secara fisik sel dipecah dengan kekuatan mekanik, yaitu secara *freeze thaw*, *bead mill homogenization*, dan resonansi misalnya dengan sonikasi. Sedangkan secara kimia sel dirusak dengan menggunakan *buffer* lisis berisi senyawa kimia yang dapat merusak integritas *barrier* dinding sel, contohnya *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) dan *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (Murtiyaningsih, 2017).

Setelah tahapan lisis berlangsung, tahap selanjutnya ialah tahap ekstraksi. Pada tahap ekstraksi DNA digunakan *chelating agent* seperti *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) yang berperan menginaktivasi enzim DNase untuk mencegah terjadinya denaturasi DNA yang diisolasi. DNA yang telah diekstraksi dari dalam sel selanjutnya perlu dipisahkan dari kontaminan komponen penyusun sel

lainnya. Fenol kloroform seringkali digunakan untuk mendenaturasi protein agar protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan melalui sentrifugasi. Hasil sentrifugasi akan terbentuk dua fase yang terpisah, yakni fase organik pada lapisan bawah dan fase *aqueous* pada lapisan atas. DNA berada pada fase *aqueous* sesuai dengan sifat asam nukleat yaitu hidrofilik (Murtiyaningsih, 2017).

Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dipekatkan melalui presipitasi (pemisahan). Pada umumnya digunakan etanol atau isopropanol pada tahapan presipitasi. Kedua senyawa tersebut akan memisahkan DNA sehingga DNA menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk *pellet* setelah dilakukan sentrifugasi. Presipitasi juga bertujuan untuk menghilangkan residu-residu yang berasal dari tahapan ekstraksi. Setelah dilakukan proses presipitasi, tahap selanjutnya adalah mengeringkan *pellet* DNA untuk menghilangkan residu etanol. Kemudian setelah *pellet* DNA kering ditambahkan *buffer* TE ke dalam tabung yang berisi *pellet* dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu sekitar -20°C (Murtiyaningsih, 2017).

2.4.2. *Polymerase Chain Reaction*

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi atau menggandakan DNA secara *in vitro* menggunakan sistem enzimatik dan suhu. Selektifitas

dalam reaksi PCR ditentukan oleh pemilihan primer yang tepat. Primer merupakan potongan DNA dalam bentuk untai tunggal dimana sekuens yang dimilikinya komplemen dengan sekuens DNA *template* yang bersebelahan dengan DNA target. Primer umumnya mempunyai panjang 9 sampai 25 basa (Maftuchah, *et al.*, 2014). Primer yang digunakan untuk mengidentifikasi *circumsporozoite protein* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Oligonukleotida *Primer Circumsporozoite Protein*.

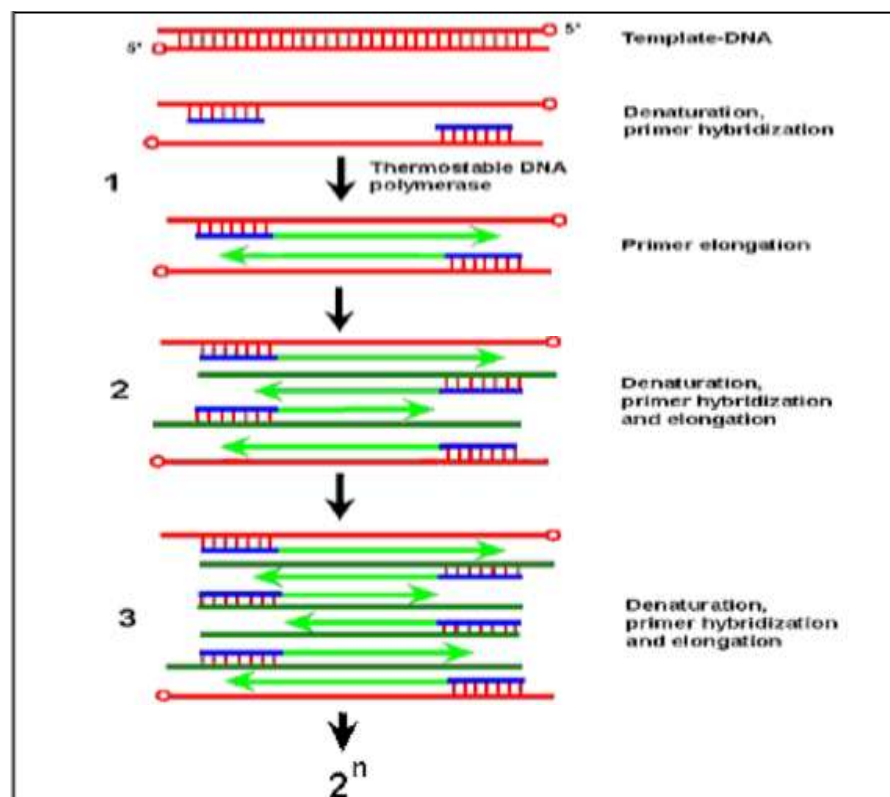
Reaksi	Sekuensi Basa
<i>Forward</i>	5'-GTTGAGGCCTTTTCCAGGAATACCAG-3'
<i>Reverse</i>	5'-GTACAACTCAAACCTAAGATGTGTTC-3'

Sumber: (Gandhi, *et al.*, 2014).

Pada PCR terdapat tiga suhu atau tahapan inkubasi yang diulang sebanyak 20-50 kali. Tahap pertama disebut denaturasi, dimana kedua untai molekul DNA target akan terpisah oleh pemanasan DNA dengan suhu 94°C untuk memutus ikatan hidrogen di antara basa-basa. Tahap kedua disebut penempelan (*annealing*) dimana dua primer akan menempel pada sekuens komplementer rantai tunggal DNA. Primer tersebut akan membentuk ikatan hidrogen dengan sekuens komplementernya sehingga terbentuk molekul untai ganda yang stabil. Suhu *annealing* berkisar 37-60°C. Pada tahap ketiga, ekstensi atau elongasi, primer akan diperpanjang oleh DNA polimerase pada suhu 72°C. Ketiga tahapan tersebut disebut satu siklus dan dalam metode PCR dibutuhkan 15-30 siklus, sehingga proses tersebut dapat diulangi

kembali hingga mencapai jumlah siklus yang dibutuhkan. Gambaran tahapan PCR dapat dilihat pada gambar 9 (Maftuchah, *et al.*, 2014).

Pada ketiga tahapan tersebut, tidak hanya DNA *template* yang digunakan, melainkan membutuhkan dua oligonukleotida *primer* 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 *buffer* PCR yang mengandung Tris-HCl, KCl, dan MgCl₂ (Maftuchah,*et al.*, 2014; Yusuf, 2010).



Sumber: (Maftuchah, *et al.*, 2014).
Gambar 9. Tahap-Tahap PCR.

2.4.3. Elektroforesis

Metode analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi hasil PCR yang berupa fragmen DNA target penelitian, yaitu elektroforesis. Elektroforesis merupakan cara analisis dengan melihat pergerakan molekul-molekul protein yang bermuatan di dalam medan listrik. Pada metode ini besar molekul DNA yang dapat teridentifikasi antara 500-300.000 bp (The biotechnology education company, 2015).

Metode elektroforesis menggunakan aliran listrik sebagai penghantar molekul DNA. Prinsip dasar metode ini adalah perpindahan molekul DNA sesuai dengan ukuran molekul. Molekul DNA mengandung muatan negatif dalam gugus fosfatnya sehingga pergerakan molekul akan berjalan ke arah kutub positif dalam medan listrik. Semakin berat ukuran molekul maka semakin lama laju perpindahan molekulnya dan sebaliknya (Campbell, *et al.*, 2010).

Teknik elektroforesis menggunakan gel dari polimer, misalnya polisakarida. Gel bekerja sebagai penapis molekular untuk memisahkan asam nukleat atau protein berdasarkan bentuk, ukuran, muatan listrik, sifat kimia, dan sifat fisik molekul. Dengan demikian, elektroforesis gel memisahkan campuran molekul DNA menjadi pita-pita, yang masing-masing terdiri atas molekul DNA yang panjangnya sama (Campbell, *et al.*, 2010).

Elektroforesis dapat dilakukan dalam beberapa media, seperti media cair ataupun media padat. Penelitian ini menggunakan media padat dalam bentuk agar. Agar yang digunakan dalam elektroforesis terdapat dua jenis, yaitu agarose (muatan netral) dan agaropektin (muatan negatif). Penggunaan agaropektin sebagai media pada larutan penyangga basa dapat menyebabkan gerakan elektroendosmotik dan terkadang dapat menyerap protein, sehingga pada penelitian ini digunakan agarose (Rianta, 2001; The biotechnology education company, 2015).

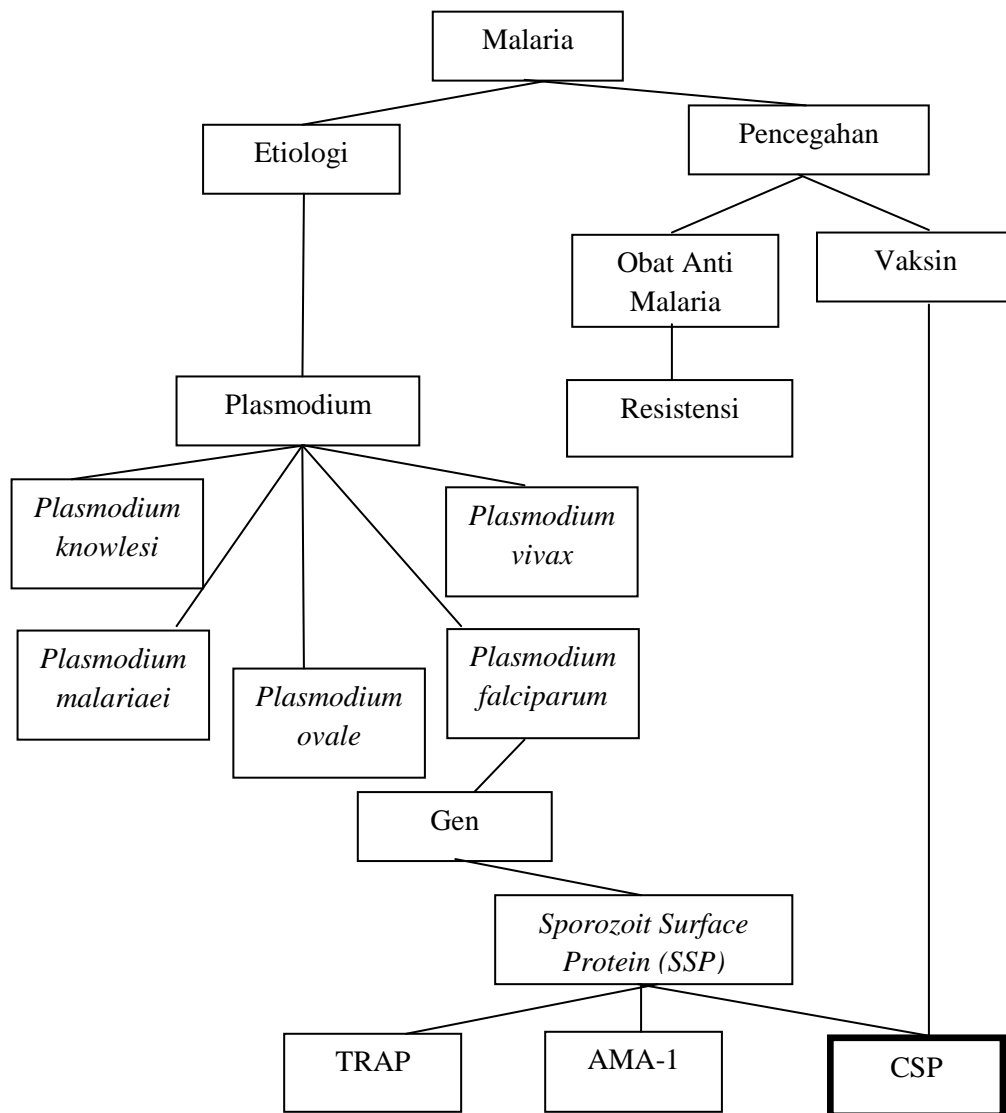
Gel agarose dibuat menggunakan bubuk agarose yang dilarutkan dalam larutan *buffer*. Campuran tersebut kemudian didinginkan sampai suhu kira-kira 55 °C. Setelah mencapai suhu yang diinginkan, lalu cairan tersebut dituangkan ke dalam *casting tray* yang berfungsi sebagai cetakan. Pada bagian ujung cetakan diletakkan *comb* (berbentuk seperti sisir) untuk membuat sumur tempat meletakkan hasil PCR (Lucchi, *et al.*, 2012; Rianta, 2001; The biotechnology education company, 2015).

Agarose yang mengeras diletakkan pada bilik elektroforesis yang terisi larutan *buffer*, kemudian diletakkan hasil amplifikasi PCR pada setiap sumur dalam agarose. Setelah itu, dialirkan listrik ke dalam bilik selama waktu yang telah ditentukan. Hasil yang akan didapatkan adalah molekul DNA yang berjalan menuju kutub positif dan berhenti

pada suatu tempat yang sesuai dengan ukuran molekulnya (The biotechnology education company, 2015).

2.5. Kerangka Teori

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium sp.* Terdapat lima jenis *plasmodium* salah satunya yaitu *Plasmodium falciparum* yang mengandung *circumsporozoite protein* sebagai salah satu petanda genetik yang tergolong dalam *sporozoite surface protein*. *Circumsporozoite protein* adalah suatu gen yang berperan dalam invasi sel hepatosit manusia. Banyak penelitian yang mengungkapkan potensi *circumsporozoite protein* sebagai antigen vaksin malaria yang bekerja pada stadium pre-eritrositik. Dengan adanya vaksin malaria dapat menjadi suatu perubahan baru untuk pencegahan malaria mengingat kejadian resistensi obat malaria yang tinggi. Kerangka teori pada penelitian ini dijelaskan pada gambar 10.



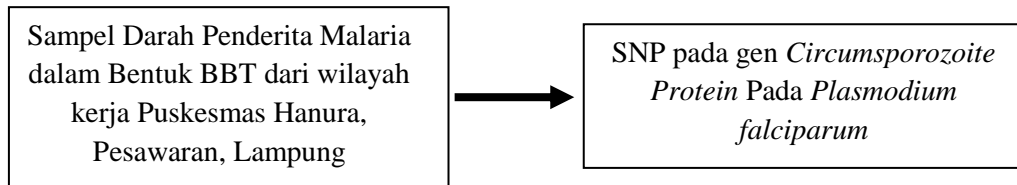
Sumber: (Harijanto, 2014; Swearingen, *et al.*, 2016).
 Gambar 10. Kerangka Teori Penelitian.

Keterangan:

: Subjek yang diteliti

2.6. Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dijelaskan pada gambar 11.



Sumber: (Swearingen, *et al.*, 2016).
Gambar 11. Kerangka Konsep Penelitian.

2.7. 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 ialah terdapat SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ialah penelitian kuantitatif dengan metode survey deskriptif. Penelitian akan dilakukan dengan mengidentifikasi SNP pada gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum* dari sampel darah penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Desember 2018 sampai Maret 2019.

3.3. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah penderita malaria yang ada di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bahan biologi tersimpan (BBT) dari sampel darah penderita positif malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura yang telah diambil pada tahun 2016.

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam suatu penelitian dibagi menjadi dua, yaitu populasi target dan populasi terjangkau. Populasi target dalam penelitian ini adalah penderita malaria pada wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung. Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah bahan biologi tersimpan (BBT) dari darah penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura. Terdapat kriteria inklusi dan eksklusi untuk penentuan sampel yang akan dipilih dalam penelitian guna meminimalisir bias.

3.3.1.1. Kriteria Inklusi

Volume sampel mencukupi dalam penelitian.

3.3.1.2. Kriteria Eksklusi

Sampel BBT yang rusak.

3.3.2. Jumlah Sampel dan Teknik *Sampling*

Sampel dari penelitian ini adalah BBT dari penderita malaria pada wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung. Jumlah sampel darah yang telah terambil pada tahun 2016 yaitu 53 BBT. Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *consecutive sampling*, yaitu pengambilan sampel dilakukan secara berurutan dan sampel yang memenuhi kriteria akan dimasukkan dalam sampel penelitian. Setelah dilakukan pengecekan kualitas sampel

menggunakan nanofotometer, hanya 16 sampel yang terqualifikasi untuk dilanjutkan pada prosedur PCR dikarenakan sampel tersebut memiliki kualitas DNA yang baik.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode *survey* deskriptif. Digunakan pendekatan *survey* morbiditas untuk mengidentifikasi SNP pada gen *circumsporozoite protein* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung. Hasil penelitian menunjukkan ada tidaknya SNP pada gen *circumsporozoite protein*. Hasil tersebut dapat dimanfaatkan untuk memberikan gambaran dalam memperbaiki cara pencegahan pada malaria di daerah endemis, seperti wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung (Notoadmodjo, 2012).

3.5. Identifikasi Variabel

Penelitian ini memiliki satu variabel, yaitu gen *circumsporozoite protein Plasmodium falciparum*.

3.6. Definisi Operasional Variabel

Gen *circumsporozoite protein* tergolong dalam *sporozoit surface protein* yang ada pada *plasmodium* stadium sporozoit. Gen ini berfungsi pada siklus pre-eritrositik yang berperan dalam proses invasi ke hepatosit melalui ikatan heparin sulfat. *Circumsporozoite protein* berada di kromosom 3 *Plasmodium falciparum*. Komponen vaksin yang dibuat dari antigen

circumsporozoite protein berasal dari regio pengulangan NANP yang merupakan target antibodi. *Circumsporozoite protein* memiliki panjang basa 1335 bp.

3.7. Instrumen Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu isolasi DNA, amplifikasi gen *circumsporozoite protein* dengan PCR, dan pembacaan hasil PCR melalui elektroforesis. Alat dan bahan yang digunakan dibedakan sesuai dengan tahapan yang akan dilakukan. Berikut adalah alat dan bahan yang digunakan dalam tahap-tahap penelitian.

3.7.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan prosedur yang bertujuan untuk memisahkan materi genetik suatu makhluk hidup dari materi yang ada disekitarnya. Proses ini berfungsi melisiskan materi yang melindungi DNA sehingga DNA tersebut terpisah sempurna dan pada akhirnya dapat diidentifikasi. Isolasi DNA dapat dilakukan dalam dua cara, yaitu bahan-bahan yang digunakan didapatkan secara terpisah, atau bahan yang diperlukan sudah dikemas dalam satu kemasan, atau disebut dengan kit. Seluruh prosedur serta bahan yang digunakan dalam isolasi DNA telah tertera dalam kit tersebut.

Terdapat berbagai jenis kit dengan berbagai merk dagang yang tersebar di pasaran. Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan

GeneAid Extraction Kit. Bahan-bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA terdiri dari proteinase K; RBC lysis buffer; GT buffer; GB buffer, W1 buffer, wash buffer, elution buffer, etanol (96-100%), sampel darah, dan air murni (DDH₂O atau aquabidest). Penggunaan setiap bahan, baik pengenceran dan cara penggunaan, sudah termasuk di dalam *GeneAid Extraction Kit*.

Adapun alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah *pulse-vortexing*; *spindown*; *GeneAid spin column*; *collection tube 2 ml*; *centrifuge*; *microcentrifuge tube*; mikropipet 100-1000µl; mikropipet 10-100 µl; *blue tips*; *yellow tips*; *stopwatch*; dan *waterbath 60°C*.

3.7.2. Amplifikasi Gen *Circumsporozoite Protein* dengan PCR

Hasil isolasi DNA dari sampel akan dilanjutkan dengan tahapan amplifikasi, yaitu proses yang bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA target yang sudah diisolasi. Proses amplifikasi pada penelitian ini menggunakan teknik PCR. Kit PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah *MyFi DNA Polymerase* dari Bioline.

Selama amplifikasi dibutuhkan bahan serta lingkungan yang tepat agar penggandaan fragmen DNA target dapat terjadi. Bahan-bahan yang akan dipakai dalam amplifikasi sudah terkemas menjadi satu dan disertai dengan perkiraan suhu yang dapat dipakai dalam menjalankan

setiap tahapan pada proses amplifikasi. Adapun bahan yang ada pada kit tersebut adalah sebagai berikut:

1. MyFi DNA Polymerase
2. 5X MyFi reaction buffer.

Selain kit PCR, dalam amplifikasi juga dibutuhkan *Aqua for Inspection* (DDH₂O), primer DNA target (primer forward dan reverse), dan DNA tamplate (Bioline, 2017).

Adapun alat yang dibutuhkan dalam proses amplifikasi adalah sebagai berikut; mesin PCR (Merck); mikropipet 0,5-10 µl; mikropipet 10-100 µl; *small tips*; *yellow tips*; *microcentrifuge tube*; nampan; rak dingin; *ice box*; lemari pendingin; *vortex*; dan *spindown*.

3.7.3. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara untuk membaca atau menginterpretasikan hasil PCR. Bahan yang diperlukan untuk melakukan elektroforesis adalah gel agarose 0,8% (agarose 0,8 gr dengan TBE 0.5× 100 ml); loading dye; *buffer* TBE 1×; gel red; dan *aquabidest*.

Adapun alat yang digunakan dalam elektroforesis adalah satu set alat elektroforesis; solatip; parafilm; tabung erlenmayer; pemanas; stabilizer; mikropipet 0,5-10 µl; dan *small tips*.

3.8. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur yang tepat dalam penelitian ini adalah.

3.8.1. Isolasi DNA

- a. Memasukan 300µl sampel ke *microcentrifuge tube*.
- b. Menambahkan 900µl *lysis buffer* ke dalam sampel.
- c. Menginkubasi selama 10 menit pada temperatur ruangan.
- d. Melakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 7700 *rps*.
- e. Membuang supernatan.
- f. Menambahkan 100µl *lysis buffer* ke *microcentrifuge tube*.
- g. Menambahkan 200µl *GB buffer* ke *microcentrifuge tube*.
- h. Menambahkan 30µl Proteinase K ke dalam *microcentrifuge tube*.
- i. Menginkubasi selama 10 menit dengan suhu 60°C dalam *waterbath*.
- j. Menambahkan 200µl etanol absolut ke dalam sampel, kemudian campuran dipindahkan ke *GD column* dan dipasang *collection tube*.
- k. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 x g selama 5 menit. Kemudian hasil filter yang terdapat pada *collection tube* dibuang dan mengganti *collection tube*.
- l. Menambahkan 400µl *W1 buffer* ke dalam *GD column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan sentrifugasi

dengan kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Membuang hasil filter yang terdapat pada *collection tube*.

- m. Menambahkan 600µl *wash buffer* ke dalam *GD column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 x g selama 1 menit.
- n. Meletakkan *GD column* ke dalam *microcentrifuge tube* dan menyingkirkan *collection tube* yang terdapat hasil filter.
- o. Menambahkan 50µl *elution buffer* ke dalam *GD column* tanpa membasahi pinggiran tabung.
- p. Menginkubasi pada suhu ruangan selama 3 menit
- q. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000 x g selama 1 menit.
- r. Membuang *GD column* dan menutup 1,5 ml *microcentrifuge tube*, hasil ekstraksi dapat disimpan pada lemari pendingin.

3.8.2. Amplifikasi Gen *Circumsporozoite Protein* dengan PCR

Proses amplifikasi dengan menggunakan kit adalah sebagai berikut.

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 (total nomor reaksi + 1). Volume setiap bahan yang dibutuhkan yaitu:

5X MyFi Reaction Buffer : 5 µL

20 µM Forward Primer : 0,5 µL

- | | |
|---------------------------|---------------|
| 20 μ M Reverse Primer | : 0,5 μ L |
| DNA Tamplate | : 1 μ L |
| MyFi DNA Polymerase | : 1 μ L |
| Aquabidest | : 17 μ L |
3. Mencampurkan setiap bahan dengan volume sesuai dengan perhitungan total reaksi ke dalam *microcentrifuge tube*, kecuali DNA tamplate. Selama pengerjaan, seluruh bahan diletakkan pada nampan dan rak dingin untuk menjaga suhu.
 4. Melakukan aliquot campuran reaksi tersebut sebanyak 24 μ L pada setiap 0,5 ml *microcentrifuge tube*.
 5. Menambahkan DNA tamplate sebanyak 1 μ L pada setiap *tube*.
 6. Menempatkan *tube* kedalam *cycler* dan menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

Pada tahap ini, terjadi tiga proses utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension* sebanyak 35 siklus dari materi genetik sampel. Setiap tahapan pada PCR ini membutuhkan suhu tertentu yang berbeda-beda. Suhu serta waktu yang dibutuhkan pada setiap tahapan amplifikasi dijelaskan pada tabel 5.

Tabel 5. Suhu Amplifikasi PCR

No	Siklus	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu
1	Pre-denaturasi	95	5 menit
2	Denaturasi	95	30 detik
3	Annealing	52	30 detik
4	Extension	72	60 detik
5	Final Extension	72	10 menit

Sumber: (Gandhi, *et al.*, 2014)

Setelah selesai seluruh tahapan, setiap *tube* dari *cycler* disimpan pada lemari pendingin (Moll,*et al.*, 2008).

3.8.3. Elektroforesis

a. Pembuatan Gel Agarose

Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 0,8%. Pembuatan gel dimulai dengan mencampurkan 0,8 gram gel agarose dengan 100 ml TBE 0.5× kemudian campuran dididihkan dalam pemanas selama 25 menit pada $\pm 80^{\circ}\text{C}$. Campuran dibiarkan hingga suhunya turun sampai 55°C , serta menambahkan *gel red* pada agarose. Selagi menunggu turunnya suhu agarose, dipersiapkan bilik elektroforesis dengan memasang pembatas pada setiap sisi baki sebagai pencetak agarose. 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 kemudian pembatas baki pada setiap sisi dilepaskan dan baki diletakkan ke dalam bilik elektroforesis yang telah terisi larutan *buffer* TBE 1X (Rianta, 2001; The biotechnology education company, 2015; Lucchi *et al.*, 2012).

b. Elektroforesis

1. Menyiapkan kertas parafilm atau solatip pada meja

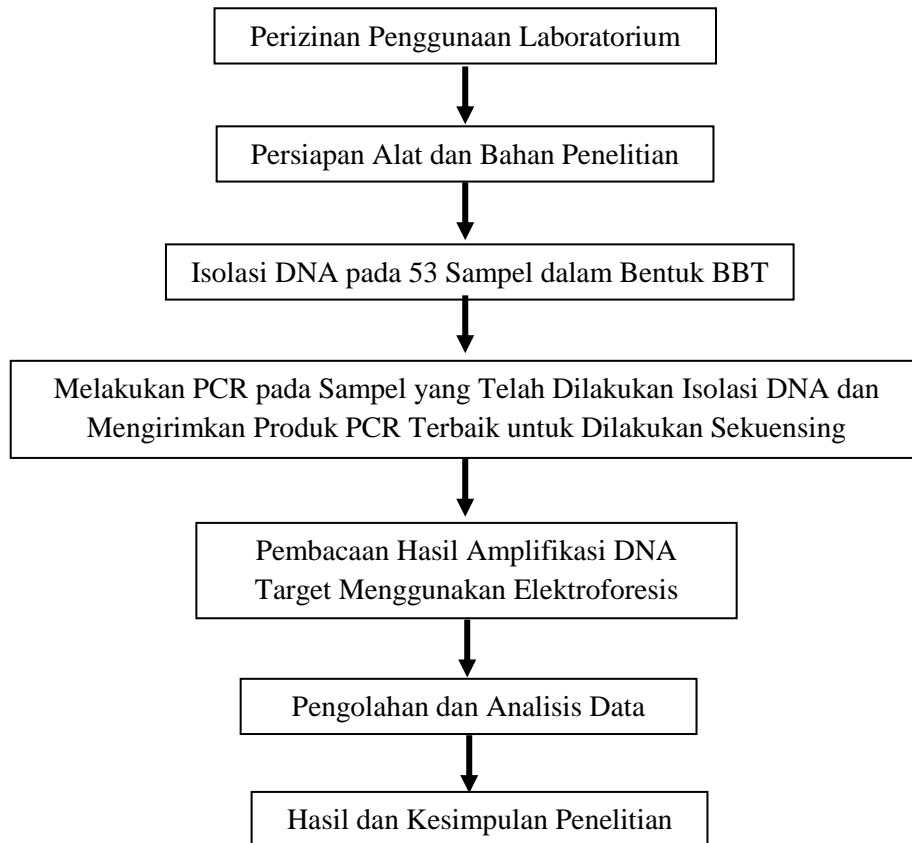
2. Meletakkan 2 μL *loading dye* pada parafilm atau solatip
3. Mengambil 2 μL hasil amplifikasi, kemudian mencampurkannya dengan *loading dye*
4. Mengambil 4 μL hasil campuran tersebut, kemudian memasukkannya ke dalam sumur pada gel agarose
5. Menyambungkan alat elektroforesis dengan sumber listrik dengan pengaturan pada alat elektroforesis, yaitu 100 V, 50 Watt, dan 300 mA selama 55 menit
6. Setelah selesai, didiamkan beberapa saat dan mengangkat agarose dari bilik elektroforesis, dan meletakkannya pada alat UV *translator* untuk divisualisasikan (Moll *et al.*, 2008).

3.9. Teknik Analisis Data

Penelitian ini akan menghasilkan sejumlah data mengenai panjang basa gen *circumsporozoite protein* pada sampel yang diujikan. Data yang didapatkan dari penelitian ini berasal dari elektroforesis hasil amplifikasi PCR sampel pada gel agarose dengan membandingkan panjang pita pada sampel dengan DNA *marker*. Selanjutnya produk PCR dilakukan proses sekuensing untuk mengetahui susunan basa nukleotida. Proses sekuensing dilakukan dengan menggunakan primer forward dan reverse. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis menggunakan *software* MegaX mulai dari pembacaan elektroferogram, *reverse complement* untuk *reverse primer*, *alignment*, dan *multiple alignment*. Kemudian hasil data tersebut akan dianalisis untuk melihat perbedaannya (Dahlan, 2014).

3.10. Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan sesuai dengan tahapan yang dijelaskan pada gambar 12.



Gambar 12. Alur penelitian.

3.11. Etik Penelitian

Etik penelitian ini diajukan kepada bagian etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan telah disetujui dengan nomor surat 3961/UN26.18/PP.05.02.00/2018. Etik penelitian ditunjukkan untuk penggunaan BBT yang berasal dari penderita malaria pada wilayah kerja

Puskesmas Hanura, Pesawaran dalam identifikasi gen *circumsporozoite protein*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu tidak terdapat SNP pada gen *circumsporozite protein Plasmodium falciparum* dari penderita malaria di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Pesawaran, Lampung.

5.2. Saran

Adapun saran yang dapat diberikan terkait penelitian ini yaitu:

1. Menguji nilai konsentrasi dan absorbansi pada seluruh produk ekstraksi menggunakan nanofotometer untuk menilai kualitas sampel yang baik.
2. Sampel yang digunakan sebaiknya berasal dari daerah/desa yang berbeda dalam satu wilayah kerja puskesmas untuk mengetahui demografis perbandingan variasi gen di setiap titik wilayah.
3. Penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan dengan metode *sequencing* untuk seluruh sampel agar dapat mengetahui susunan basa nukleotida.

DAFTAR PUSTAKA

- Bannister LH, Sherman IW. 2009. Plasmodium. Dalam: Wiley-Blackwell. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons.
- Bioline. 2017. MyFi DNA polymerase. Singapore: Bioline.
- Bowman NM, Congdon S, Mvalo T, Patel JC, Escamilla V, Emch M, *et al.* 2013. Comparative population structure of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein NANP repeat lengths in Lilongwe, Malawi. *Sci Rep.* 3:1-8.
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, *et al.* 2010. *Biologi*. Edisi 8. Jilid I. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. *Malaria*. Georgia: CDC.
- Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James AR, Roggero MA, *et al.* 2011. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med [Online Journal]* [diunduh 13 desember 2017]. Tersedia dari: <http://jem.rupress.org/content/208/2/341>.
- Dahlan MS. 2014. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Edisi ke-6. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Departemen Parasitologi FKUI. 2015. Buku ajar parasitologi kedokteran. Edisi ke-4. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran. 2015. Profil kesehatan Kabupaten Pesawaran tahun 2014. Pesawaran: Dinas Kesehatan Kabupaten Pesawaran.

Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung. 2015. Profil kesehatan Provinsi Lampung tahun 2015. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung.

DNA Data Bank of Japan (DDBJ). 2018. Codes used in sequence description [internet]. [Diakses tanggal 21 Agustus 2018]. Tersedia dari: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/code-e.html>.

Fatchiyah, Arumingtyas E, Widyarti S, Rahayu S. 2015. Biologi molekular. Jakarta: Erlangga.

Futuyama D J. 1986. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Inc.

Gandhi K, Thera MA, Coulibaly D, Traore K, Guindo AB, Ouattara A, *et al.* 2014. Variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: vaccine development implications. PLOS ONE. 9(7):1-9.

Harijanto PN. 2014. Malaria. Dalam: Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, Simadibrata M, Setiyohadi B, Syam AF. Buku ajar ilmu penyakit dalam. Edisi ke-6. Jakarta: Interna Publishing.

Igweh JC. 2012. Biology of Malaria Parasites. Dalam: Okwa O. Malaria parasites. Kroasia: InTech.

Jalloh A, Thien HV, Ferreira MU, Ohashi J, Matsuoka H, Kanbe T, *et al.* 2006. Sequence variation in the T-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein among field isolates is temporally stable: a s-year longitudinal study in Southern Vietnam. J Clin Microbiol. 44(4): 1229-1235.

Jongwutiwes S, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. 1994. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai isolates. Am J Trop Med Hyg. 51(5): 659-668.

- Keas BE. 1999. Taxonomy plasmodium [internet]. [Diakses tanggal 08 Agustus 2018]. Tersedia dari: <https://msu.edu/course/zol/316/psptax.htm>.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Infodatin malaria. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 5 tahun 2013 tentang pedoman tatalaksana malaria. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2001. Buletin jendela dan informasi kesehatan: epidemiologi malaria di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kurniawan B. 2017. Hubungan polimorfisme gen Pfk13 dengan respon terapi ACT penderita malaria falciparum di Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung [disertasi]. Padang: Universitas Andalas.
- Le HG, Kang JM, Moe M, Jun H, Thai TL, Lee J, *et al.* 2018. Genetic polymorphism and natural selection of circumsporozoite surface protein in plasmodium falciparum field isolates from Myanmar. *Malar J.* 17(361):1-14.
- Leventhal R dan Cheadle RF. 2012. Medical parasitology: a self instructional text. Edisi Ke-6. Philadelphia: F. A. Davis Company.
- 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.
- Maftuchah, Winaya A, Zainudin A. 2014. Teknik dasar analisis biologi molekuler. Yogyakarta: Penerbit Deepublish.
- Malaria Vaccine Initiative. 2017. First-generation vaccine [internet]. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/first-generation-vaccine>.

Malaria Vaccine Initiative. 2017. Our research and development strategy [internet]. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development/our-research-and-development-strategy>.

Malaria Vaccine Initiative. 2017. Preventing infection [internet]. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/next-generation-vaccine/preventing-infection>.

Malaria Vaccine Initiative. 2018. RTS,S frequently asked questions (FAQs). [Diakses tanggal 28 Juli 2018]. Tersedia dari: <https://www.malariavaccine.org/resources/fact-sheets/rtss-frequently-asked-questions-faqs>.

Mandal BK, Wilkins EGL, Dunbar EM, Mayon-White RT. 2006. Lecture notes: penyakit infeksi. Edisi Ke-6. Jakarta: Erlangga.

Moll K, Kaneko A, Scherf A, Wahlgren M. 2013. Methods in malaria research. Edisi ke-6. UK: EVI Malar Glasgow.

Murtiyaningsih H. 2017. Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik menggunakan random amplified polymorphic DNA (RAPD). Jurnal UNMUH Jember. 15(1): 1-10.

Mustafa H, Rachmawati I, dan Udin Y. 2016. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA genom nyamuk *Anopheles barbirostris*. Jurnal Vektor Penyakit. 10(1): 7-10.

National Center for Biotechnology (NCBI). 2017. Circumsporozoite (CS) protein [internet]. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/814364>.

Notoadmodjo S. 2012. Metodologi penelitian kesehatan. Jakarta: Rineka Cipta.

Pemerintah Daerah Kabupaten Pesawaran. 2018. Kecamatan dan Desa [internet]. [Diakses tanggal 7 April 2019]. Tersedia dari: <http://www.pesawarankab.go.id>.

- Plessmeyer ML, Reiter K, Shimp LR, Kotova S, Smith PD, Hurt DE, *et al.* 2009. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *JBC Papers in Press*. 284(39):26951–26963.
- Rianta P. 2001. Mengenal metode elektroforesis. *Oseana*. 26(1):25–31.
- Sambrook J dan Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Edisi ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soedarto. 2011. *Malaria*. Jakarta: Sagung Seto.
- Stanfields WD, Colome JS, Cano RJ. 2006. *Schaum's easy outlines: biologi molekuler dan sel*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Sutarto dan Cania E. 2017. Faktor lingkungan, perilaku dan penyakit malaria. *J Agromed Unila*. 4(1): 173-184.
- Swearingen KE, Lindner SE, Shi L, Shears MJ, Harupa A, Hopp CS, *et al.* 2016. Interrogating the plasmodium sporozoit surface: identification of surface-exposed proteins and demonstration of glycosylation on CSP by mass spectrometry-based proteomics. *PLOS Pathogens*. 12(4):e1005606.
- The biotechnology education company. 2015. *Principles and practice of agarose gel electrophoresis*. Maryland: EDVOTEX.
- Tucker K, Noe AR, Kotraiah V, Phares TW, Tsuji M, Nardin EH, *et al.* 2016. Pre-erythrocytic vaccine candidates in malaria. *InTECH*. 335-364.
- Vaccine Investigation and Online Information Network (VIOLA). 2017. Protective antigens: CS from *p. falciparum*. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: http://www.violinet.org/protogen/query_detail.php?c_pathogen_id=30.
- Warmadewi DA. 2017. *Buku ajar materi genetik*. Denpasar: Universitas Udayana.
- Widodo, Umie L, dan Amin M. 2007. *Bahan Ajar Evolusi*. Malang: Departemen Pendidikan Nasional

Widoyono. 2011. Penyakit tropis: epidemiologi, penularan, pencegahan dan pemberantasannya. Edisi Ke-2. Jakarta: Penerbit Erlangga.

World Health Organization. 2017. World malaria report 2017. Switzerland: WHO Library Cataloguing Data.

World Health Organization. 2017. Request for proposals: evaluation of malaria vaccine RTS,S/AS01 pilot implementation. [Diakses tanggal 14 Desember 2017]. Tersedia dari: <http://www.who.int/malaria/news/2017/malaria-vaccine-implementation-rfp/en/>.

World Health Organization. 2015. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd Edition. Italy: WHO Library Cataloguing Data.

Yusuf ZK. 2010. Polymerase chain reaction (PCR). Saintek. 5(6):1-6.

Zeeshan M, Alam MT, Vinayak S, Bora H, Tyagi RK, Alam MS, *et al.* 2012. Genetic variation in the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in India and its relevance RTS,S malaria vaccine. PLOS ONE. 7(8): 1-10.

Zeibig EA. 2013. Clinical parasitology: a practical approach. Edisi Ke-2. Missouri: Elsevier Saunders.