



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI POLIMORFISME GEN PENGKODE *Plasmodium vivax*
Duffy Binding Protein II (PvDBP II) DARI SUBJEK PENDERITA
MALARIA VIVAX DI KABUPATEN MIMIKA, PAPUA**

SKRIPSI

**RETNO AYU SETYA UTAMI
0706264261**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI POLIMORFISME GEN PENGKODE *Plasmodium vivax*
Duffy Binding Protein II (PvDBP II) DARI SUBJEK PENDERITA
MALARIA VIVAX DI KABUPATEN MIMIKA, PAPUA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**RETNO AYU SETYA UTAMI
0706264261**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Retno Ayu Setya Utami

NPM : 0706264261

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juni 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Retno Ayu Setya Utami
NPM : 0706264261
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Studi Polimorfisme Gen Pengkode *Plasmodium vivax*
Binding Protein II (PvDBP II) dari Subjek Penderita
Malaria Vivax di Kabupaten Mimika, Papua

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dra. Rintis Noviyanti, Ph.D. (.....)

Pembimbing II : Retno Lestari, M.Si. (.....)

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)

Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juni 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan kemudahan dan kelancaran bagi penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI).

Penulis menghaturkan terima kasih setulus-tulusnya kepada:

1. Dra. Rintis Noviyanti, Ph.D. dan Retno Lestari, M.Si. selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan memberi saran bagi Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih atas segala bimbingan, waktu, dukungan, semangat, dan saran sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Abinawanto, M.S. selaku Penguji I dan II, serta Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Koordinator Seminar dan penguji II saat sidang yang telah memberikan saran, perbaikan-perbaikan, dukungan, dan doa kepada Penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Papa, Mama, Mbak Tya, Puput, Heru, dan Mas Deni yang telah membantu secara moril. Terima kasih telah meluangkan waktu, memberikan semangat dan perhatian kepada Penulis selama penulisan skripsi ini.
4. Dra. Wellyzar Sjamsuridzal, M.Sc., Ph.D. selaku Pembimbing Akademis atas segala dukungan, saran-saran, serta waktu yang selalu diberikan.
5. Dr. Luthfiralda Syahfirdi, M.Biomed. selaku Koordinator Seminar, Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI dan Ketua Sidang, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada Penulis selama menempuh pendidikan di Biologi. Terima kasih pula kepada

Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.

6. Prof. Sangkot Marzuki, Ph. D. dan Prof. Herawaty Sudoyo, Ph.D. yang telah mengizinkan Penulis untuk melakukan penelitian di Lembaga Biologi Molekul Eijkman. Terima kasih yang tulus kepada Dr. Farah N. Coutrier, Ph.D., Hidayat Trimarsanto, BSc., Leily Trianty, M.Si., Andreas Kusuma, S.Si yang telah banyak memberikan masukan dan bantuan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih kepada rekan kerja di laboratorium malaria II, Fajar Muhamad, Kak Boni, serta Mas Sapto yang telah memberikan semangat kepada Penulis.
7. Sahabat terbaik Lulu Moulfia Tursina, Adela Novisa, Ratih Cempaka, R. Indah Kendarsari, seluruh teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, dan BLOSSOM atas semua dukungan, semangat, perhatian, waktu, pengalaman, dan persaudaraan yang telah diberikan kepada Penulis.

Penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari sempurna, kritik dan saran demi peningkatan kualitas di masa depan sangat diharapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 9 Juni 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retno Ayu Setya Utami
NPM : 0706264261
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

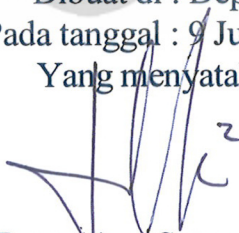
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Studi Polimorfisme Gen Pengkode *Plasmodium vivax Binding Protein II* (PvDBP II) dari Subjek Penderita Malaria Vivax di Kabupaten Mimika, Papua

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 9 Juni 2011
Yang menyatakan



(Retno Ayu Setya Utami)

ABSTRAK

Nama : Retno Ayu Setya Utami
Program studi : Biologi
Judul : Studi polimorfisme gen pengkode *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBP II) dari subjek penderita malaria vivax di Kabupaten Mimika, Papua

Invasi *Plasmodium vivax* (Grassi & Filetti, 1889) ke dalam retikulosit ditentukan oleh adanya interaksi antara ligan PvDBP II dan reseptor *Duffy Antigen Receptor for Chemokines* (DARC) pada permukaan sel darah merah. Penelitian bertujuan mengkarakterisasi polimorfisme pada gen pengkode PvDBP II dari isolat *P. vivax* di Kabupaten Mimika, Papua dan menentukan asam amino yang *conserved*. Gen pengkode PvDBP II diamplifikasi dari 12. Hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II kemudian diklona dan dilakukan *sequencing* pada 43 klon yang positif. Mutasi *synonymous* ditemukan pada 15 kodon asam amino (20%), sedangkan mutasi *nonsynonymous* terjadi pada 58 kodon asam amino (77,3%). Sebagian besar mutasi (78,6%) terletak pada *critical binding motif* PvDBP II. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode Bayesian, memperlihatkan adanya hubungan kekerabatan antara isolat Indonesia dan isolat dari negara lain. Kesimpulan dari penelitian adalah polimorfisme pada isolat Indonesia sangat tinggi (81,4%) dan asam amino sistein adalah asam amino yang *conserved* (83,3%).

Kata kunci:

Critical binding motif, *genotyping*, Kabupaten Mimika, mutasi *nonsynonymous*, mutasi *synonymous*, *Plasmodium vivax*, PvDBP II.

ABSTRACT

Name : Retno Ayu Setya Utami
Study Program: Biology
Title : Study of the gene encoding the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBP II) polymorphisms from Papuan isolates.

The interaction between PvDBP II and its receptor, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) is essential for the merozoite invasion into the reticulocytes. This study aimed to characterize the genetic polymorphisms of the gene encoding the PvDBP II in isolates from Mimika district, Papua. The gene encoding the PvDBP II from 12 isolates was subjected to PCR amplification and the patterns of polymorphisms were characterized using DNA cloning. Fourty three clones were further examined by sequencing. Fifteen synonymous (20%) and 58 nonsynonymous (77,3%) mutations were identified. The highest frequency of polymorphisms (78,6%) was found in *critical binding motif* of PvDBP II. Phylogenetic analysis of DNA sequences using Bayesian methods demonstrated that *P. vivax* (Grassi & Filetti, 1889) isolates from Indonesia were related with other isolates from different geographical regions. The conclusions of this study are the level of polymorphisms in Indonesian isolates is high (81,4%) and cysteine residues are conserved (83,3%).

Key words:

Critical binding motif, genotyping, Mimika district, nonsynonymous mutation, *Plasmodium vivax*, PvDBP II, synonymous mutation.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kabupaten Mimika	4
2.2 Taksonomi <i>Plasmodium vivax</i>	5
2.3 Siklus hidup <i>Plasmodium</i> spp.	6
2.4 Gejala klinis malaria vivax	8
2.5 <i>Plasmodium vivax</i> Duffy Binding Protein II (PvDBP II)	8
2.5.1 Struktur dan polimorfisme gen pengkode PvDBP II	8
2.5.2 Struktur PvDBP II	10
2.5.3 Interaksi antara PvDBP II dan DARC	11
2.6 Rekonstruksi pohon filogenetik	12
2.7 Teknik-teknik biologi molekuler untuk studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II	13
2.7.1 Isolasi DNA dari kertas saring menggunakan metode Chelex-100™	13
2.7.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	14
2.7.3 Elektrofesis	15
2.7.4 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	16
2.7.5 Pengklonaan DNA rekombinan	16
2.7.5.1 Plasmid sebagai vektor pengklonaan	16
2.7.5.2 Transformasi	17
2.7.5.3 Penapisan	17
2.7.6 <i>Sequencing</i>	18
3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi dan waktu penelitian	19
3.2 Alat, bahan, dan cara kerja	19
3.2.1 Alat	19
3.2.2 Bahan	20
3.2.2.1 Sampel	20
3.2.2.2 Bahan kimia	20
3.2.2.3 Primer	20

3.2.3	Cara kerja	21
3.2.3.1	Isolasi DNA dari kertas saring menggunakan metode Chelex-100™	21
3.2.3.2	Amplifikasi gen pengkode PvDBP II	22
3.2.3.3	Purifikasi hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II (<i>gel cutting</i>)	23
3.2.3.4	Pengklonaan gen pengkode PvDBP II	24
3.2.3.5	Pemeriksaan hasil pengklonaan	25
3.2.3.6	Isolasi plasmid	25
3.2.3.7	<i>Cycle sequencing</i>	26
3.2.3.8	<i>Sequencing</i>	26
3.3	Penyusunan, pengolahan, dan analisis data	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Tes diagnostik cepat (<i>Rapid Diagnostic Test</i>)	29
4.2	Hasil isolasi DNA genom <i>P. vivax</i> dengan metode Chelex-100™ dan hasil <i>genus and species-specific nested</i>	29
4.3	Profil <i>genotyping P. vivax</i> di Indonesia	31
4.4	Amplifikasi dan purifikasi gen pengkode PvDBP II	32
4.5	Pengklonaan gen pengkode PvDBP II	34
4.6	Isolasi plasmid	37
4.7	Analisis hasil <i>sequencing</i>	38
4.8	Analisis pohon filogenetik	42
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran	45
	DAFTAR REFERENSI	46

DAFTAR GAMBAR

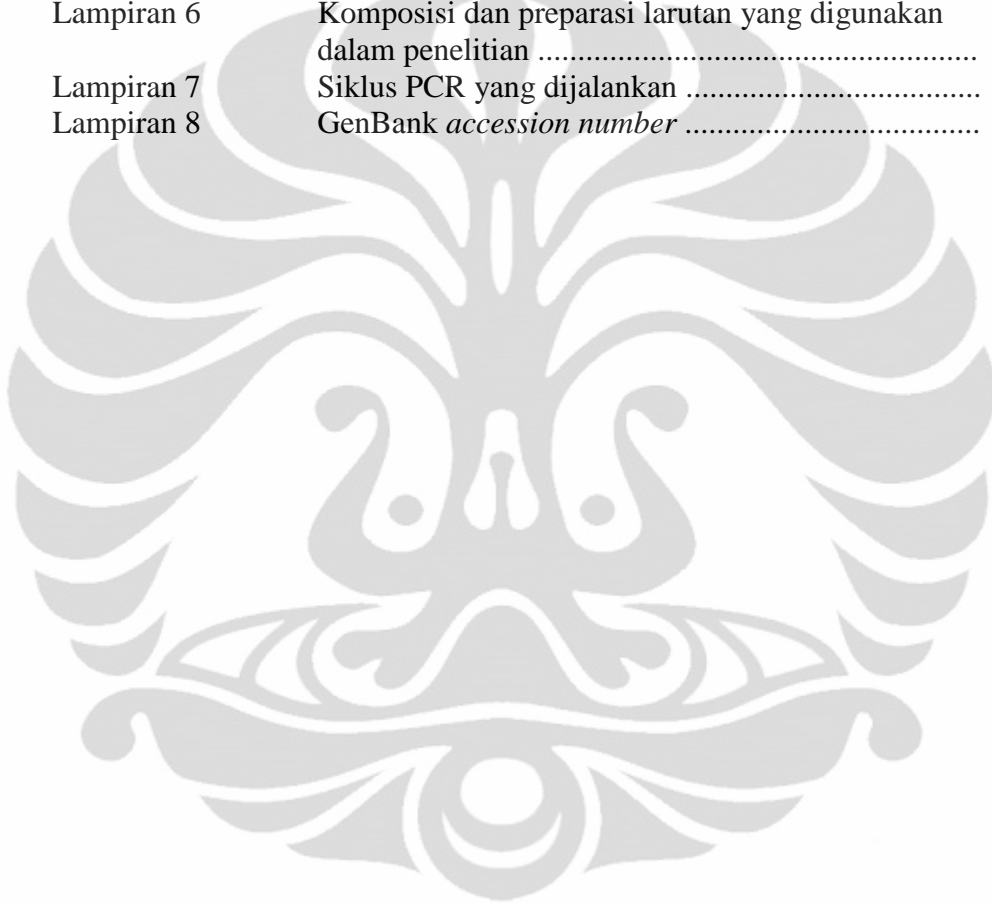
Gambar 2.1.	Peta Provinsi Papua	4
Gambar 2.3.	Siklus hidup <i>Plasmodium</i> spp.	7
Gambar 2.5.1.	Skema gen pengkode PvDBP II	9
Gambar 2.5.3.(1).	Invasi <i>P. vivax</i> ke dalam retikulosit	11
Gambar 2.5.3.(2).	Ikatan antara PvDBP II dan DARC	12
Gambar 2.7.2.	Siklus PCR	14
Gambar 3.2.2.3.(1).	Bagan strategi PCR gen pengkode PvDBP II	21
Gambar 3.2.2.3.(2).	Strategi PCR pada sekuen gen pengkode PvDBP II.	23
Gambar 3.2.3.8	Skema umum cara kerja penelitian	28
Gambar 3.3.	Pengolahan sekuen dengan DNA Baser v3	53
Gambar 4.2.	Strategi <i>genus and species-specific nested</i> PCR	30
Gambar 4.3.	Hasil RFLP gen <i>pvm_{sp}-3α</i> dengan enzim restriksi <i>Hha</i> I (A) dan <i>Alu</i> I (B)	32
Gambar 4.4.(1).	Hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II	33
Gambar 4.4.(2).	Hasil purifikasi	33
Gambar 4.5.(1).	Skema vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	34
Gambar 4.5.(2).	Klona berwarna putih dan biru	35
Gambar 4.5.(3).	Hasil konfirmasi pengklonaan	36
Gambar 4.6.	Hasil isolasi plasmid	38
Gambar 4.7.	Distribusi mutasi pada PvDBP II dari Indonesia	40
Gambar 4.8.	Pohon filogenetik	54

DAFTAR TABEL

Tabel 4.4.	Hasil <i>genotyping</i> <i>P. vivax</i> dari subjek penderita malaria vivax di Kabupaten Mimika, Papua	55
Tabel 4.7.(1).	Frekuensi polimorfisme asam amino	56
Tabel 4.7.(2).	Haplotipe gen pengkode PvDBP II pada 43 klon Indonesia	57
Tabel 4.8.	Perbandingan polimorfisme asam amino dari isolat Indonesia dan negara lain	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Reagen TOPO TA <i>Cloning</i>	60
Lampiran 2	Komponen One Shot [®] <i>competent cell kit</i>	60
Lampiran 3	Komposisi dan cara pembuatan LB medium	61
Lampiran 4	Primer yang digunakan pada studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II	62
Lampiran 5	Perhitung rasio <i>insert</i> dan vektor pada proses pengklonaan	62
Lampiran 6	Komposisi dan preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian	63
Lampiran 7	Siklus PCR yang dijalankan	64
Lampiran 8	GenBank <i>accession number</i>	65



BAB 1 PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit tropis yang disebabkan oleh infeksi organisme endoparasit dari genus *Plasmodium* ke dalam eritrosit (Pechenik 1991: 56). Empat spesies *Plasmodium* yang diketahui mampu menginfeksi manusia adalah *Plasmodium falciparum* (Welch, 1898), *P. vivax* (Grassi & Filetti, 1889), *P. malariae* (Laveran, 1881), dan *P. ovale* (Stephens, 1922) (Despommier *dkk.* 2005: 50). *Plasmodium vivax* memiliki wilayah distribusi geografis paling luas di antara 3 spesies *Plasmodium* yang lain. Malaria vivax adalah penyakit malaria nomor dua terbanyak setelah penyakit malaria falsiparum. *Plasmodium vivax* menginfeksi lebih dari 75 juta orang per tahun dan menyebabkan 70—80 juta kasus per tahun di dunia. *Plasmodium vivax* dominan pada wilayah Timur Tengah, Asia Tengah, Asia Selatan, Asia Tenggara, Afrika Utara, Amerika Selatan dan Amerika Latin, Pasifik Barat, serta Oseania (Mendis *dkk.* 2001: 98).

Penyakit malaria endemik di 105 negara, baik di negara yang beriklim tropis maupun negara beriklim sedang (WHO 2007: 1). Setiap tahun lebih dari 500 juta penduduk dunia terinfeksi malaria dan lebih dari 1.000.000 jiwa meninggal dunia. Gejala klinis malaria vivax ditandai dengan demam setiap hari ke-3. Malaria vivax dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan fisik penderita. Malaria vivax pada kehamilan dapat menyebabkan kelahiran prematur serta berat badan bayi yang rendah (Luxemburger *dkk.* 2001: 464; Poespoprodjo *dkk.* 2008: 1380). Namun belakangan ini diketahui bahwa *P. vivax* dapat menyebabkan anemia berat, kerusakan sistem pernapasan, malnutrisi, dan koma (*lihat* Mendis *dkk.* 2001: 100–101; Price *dkk.* 2007: 3).

Pada tahun 2008, diperkirakan terjadi 243 juta kasus malaria di dunia. Kasus malaria terbanyak terdapat di Afrika (85%), diikuti beberapa negara Asia Tenggara (10%) termasuk Indonesia, wilayah Mediterania Timur (4%), Amerika Latin, dan beberapa bagian negara Eropa (WHO 2009a: 27). Pada tahun 2009, dilaporkan terjadi 1.143.024 kasus malaria di Indonesia (Kemenkes RI 2010: 1). Konsentrasi terbesar dari kasus malaria di Indonesia berada di pulau Papua, Sulawesi, Kalimantan, Sumatra, kepulauan Maluku, dan Nusa Tenggara (WHO

2007: 40). Provinsi Papua, merupakan daerah di Indonesia yang endemik malaria dan memiliki prevalensi resistensi obat tertinggi untuk *P. falciparum* dan *P. vivax* (Tjitra *dkk.* 2008: 891; Kemenkes RI 2010: 1).

Berdasarkan angka kejadian malaria atau *Annual Parasite Incidence* (API), Kabupaten Mimika merupakan salah satu kabupaten di Provinsi Papua yang endemik terhadap malaria (angka API > 5/1.000 penduduk). Karyana *dkk.* (2008: 151) menyatakan antara bulan Januari 2004 dan Desember 2005, di Kabupaten Mimika terjadi 99.158 kasus malaria. Kasus malaria akibat *P. falciparum* menempati urutan pertama terbanyak, yaitu 57.938 kasus (58,4%) kemudian disusul oleh malaria akibat *P. vivax* sebanyak 36.471 kasus (36,8%). Tingkat resistensi *P. vivax* terhadap obat yang sangat tinggi serta jumlah kasus malaria vivax yang cukup banyak di Kabupaten Mimika, membutuhkan upaya penanganan yang lebih tepat berbasiskan informasi genetik. Penelitian tentang *P. falciparum* di Kabupaten Mimika telah banyak dilakukan, namun penelitian tentang *P. vivax* masih sangat sedikit. Oleh sebab itu, penelitian mengenai *P. vivax* perlu ditambah.

Upaya eliminasi malaria vivax belum dapat dilakukan secara maksimal. Hal tersebut disebabkan oleh parasit yang resistan terhadap obat antimalaria, nyamuk yang resistan terhadap insektisida, serta adanya polimorfisme gen pada *P. vivax* yang menyebabkan keragaman antigen (Beeson & Crabb 2007: 1862; WHO 2007: 1). Studi polimorfisme gen pada *P. vivax* perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik *P. vivax* dan memberikan pemahaman yang lebih baik bagi pengembangan vaksin malaria vivax.

Studi polimorfisme gen pada *P. vivax* telah berkembang sejak beberapa dekade terakhir. Salah satu di antaranya adalah studi polimorfisme gen pengkode *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II* (PvDBP II). Studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II sangat perlu dilakukan karena gen tersebut mengkode protein yang berperan penting dalam proses invasi *P. vivax* ke dalam retikulosit (eritrosit muda). Invasi *P. vivax* bergantung sepenuhnya pada ikatan yang terbentuk antara PvDBP *region II* dan *Duffy Antigen/Receptor for Chemokines* (DARC). Hal tersebut menjadikan PvDBP II sebagai target vaksin yang tepat untuk

menggagalkan proses invasi merozoit ke dalam retikulosit (Ranjan & Chitnis 1999: 14072; Ocampo *dkk.* 2002: 13).

Polimorfisme gen pengkode PvDBP II pada isolat *P. vivax* dari Papua New Guinea (PNG), Kolombia, dan Thailand menunjukkan 93% polimorfisme terjadi pada *critical binding motif* PvDBP II. *Critical binding motif* PvDBP II tersusun atas 170 asam amino yang terletak di antara asam amino sistein 4 dan 7. Polimorfisme pada *critical binding motif* PvDBP II disebabkan oleh adanya substitusi satu basa. Hampir seluruh substitusi basa pada *region* tersebut menyebabkan perubahan asam amino. Perubahan asam amino mengakibatkan perubahan struktur PvDBP II yang berinteraksi dengan DARC dan struktur epitop PvDBP II yang dikenali oleh sistem imun. Perubahan struktur epitop akibat polimorfisme gen diduga merupakan mekanisme *P. vivax* untuk menghindari sistem imun tubuh manusia (Ampudia *dkk.* 1996: 270; Xainli *dkk.* 2000: 258; Gosi *dkk.* 2008: 115).

Informasi dari hasil studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II merupakan data awal yang penting bagi pengembangan vaksin malaria vivax. Studi mengenai polimorfisme gen pengkode PvDBP II belum pernah dilakukan sebelumnya pada sampel dari Indonesia. Oleh sebab itu, tujuan penelitian adalah mengkarakterisasi polimorfisme pada *region II* gen pengkode PvDBP yang diisolasi dari penderita malaria vivax di Kabupaten Mimika dan menentukan asam amino yang *conserved* sebagai data awal pengembangan vaksin malaria vivax di Indonesia. Selain itu informasi dari penelitian ini diharapkan dapat melengkapi informasi keragaman genetik *P. vivax* di Indonesia. Hipotesis penelitian adalah polimorfisme pada gen yang mengkode PvDBP II sangat tinggi dan adanya daerah *conserved* pada gen yang mengkode PvDBP II.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kabupaten Mimika

Kabupaten Mimika terletak di pantai selatan Papua, memiliki wilayah seluas 21.522 km² yang terbagi menjadi 12 Kecamatan dan 85 desa. Letak geografis Kabupaten Mimika adalah di antara 134°31' - 138°31' Bujur Timur dan 4°60' - 5°18' Lintang Selatan (Gambar 2.1.). Posisi tersebut membuat topografi wilayah Mimika terbagi menjadi daerah dataran tinggi dan dataran rendah serta curah hujan mencapai 5.500 mm/tahun (Karyana *dkk.* 2008: 149; Tjitra *dkk.* 2008: 891).



Gambar 2.1. Peta Provinsi Papua

[Sumber: East-West Center 2003: 1. Telah diolah kembali.]

Transmisi malaria di Kabupaten Mimika terjadi sepanjang tahun, namun terbatas hanya pada daerah dataran rendah. Hal tersebut disebabkan vektor malaria lebih menyukai daerah dataran rendah (Karyana *dkk.* 2008: 150). Vektor malaria pada wilayah Papua adalah *Anopheles koliensis* (Owen, 1945), *A. farauti* (Laveran, 1902), dan *A. punctulatus* (Donitz, 1901) (Spencer *dkk.* 1974: 22). Vektor-vektor tersebut menyebabkan 99.158 kasus malaria pada tahun 2004 hingga 2005 (Karyana *dkk.* 2008: 151).

2.2 Taksonomi *Plasmodium vivax*

Malaria vivax disebabkan oleh infeksi *P. vivax* di dalam retikulosit (Ocampo *dkk.* 2002: 18). *Plasmodium vivax* adalah parasit yang paling umum dijumpai di berbagai wilayah dunia, karena memiliki distribusi geografis paling luas (Marcus 2009: 15). *Plasmodium vivax* diklasifikasikan sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: Protista
<i>Subkingdom</i>	: Protozoa
<i>Phylum</i>	: Apicomplexa
<i>Class</i>	: Sporozoasida
<i>Subclass</i>	: Coccidiida
<i>Order</i>	: Eucoccidiorida
<i>Sub-ordo</i>	: Haemosporidiidea
<i>Family</i>	: Plasmodiidae
<i>Genus</i>	: <i>Plasmodium</i>
<i>Species</i>	: <i>Plasmodium vivax</i> (Grassi & Filetti, 1889)

Ciri utama anggota *phylum* Apicomplexa adalah memiliki organel pada bagian apikal sel. Lebih dari 4.500 anggota *phylum* Apicomplexa adalah endoparasit pada hewan. Endoparasit adalah organisme yang memerlukan inang untuk dapat bertahan hidup. *Plasmodium vivax* merupakan endoparasit pada hewan vertebrata dan invertebrata (Pechenik 1991: 56; Marcus 2009: 18).

2.3 Siklus hidup *Plasmodium* spp.

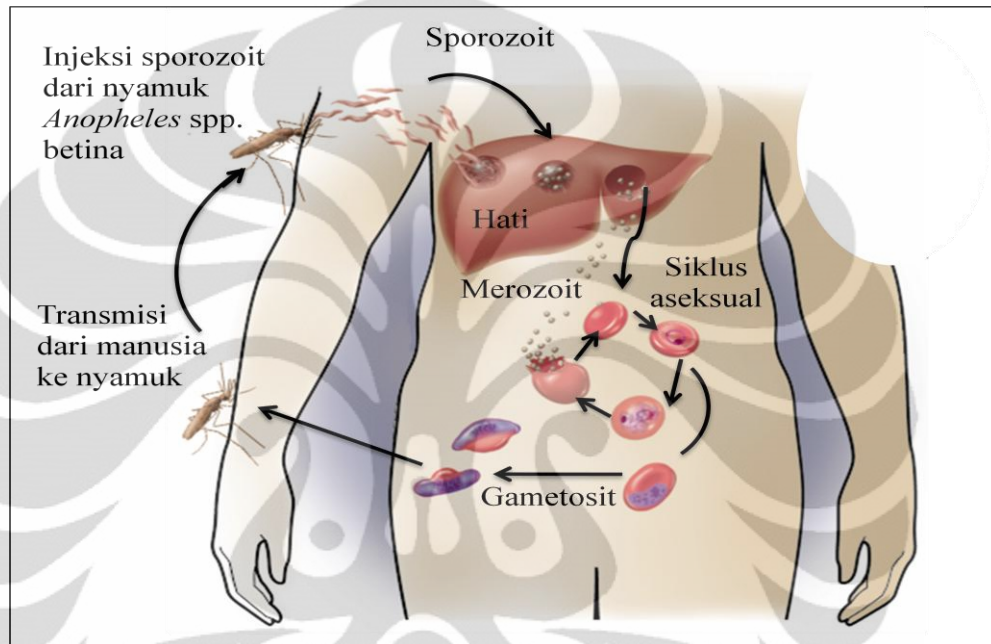
Ciri utama *family* Plasmodiidae adalah adanya 2 siklus hidup, yaitu siklus aseksual pada vertebrata yang berlangsung di eritrosit dan organ lainnya, serta siklus seksual (*sporogoni*) yang dimulai pada vertebrata dan berlanjut pada nyamuk (Gambar 2.3.). Siklus aseksual yang berlangsung pada manusia yang terdiri atas fase eritrosit (*erythrocytic schizogony*) dan fase yang berlangsung di dalam sel-sel parenkim hati (*exo-erythrocytic schizogony*) (Nugroho & Tumewo-Wagey 1999: 38—39).

Fase di hati (*exo-erythrocytic schizogony*) dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi *Plasmodium* menghisap darah dan memasukkan sporozoit yang terdapat pada air liurnya ke dalam pembuluh darah manusia. Sporozoit terbawa oleh aliran darah menuju hati, kemudian sporozoit melakukan penetrasi ke dalam sel-sel parenkim hati dan memulai reproduksi aseksual. Setiap skizogoni menghasilkan 10.000 parasit anak yang disebut merozoit, yang kemudian dikeluarkan dari sel hati dan selanjutnya menginfeksi eritrosit (Nugroho & Tumewo-Wagey 1999: 39—40; Despommier *dkk.* 2005: 55).

Khusus pada *P. vivax* dan *P. ovale* diduga terdapat 2 jenis sporozoit, yaitu takisporozoit dan brandisporozoit. Takisporozoit merupakan sporozoit yang akan berkembang cepat menjadi skizon. Brandisporozoit diduga merupakan hipnozoit atau sporozoit yang tidak mengalami perkembangan lanjut pada proses skizogoni. Hipnozoit akan tetap laten selama 8—9 bulan atau bahkan 5 tahun sebelum berkembang menjadi skizon jaringan. Peristiwa relaps adalah peristiwa aktifnya hipnozoit dan kemudian mengalami pembelahan (proses skizogoni). Faktor-faktor yang menyebabkan aktifnya hipnozoit belum diketahui dengan jelas (Nugroho & Tumewo-Wagey 1999: 40—41; Despommier *dkk.* 2005: 55).

Fase eritrosit (*erythrocytic schizogony*) dimulai dengan keluarnya merozoit dari skizon matang ke dalam sirkulasi darah. Proses invasi parasit ke dalam eritrosit diawali dengan perlekatan merozoit dengan eritrosit, sehingga terjadi perubahan bentuk dari eritrosit yang terinfeksi. Merozoit berputar untuk mengarahkan ujung apikal menghadap membran sel eritrosit, kemudian dari badan rhoptri mengeluarkan suatu protein yaitu *rhoptry-associated protein* yang

akan melubangi membran sel eritrosit. Proses tersebut juga melibatkan beberapa enzim protease spesifik seperti endopeptidase, *chymotrypsin-like enzym*, dan protease inhibitors. Selanjutnya merozoit masuk melalui proses endositosis, setelah itu membran eritrosit akan tertutup kembali (Nugroho & Tumewo-Wagey 1999: 42).



Gambar 2.3. Siklus hidup *Plasmodium* spp.

[Sumber: Miller *dkk.* 2002: 674. Telah diolah kembali.]

Parasit di dalam eritrosit berkembang dan membentuk struktur seperti cincin yang disebut tropozoit awal. Struktur cincin kemudian membesar hingga memenuhi eritrosit. Pembelahan aseksual dari parasit menghasilkan skizon yang terdiri atas banyak merozoit. Parasit mendapatkan nutrisi dari hemoglobin di dalam eritrosit dan menghasilkan pigmen khusus yang disebut hemazoin. Fase eritrosit telah lengkap saat eritrosit pecah dan mengeluarkan merozoit yang siap menginvasi eritrosit lain. Tidak semua merozoit berkembang secara aseksual, beberapa merozoit berkembang secara seksual dengan membentuk makrogametosit (betina) dan mikrogametosit (jantan). Perkembangan makrogametosit dan mikrogametosit diselesaikan secara lengkap di dalam pencernaan nyamuk (Despommier *dkk.* 2005: 55—57).

2.4 Gejala klinis malaria vivax

Gejala klinis malaria dipengaruhi oleh strain *Plasmodium*, imunitas tubuh, jumlah parasit yang menginfeksi, endemisitas daerah infeksi, dan pengaruh pemberian obat antimalaria. Beberapa daerah memiliki gejala spesifik, seperti di Papua banyak terjadi diare sebagai gejala malaria. Gejala umum malaria adalah demam yang diduga berhubungan dengan proses skizogoni (pecahnya merozoit/skizon), berhubungan dengan pengaruh *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI), terbentuknya sitokin, dan toksin lainnya. Demam tidak selalu muncul sebagai gejala umum malaria, namun di daerah hiperendemik demam selalu muncul sebagai gejala malaria. Gambaran karakteristik dari malaria adalah demam periodik, anemia, dan splenomegali (Harijanto 1999: 151).

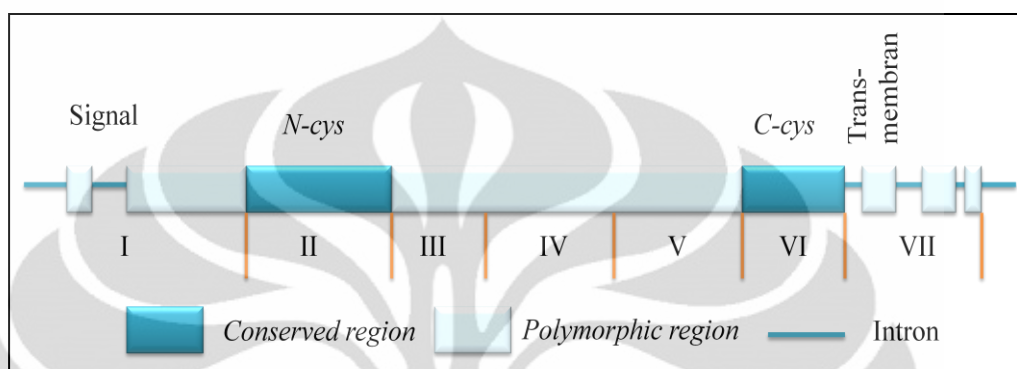
Jenis *Plasmodium* yang menginfeksi memengaruhi tingkat manifestasi klinis malaria. Malaria yang disebabkan oleh *P. vivax* disebut malaria tertiana/vivax, dengan demam setiap hari ke-3. Manifestasi klinis malaria vivax umumnya tidak berbahaya, namun dapat berkembang menjadi malaria berat bila tidak ditangani dengan tepat. Mortalitas malaria vivax rendah tetapi morbiditas tinggi karena seringnya peristiwa relaps. Pola relaps malaria vivax di daerah tropik terjadi sepanjang tahun (Harijanto 1999: 152, 156 & 157).

2.5 *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBP II)

2.5.1 Struktur dan polimorfisme gen pengkode PvDBP II

Genom *P. vivax* terdiri atas 14 kromosom (~26,8 Mb) (Carlton *dkk.* 2008: 758). Prekursor gen pengkode PvDBP II terdapat di kromosom nomor 6 (NCBI 2010: 1). *Open Reading Frames* (ORF) gen pengkode PvDBP terdiri atas 5 ekson. Setiap ekson mengkode protein yang fungsional (Gambar 2.5.1). Ekson 1 mengkode sekuen signal (*start* kodon), diikuti oleh beberapa asam amino bermuatan positif dan 12 asam amino hidrofobik. Ekson 2 mengkode protein berukuran besar yang terdiri atas 986 asam amino. Ekson 2 terdiri atas I—VI *region* sekuen asam amino. *Critical binding motif* pada PvDBP yang penting

untuk berikatan dengan DARC terletak pada *region II*. Ekson 3 mengkode 18 asam amino yang berperan sebagai protein transmembran, sedangkan ekson 4 dan 5 mengkode 45 asam amino yang berperan sebagai protein *cytoplasmic* (Adams *dkk.* 1992: 7086–7087; Ranjan & Chitnis 1999: 14072).



Gambar 2.5.1. Skema gen pengkode PvDBP

[Sumber: Gosi *dkk.* 2008: 151. Telah diolah kembali.]

Menurut Xainli *dkk.* (2000: 258), polimorfisme pada *region II* gen pengkode PvDBP merupakan hasil dari substitusi satu basa pada beberapa kodon asam amino. Substitusi tersebut menghasilkan mutasi *synonymous* dan *nonsynonymous*. Substitusi basa yang tidak menyebabkan perubahan asam amino yang dikode disebut mutasi *synonymous*, sedangkan substitusi basa yang menyebabkan perubahan asam amino yang dikode disebut mutasi *nonsynonymous*.

Hasil studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II isolat PNG, Kolombia, dan Thailand, menunjukkan 93% polimorfisme terjadi pada *critical binding motif* PvDBP II. Polimorfisme pada *critical binding motif* PvDBP II disebabkan oleh mutasi *nonsynonymous*. Mutasi *nonsynonymous* pada kodon asam amino 384, 386, 417, 424, 437, dan 503 terjadi pada seluruh isolat *P. vivax* dari PNG, Kolombia, dan Thailand. Perubahan asam amino yang dikode oleh kodon 384, 417, 424, 437, dan 503 konsisten pada ketiga wilayah studi. Hal tersebut menunjukkan bahwa beberapa bentuk polimorfisme yang sama dapat ditemukan dari wilayah studi yang berbeda (Ampudia *dkk.* 1996: 271; Xainli *dkk.* 2000: 258; Gosi *dkk.* 2008: 151).

Perubahan asam amino yang menyusun *critical binding motif* PvDBP II relatif tidak memengaruhi interaksi antara PvDBP II dengan DARC, karena asam amino yang berikatan dengan DARC adalah asam amino *conserved* atau tidak mengalami perubahan (Singh *dkk.* 2006: 742; Chitnis & Sharma 2008: 32). Asam amino yang *conserved* pada *critical binding motif* PvDBP II dapat dijadikan kandidat vaksin malaria vivax. Asam amino penyusun epitop PvDBP cukup bervariasi, sehingga memunculkan dugaan bahwa polimorfisme merupakan mekanisme parasit untuk menghindari sistem imun (Ampudia *dkk.* 1996: 271).

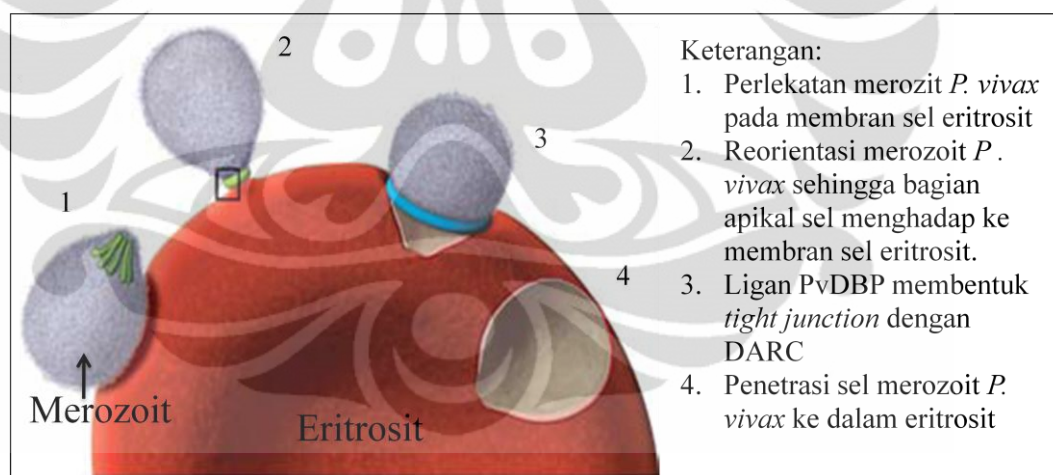
2.5.2 Struktur PvDBP II

Plasmodium vivax Duffy Binding Protein adalah protein pada sel merozoit *P. vivax* yang memiliki berat molekul sebesar 140-kDa. Protein tersebut termasuk anggota keluarga dari *erythrocyte binding protein* yang memiliki daerah *conserved cysteine-rich*. Daerah *conserved cysteine-rich* terdiri atas dua daerah, yaitu *amino cysteine-rich domain (N-cys)* dan *carboxy cysteine-rich domain (C-cys)*. Hasil *sequencing* memperlihatkan bahwa protein tersebut terbagi menjadi VI *region* (Gambar 2.5.1). *Region I* terdiri atas asam amino yang sangat *conserved* dan bermuatan, sebagian besar bermuatan negatif. *Region II* atau 5' *amino cysteine-rich domain (N-cys)* terdiri atas 330 asam amino. Asam amino aromatik, 12 asam amino sistein, 10 asam amino triptopan, 7 asam amino fenilalanin, dan 10 asam amino tirosin pada *region II* merupakan asam amino yang *conserved*. *Region* antara asam amino fenilalanin 2 dan 5 atau asam amino tirosin merupakan daerah yang polimorfik (Adams *dkk.* 1992: 7087; Chitnis & Miller 1994: 504).

Region lain yang kaya akan asam amino sistein adalah *region IV* atau 3' *carboxy cysteine-rich domain (C-cys)*. *Region IV* merupakan bagian transmembran dari PvDBP. Seluruh asam amino sistein dan 11 dari 13—15 asam amino aromatik pada *region* tersebut adalah asam amino yang *conserved*. *Region III, V, dan VI* merupakan *region* dengan asam amino yang sangat bervariasi, baik pada *P. vivax* maupun *P. knowlesi* (Adams *dkk.* 1992: 7087).

2.5.3 Interaksi antara PvDBP II dan DARC

Invasi sel merozoit *Plasmodium* ke dalam retikulosit memerlukan interaksi molekular antara reseptor pada membran sel retikulosit dan ligan pada permukaan sel parasit. *Plasmodium vivax* berikatan dengan antigen Duffy untuk menginvasi retikulosit (Chitnis & Miller 1994: 503–504). Invasi retikulosit oleh sel merozoit *P. vivax* melalui banyak tahap dan sangat kompleks. Tahap dari invasi merozoit meliputi perlekatan merozoit dengan retikulosit yang dilanjutkan dengan reorientasi sel merozoit sehingga kompleks apikal menghadap ke membran retikulosit. Organel sekretori pada kompleks apikal yang disebut mikronema kemudian memunculkan PvDBP, sehingga PvDBP dapat membentuk *tight junction* dengan DARC. Sel merozoit kemudian melakukan penetrasi ke dalam retikulosit (Gambar 2.5.3 (1)) (Ocampo *dkk.* 2002: 18; Beeson & Crabb 2007: 1862).

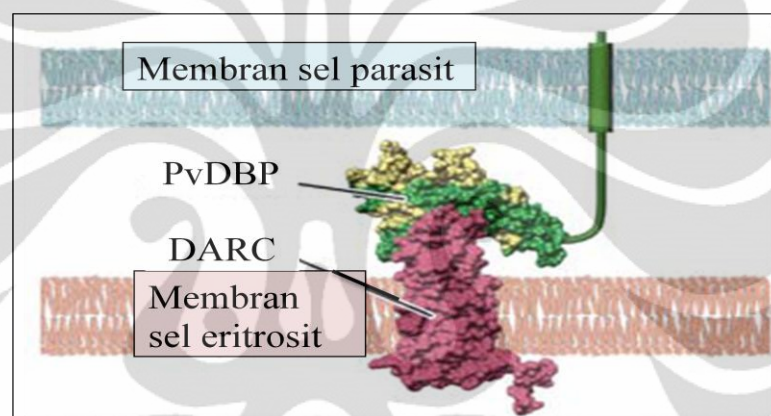


Gambar 2.5.3.(1). Invasi *P. vivax* ke dalam retikulosit

[Sumber: Beeson & Crabb 2007: 1863. Telah diolah kembali.]

Reseptor DARC pada retikulosit berikatan dengan ligan PvDBP II pada *P. vivax* (Gambar 2.5.3 (2)). *Critical binding motif* pada PvDBP *region* II yang penting untuk berikatan dengan DARC terdiri atas 170 asam amino, terbentang antara sistein 4 dan 7 (asam amino 291–460) (Ranjan & Chitnis 1999: 14072). *Duffy antigen/receptor for chemokines* (DARC) adalah kelompok antigen pada

permukaan sel eritrosit dan retikulosit yang berfungsi sebagai reseptor untuk *chemokines*. Studi populasi pada *Duffy blood group* menunjukkan adanya individu Duffy-positif (Fy^a atau Fy^b) dan Duffy-negatif (Fy^{a-} atau Fy^{b-}). Populasi individu dengan Duffy-negatif banyak ditemukan di benua Afrika. *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein* (PvDBP) hanya mampu berikatan dengan retikulosit Duffy-positif. Individu dengan retikulosit Duffy-negatif memiliki kekebalan terhadap *P. vivax*, meskipun laporan terkini menunjukkan adanya infeksi *P. vivax* pada individu Duffy-negatif di Madagaskar (Chitnis & Miller 1994: 504; Menard *dkk.* 2010: 5967).



Gambar 2.5.3.(2). Ikatan antara PvDBP II dan DARC

[Sumber: Beeson & Crabb 2007: 1863. Telah diolah kembali.]

2.6 Rekonstruksi pohon filogenetik

Hubungan kekerabatan dan hubungan evolusi antar organisme dapat digambarkan melalui pohon filogenetik. Tujuan dari mempelajari pohon filogenetik adalah merekonstruksi *genealogical ties* (silsilah) antar organisme dan menentukan waktu evolusi dari suatu organisme. Pohon filogenetik adalah suatu grafik yang terdiri atas cabang dan nodus. Dua nodus yang berdekatan dihubungkan dengan satu cabang. Nodus merepresentasikan unit taksonomi, sedangkan cabang merepresentasikan hubungan antar unit taksonomi. Pola percabangan pada pohon filogenetik disebut topologi. Panjang pada suatu cabang merepresentasikan perbedaan pada cabang tersebut. Unit taksonomi dapat berupa spesies, populasi, individu, atau gen (Li 1997: 100).

Pohon filogenetik dapat direkonstruksi dengan menggunakan beberapa metode statistik. Salah satu metode statistik yang umum digunakan adalah *Bayesian methods*. *Bayesian methods* adalah suatu metode rekonstruksi pohon filogenetik yang menggunakan *optimality criterion* (standar optimal). Metode tersebut memiliki konsep yang sama dengan *likelihood methods*, yaitu menggunakan *probability distribution of tree* untuk mencari pohon filogenetik yang paling tepat dari sekuen data yang digunakan. Posisi setiap sekuen pada *aligned sequences* disebut “*character*”, sedangkan nukleotida disebut “*states*” pada *bayesian methods*. Posisi seluruh “*character*” dianalisis secara mandiri atau terpisah satu sama lain, sehingga setiap *alignment column* diasumsikan sebagai realisasi mandiri pada proses evolusi. *Bayesian methods* memungkinkan peneliti untuk menentukan sendiri model parameter seperti model substitusi, panjang cabang, dan topologi pohon (Vandamme 2009: 24 & 27).

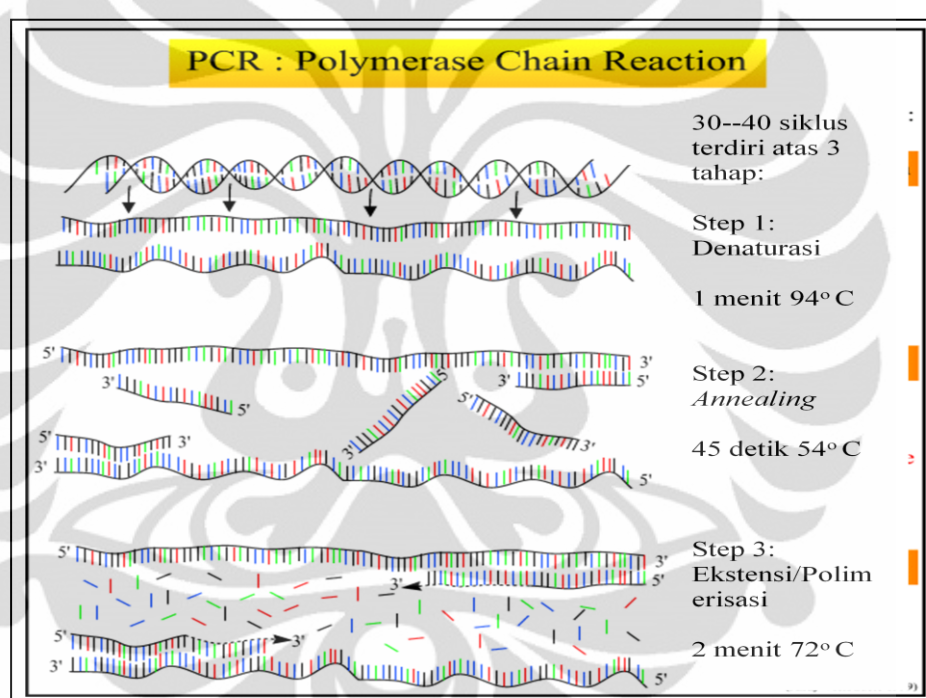
2.7 Teknik-teknik biologi molekuler pada studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II

2.7.1 Isolasi DNA dari kertas saring menggunakan metode Chelex-100™

Isolasi DNA yang dilakukan dengan metode Chelex-100™ telah banyak digunakan untuk mengisolasi DNA dari spesimen forensik, spesimen berformalin, jaringan yang direndam dalam parafin, darah pada kertas saring, dan kultur sel. Chelex-100™ adalah resin pengkelat dengan afinitas yang tinggi terhadap ion besi multivalen. Resin tersebut berikatan dengan ion-ion sehingga terbentuk DNA bebas ion, melindungi dari kerusakan DNA pada suhu tinggi, dan menghilangkan inhibitor *Taq* polimerase. Isolasi DNA dengan Chelex-100™ tidak membutuhkan penghilangan *buffy coat* dan dapat menggunakan darah kering sebagai sumber DNA. Faktor-faktor tersebut membuat Chelex-100™ menjadi metode Isolasi DNA yang tidak membutuhkan banyak reagen dan sampel, mudah dilakukan, hemat biaya, dan *non-toxic* (Polski *dkk.* 1998: 215–217).

2.7.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik perbanyakan (amplifikasi) sekuen DNA kopi tunggal secara *in vitro* yang berlangsung secara cepat, dengan menggunakan DNA polimerase I (Sambrook & Russell 2001b: 8.4). Komponen-komponen utama yang diperlukan dalam reaksi PCR adalah DNA polimerase (*Taq DNA polymerase*), primer, dNTPs, kation bivalen, *buffer*, DNA *template*, dan ddH₂O (*Aquabides sterille*).



Gambar 2.7.2. Siklus PCR

[Sumber: Vierstraete 1999: 1. Telah diolah kembali.]

Siklus PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi (Gambar 2.7.2). Denaturasi adalah tahap pemisahan DNA *double helix* menjadi *single helix*. Tahap tersebut berlangsung pada suhu 94—95° C. Suhu denaturasi ditentukan oleh jumlah basa G+C pada DNA *template*. Semakin banyak jumlah basa G+C, semakin tinggi suhu denaturasi (Sambrook & Russell 2001b: 8.8). Tahap berikutnya adalah *annealing* atau pelekatan primer. Suhu pada tahap tersebut berkisar antara 50—70° C. Produk dari setiap siklus berperan

sebagai DNA *template* bagi siklus berikutnya. Tahap terakhir adalah polimerisasi, yaitu proses sintesis DNA rantai baru oleh *Taq* polimerase. Suhu pada tahap tersebut adalah 70—78° C (Brown 1999: 20; Strachan & Read 1999: 19; Sambrook & Russell 2001b: 8.8—8.9).

Nested PCR merupakan suatu variasi metode PCR, yang menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi satu fragmen gen. Pasangan primer pertama akan mengamplifikasi fragmen gen target seperti pada reaksi PCR standar. Pasangan primer kedua (*nested primer*) akan berikatan dengan produk hasil PCR yang pertama (1st *nest*) dan menghasilkan produk PCR kedua yang lebih pendek dari produk PCR yang pertama. Keunggulan dari *nested PCR* adalah tingkat spesifikasi hasil PCR yang lebih tinggi dari PCR standar (Davidson College 2002: 1).

2.7.3 Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik pengukuran laju migrasi molekul bermuatan pada medium padat di dalam medium cair berarus listrik. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mempurifikasi fragmen DNA. Kecepatan migrasi suatu partikel dipengaruhi oleh muatan listrik dan bentuk partikel. Molekul DNA bermuatan negatif karena memiliki gugus fosfat, sehingga molekul DNA akan bermigrasi ke elektroda positif. Lokasi fragmen DNA dapat diidentifikasi dengan mudah karena adanya *low concentration fluorescent intercalating dyes*, seperti etidium bromida atau SYBR Gold. Pita DNA yang berikatan dengan perwarna tersebut dapat berpendar di bawah sinar UV. Medium padat yang digunakan dalam elektroforesis adalah gel agarosa dan gel poliakrilamid. Fragmen DNA dari ukuran 50 bp hingga beberapa mega dapat dipisahkan dengan gel agarosa (Klug & Cummings 1994: A-6; Brown 1999: 43; Sambrook & Russell 2001a: 5.2; Albert *dkk.* 2008a: 534).

2.7.4 *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) merupakan suatu metode molekuler yang digunakan dalam analisis genetika berdasarkan polimorfisme pada situs pemotongan enzim restriksi. Mutasi menyebabkan perubahan pada situs pemotongan enzim restriksi, sehingga enzim tidak dapat mengenali situs pemotongan. Mutasi juga dapat membuat situs pemotongan yang baru. Mutasi tersebut menyebabkan variasi pada panjang fragmen DNA yang dihasilkan dari proses pemotongan enzim restriksi. Fragmen DNA hasil RFLP dapat divisualisasi dengan gel elektroforesis. Metode RFLP dapat digunakan dalam pemetaan genetik (*genetic map*) (Snustad *dkk.* 1997: 503)

2.7.5 Pengklonaan DNA rekombinan

2.7.5.1 Plasmid sebagai vektor pengklonaan

Bakteri memiliki kromosom tambahan yang disebut plasmid. Plasmid umumnya berbentuk DNA sirkular utas ganda (Snyder & Champness 1997: 105). Replikasi plasmid tidak diatur oleh kromosom, karena plasmid memiliki titik *ori* (*origin of replication*) yang menyebabkan plasmid dapat bereplikasi secara mandiri. Plasmid digunakan dalam bidang biologi molekuler, salah satunya berperan sebagai vektor pada proses pengklonaan (Snyder & Champness 1997: 105). Plasmid berperan sebagai vektor dengan membawa gen target ke dalam sel bakteri. Vektor yang baik memiliki beberapa kriteria, di antaranya harus mampu bereplikasi secara mandiri, berukuran kecil, tidak membahayakan hidup sel inang, memiliki jumlah kopi yang banyak, memiliki situs pemotongan enzim restriksi, harus memiliki marka genetik, dan mudah dipanen dari sel inang (Klug & Cummings 1994: 386; Snyder & Champness 1997: 124).

2.7.5.2 Transformasi

Pengklonaan adalah proses penggabungan gen eukariot dengan DNA bakteri (plasmid) atau DNA virus menjadi DNA rekombinan dan memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel inang (bakteri). Molekul rekombinan masuk ke dalam sel bakteri melalui peristiwa transformasi. Koloni bakteri yang identik disebut klon (Griffiths *dkk.* 1996: 416).

Transformasi adalah proses masuknya DNA bebas dari lingkungan ke dalam sel bakteri. Istilah sel yang menerima atau memasukkan DNA bebas adalah transforman. Sebagian besar sel bakteri tidak dapat memasukkan DNA bebas ke dalam selnya, kecuali sel-sel tersebut terpapar oleh bahan kimia khusus atau diberi perlakuan listrik yang membuat sel lebih permeabel (Snyder & Champness 1997: 124).

2.7.5.3 Penapisan

Penapisan (*screening*) adalah proses identifikasi sel bakteri yang memiliki DNA rekombinan dengan yang tidak membawa DNA rekombinan. Penapisan dilakukan dengan cara menginaktivasi kerja dari marka genetik. Inaktivasi marka genetik terjadi karena adanya sisipan gen target pada vektor (*insertional inactivation*). Marka genetik meliputi gen resistan antibiotik, marka histokimia yang memberikan warna pada koloni dengan DNA rekombinan, dan marka nutrisi yang memungkinkan koloni dengan DNA rekombinan tumbuh pada medium yang tidak mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh sel inang (Brown 1999: 53; Strachan & Read 1999: 81).

Dua marka genetik yang umum digunakan adalah gen resistan antibiotik dan gen *lacZ* (*β -galactosidase gene complementation*). Gen resistan antibiotik pada plasmid membuat sel inang yang memiliki DNA rekombinan dapat tumbuh pada medium yang mengandung antibiotik. Marka genetik, gen *lacZ* membuat koloni sel inang yang memiliki DNA rekombinan akan berwarna putih pada medium yang mengandung X-gal, sedangkan yang tidak memiliki DNA rekombinan akan berwarna biru (Strachan & Read 1999: 81).

2.7.6 Sequencing

The chain termination method pertama kali diperkenalkan oleh Sanger pada pertengahan tahun 1970 (Brown 1999: 61—62). Prinsip dasar dari metode Sanger adalah memisahkan molekul DNA utas tunggal yang hanya berbeda satu nukleotida dengan molekul DNA utas tunggal yang lain pada gel poliakrilamid. Komponen-komponen yang diperlukan dalam proses *sequencing* adalah primer yang dapat menempel dengan DNA *template* dan mengawali proses polimerisasi rantai DNA baru. Enzim DNA polimerase yang mengkatalisis proses sintesis rantai DNA baru. *Building block* (bahan dasar) untuk proses sintesis berupa empat molekul dNTPs (*deoxynucleotide*) dan empat molekul ddNTPs (*dideoxynucleotide*) (Brown 1999: 60). Setiap molekul ddNTPs digabungkan dengan *fluorophore* (zat kimia yang dapat memberikan warna). *Fluorophore* akan diterjemahkan menjadi warna-warna yang berbeda. Warna dari ddATP adalah hijau, ddCTP adalah biru, ddGTP adalah hitam, dan ddTTP adalah merah (Brown 1999: 68).

Template yang dibutuhkan untuk proses *chain termination* adalah DNA utas tunggal. Hasil pengklonaan yang berupa DNA utas ganda dapat digunakan sebagai *template*, namun menghasilkan kualitas *sequencing* yang buruk. Untai DNA utas tunggal dapat dihasilkan dengan cara mendenaturasi DNA dengan larutan alkali atau pemanasan, pengklonaan DNA dengan vektor M13 atau *fagemid*, dan *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* adalah reaksi PCR yang menghasilkan DNA linear utas tunggal. Proses tersebut tidak berbeda jauh dengan reaksi PCR dasar, yaitu membutuhkan *thermostable* DNA polimerase dan format suhu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. Perbedaan dengan reaksi PCR dasar adalah primer yang dibutuhkan hanya satu, baik *forward* maupun *reverse* (Strachan & Read 1999: 133).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Malaria II Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Diponegoro 69, Jakarta, Indonesia. Penelitian dilaksanakan selama enam bulan, mulai dari bulan November 2010 hingga Mei 2011.

3.2 Alat, bahan, dan cara kerja

3.2.1 Alat

Tabung sentrifus 0,2 ml; 0,5 ml [MBP] dan 1,5 ml [Axygen]; mikropipet 10; 100; 250 μ l [Eppendorf] dan 20 μ l [BioHit]; tip kuning; biru [LP ITALIANA SPA] dan putih [Axygen]; rak tabung [ART]; tisu [Nice]; marka DNA [NEB]; boks es; botol semprot alkohol 500 ml [Hawaii]; sentrifus [Heraeus Biofuge Pico] dan [Tomy Micro One]; mesin vorteks [Thermolyne 37600]; PCR *ice box* [Eppendorf]; sarung tangan [Protos]; aparatus elektroforesis [Bio-RAD]; pengatur tegangan listrik [Bio-RAD]; mesin *Gel Doc* 100 [Bio-RAD]; printer [Mitsubishi P93D]; *thermal cycler* [GeneAmp[®] PCR System 9700]; parafilm [American National Can]; *heater* [ESMC 1500 A]; Erlenmeyer 250 dan 1.000 ml [Schott Duran]; cawan petri; mesin *sequencing* [Applied Biosystem 3130XL]; tusuk gigi; timbangan digital [Sartorius]; gelas ukur 100 dan 500 ml [Pyrex]; timer [Hoseki]; microwave [Panasonic]; lemari pendingin [Sanyo]; *plastic wrap* [KlinPak]; nano drop spektrofotometer [Thermo scientific NanoDrop 2000]; & program komputer Quantity[®] One Analysis Software.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Sampel

Sampel dikumpulkan dari pasien anak-anak, wanita hamil, pria, dan wanita dewasa di Rumah Sakit Mitra Masyarakat (RSMM), Kabupaten Mimika, Papua. Sampel telah dikoleksi dari tahun 2006—2008 dalam bentuk tetesan darah pada kertas saring. Label untuk sampel yang berasal dari wanita hamil adalah *Pregnancy-Associated Vivax* (PAV), sedangkan label untuk sampel yang berasal dari anak-anak, pria dewasa, dan wanita yang tidak hamil adalah *Non Pregnant-Infected Vivax* (NPV). Jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah 10 sampel NPV dan 2 sampel PAV.

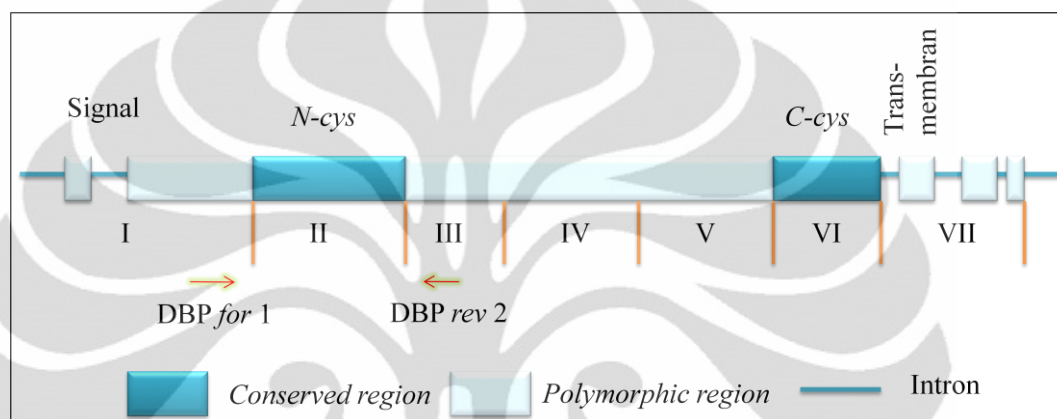
3.2.2.2 Bahan kimia

Saponin 0,5% [SIGMA] dalam PBS; PBS pH 10,5; Chelex-100™ 20% [SIGMA]; QIAquick gel extraction kit [QIAGEN]; cawan petri; QIAprep spin miniprep kit [QIAGEN]; ddH₂O; 10x PCR buffer [NEB]; 10 mM dNTPs [PROMEGA]; 50 mM MgCl₂ [MERCK]; Big Dye buffer [Applied Biosystem]; 125 mM pH 8 EDTA [Analar]; 3 M pH 5,2 sodium asetat [MERCK]; etanol 100%; 70%; primer DBP *for* 1, DBP *for* 2, dan *rev* 2 [First Base]; 40 pmol/μl primer M13F dan M13R [Invitrogen]; bubuk agarosa [Sea-Kem LE]; TBE buffer; 10 mg/ml ethidium bromide [SIGMA]; loading buffer; 500 μg/ml 1 kb dan 100 bp DNA Ladder [NEB]; 5.000 u/ml Taq DNA polimerase [NEB]; isopropanol 100%; TOPO TA Cloning® Kits [Invitrogen]; 100 mg/ml ampisilin [Schering-Plough]; & 100 mg/ml X-gal [GibcoBRL].

3.2.2.3 Primer

Amplifikasi gen pengkode PvDBP II mengadaptasi metode Xianli *dkk.* (2003: 2509) dengan beberapa modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah desain primer dan teknik PCR. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah

DBP *forward* 1 dan *reverse* 2, yang mengagipit gen pengkode PvDBP II pada posisi nukleotida 788—2004 ($\pm 1,2$ kb) (Gambar 3.2.2.3 (1)). Primer DBP *for* 1 dan *rev* 2 dirancang untuk dapat mencakup seluruh gen pengkode PvDBP II, sehingga didapat sekuen PvDBP II yang lengkap (Gambar 3.2.2.3 (2)). Teknik PCR yang digunakan adalah teknik PCR dasar, bukan *nested* PCR seperti yang dilakukan oleh Xianli *dkk* (2003: 2509).



Gambar 3.2.2.3.(1). Bagan strategi PCR gen pengkode PvDBP II

[Sumber: Gosi *dkk*. 2008: 151. Telah diolah kembali.]

3.2.3 Cara kerja

3.2.3.1 Isolasi DNA dari kertas saring dengan metode Chelex-100™

Isolasi DNA dengan metode Chelex-100™ diadaptasi dan dimodifikasi dari Polski *dkk*. (1998: 215) dan Wooden *dkk*. (1993: 303). Darah pasien diambil dari pembuluh vena, kemudian darah diteteskan pada kertas saring (± 200 μ l). Tetesan darah dikeringkan dalam suhu ruang (22 — 23° C). Satu tetes darah yang telah kering digunting menjadi potongan kecil dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml. Saponin 0,5% dalam PBS ditambahkan ke dalam tabung. Larutan dihomogenkan, kemudian diinkubasi *overnight* di dalam lemari pendingin.

Tabung kemudian disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 12.000 rpm dan supernatan yang berwarna merah dibuang. Satu ml PBS

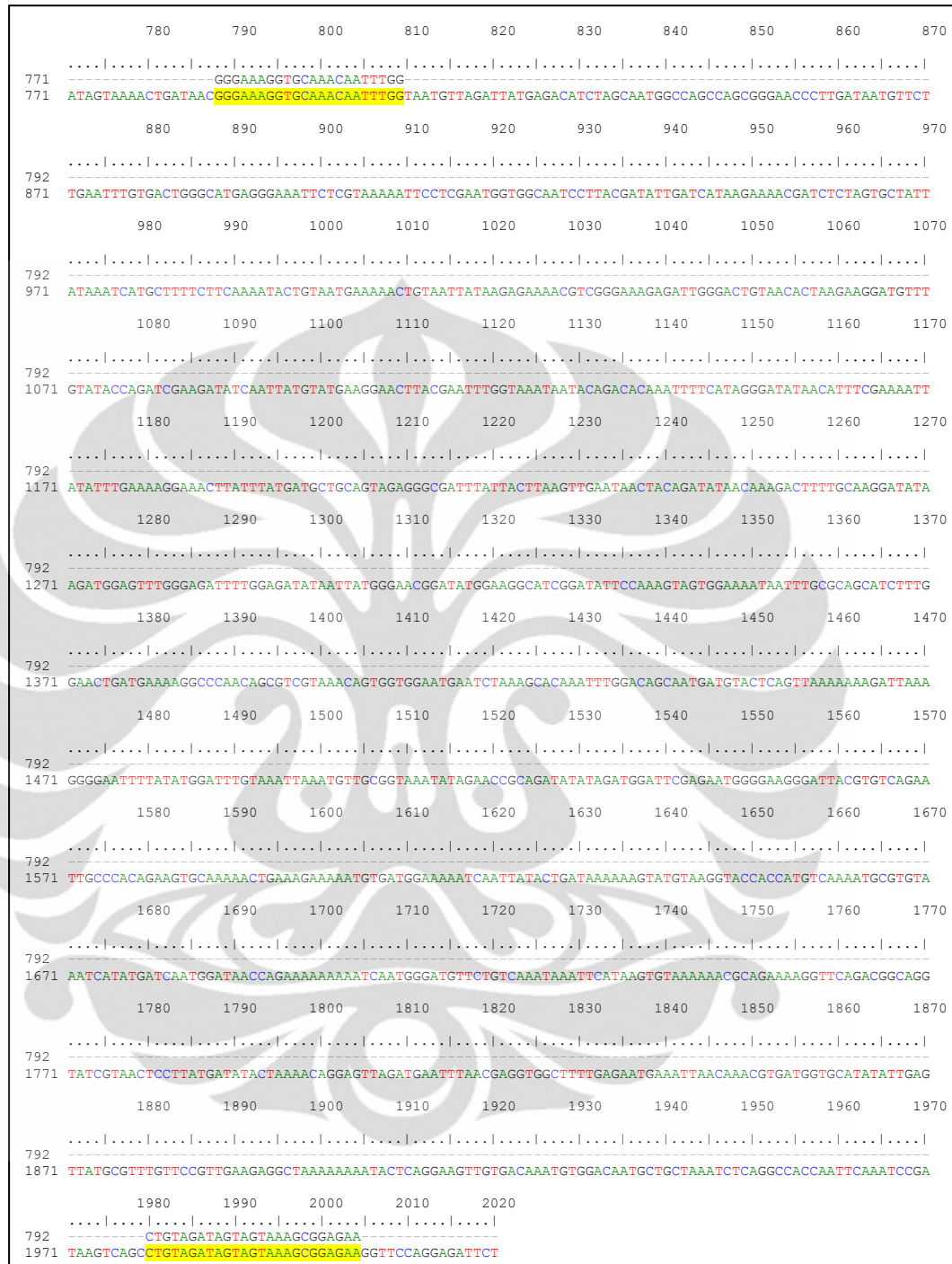
ditambahkan ke dalam tabung lalu disentrifugasi selama 1 menit, dengan kecepatan 4.000 rpm dan supernatan dibuang. Satu ml PBS ditambahkan kembali, larutan dihomogenkan, kemudian disentrifugasi selama 5 detik pada kecepatan 4.000 rpm dan supernatan dibuang. Langkah tersebut diulang satu kali lagi.

Larutan ditambahkan 150 μ l ddH₂O dan 150 μ l larutan Chelex-100™ 20%. Tabung diinkubasi di dalam air mendidih (100° C) selama 8 menit. Tabung kemudian disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 12.000 rpm dan supernatan yang berisi DNA dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml yang baru. Hasil isolasi DNA disimpan dalam suhu -20° C. Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan mesin nanodrop spektrofotometer.

3.2.3.2 Amplifikasi gen pengkode PvDBP II

Kondisi PCR gen pengkode PvDBP II diadopsi dari Xainli *dkk.* (2003: 2509). *Master mix* terdiri atas ddH₂O, 1x NEB *buffer*, 0,2 mM dNTPs, 0,4 pmol/ μ l primer DBP *for* 1, 0,4 pmol/ μ l DBP *rev* 2, 1 u/ μ l enzim NEB *Taq* polimerase, dan 1,6—2,4 ng DNA *template*. Total volume *master mix* adalah 25 μ l. *Master mix* kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR. Selanjutnya tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* dan diatur tahap-tahap PCR (Lampiran 7).

Produk PCR gen pengkode PvDBP II sebanyak 6 μ l dicampur dengan 6x *loading buffer*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Hal yang sama dilakukan untuk kontrol negatif, positif, dan marka 1kb DNA Ladder. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 1%, proses dijalankan pada 60 V selama 70 menit. Pita DNA pada gel agarosa divisualisasikan dengan mesin *Gel Doc*.



Gambar 3.2.2.3.(2). Strategi PCR pada sekuen gen pengkode PvDBP II

[Sumber: NCBI 1995: 1. Telah diolah kembali.]

3.2.3.3 Purifikasi hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II (*gel cutting*)

Proses purifikasi mengikuti metode dari QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 2002: 23—24). Produk PCR dicampur dengan 7 μ l *loading buffer*,

Universitas Indonesia

kemudian dimasukkan ke dalam sumur. Elektroforesis dijalankan selama 50 menit, pada 70 V dengan konsentrasi gel agarosa sebesar 0,8%. Hasil elektroforesis divisualisasikan dalam mesin *Gel Doc* dan gel agarosa dipotong dengan pisau pemotong pada pita DNA dengan ukuran 1,2 kb. Potongan gel dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml. Berat potongan gel ditentukan berdasarkan selisih antara berat tabung berisi gel dan berat tabung kosong. *Buffer* QG ditambahkan sebanyak 3x volume gel (500 µl). Tabung diinkubasi pada suhu 42° C selama 10 menit atau sampai seluruh gel larut.

Isopropanol 100% ditambahkan sebanyak 1x volume gel (500 µl) ke dalam tabung. Sampel dipindahkan ke dalam *QIAquick column* di dalam 2 ml *collection tube*, sebanyak 700 µl. *QIAquick column* disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Sisa sampel (300 µl) dipindahkan ke dalam *QIAquick column*, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm dan supernatan dibuang kembali.

Buffer QG ditambah sebanyak 750 µl dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. *Buffer* PE ditambahkan sebanyak 750 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dan supernatan dibuang. *QIAquick column* dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru. Tris-EDTA hangat ditambahkan sebanyak 30 µl ke bagian tengah *column*. Sampel didiamkan selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Sampel di dalam tabung 1,5 ml siap digunakan dan disimpan pada suhu -20° C.

Sampel sebanyak 6 µl dan 3 µl *loading buffer* dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Elektroforesis dijalankan selama 50 menit pada 70 V dan konsentrasi gel 0,8%. Hasil elektroforesis divisualisasi pada mesin *Gel Doc*.

3.2.3.4 Pengklonaan gen pengkode PvDBP II

Pengklonaan dilakukan dengan mengikuti prosedur dari TOPO TA *Cloning*[®] (Invitrogen 2006: 5—10). Vektor yang digunakan adalah pCR[®]2.1-TOPO[®] dan sel inang atau sel kompeten yang digunakan adalah *E. coli* strain TOP10. *Master mix* untuk reaksi pengklonaan dengan TOPO[®] terdiri atas 4,6 ng

produk PCR, 0,4 M NaCl dan 0,02 M MgCl₂ sebagai larutan garam, dan 5 ng vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]. Total volume *master mix* adalah 3 µl. *Master mix* di dalam tabung, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (22—23° C).

Tabung One Shot[®] yang berisi sel *E. coli* kompeten dicairkan untuk proses transformasi. Sel *E. coli* kompeten sebanyak 25 µl ditambahkan ke dalam tabung yang berisi *master mix*. Campuran diinkubasi dalam es selama 30 menit. Sel *E. coli* kemudian diberi perlakuan panas (*heat-shock*) selama 30 detik, pada suhu 42° C dan langsung dipindahkan ke dalam es. Medium SOC ditambahkan sebanyak 125 µl. Tabung ditutup dengan rapat dan dihomogenkan (*shake*) secara horizontal pada suhu 37° C selama 1 jam dengan kecepatan 200 rpm. Medium LB padat yang mengandung ampisilin (Lampiran 3) ditambahkan X-gal dengan konsentrasi akhir 40—50 µg/ml. Campuran yang berisi transforman disebar sebanyak 50—100 µl di atas medium LB padat dan diinkubasi *overnight* pada suhu 37° C.

3.2.3.5 Pemeriksaan hasil pengklonaan

Identifikasi hasil pengklonaan dilakukan dengan metode PCR. Koloni yang berwarna putih dipilih untuk pemeriksaan menggunakan primer M13F dan M13R. *Master mix* dibuat dengan volume total 25 µl, yang terdiri atas 1x PCR *buffer*, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 pmol/µl primer M13F, 0,4 pmol/µl M13R, 0,5 u/µl *Taq* polimerase, ddH₂O, dan 5 µl suspensi koloni putih didalam ddH₂O sebagai *template*. *Master mix* didistribusikan ke dalam tabung PCR. Tabung PCR kemudian ditempatkan ke dalam mesin PCR dan diatur tahap-tahap PCR (Lampiran 7). Hasil PCR divisualisasi dalam gel agarosa 1%. Elektroforesis dijalankan pada 90 V selama 30 hingga 45 menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran ± 1,4 kb.

3.2.3.6 Isolasi plasmid

Plasmid dari klon yang mengandung DNA gen target diisolasi dengan menggunakan metode isolasi plasmid dari QIAprep *Spin Miniprep Kit* (Qiagen

2005: 22—23). Sel bakteri yang telah dikultur pada medium LB cair selama semalam (\pm 16 jam) pada suhu 37° C, kemudian dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 3 menit di suhu ruang (15—25° C). Pelet sel bakteri disuspensikan kembali dalam 250 μ l *buffer* P1, kemudian ditransfer ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml. *Buffer* P2 ditambahkan sebanyak 250 μ l ke dalam tabung dan dibolak-balik selama 4—6 kali. *Buffer* N3 ditambahkan sebanyak 350 μ l dan dibolak-balik kembali sebanyak 4—6 kali.

Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dipindahkan kedalam *QIAprep spin column* dengan pipet. *QIAprep spin column* disentrifugasi selama 30—60 detik, dan supernatan dibuang. *QIAprep spin column* dicuci dengan *buffer* PB sebanyak 0,5 ml, disentrifugasi selama 30—60 detik kemudian supernatan dibuang. *QIAprep spin column* dicuci kembali dengan *buffer* PE sebanyak 0,75 ml dan disentrifugasi selama 30—60 detik. Supernatan dibuang dan disentrifugasi sekali lagi selama 1 menit. *QIAprep spin column* dipindahkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang baru. *Buffer* EB ditambahkan sebanyak 50 μ l ke bagian tengah *column* untuk melarutkan DNA. Sampel didiamkan selama 1 menit dan disentrifugasi selama 1 menit. Sampel di dalam tabung 1,5 ml siap digunakan.

3.2.3.7 *Cycle sequencing*

Cycle sequencing dilakukan dengan mengikuti metode dari Applied Biosystems (2000: 3.27). *Master mix cycle sequencing* dibuat dengan total volume 15 μ l, terdiri atas 6 μ l *Big Dye buffer*, 0,3 pmol/ μ l primer *DBP for 1* atau *DBP for 2*, 125 ng DNA rekombinan sebagai *template*, dan ddH₂O. *Master mix* kemudian didistribusikan ke setiap tabung PCR. Tabung kemudian ditempatkan ke dalam mesin PCR dan diatur tahap-tahap PCR (Lampiran 7).

3.2.3.8 *Sequencing*

Sequencing dilakukan dengan menggunakan metode yang dimodifikasi dari Applied Biosystems (2000: 3.41 & 3.53). Sampel hasil amplifikasi PCR

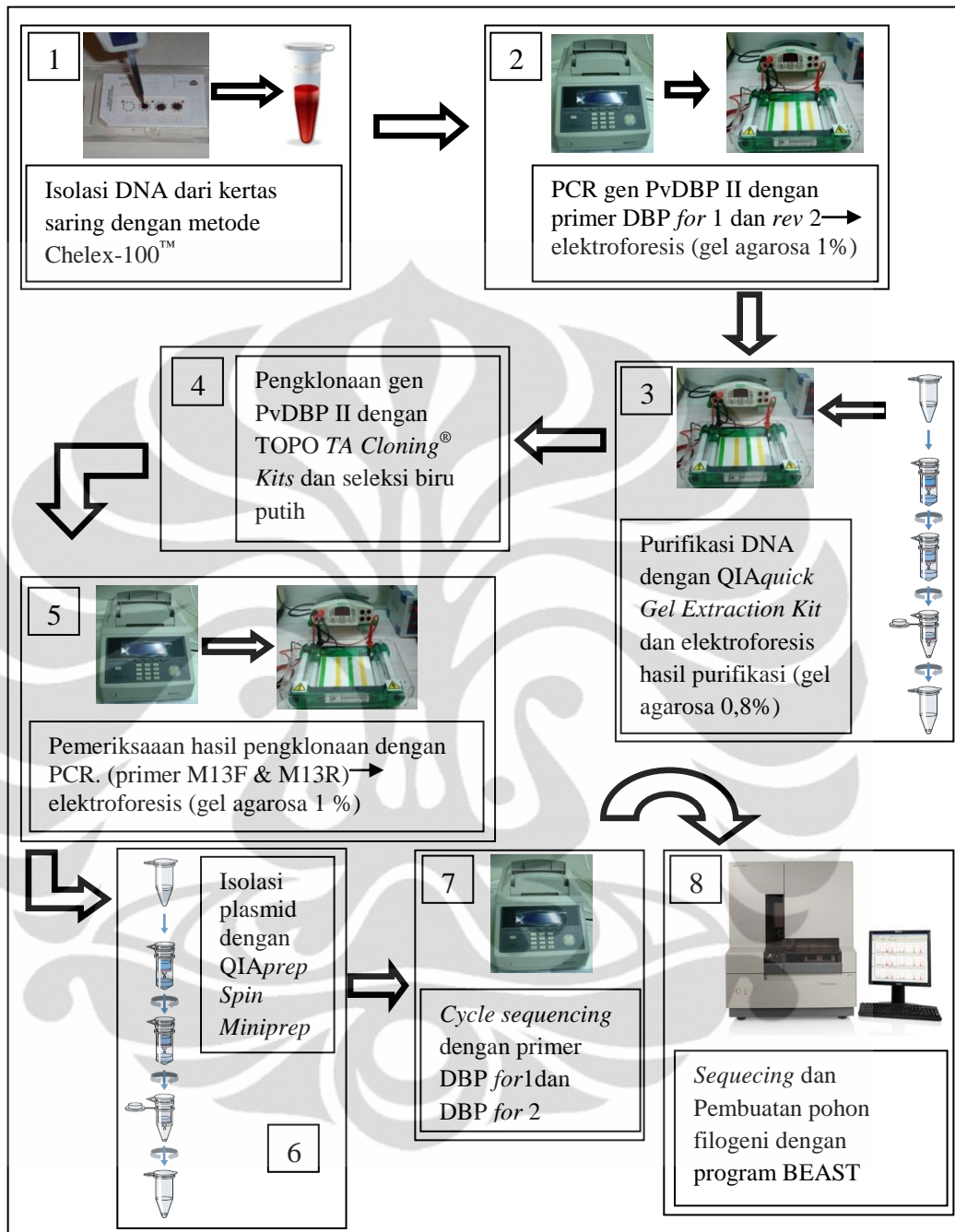
cycle sequencing dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 1,5 ml. Sampel selanjutnya ditambahkan 3,4 mM EDTA, 0,08 M sodium asetat, dan etanol dingin $\pm 70\%$. Tabung kemudian divorteks dan diinkubasi selama 10 menit dalam es.

Tabung disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan etanol dingin 70% ditambahkan dalam tabung tersebut. Tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet pada tabung dikeringkan dengan mesin vakum DNA selama 10 menit. Sampel kemudian dibungkus aluminium foil untuk disequencing dengan mesin ABI Prism 3130XL Automated DNA Sequencer. Skema umum cara kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2.3.8.

3.3 Penyusunan, pengolahan, dan analisis data

Hasil *sequencing* dari primer DBP *for 1* dan *for 2* kemudian digabungkan menjadi satu *contig* dengan program komputer DNA Baser v3 [Heracle BioSoft] (Gambar 3.3.). *Contig* yang diperoleh lalu diedit dan di-*align* dengan program komputer CrustalW Multiple Alignment pada BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999: 95). Hasil *sequencing* yang telah diedit dan di-*align*, kemudian ditranslasikan menjadi asam amino pada program BioEdit. Sekuen isolat Indonesia lalu dibandingkan dengan sekuen acuan, yaitu strain *P. vivax* Sal-I untuk mengetahui jenis mutasi yang terjadi pada isolat Indonesia.

Sekuen isolat dari beberapa negara, seperti Papua New Guinea, Kolombia, Thailand, Vietnam, India, Korea Selatan, Korea Utara, Brazil, Indonesia, Iran, Honduras, Mauritania, Amerika, Sri Lanka, dan Bangladesh digabungkan dengan isolat Indonesia dan di-*align* bersama. Isolat dari negara lain diambil dari www.ncbi.nlm.nih.gov. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode Bayesian pada program komputer BEAST v1.6.1. untuk mendapatkan gambaran keragaman *P. vivax* dari Indonesia dan hubungan kekerabatan isolat Indonesia dengan negara-negara lain (Drummond & Rambaut 2007: 215). Pohon filogenetik dapat dilihat dengan program komputer FigTree v1.3.1.



Gambar 3.2.3.8. Skema umum cara kerja penelitian

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Tes diagnostik cepat (*Rapid Diagnostic Test*)

Uji mikroskopik ulasan darah tebal dan tipis dengan pewarna Giemsa dan tes diagnostik cepat (*Rapid Diagnostic Test*) dilakukan terhadap sampel darah pasien. Kedua tes tersebut dikerjakan oleh peneliti lapangan di Kabupaten Mimika. Uji mikroskopik dilakukan untuk menentukan tingkat parasitemia pasien dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi merozoit *P. vivax* per 200 μ l darah. Tes diagnostik cepat dilakukan untuk mengetahui spesies parasit yang menginfeksi pasien dengan menggunakan Malaria strip.

Malaria strip menggunakan antibodi monoklonal terhadap *Histidin-rich protein 2* (HRP2) untuk mendeteksi *P. falciparum* dan antibodi monoklonal terhadap *parasite lactate dehidrogenase* (pLDH) untuk mendeteksi *P. vivax* (WHO 2009b: 13). Sampel yang terinfeksi *P. vivax* tunggal akan menunjukkan dua pita yang spesifik pada Malaria strip. Tes diagnostik cepat mudah dilakukan dan dikerjakan dalam waktu singkat (15—20 menit) (Moody 2002: 71 & 75). Walaupun tes tersebut dapat dikerjakan dalam waktu singkat, namun uji mikroskopik tetap menjadi *gold standard* pada penelitian lapangan (Moody 2002: 75; Boonma *dkk.* 2007: 129). Berdasarkan hasil uji mikroskopik dan tes diagnostik cepat, terdapat 98 sampel darah terinfeksi *P. vivax*. Tiga sampel kemudian diketahui tidak ada pada *database*, karena terjadi kesalahan pencatatan.

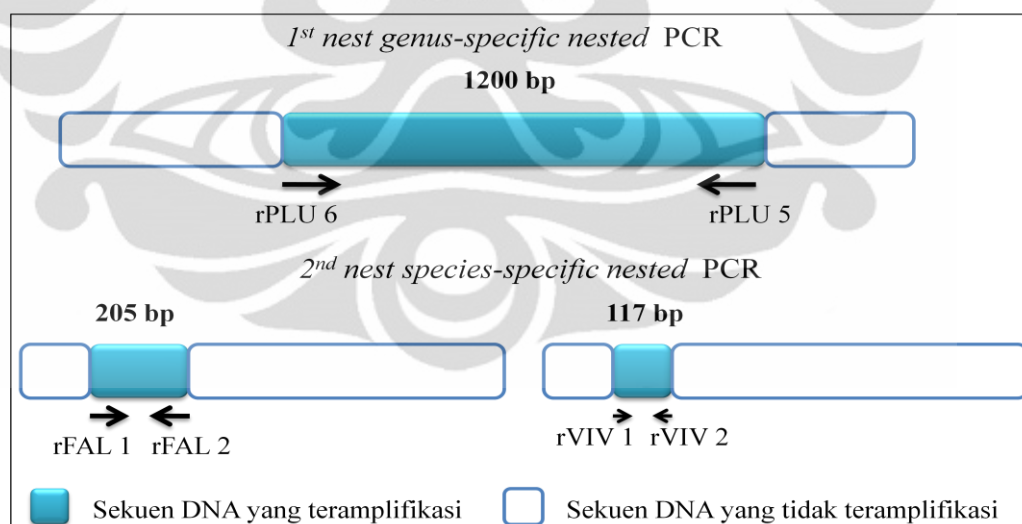
4.2. Hasil Isolasi DNA genom *P. vivax* dengan metode Chelex-100™ dan hasil *genus and species-specific nested PCR*

Sampel darah dikoleksi dalam bentuk tetesan darah kering pada kertas saring. Metode tersebut mudah dilakukan pada pengambilan sampel di lapangan dan memudahkan penyimpanan sampel. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Chelex-100™ untuk mendapatkan DNA parasit. Hasil isolasi berupa larutan tanpa warna dan tanpa endapan, dengan konsentrasi DNA sebesar

1,6—2,4 ng. Hasil isolasi dapat disimpan selama 6 bulan dan dapat digunakan sebagai *template* pada reaksi PCR (Wooden *dkk.* 1993: 303).

Hasil isolasi DNA digunakan sebagai *template* pada reaksi *nested* PCR di Laboratorium Malaria II. *Nested* PCR merupakan suatu metode deteksi yang spesifik dan sangat sensitif dalam menentukan spesies parasit yang menginfeksi pasien. Metode tersebut dapat digunakan pada sampel dengan tingkat parasitemia yang rendah dan dapat menentukan adanya *mixed infection* (Snounou *dkk.* 1993: 320).

Konfirmasi spesies yang menginfeksi pasien dilakukan dengan mengamplifikasi gen *small subunit ribosomal RNA* (*ssu rRNA*). *Region* yang spesifik terhadap spesies parasit malaria, banyak ditemukan pada gen *ssu rRNA*. Hal tersebut membuat gen *ssu rRNA* digunakan sebagai pembeda spesies parasit. Uji dengan *ssu rRNA* adalah uji yang sederhana, relatif murah, faktor kesalahan relatif kecil, dan dapat diaplikasikan untuk diagnosis infeksi non-viral (Waters & McCutchan 1989: 1344 & 1346).



Gambar 4.2. Strategi *genus and species-specific nested* PCR

[Sumber: Snounou *dkk.* 1993: 316. Telah diolah kembali.]

Optimasi primer dan kondisi *nested* PCR sesuai dengan Snounou *dkk.* (1993: 316). Tiga pasang primer yang digunakan dalam reaksi *nested* PCR adalah rPLU 5 dan 6, rFAL 1 dan 2, serta rVIV 1 dan 2. Primer rPLU 5 dan 6 digunakan

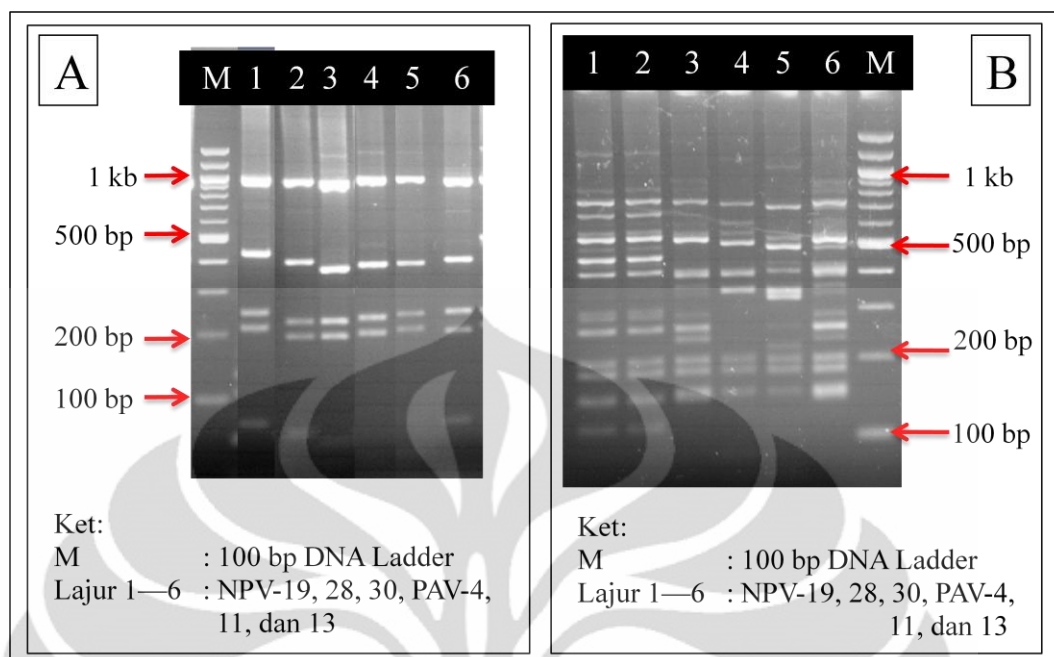
pada *nest* pertama. Pita DNA dari hasil *nest* pertama berukuran 1,2 kb. Hasil tersebut kemudian digunakan sebagai *template* pada *nest* kedua dengan primer rFAL 1 dan 2 serta rVIV 1 dan 2. Primer rFAL 1 dan 2 mengamplifikasi gen *ssu rRNA* pada *P. falciparum* dan menghasilkan pita DNA berukuran 205 bp, sedangkan primer rVIV 1 dan 2 mengamplifikasi gen *ssu rRNA* pada *P. vivax* dan menghasilkan pita DNA berukuran 117 bp (Gambar 4.2.). Hasil *genus and species-specific nested PCR* menunjukkan satu sampel terinfeksi oleh *P. falciparum* dan *P. vivax*, yaitu NPV-51 dan 8 sampel (NPV-18, 20, 65 dan PAV-2, 3, 5, 11, 12) negatif. Sampel negatif adalah sampel yang tidak menunjukkan pita DNA. Sembilan sampel tersebut tidak diikutsertakan pada analisis berikutnya.

4.3. Profil *genotyping P. vivax* di Indonesia

Genotyping P. vivax pada sampel dari Kabupaten Mimika, Papua dilakukan dengan metode PCR-RFLP dengan menggunakan informasi genetik dari gen *pvmsp-3α* dan *pvcsp*. Hasil *nested PCR* gen *pvmsp-3α* dan *pvcsp* menunjukkan tiga sampel negatif. Tiga sampel tersebut tidak diikutsertakan pada analisis *genotyping*, sehingga total sampel yang digunakan adalah 83 buah.

Analisis RFLP dilakukan dengan menggunakan dua enzim restriksi, yaitu *HhaI* dan *AluI*. Analisis RFLP memiliki sensitivitas yang tinggi dalam membedakan tipe alel *P. vivax* (Bruce *dkk.* 1999: 520). Sekuen DNA yang terekspose oleh enzim restriksi akan terpotong pada situs pemotongan yang spesifik dan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang bervariasi (Bradley *dkk.* 1995: 101).

Hasil analisis RFLP gen *pvmsp-3α* dengan enzim *HhaI* menghasilkan 37 tipe alel (H1—H37) dari 83 sampel. Dua belas tipe alel ditemukan pada lebih dari satu sampel. Dua belas tipe alel kemudian dianalisis lebih lanjut dengan enzim *AluI*. Pemotongan dengan enzim *AluI* memecah dua belas tipe alel menjadi 38 tipe alel (A1—A38). Hasil *genotyping P. vivax* adalah 63 buah tipe alel atau 75,9% (63/83).

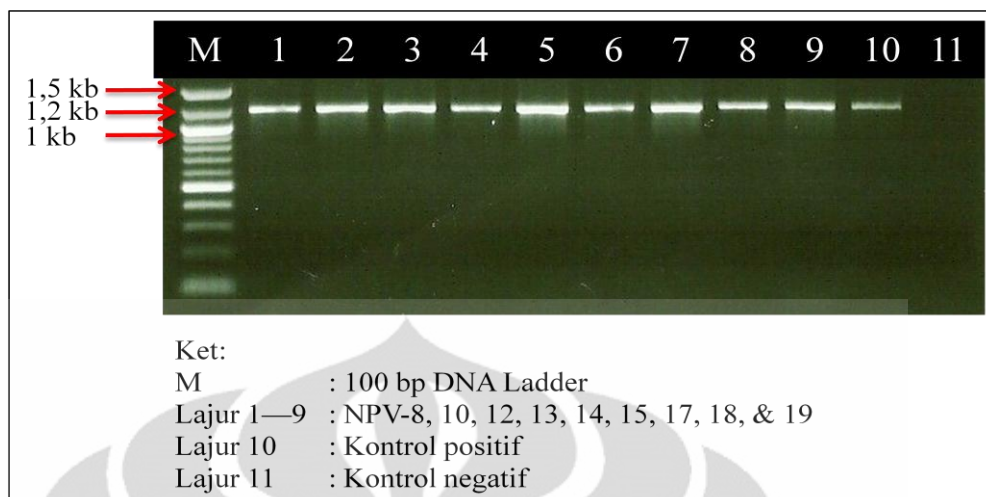


Gambar 4.3. Hasil RFLP gen *pvmsp-3α* dengan enzim *HhaI* (A) dan *AluI* (B)

Pengelompokan sampel dilakukan berdasarkan kesamaan pola pita DNA (Gambar 4.3.). Keragaman pola pita DNA dihasilkan dari variasi pasangan basa pada situs pemotongan atau di antara situs pemotongan enzim restriksi (Bradley *dkk.* 1995: 101). Polimorfisme yang tinggi pada gen *pvmsp-3α* membuat gen tersebut sangat ideal sebagai marka pembeda *genotype* parasit dalam studi epidemiologi (Bruce *dkk.* 1999: 522).

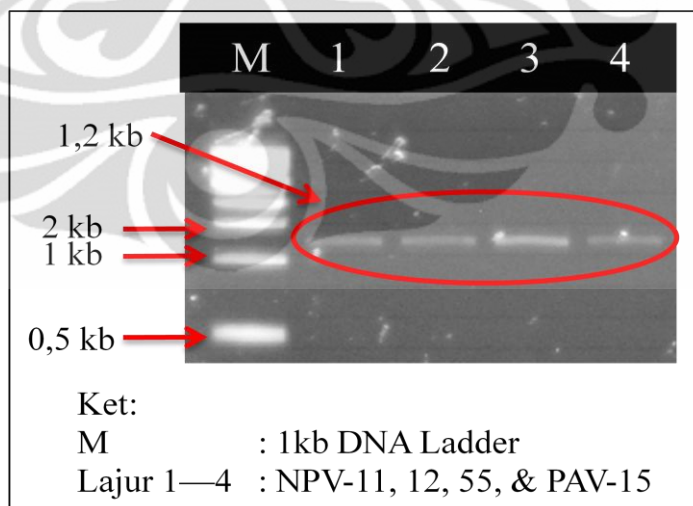
4.4. Amplifikasi dan purifikasi gen pengkode PvDBP II

Hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II pada 83 sampel, diperoleh 79 sampel positif (95,2%) dan 4 sampel negatif. Gambar 4.4.(1). menunjukkan bahwa gen pengkode PvDBP II berhasil diamplifikasi dengan primer DBP *for* 1 dan *rev* 2. Sampel positif memiliki pita DNA spesifik dengan ukuran $\pm 1,2$ kb. Pita DNA tersebut mencakup *region* II gen pengkode PvDBP secara keseluruhan.



Gambar 4.4.(1). Hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II

Berdasarkan hasil *genotyping*, 12 sampel yang positif terhadap hasil amplifikasi gen pengkode PvDBP II dipilih untuk analisis lebih lanjut (Tabel 4.4.). Sampel-sampel tersebut dipilih karena menunjukkan hasil *genotyping* yang bervariasi dan mewakili tipe alel yang berbeda. Sampel terpilih selanjutnya dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick Gel Extraction Kit* dan divisualisasi dengan gel elektroforesis.



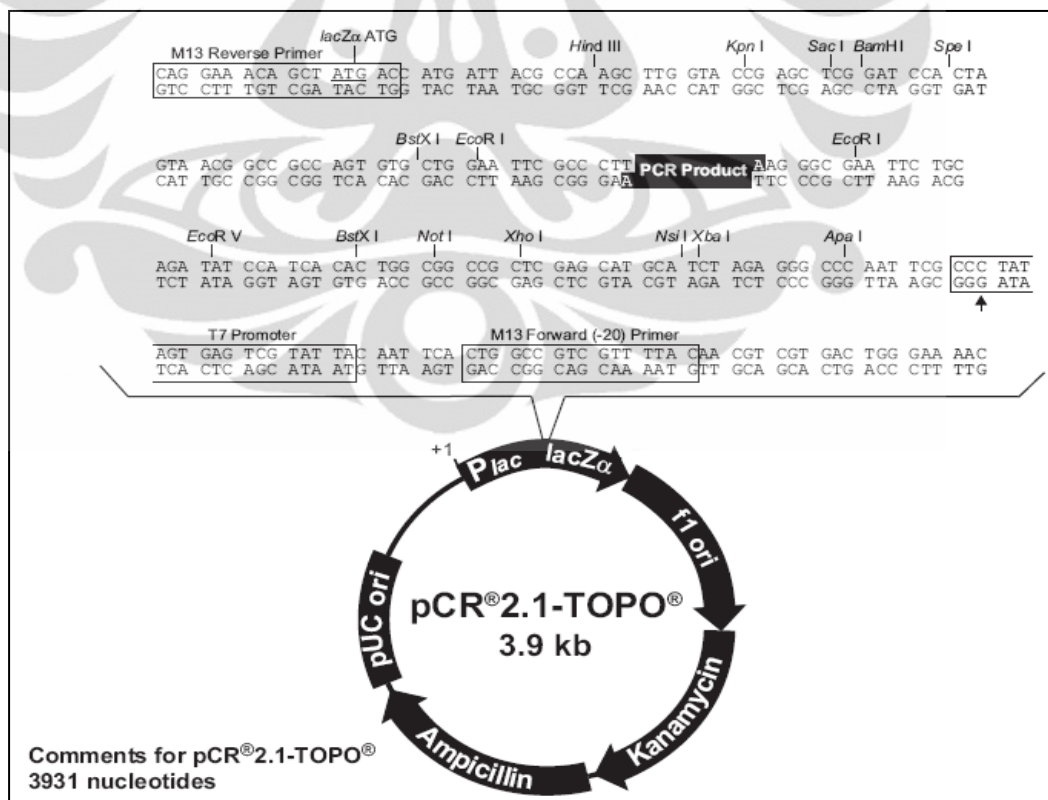
Gambar 4.4.(2). Hasil purifikasi

Ukuran pita DNA hasil purifikasi sama dengan hasil amplifikasi, yaitu 1,2 kb. Namun ketebalan pita DNA hasil purifikasi lebih rendah

dibandingkan dengan hasil amplifikasi (Gambar 4.4.(2)). Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh adsorpsi DNA yang tidak optimal pada membran silika. Adsorpsi DNA pada membran silika sangat tergantung pada keadaan pH larutan saat purifikasi. Keadaan pH yang baik bagi adsorpsi DNA adalah $\leq 7,5$. Kenaikan pH larutan akan menurunkan jumlah DNA yang teradsorpsi pada membran silika (Qiagen 2002: 11—12).

4.5. Pengklonaan gen pengkode PvDBP II

Fragmen DNA hasil purifikasi (DNA target) disisipkan ke dalam vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]. Hasil penggabungan DNA target dan vektor (DNA rekombinan) ditransformasikan ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* strain TOP10. Tahap pengklonaan dibutuhkan untuk mendapat kopi gen pengkode PvDBP II dalam jumlah banyak (Snyder & Champness 1997: 124).

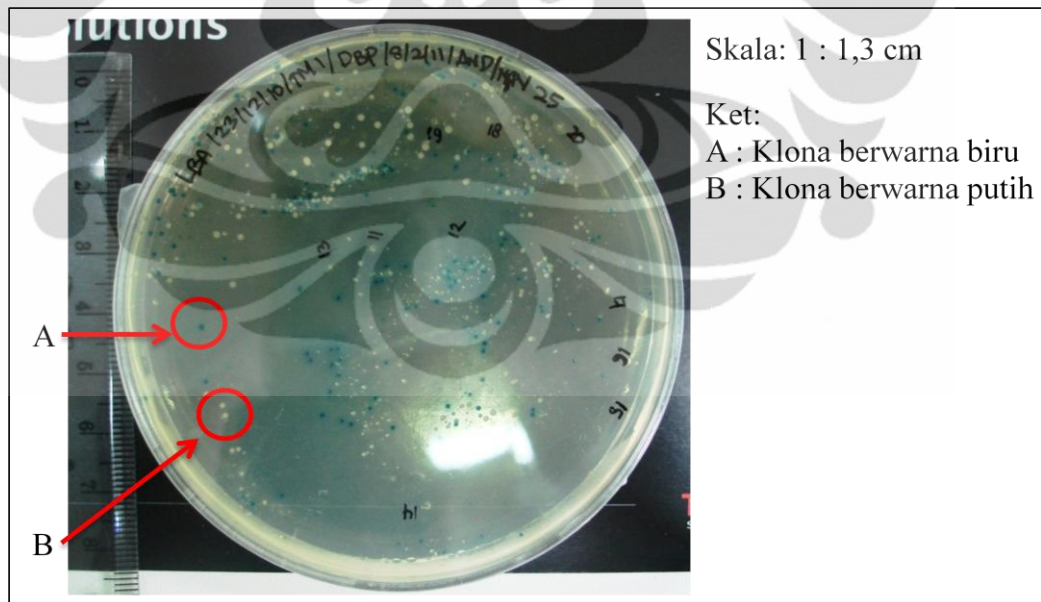


Gambar 4.5.(1). Skema vektor pCR[®]2.1-TOPO[®]

[Sumber: Invitrogen 2006: 15.]

Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] berukuran 3,9 kb dan berbentuk linear. Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] memiliki gen resistan ampisilin, gen *lacZ*, satu basa timin (T) pada masing-masing ujung 3', dan enzim topoisomerase yang berikatan secara kovalen dengan gugus fosfat pada basa timin di ujung 3' (Gambar 4.5.(1)). Produk PCR gen pengkode PvDBP II memiliki satu basa adenin (A) pada ujung 3'. Penambahan satu basa A dilakukan oleh enzim *Taq* polimerase, sehingga terbentuk struktur *sticky end* pada ujung fragmen gen tersebut. Basa T dan A akan berikatan saat proses ligasi dan membuat proses tersebut lebih efisien (Invitrogen 2006: 1).

Transformasi dilakukan pada suhu 42° C selama 30 detik (*heat shock*). Langkah tersebut berguna dalam memaksimalkan plasmid yang masuk ke dalam sel kompeten (Reynolds 2004: 1). Transforman dipindahkan ke dalam medium LB padat yang mengandung 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosida (X-gal) dan ampisilin. Kedua senyawa kimia tersebut berfungsi sebagai indikator keberhasilan proses pengklonaan (Invitrogen 2006: 1—5).

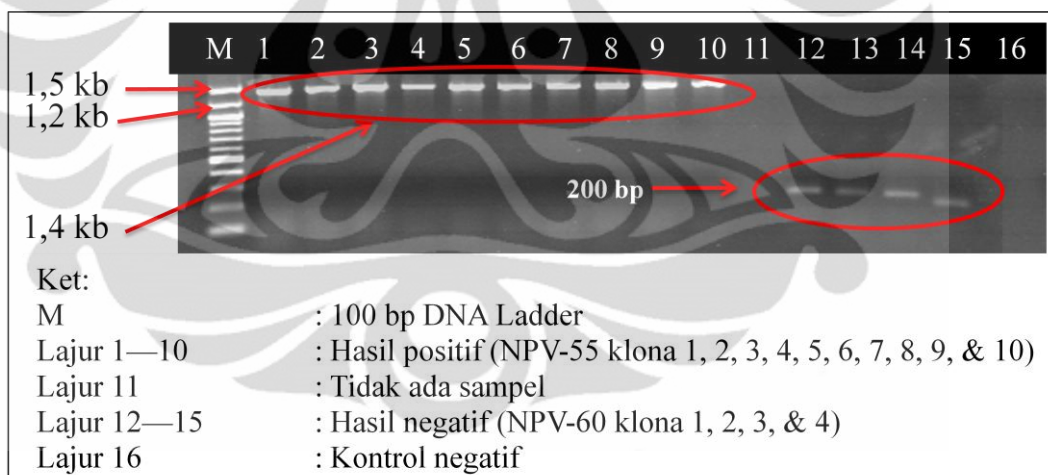


Gambar 4.5.(2). Klon berwarna biru dan putih

Keberhasilan proses pengklonaan dapat dilihat dari warna koloni *E. coli* yang tumbuh pada medium LB padat. Koloni *E. coli* dapat tumbuh pada medium LB padat karena memiliki gen resistan ampisilin yang terdapat pada vektor

plasmid (Strachan & Read 1999: 81). Koloni yang berwarna putih adalah koloni yang memiliki fragmen gen pengkode PvDBP II (Gambar 4.5.(2)). Koloni tersebut berwarna putih karena tidak ada zat warna (*indigo dye*) yang dapat membuat koloni menjadi berwarna biru. Zat warna (*indigo dye*) berasal dari hidrolisis X-gal oleh enzim β -galaktosidase. Gen pengkode PvDBP II yang disisipkan pada vektor membuat gen *lacZ* tidak dapat mengekspresikan enzim β -galaktosidase, sehingga X-gal tidak terhidrolisis dan tidak dihasilkan zat warna (*indigo dye*) (Griffith *dkk.* 1996: 421).

Klona berwarna putih diambil untuk proses konfirmasi dan subkultur. Sepuluh klon putih dari masing-masing sampel, dipindahkan ke medium padat yang baru dengan menggunakan tusuk gigi steril. Medium tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37° C. Keberhasilan proses pengklonaan dikonfirmasi dengan menggunakan metode PCR dan elektroforesis. Primer yang digunakan adalah primer M13 *forward* dan M13 *reverse* (Invitrogen 2006: 10).



Gambar 4.5.(3). Hasil konfirmasi pengklonaan

Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang berukuran \pm 1,4 kb, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA dengan ukuran \pm 200 bp (Gambar 4.5.(3)). Ukuran pita DNA pada klon dengan hasil positif, lebih besar dibandingkan dengan ukuran pita DNA hasil amplifikasi. Hal tersebut disebabkan oleh adanya bagian dari vektor pCR[®] 2.1-TOPO[®] yang ikut teramplifikasi bersama dengan gen pengkode PvDBP II. Bagian dari vektor yang

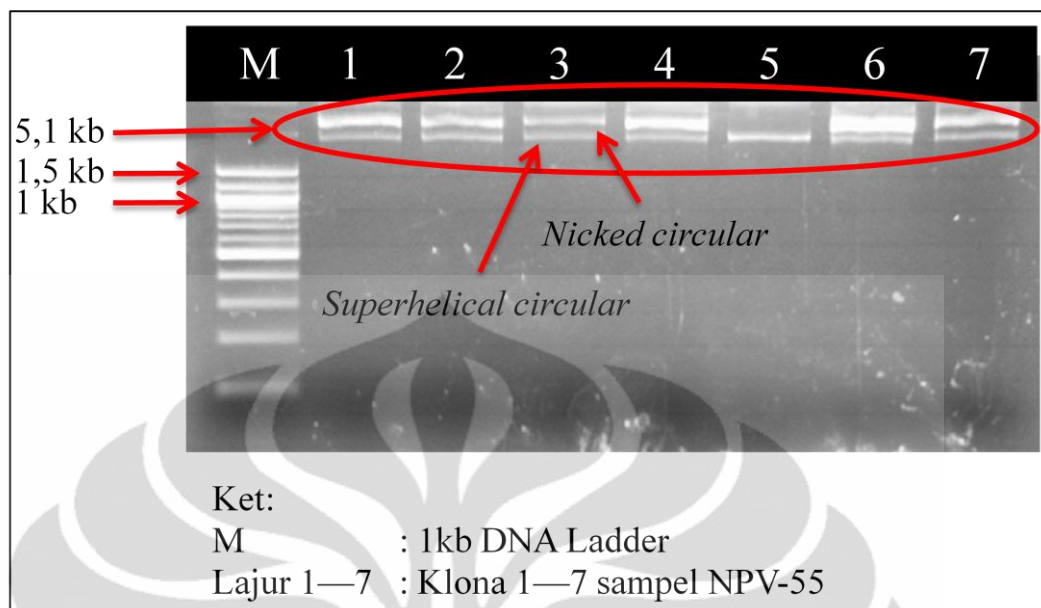
teramplifikasi berukuran ± 200 bp. Vektor dapat ikut teramplifikasi karena masing-masing primer M13F dan M13R memiliki situs perlekatan yang berjarak ± 100 bp dari gen target (Invitrogen 2006:15).

Hasil elektroforesis menunjukkan beberapa klon berwarna putih tidak memiliki DNA target (hasil negatif). Hal tersebut disebabkan oleh hilangnya basa T pada masing-masing ujung 3' dari vektor pCR[®]2.1-TOPO[®], sehingga terjadi perubahan struktur pada ujung vektor dari *sticky end* menjadi *blunt end*. Ligasi (*re-joining*) vektor dengan ujung *blunt end* menyebabkan perubahan pada kerangka baca dari gen *lacZ* sehingga dihasilkan koloni berwarna putih tanpa DNA target (Invitrogen 2006: 18).

4.6. Isolasi plasmid

Klon yang positif, kemudian ditumbuhkan pada medium LB cair selama 16 jam pada suhu 37° C. Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan jumlah kopi vektor yang cukup banyak. Tahap berikutnya adalah isolasi plasmid dengan QIAprep Spin Miniprep Kit. Protokol QIAprep Spin Miniprep Kit didisain untuk purifikasi plasmid hingga 20 μ g dari 3 ml kultur *E. coli* berumur 24 jam pada medium LB. Prosedur dalam QIAprep miniprep dirancang berdasarkan proses lisis sel kompeten dalam larutan alkali dan adsorpsi plasmid ke dalam membran silika pada kondisi lingkungan yang kaya akan garam (Qiagen 2005: 10—11).

Hasil isolasi plasmid divisualisasi dengan gel elektroforesis. Hasil positif menunjukkan adanya dua pita DNA dengan ukuran $\pm 5,1$ kb (Gambar 4.6.). Ukuran pita DNA tersebut adalah hasil penggabungan dari vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (3,9 kb) dan gen pengkode PvDBP II (1,2 kb). Dua pita DNA tersebut muncul karena adanya perbedaan konformasi dari DNA plasmid. Konformasi yang muncul pada hasil elektroforesis kemungkinan adalah *superhelical circular* dan *nicked circular*. *Superhelical circular* bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan *nicked circular* pada gel agarosa, sehingga plasmid dengan konformasi *superhelical circular* berada di bawah plasmid dengan konformasi *nicked circular* (Sambrook & Russell 2001a: 5.5).



Gambar 4.6. Hasil isolasi plasmid

4.7. Analisis hasil *sequencing*

Sequencing dilakukan terhadap 43 klon dari 12 sampel terpilih. Hasil dari proses tersebut didapatkan sekuen sepanjang $\pm 1,2$ kb. Setelah dikurangi dengan sekuen primer, didapatkan sekuen berukuran 1 kb. Sekuen kemudian dibandingkan dengan sekuen acuan, yaitu strain *P. vivax* Sal-I (Salvador-I). Strain *P. vivax* Sal-I adalah pilihan yang sesuai untuk digunakan sebagai sekuen acuan karena strain *P. vivax* Sal-I telah banyak digunakan pada berbagai penelitian baik penelitian polimorfisme gen pengkode PvDBP II, maupun penelitian lain (Collins *dkk.* 2009: 228). Genom Sal-I juga telah *disequencing* dan dipetakan secara keseluruhan (Carlton *dkk.* 2008: 756).

Hasil perbandingan tersebut menunjukkan banyak polimorfisme asam amino pada isolat dari Indonesia. Analisis lebih lanjut pada sekuen yang telah didapat, menunjukkan adanya 75 titik mutasi. Tujuh puluh tiga titik mutasi menunjukkan mutasi monomorfik (mutasi yang menyebabkan perubahan satu tipe asam amino) dan 2 titik mutasi menunjukkan mutasi dimorfik (mutasi yang menyebabkan perubahan dua tipe asam amino).

Polimorfisme yang terjadi pada 360 asam amino penyusun PvDBP II antara lain disebabkan oleh mutasi *synonymous*, *nonsynonymous*, dan insersi.

Insersi satu kodon ditemukan pada klon PAV15C10, NPV39C2, NPV39C3, NPV39C5, NPV39C7, dan NPV1C3. Insersi terjadi di antara asam amino kodon 474 dan 475 [L (CTA)]. Hal yang sama juga dijumpai pada isolat dari Iran. Beberapa isolat dari Iran mengalami insersi pada asam amino kodon 474 dan 475 [L (CTA)] (Babaekho *dkk.* 2009: 114).

Mutasi *synonymous* terjadi pada 15 kodon asam amino (20%), sedangkan mutasi *nonsynonymous* terjadi pada 58 kodon asam amino (77,3%). Mutasi *nonsynonymous* pada 21 kodon asam amino dijumpai paling sedikit pada 2 klon, sedangkan mutasi lainnya dijumpai hanya pada 1 klon. Tujuh klon (16,2%) dari 43 klon Indonesia memiliki mutasi yang sama pada kodon 384, 386, 390, 417, 424, dan 437.

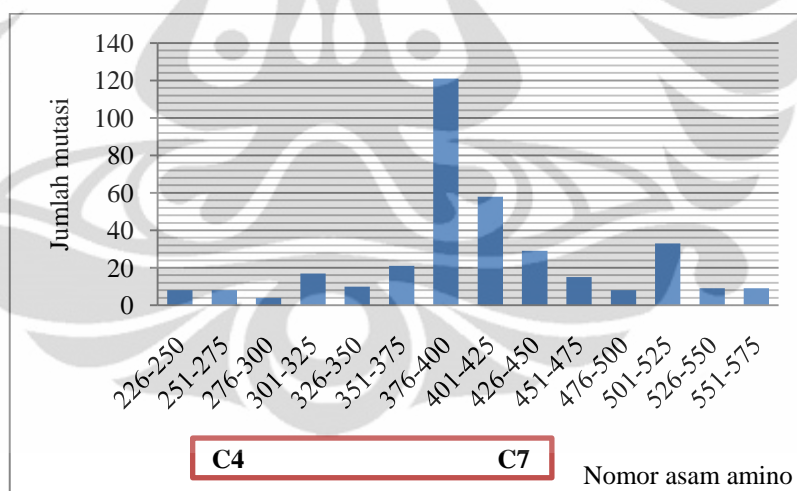
Mutasi *nonsynonymous* menyebabkan perubahan asam amino. Perubahan asam amino dapat berakibat pada perubahan struktur PvDBPII yang dikenali oleh sel T dan antibodi, sehingga parasit dapat meloloskan diri dari sistem imun tubuh inang. Mutasi *nonsynonymous* yang dominan pada isolat Indonesia terjadi secara tidak acak dan tetap pada populasi parasit. Hal tersebut kemungkinan disebabkan juga oleh adanya tekanan dari sistem imun tubuh inang (Xianli *dkk.* 2000: 258). Tekanan sistem imun dapat berupa penghancuran *P. vivax* oleh antibodi dan sel makrofag yang telah diaktifkan oleh sel T (Baratawidjaja 2006: 19).

Hasil yang menarik ditemukan pada kodon asam amino 563. Kodon 563 pada sekuen acuan adalah asam amino asam glutamat (E). Mutasi *nonsynonymous* kodon 563 yang terjadi pada klon PAV22C1 mengubah asam amino glutamat (E) menjadi glutamin (Q), sedangkan mutasi *synonymous* kodon 563 yang terjadi pada klon NPV31C4, tidak mengubah asam amino yang dikode.

Frekuensi variasi asam amino tertinggi (lebih dari 40%) dijumpai pada kodon asam amino D384G (83,7%), L424I (72,1%), I503K (67,4%), R390H (65,1%), W437R (48,8%), dan N417K (44,2%) (Tabel 4.7.(1)). Hasil yang sedikit berbeda ditunjukkan oleh isolat dari Maprik (PNG), Iran, dan Thailand. Kodon asam amino L424I adalah kodon yang memiliki frekuensi variasi tertinggi pada isolat dari Maprik (PNG) (83,7%) dan Thailand (86%), sedangkan kodon asam amino I503K adalah kodon yang memiliki frekuensi variasi tertinggi pada isolat Iran (70,6%). Keenam asam amino yang memiliki frekuensi tertinggi

merupakan asam amino hidrofilik. Asam amino hidrofilik dapat menimbulkan respons antibodi, sehingga diduga keenam asam amino tersebut merupakan target dari sistem imun (Xianli *dkk.* 2000: 256 & 258; Gosi *dkk.* 2008: 3; Babaeekho *dkk.* 2009: 114).

Mutasi pada gen pengkode PvDBPII isolat Indonesia, sebagian besar (78,6%) terjadi pada *critical binding motif* (Gambar 4.7.). *Critical binding motif* pada PvDBPII terbentang antara asam amino sistein 4 dan 7 (asam amino 291—460) (Ranjan & Chitnis 1999: 14072). Mutasi terbanyak pada isolat Indonesia ditemukan pada kodon asam amino 376—400. Kodon asam amino 501—525 juga terlihat cukup banyak mengalami mutasi, walaupun kodon asam amino tersebut tidak terletak di *critical binding motif*. Hal yang berbeda ditemukan pada isolat dari PNG dan Kolombia. Mutasi terbanyak pada kedua negara tersebut terletak pada asam amino 351—375, sedangkan kodon asam amino 501—525 sangat sedikit mengalami mutasi (Xianli *dkk.* 2000: 258).



Gambar 4.7. Distribusi mutasi pada PvDBPII dari Indonesia

Asam amino sistein pada isolat Indonesia relatif *conserved* (83,3%). Mutasi hanya terjadi pada 2 asam amino sistein dari 12 asam amino sistein yang menyusun PvDBPII. Hal tersebut kemungkinan karena asam amino sistein memegang peranan yang penting bagi fungsi PvDBPII sebagai ligan (Xianli *dkk.* 2000: 258).

Haplotipe adalah kumpulan alel pada kromosom tunggal yang diwariskan bersama (Brown *dkk.* 1999: 406). Berdasarkan variasi *nonsynonymous* pada isolat Indonesia yang dibandingkan dengan Sal-I, maka haplotipe yang ditemukan pada sampel Indonesia adalah INA1—IND35. Tiga puluh satu haplotipe ditemukan hanya pada satu klon, sedangkan 4 haplotipe ditemukan pada 2 klon, dan 1 haplotipe ditemukan pada 5 klon. Klon PAV22C1 memiliki haplotipe yang sama dengan sekuen acuan, yaitu Sal-I (Tabel 4.7.(2)).

Isolat dari Indonesia memiliki 1 haplotipe yang dominan, yaitu INA26. Isolat dari Thailand yang memiliki 25 haplotipe terbagi menjadi 5 kelompok dominan, sedangkan isolat dari Madang (PNG) yang memiliki 27 haplotipe terbagi menjadi 3 kelompok dominan (Cole-Tobian *dkk.* 2007: 958; Gosi *dkk.* 2008: 7). Kelompok haplotipe yang dominan kemungkinan memiliki kemampuan yang lebih baik untuk berikatan dengan reseptor DARC, sehingga meningkatkan kemampuan invasi parasit ke dalam retikulosit. Kelompok haplotipe yang dominan kemungkinan juga memiliki tingkat imunogenesitas yang rendah, sehingga dapat menghindari sistem imun (Cole-Tobian *dkk.* 2007: 960).

Polimorfisme yang tinggi pada gen pengkode PvDBP II dari isolat Indonesia dapat terlihat dari jumlah haplotipe yang banyak ditemukan, yaitu 35 haplotipe dari 43 klon (81,4%). Tingkat polimorfisme gen pengkode PvDBP II pada suatu populasi dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, di antaranya adalah mutasi, rekombinasi, seleksi alam, aliran gen dari wilayah dan populasi yang berbeda (Cole-Tobian & King 2003: 128). Faktor-faktor yang mungkin memengaruhi tingkat polimorfisme gen pengkode PvDBP II di Indonesia adalah rekombinasi dan mutasi. Rekombinasi dapat terjadi pada individu yang menderita *mixed infection*. *Mixed infection* terjadi karena adanya infeksi haplotipe *P. vivax* yang berbeda. Mutasi pada gen pengkode PvDBP II merupakan suatu mekanisme parasit untuk menghindari sistem imun. Rekombinasi dan mutasi dapat dihasilkan haplotipe yang baru (Ampudia *dkk.* 1996: 271; Xianli *dkk.* 2000: 258).

Studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II merupakan langkah awal pembuatan vaksin malaria vivax. Penelitian dan studi lanjutan masih harus dilakukan untuk mendapatkan vaksin yang tepat. Salah satu studi lanjutan yang dapat dikerjakan berdasarkan hasil studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II

adalah mengekspresikan gen pengkode PvDBP II dan direaksikan dengan serum pasien (Singh *dkk.* 2001: 17115—17116).

4.8. Analisis pohon filogenetik

Analisis sekuen dari isolat Indonesia selanjutnya dilakukan dengan merekonstruksi pohon filogenetik. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode Bayesian pada program komputer BEAST v1.6.1. Empat puluh tiga sekuen dari Indonesia, 527 sekuen dari mancanegara, dan sekuen acuan (Sal-D) digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik. Sekuen isolat dari negara lain diperoleh dari www.ncbi.nlm.nih.gov. Sekuen tersebut berasal dari Papua New Guinea (PNG), Kolombia (COL), Thailand (THA), Vietnam (VIE), India (IND), Korea Selatan (KOR), Korea Utara (PRK), Brazil (BRA), Bangladesh (BAN), Iran (IRI), Honduras (HON), Mauritania (MTN), Palo Alto (USA), Sri Lanka (SRI), dan Indonesia (INA). Isolat Indonesia (INA) dengan *accession number* EU395591 adalah isolat *P. vivax* dari Indonesia yang telah diadaptasikan pada primata (Ntumngia *dkk.* 2009: 219). Isolat Indonesia (INA) dengan *accession number* DQ156521 adalah isolat yang dikerjakan oleh Lim *dkk.* pada tahun 2005, namun tidak dipublikasi.

Pohon filogenetik yang telah direkonstruksi masih bersifat sementara, sehingga belum dapat menggambarkan hubungan kekerabatan antara isolat Indonesia dan isolat dari negara lain secara total. Pohon filogenetik (Gambar 4.8.) yang telah didapat menunjukkan bahwa isolat dari Indonesia (TMK) dan isolat dari negara lain tidak mengelompok pada satu cabang, melainkan tersebar pada berbagai cabang. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh peristiwa *gene flow*, sehingga menyebabkan kekerabatan yang dekat antar isolat dari berbagai wilayah geografis (Cole-Tobian & King 2003: 131). Berdasarkan hasil pohon filogenetik tersebut, vaksin polivalensi kemungkinan dapat digunakan secara global (Babaeekho *dkk.* 2009: 115). Vaksin polivalensi atau multivalensi adalah vaksin yang mengandung antigen PvDBP II dengan jumlah epitope yang berbeda (Baratawidjaja 2006: 434).

Pohon filogenetik yang telah didapat memiliki tiga cabang utama yang memuat isolat Indonesia dan isolat dari negara-negara lain. Ketiga cabang tersebut memiliki nilai *significant statistical support* yang tinggi (lebih dari 0,5 dari 1). Nilai tersebut mendukung bahwa percabangan yang terbentuk memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi.

Percabangan pertama memuat isolat Indonesia dan isolat dari PNG, Vietnam, Indonesia (INA), India, Iran, USA, Thailand, Brazil, serta Sri Lanka. Nilai *significant statistical support* pada cabang tersebut adalah 0,9853. Percabangan kedua memuat isolat Indonesia dan isolat dari PNG. Nilai *significant statistical support* pada cabang kedua adalah 0,9877. Percabangan ketiga memuat isolat Indonesia dan isolat dari Kolombia, Thailand, Brazil, Honduras, Mauritania, serta Sri Lanka. Nilai *significant statistical support* pada cabang ketiga adalah 0,5570.

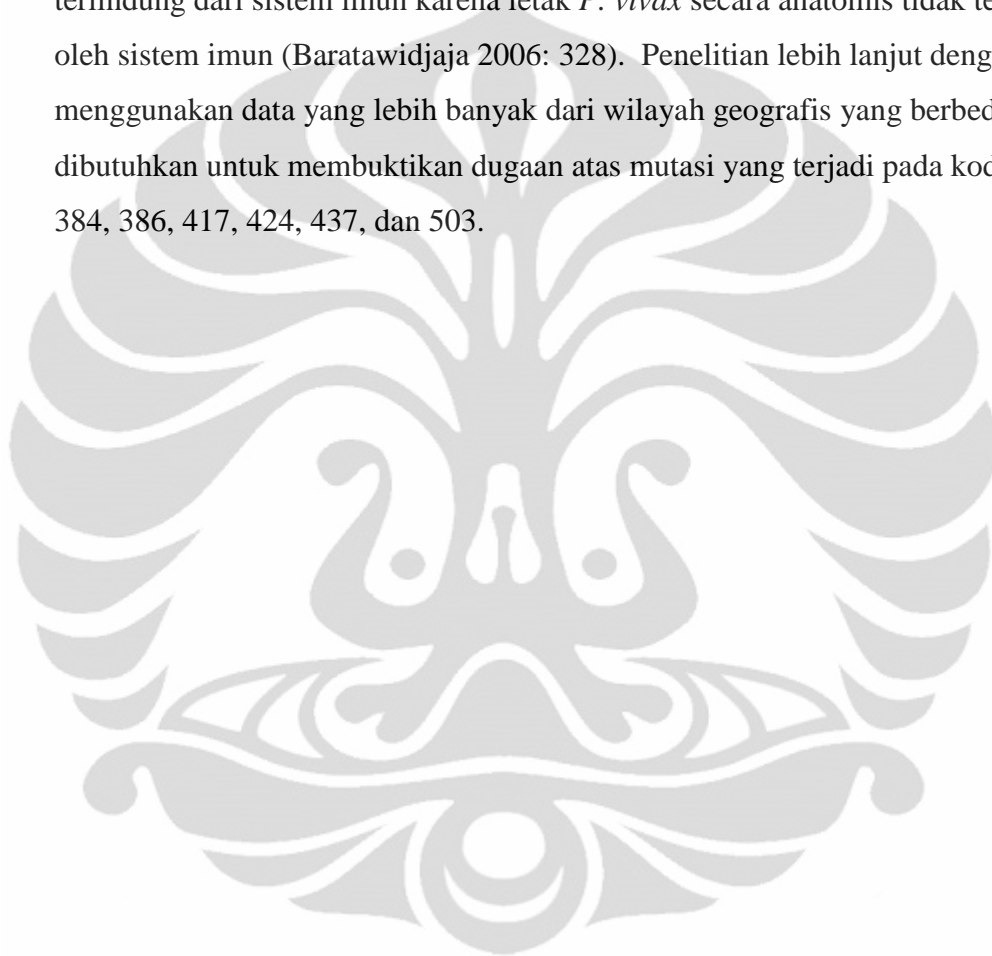
Hal menarik lain yang berhasil diamati pada pohon filogenetik adalah sebagian besar isolat Indonesia (INA) berada satu cabang dengan isolat dari PNG. Hal tersebut sangat mungkin terjadi karena Kabupaten Mimika terletak satu pulau dengan PNG, sehingga faktor lingkungan yang memengaruhi keragaman genetik *P. vivax* tidak jauh berbeda (Vandamme 2009: 3). Hal tersebut menyebabkan *P. vivax* yang bersirkulasi pada kedua wilayah memiliki kekerabatan yang dekat.

Hubungan antara isolat Indonesia dan isolat dari negara lain tidak hanya dapat dilihat dari pohon filogenetik, tetapi juga dapat dianalisis dari perbandingan asam amino. Sekuen asam amino isolat Indonesia dibandingkan dengan sekuen asam amino dari Madang (PNG); Maprik (PNG); Thailand; Kolombia; dan Iran. Perbandingan tersebut dilakukan untuk melihat variasi polimorfisme PvDBP II dari berbagai wilayah geografis.

Tabel 4.8. memperlihatkan bahwa substitusi basa pada kodon asam amino 371, 384, 386, 417, 424, 437, dan 503 ditemukan pada seluruh wilayah studi. Hal tersebut memunculkan dugaan bahwa mutasi *nonsynonymous* pada kodon tersebut terjadi secara konstan dan tersebar pada berbagai wilayah (Xianli *dkk.* 2000: 258). Perubahan pada kodon asam amino K371E, D384G, K386N/Q/T, N417K, L424I, W437R, dan I503K/P merupakan mekanisme adaptasi parasit untuk menghindari

sistem imun, sehingga sistem imun tidak dapat mengenali antigen PvDBP yang baru.

Parasit menghindari sistem imun inang melalui berbagai mekanisme, salah satu di antaranya adalah mengubah antigen dan hidup di dalam sel tubuh inang (parasit intraseluler). *Plasmodium vivax* yang hidup di dalam sel hati dan eritrosit terlindung dari sistem imun karena letak *P. vivax* secara anatomis tidak terpajan oleh sistem imun (Baratawidjaja 2006: 328). Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan data yang lebih banyak dari wilayah geografis yang berbeda dibutuhkan untuk membuktikan dugaan atas mutasi yang terjadi pada kodon 371, 384, 386, 417, 424, 437, dan 503.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Polimorfisme gen pengkode PvDBP II pada isolat Indonesia sangat tinggi (81,4%).
2. Mutasi *nonsynonymous* pada kodon asam amino D384G (83,7%), L424I (72,1%), I503K (67,4%), R390H (65,1%), W437R (48,8%), dan N417K (44,2%) adalah mutasi yang paling banyak terjadi.
3. Asam amino yang ditemukan relatif *conserved* pada gen pengkode PvDBP II adalah asam amino sistein.
4. Isolat *P. vivax* Indonesia memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat *P. vivax* dari PNG, Kolombia, Thailand, Vietnam, India, Brazil, Iran, Honduras, Mauritania, USA, dan Sri Lanka.

5.2. Saran

Perlu dilakukan studi polimorfisme gen pengkode PvDBP II dari daerah lain yang memiliki endemisitas *P. vivax* yang tinggi, agar didapat gambaran yang lebih lengkap dan sesuai mengenai tingkat polimorfisme gen pengkode PvDBP II di Indonesia untuk keperluan pengembangan vaksin malaria vivax.

DAFTAR REFERENSI

- Adams, J.H., B.K. Sim, S.A. Dolan, X. Fang, D.C. Kaslow & L.H. Miller. 1992. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(15): 7085–7089.
- Albert, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2008a. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. Garland science, Taylor & Francis Group, NY: xxxiii + 694 hlm.
- Ampudia, E., M.A. Patarroyo, M.E. Patarroyo & L.A. Murillo. 1996. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**(1–2): 269–272.
- Applied Biosystem. 2000. *Automated DNA sequencing: Chemistry guide*. Applied Biosystems, California: iii + 7-65 + Index-6 hlm.
- Babaeekho, L., S. Zakeri & N.D. Djadid. 2009. Genetic mapping of the Duffy Binding Protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**(1): 112–118.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi dasar*. Ed 7. Balai Penerbit FKUI, Jakarta: xxxviii + 572 hlm.
- Beeson, J.G. & B.S. Crabb. 2007. Towards a vaccine against *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Medicine* **4**(12): 1862–1864.
- Boonma, P., P.R. Christensen, R. Suwanarusk, R.N Price, B. Russell & U. Lek-Uthai. 2007. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* **6**: 124–130.
- Bradley, J., D. Johnson & D. Rubenstein. 1995. *Lecture notes on: Molecular medicine*. Blackwell Science Ltd, Oxford: viii + 151 hlm.
- Brown, T.A. 1999. *Genomes*. John Wiley & Sons, Inc., NY: xxviii + 472 hlm.
- Bruce, M.C., M.R. Galinski, J.W. Barnwell, G. Snounou & K.P. Day. 1999. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 α locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *The American Journal of Tropical*

Medicine and Hygiene **61**(4): 518—525.

- Carlton, J.M., J.H. Adams, J.C. Silva, S.L. Bidwell, H. Lorenzi, E. Caler, J. Crabtree, S.V. Angiuoli, E.F. Merino, P. Amedeo, Q. Cheng, R.M.R. Coulson, B.S. Crabb, H.A. del Portillo, K. Essien, T.V. Feldblyum, C. Fernandez-Becerra, P.R. Gilson, A.H. Gueye, X. Guo, S. Kang'a, T.W. A. Kooij, M. Korsinczky, E.V.S. Meyer, V. Nene, I. Paulsen, O. White, S.A. Ralph, Q. Ren, T.J. Sargeant, S.L. Salzberg, C.J. Stoeckert, S.A. Sullivan, M.M. Yamamoto, S.L. Hoffman, J.R. Wortman, M.J. Gardner, M.R. Galinski, J.W. Barnwell & C.M. Fraser-Liggett. 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **455**(7214): 757–763.
- Chitnis, C.E. & A. Sharma. 2008. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends in Parasitology* **24**(1): 29–34.
- Chitnis, C.E. & L.H. Miller. 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *The Journal of Experimental Medicine* **180**(2): 497–506.
- Cole-Tobian, J.L., A. Cortes, M. Baisor, W. Kastens, J. Xainli, M. Bockarie, J. H. Adams & C.L. King. 2002. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the Duffy binding protein. *The Journal of Infectious Diseases* **186**(4): 531–539.
- Cole-Tobian, J.L. & C.L. King. 2003. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* **127**(2): 121–132.
- Cole-Tobian, J.L., P. Michon, E. Dabod, I. Mueller & C.L. King. 2007. Dynamics of asymptomatic *Plasmodium vivax* infections and Duffy binding protein polymorphisms in relation to parasitemia levels in Papua New Guinean children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **77**(5): 955–962.
- Collins, W.E., J.S. Sullivan, E. Strobert, G.G. Galland, A. Williams, D. Nace, T. Williams & J.W. Barnwell. 2009. Studies on the Salvador I strain of

- Plasmodium vivax* in non-human primates and anopheline mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**(2): 228–235.
- Davidson College. 2002. Nested primer for PCR. (?): 1 hlm.
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html>,
 14 Mei 2011, pk. 11.09.
- Despommier, D.D., R.W. Gwadz, P.J. Hotez & C.A. Knirsch. 2005. *Parasitic diseases*, 5th ed. Apple Trees Productions, L.L.C, New York: xii + 363 hlm.
- Drummond, A.J. & A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214–221.
- Eas-Weat Center. 2003. Maps of Papua province, Indonesia. (?): 1 hlm.
http://www2.eastwestcenter.org/environment/spatial/ewc_sdi/maps/papua2.pdf, 2 November 2010, pk. 13.33.
- Gosi, P., S. Khusmith, T. Khalambaheti, D.E. Lanar, K.E. Schaecher, M.M. Fukuda & S.R. Miller. 2008. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malaria Journal* **7**(1): 112–119.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin & W.M. Gelbart. 1996. *An introduction to genetic analysis*. W.H Freeman and Company, NY: xvii + 860 hlm.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **41**:95-98.
- Harijanto, P.N. 1999. Gejala klinik malaria. Dalam: Harijanto, P.N. (ed.). 1999. *Malaria: Epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: 151—183 hlm.
- Invitrogen. 2006. *TOPO TA cloning[®]: five-minute cloning of Tag polymerase amplified PCR products*. Invitrogen: viii + 27 hlm.
- Karyana, M., L. Burdarm, S. Yeung, E. Kenangalem, N. Wariker, R. Maristela, K.G. Umana, R. Vemuri, M.J. Okoseray, P.M. Penttinen, P. Ebsworth, P. Sugiarto, N.M. Anstey, E. Tjitra & R.N. Price. 2008. Malaria morbidity in Papua

- Indonesia, an area with multidrug resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* **7**(1): 148–157.
- Kemenkes RI (=Kementrian Kesehatan Republik Indonesia). 2010. Bersama kita berantas malaria. 19 April: 1 hlm.
<http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1055-bersama-kita-berantas-malaria.html>, 27 Oktober 2010, pk. 11.02.
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Macmillan College Publishing Company, NY: xvi + 779 + CR-4 hlm.
- Li, W-H., 1997. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publisher, Sunderland Massachusetts: xv + 487 hlm.
- Luxemburger, C., R. McGready, A. Kham, L. Morison, T. Cho, T. Chongsuphajaisiddhi, N.J. White & F. Nosten. 2001. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *American Journal of Epidemiology* **154**(5): 459–465.
- Marcus, B. 2009. *Deadly diseases and epidemics: Malaria*. 2nd ed. Chelsea House Publishing, New York: 119 hlm.
- Menard, D., C. Barnadasa, C. Bouchierd, C. Henry-Halldinc, L.R. Grayc, A. Ratsimbasoae, V. Thoniera, J.F. Carodf, O. Domarlea, Y. Coling, O. Bertrandg, J. Picotg, C.L. King, B.T. Grimberg, O. Mercereau-Puijalonb & P.A. Zimmerman. 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(13): 5967–5971.
- Mendis, K., B.J. Sina, P. Marchesini & R. Carter. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **64**(1 suppl): 97–106.
- Miller, L.H., D.I. Baruch, K. Marsh & O.K. Doumbo. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**(6872): 673–679.
- Moody, A. 2002. Rapid Diagnostic Tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews* **15**(1): 66–78.
- NCBI. 1995. Plasmodium vivax Duffy receptor gene, complete cds. 7 Maret: 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M61095>, 3 Juni 2011, pk. 16.33.

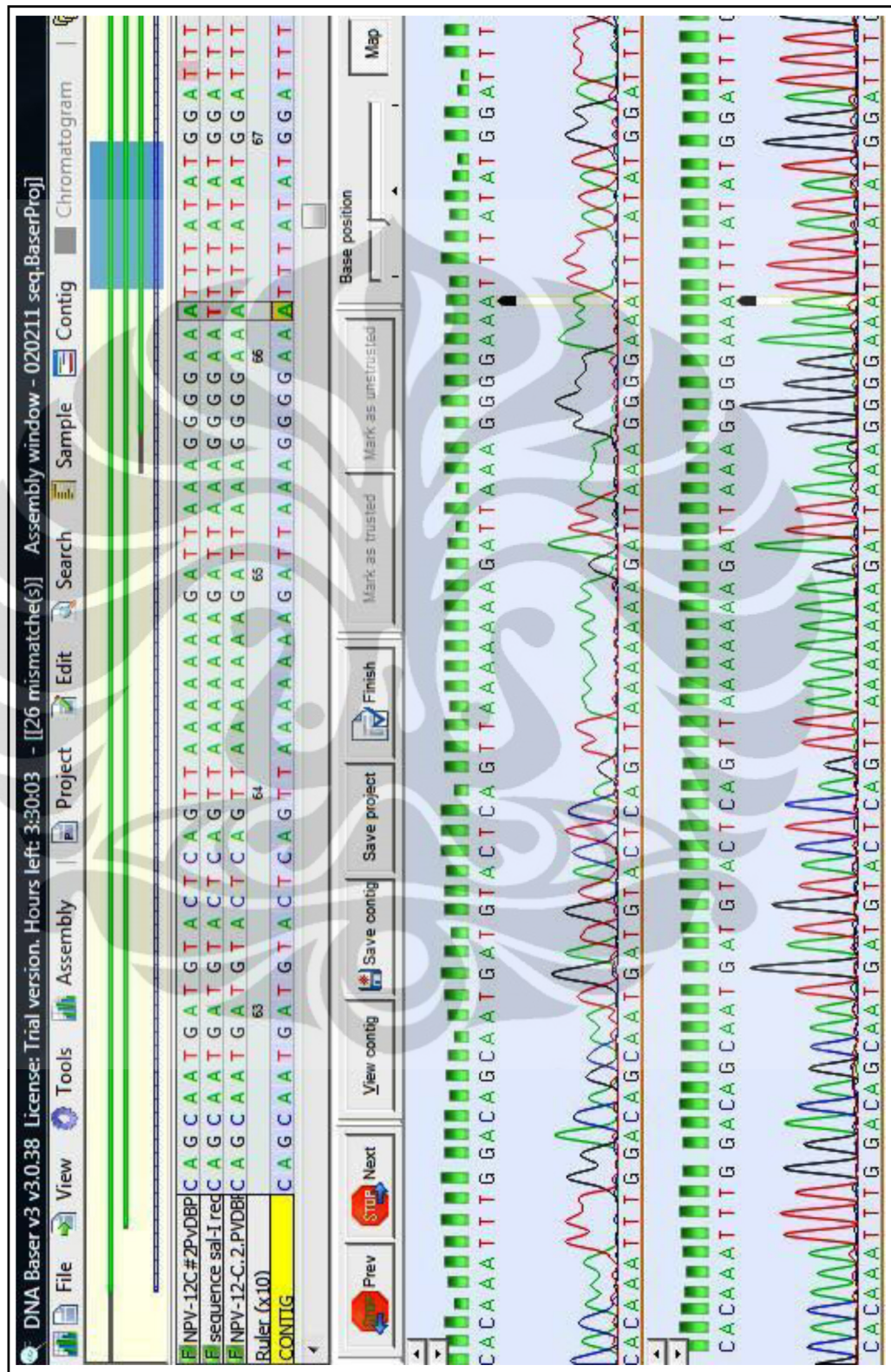
- NCBI. 2010. PVX_110810 Duffy receptor precursor [*Plasmodium vivax* SaI-1].
14 Agustus: 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5471431>, 4 Mei
2011, pk. 10.42.
- Ntumngia, F.B., A.M. McHenry, J.W. Barnwell, J. Cole-Tobian, C.L. King & J.H.
Adams. 2009. Genetic variation among *Plasmodium vivax* isolates adapted
to non-human primates and the implication for vaccine development. *The
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**(2): 218–227.
- Nugroho, A & M. Tumewu-Wagey. 1999. Siklus hidup Plasmodium malaria.
Dalam: Harijanto, P.N. (ed.). 1999. *Malaria: Epidemiologi, patogenesis,
manifestasi klinis, & penanganan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC,
Jakarta: 38—53 hlm.
- Ocampo, M., R. Vera, L.E. Rodriguez, H. Curtidor, M. Urquiza, J. Suarez, J.
Garcia, A. Puentes, R. Lopez, M. Trujillo, E. Torres & M.E. Patarroyo.
2002. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein peptides specifically bind
to reticulocytes. *Peptides* **23**(1): 13–22.
- Pechenik, J.A. 1991. *Biology of the Invertebrates*. 2nd ed. Wm. C. Brown
Publishers, Dubuque: xvi + 567 hlm.
- Poespoprodjo, J.R., W. Fobia, E. Kenangalem, D.A. Lampah, N. Warikar, A.
Seal, R. McGready, P. Sugiarto, E. Tjitra, N.M. Anstey & R.N. Price.
2008. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant
Plasmodium vivax and *Plasmodium falciparum* infections are endemic.
*Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of The Infectious
Diseases Society of America* **46**(9): 1374–1381.
- Polski, J.M., S. Kimzey, R.W. Percival & L.E. Grosso. 1998. Rapid and effective
processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and
Chelex-100. *Molecular Pathology* **51**(4): 215–217.
- Price, R.N., E. Tjitra, C.A. Guerra, S. Yeung, N.J. White & N.M. Anstey. 2007. Vivax
malaria: neglected and not benign. *The American Journal of Tropical
Medicine and Hygiene* **77**(6 suppl): 79–87.
- Promega. 2003. *Technical manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T easy vector systems*.
Promega Corporation, Madison: 28 hlm.

- Qiagen. 2002. *QIAquick® Spin Handbook*. QIAGEN companies, Singapura: 34 hlm.
- Qiagen. 2005. *QIAprep® Miniprep Handbook*. QIAGEN companies, Singapura: 51 hlm.
- Ranjan, A. & C.E. Chitnis. 1999. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(24): 14067–14072.
- Reynolds, J. 2004. Bacterial transformation. 4 Januari: 1 hlm.
http://delrio.dcccd.edu/MFarinha/lab_manual/transformation.html, 10 November 2010, pk. 08.30.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001a. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 1. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1—7.94 + I.1—I.44 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001b. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 3. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1—14.53 + I.1—I.44 hlm.
- Singh, K., K. Pandey, R. Chattopadhyay, S.S. Yazdani, A. Lynn, A. Bharadwaj, A. Ranjan & C. Chitnis. 2001. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-Binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(20): 17111–17116.
- Singh, S.K., R. Hora, H. Belrhali, C.E. Chitnis & A. Sharma. 2006. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature* **439**(7077): 741–744.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, X.P. Z hu, W. Jarra, L. Pinheiro, V.E. do Rosario, S. Thaithong & K.N. Brown. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* **61**(2): 315–320.
- Snustad, D.P., M.J. Simmons & J.B. Jenkins. 1997. *Principles of genetics*. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xviii + 829 hlm.

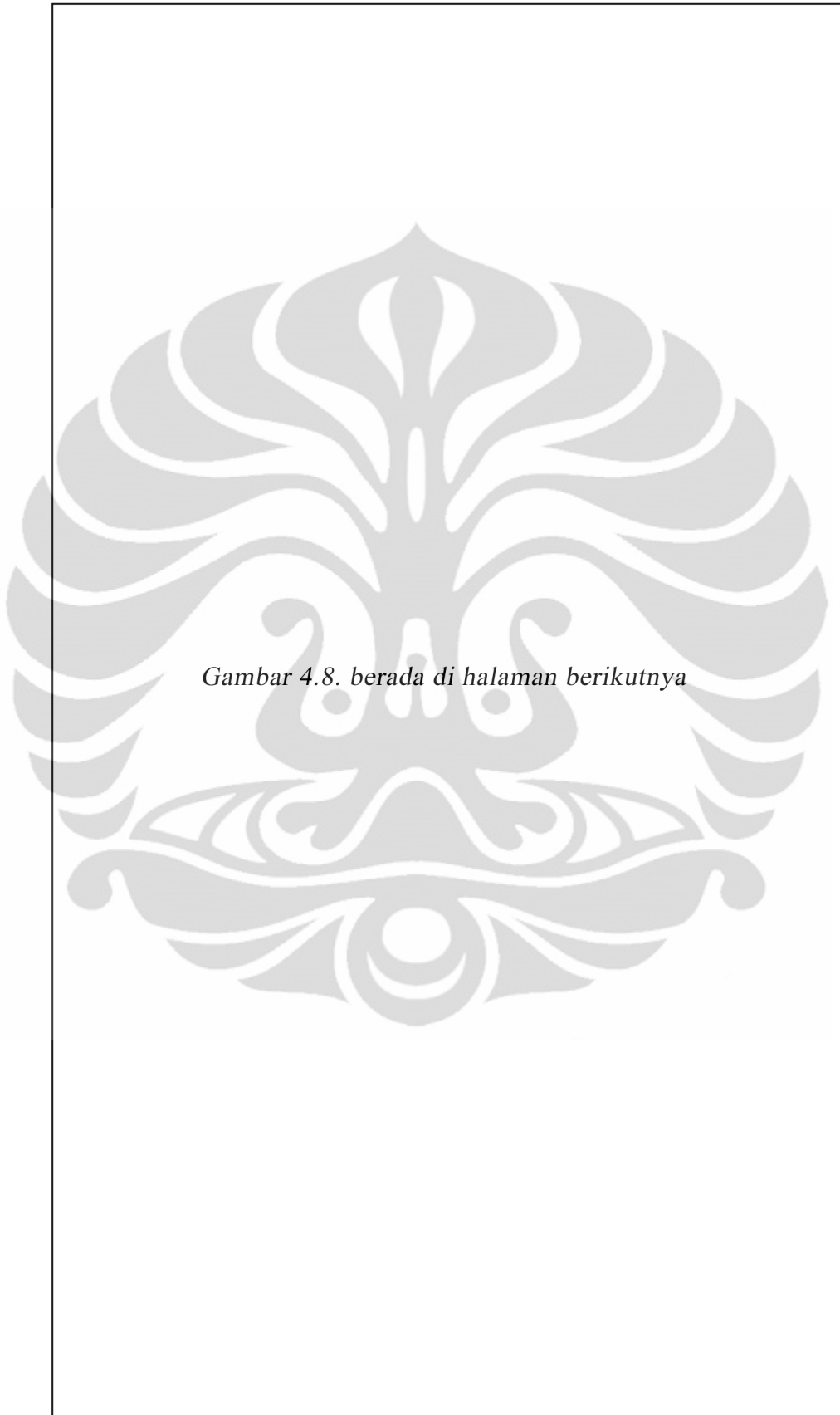
- Snyder, L. & W. Champness. 1997. *Molecular genetics of bacteria*. ASM press, Washington D. C: xxii + 503 hlm.
- Spencer, T., M. Spencer & D. Venters. 1974. Malaria vectors in Papua New Guinea. *Papua New Guinea Medical Journal* **17**(1): 22—30.
- Strachan, T & A.P. Read. 1999. *Human molecular genetics*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., NY: xxiii + 576 hlm.
- Tjitra, E., N.M. Anstey, P. Sugiarto, N. Warikar, E. Kenangalem, M. Karyana, D.A. Lampah & R.N. Price. 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine* **5**(6): 890–899.
- Vandamme, A-M. 2009. Basic concepts of molecular evolution. Dalam: Lemey, P., M. Salemi & A-M. Vandamme. (ed.). 2009. *The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press, Cambridge: 3–29 hlm.
- Vierstraete, A. 1999. Principle of the PCR. (?): 1 hlm.
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, 18 Oktober 2010, pk. 18.24.
- Waters, A.P. & T.F. McCutchan. 1989. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* **1**(8651): 1343–1346.
- WHO. 2007. What is Malaria?. 9 Januari: 1 hlm.
<http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section21/Section334.htm>, 27 Oktober 2010, pk. 11.05.
- WHO. 2009a. *World malaria report 2009*. WHO Press, Switzerland: x + 190 hlm.
- WHO. 2009b. *Malaria rapid diagnostic test performance: Results of who product testing of malaria RDTs: round 2 (2009)*. WHO: x + 22 hlm.
- Wooden, J., S. Kyes & C.H. Sibley. 1993. PCR dan strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* **9**(8): 303—305
- Xainli, J., J.H. Adams & C.L. King. 2000. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* Duffy Binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**(2): 253–260.

Xainli, J., J.L. Cole-Tobian, M. Baisor, W. Kastens, M. Bockarie, S.S. Yazdani,4
C.E. Chitnis, J.H. Adams & C.L. King. 2003. Epitope-specific humoral
immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and
Immunity* **71**(5): 2508–2515.

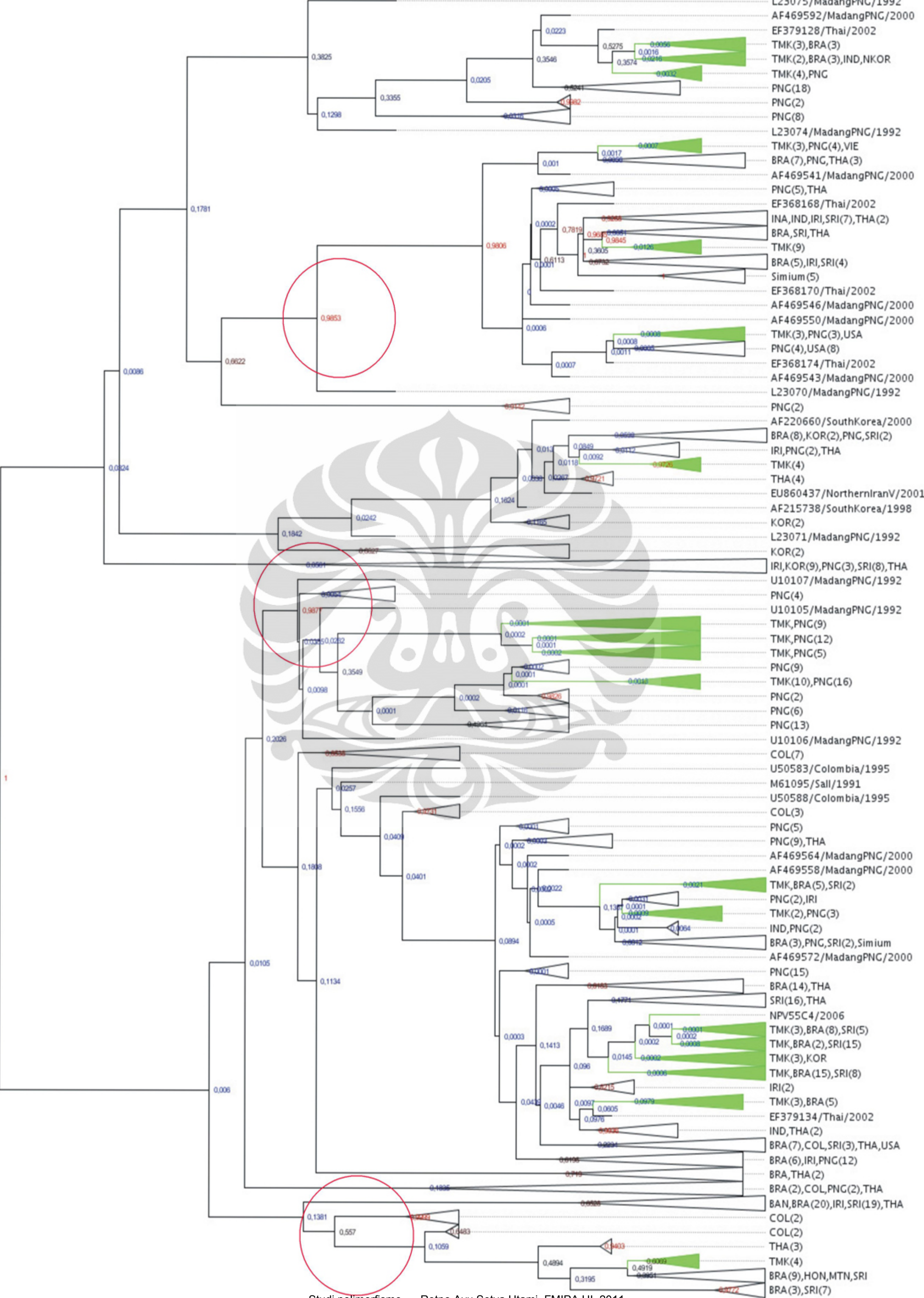




Gambar 3.3. Pengolahan sekuen dengan DNA Baser v3



Gambar 4.8. Pohon filogenetik



Studi polimorfisme ..., Retno Ayu Setya Utami, FMIPA UI, 2011

Tabel 4.4. Hasil *genotyping P. vivax* dari subjek penderita malaria vivax di Kabupaten Mimika, Papua

No.	Alel	Sampel	
		NPV	PAV
1	A1	1 & 31	–
2	A8	19	–
3	A13	12	–
4	A19	32	–
5	A22	44	–
6	A25	55	–
7	A34	–	15
8	A38	–	22
7	A42	11	–
8	A48	39	–
9	A51	42	–

Keterangan:

A1 : Alel nomor 1

NPV : *Non Pregnant-Infected Vivax*

PAV : *Pregnancy-Associated Vivax*

Tabel 4.7.(1). Frekuensi polimorfisme asam amino

231	232	244	246	250	252	253	255	256	267	270	274	282	283	296	300	302	308	333	335	
Sal-1	N	G	I	S	N	A	F	Q	N	K	E	D	C	I	T	N	T	R	L	L
INA	N	G	T	G	D	A	F	Q	D	E	G	R	M	M	S	T	S	F	L	
Σ	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	15	5	2	
%	4,65	4,65	4,65	2,33	2,33	4,65	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	4,65	34,9	11,6	4,65	
336	350	351	357	371	372	375	378	379	384	385	386	389	390	396	398	399	404	417	420	
Sal-1	N	W	S	D	K	V	N	R	S	D	E	K	Q	R	N	S	K	T	W	
INA	D/S	R	G	G	E	V	D	R	R	G	K	N/Q	R	H	S	T	R	R	R	
Σ	1	1	1	1	10	1	8	13	1	36	13	13	1	28	1	6	1	6	19	
%	2,33	2,33	2,33	2,33	23,3	2,33	18,6	30,2	2,33	83,7	30,2	30,2	2,33	65,1	2,33	14	2,33	14	44,2	
					1					8									2,33	
					2,33					18,6										
421	424	431	437	440	447	449	451	459	461	463	466	—	475	484	486	495	503	504	507	
Sal-1	I	L	E	W	E	S	L	T	K	D	K	Y	—	P	Y	Q	W	I	S	
INA	V	I	G	R	E	K	S	K	G	K	Y	L	R	R	H	E	R	K	G	
Σ	1	31	2	21	1	4	1	1	1	1	1	1	6	4	1	6	1	29	1	
%	2,33	72,1	4,65	48,8	2,33	9,3	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	14	9,3	2,33	14	2,33	67,4	2,33	4,65	
517	529	533	534	537	539	540	545	550	551	553	563	566	570	574	575					
Sal-1	V	E	V	A	N	I	N	A	C	V	S	E	T	N	S	Q				
INA	I	E	A	T	D	I	S	T	R	A	S	Q/E	A	S	P	R				
Σ	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1				
%	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	4,65	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	4,65	4,65	2,33					

Keterangan: Kodon asam amino yang berada dalam kotak merah () adalah kodon asam amino dengan jumlah mutasi tertinggi.

Tabel 4.7.(2). Haplotype gen pengkode PvDBP11 pada 43 klon Indonesia

Haplotype	Sampel	Persentase Haplotype (%)	Asam amino
	Sal-I		
INA1	NPV1C1	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQQRNSKTNWILEWESLTD-PYQWISNVVANNACVETNSQ
INA2	NPV1C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGEKHNTKTNWIERESLTD-PYQWKSNVVANNTRVETNSQ
INA3	NPV11C1	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKNQHNSKRNWIEWESLTDLPYEWISNVAANNACVETNSQ
INA4	NPV11C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGKNQHNSKTKEIERGSLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA5	NPV11C4	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGKNQHNSKTKEIERGSLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA6	NPV11C6	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGEKHNSKTNWIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA7	NPV12C2 & C8	5,71	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQQRNSKTKEIERESLTD-RYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA8	NPV12C6	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQQRNSKTKEIERESLTD-RYQWKSNVVTNNACVETNSQ
INA9	NPV12C9	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQQRNSKTKEIERESLTD-RYQWKGNNVANNACVETNSQ
INA10	NPV19C1	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGEQQRNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA11	NPV19C2	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGEQQRNSKTKEIERESLTD-PYQRKSNVVANNACVETNSQ
INA12	NPV19C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGEQQRNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA13	NPV19C4	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGEQQRNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA14	NPV19C5	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDENSGEQQRNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA15	NPV31C1	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKDSGEKHNSKTNWIEWEKLTD-PYQWISNVVANNACVETNSQ
INA16	NPV31C2	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDEDRGEQQRSSKTKEIEREKLTD-PYQWISNVVANNACVETNSQ
INA17	NPV31C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKDSGEKHNSKTNWIEWEKLTD-PYQWISNVVANACVETNSQ
INA18	NPV31C4	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKDSGEKHNSKTNWIEWEKLTD-PYQWISNVVANNACVETNSR
INA19	NPV31C5	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGEKHNSKTNWIEWEKLTD-PYQWISNVVANNACVETNSQ
INA20	NPV32C3	2,32	ISNNKEDCITNRFNWSGKNSDKNQHNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNVVANNACVETNSQ
INA21	NPV32C4	2,32	ISNNKEDCITNRFNWSGKNSDKNQHNSKTKEIERESLTD-PYQWKSNIVANNACVETNSQ

Tabel 4.7.(2). Haplotype gen pengkode PvDBP2 pada 43 klon Indonesia (sambungan)

Haplotype	Sampel	Persentase Haplotype (%)	Asam amino
	Sal-I		
INA22	NPV39C2 & C7	4,65	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQRNSKTNWILEWESLTD-PYQWISN V WANNACVETNSQ
INA23	NPV39C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKNQHNTKRNNWIEWESLTDLPYE W ISN V WANNACVETNSQ
INA24	NPV39C5	2,32	ISNNKEGCITNRLNWSDKNSGKNQHNTKRNNWIEWESLTDLPYE W ISN V WANNACVETNSQ
INA25	NPV42C5	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKNQHNTKRNNWIEWESLTDLPYE W ISN V WANNACVETNSQ
INA26	NPV44C5, C6, C7, C10, & NPV55C8	11,62	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKQHNSKTNWILEWESLTD-PYQW K SN V WANNACVETNSQ
INA27	NPV55C4	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKQHNSKTNW V LEWESLTD-PYQW K SN V WANNACVETNSQ
INA28	NPV55C6	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKQHNSKTNWILEWESLTD-PYQW K SN V WANNACVETNSQ
INA29	NPV55C7 & C9	4,65	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSGKQHNSKTNWILEWESLTD-PYQW K SN V WANNACVETNPQ
INA30	PAV15C1	2,32	ISNNKEDCITN S FNW G DK D SGKNQHNSKT K WIE R ESLTD-PYQW K SN V WANNACVETNSQ
INA31	PAV15C3 & C4	4,65	T SN N KEDCITN S FNW S DK D SGKNQHNSKT K WIE R ESLTD-PYQW K SD V WANNACVETSSQ
INA32	PAV15C10	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSGKN S DKNQHNT R RRNWI G WESLTDLPYE W ISN V WANNACVETNSQ
INA33	PAV22C1	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQRNSKTNWILEWESLTD-PYQWISN V WANNACVETNSQ
INA34	PAV22C2	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQRNSKTNWILEWESLTD-PYQWISN V WANNACV Q TNSQ
INA35	PAV22C3	2,32	ISNNKEDCITNRLNWSDKNSDEKQRNSKTNWILEWESLT G -PHQWISN V WANNACVETNSQ

Asam amino yang menyusun haplotype adalah: 244, 246, 250, 256, 267, 270, 274, 282, 283, 296, 300, 308, 333, 336, 350, 351, 357, 371, 375, 379, 384, 385, 386, 389, 396, 398, 399, 404, 417, 420, 421, 424, 431, 437, 440, 447, 449, 451, 461, 475, 484, 486, 495, 503, 504, 507, 517, 533, 534, 537, 540, 545, 550, 551, 563, 566, 570, dan 574.

Tabel 4.8. Perbandingan polimorfisme asam amino dari isolat Indonesia dan negara lain

Sampel	Posisi asam amino																		
	189	191	192	220	268	276	281	293	306	308	325	333	351	367	369	371	375	376	377
Sal I	K	G	N	G	R	N	V	K	F	R	A	L	S	I	Y	K	N	N	L
Indonesia									S			L	G			E	D		
Thai					S	N	V		L	S		F	C	T		E	D		
Kolombia	E	E	D	E											N	E		K	
Iran									L	S						E			
Madang, PNG								K	S	A	F					E	D		
Maprik, PNG	E							S							E				S

Sampel	Posisi asam amino																		
	378	379	381	384	385	386	390	391	393	394	395	398	399	404	412	417	419	424	428
Sal I	R	S	F	D	E	K	R	R	Q	W	W	S	K	T	K	N	I	L	V
Indonesia	R	R		G	K	N/Q	H					T	R	R	K	K	I		
Thai	R			G	K	N/Q	H					T		R	K	M	I		
Kolombia				G	K	N									K	I	I		I
Iran				G	K	N	H					T		R	K	M	I		
Madang, PNG	R			G	K	N/Q	H	H	R				K		E	K	I		
Maprik, PNG		N	S	G	T	H			R	C					K	K	I		

Sampel	Posisi asam amino																		
	433	434	436	437	442	446	447	454	464	467	475	485	486	503	505	507	513		
Sal I	Q	I	R	W	G	V	S	Q	I	T	P	D	Q	I	V	N	T		
Indonesia				R			K				R		E	K		D			
Thai	K		T	R			S		I		A		E	K	H	K			
Kolombia				R									K	K	L				
Iran				R										K					
Madang, PNG				R	G	V	K	K			D			K					
Maprik, PNG		T		R	V	V	K		P				K/P						

Keterangan: Mutasi nonsynonymous yang umum ditemukan berada pada kolom yang berwarna biru (■)

[Sumber: Ampudia *dkk.* 1996: 271; Xianli *dkk.* 2000: 255—256; Cole-Tobian *dkk.* 2002: 532; Gosi *dkk.* 2008: 4; Babaeekho *dkk.* 2009: 114]

Lampiran 1

Reagen TOPO TA *Cloning*

Reagen	Konsentrasi	Jumlah
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	10 ng/μl DNA plasmid: 50 % gliserol 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (25° C) 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 % Triton X-100 100 μg/ml BSA <i>Phenol red</i>	20 μl
Primer M13F & M13R	0,1 μg/ μl dalam TE <i>buffer</i>	20 μl
Larutan garam	1,2 M NaCl 0,06 M MgCl ₂	50 μl

[Sumber: Invitrogen 2006: v.]

Lampiran 2

Komponen One Shot[®] *competent cell kit*

Material	Komposisi	Jumlah
SOC medium	2% Triptone 0,5% ekstrak khamir 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glukosa	6 ml
TOP10		21 x 50 μl
pUC19 DNA kontrol	10 pg/ μl dalam 5 mM Tris-HCl 0,5 mM EDTA, pH 8	50 μl

[Sumber: Invitrogen 2006: vi.]

Lampiran 3

Komposisi dan cara pembuatan LB medium

Komposisi:

1 % Tripton

0,5% Ekstrak khamir

1% NaCl

pH 7

Cara pembuatan medium LB cair:

Satu liter medium LB dibuat dengan melarutkan 10 g tripton, 5 g ekstrak khamir, dan 10 g NaCl dalam 950 ml dH₂O. Kestabilan pH larutan dijaga untuk tetap 7 dengan menambahkan NaOH hingga volume 1 l. Larutan disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121° C. Larutan didinginkan hingga mencapai suhu 55° C dan ditambahkan antibiotik ampisilin 50 µl (100 mg/ml) pada setiap 50 ml. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

Cara pembuatan medium LB padat:

Medium LB dibuat seperti cara di atas, tapi ditambahkan 15 g/l bubuk agar sebelum diautoklaf. Larutan disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121° C. Larutan didinginkan hingga mencapai suhu 55° C dan ditambahkan antibiotik ampisilin 50 µl (100 mg/ml) pada setiap 50 ml. Medium dituang ke dalam cawan petri ± 10 cm, kemudian diamkan pada suhu ruang hingga medium mengeras. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

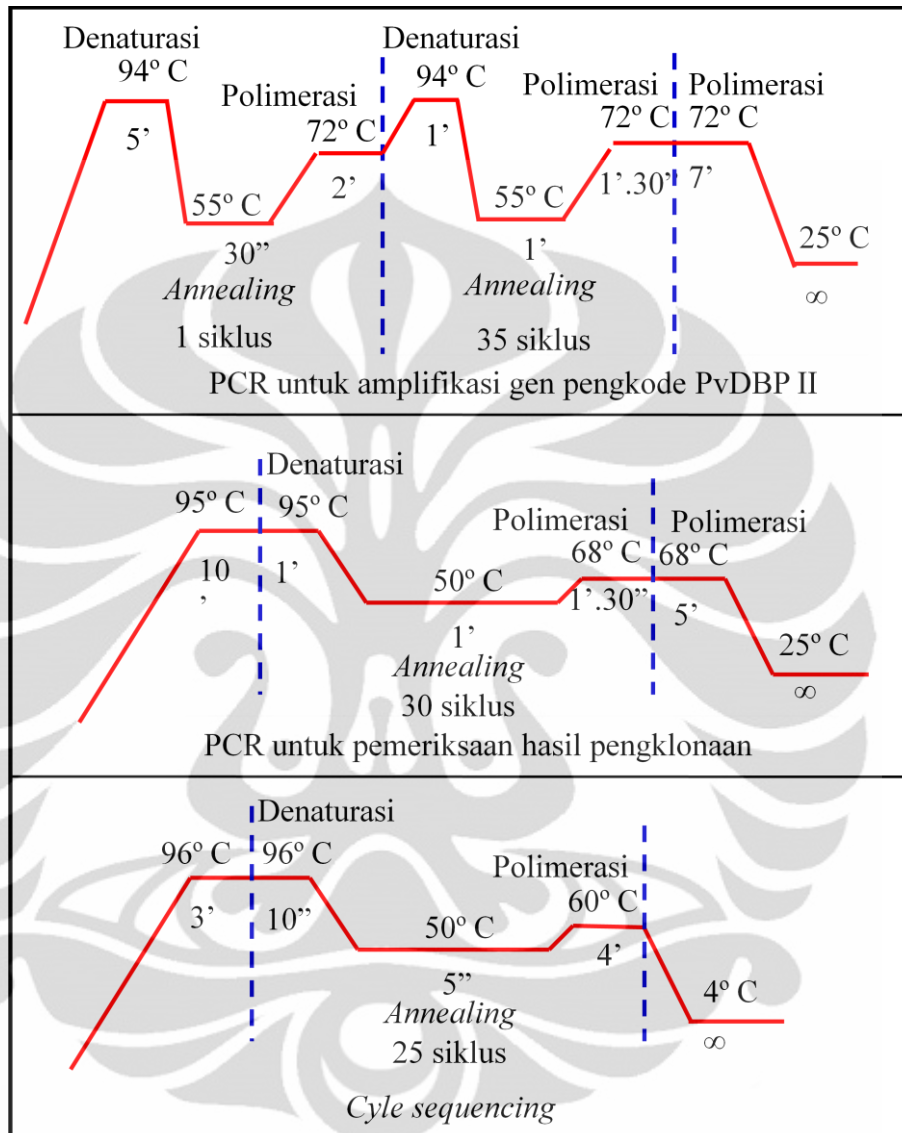
[Sumber: Invitrogen 2006: 23.]

Lampiran 6

Komposisi dan preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian

No.	Reagen	Komposisi	Acuan
1	Saponin 0,5% dalam PBS	Saponin 0,5% (v/v) ditambah dengan PBS sampai volume tertentu	Wooden <i>dkk.</i> 1993: 303
2	Suspensi Chelex-100™ 20%	Resin Chelex 20% (w/v) ditambahkan dengan ddH ₂ O sampai volume tertentu (pH=10).	Polski <i>dkk.</i> 1998: 215
3	TBE <i>buffer</i>	Larutan stok: 10x TBE 108 g Tris base; 54 g asam boraks; dan 6,696 g EDTA dilarutkan dalam <i>nanopure water</i> (ddH ₂ O) pH= 8.3 hingga mencapai volume 1 l, lalu disterilisasi dengan autoklaf.	Sambrook & Russell 2001a: 5.8
4	6x <i>Loading buffer type IV</i>	0.25% (w/v) bromfenol biru dan 40% (w/v) sukrosa dilarutkan dalam RO <i>pure water</i> (dH ₂ O) dan disimpan pada suhu 4° C	Sambrook & Russell 2001a: 5.9
5	Etidium bromida	Larutan stok: 10 mg/ml EtBr 1 g etidium bromida dilarutkan dalam 100 ml H ₂ O menggunakan pengaduk magnetik. Tabung dibungkus dengan <i>aluminium foil</i> dan disimpan pada suhu kamar	Sambrook & Russell 2001a: A1.26

Lampiran 7
Siklus PCR yang dijalankan



Lampiran 8

GenBank accession number

NO	Nama	GenBank accession number
1	Kolombia (COL), 1995	U50575 U50576 U50577 U50578 U50579 U50580 U50581 U50582 U50583 U50584 U50585 U50586 U50587 U50588 U50589 U50590 U50591
2	Kolombia (COL), 2005	DQ156513
3	Korea Utara (PRK), 2008	EU395592
4	Korea Selatan (KOR), 1998	AF215737 AF215738
5	Korea Selatan (KOR), 2000	AF220657 AF220658 AF220659 AF220660 AF220661 AF220662 AF220663 AF220668 AF220664 AF220665 AF220666 AF220667
6	Korea Selatan (KOR), 2005	DQ156515 DQ156522 DQ156523
	Korea Selatan (KOR), 2009	AB480883
7	India (IND), 2005	DQ156514 DQ156516
8	India (IND), 2008	EU395590
9	Vietnam (VIE), 2005	DQ156518
10	Indonesia (INA), 2005	DQ156521
11	Indonesia (INA), 2008	EU395591
12	Wosera Utara, PNG, 2000	AF289480 AF289481 AF289482 AF289483 AF289637 AF289638 AF289639 AF289640 AF289641 AF289642 AF289643 AF289644 AF289645 AF289646 AF289647 AF289648 AF289649 AF289650 AF289651 AF289652 AF289653 AF291096
13	Madang, PNG, 1992	L23069 L23070 L23071 L23072 L23073 L23074 L23075 U10103 U10104 U10105 U10106 U10107

Lampiran 8

GenBank accession number (sambungan)

NO	Nama	GenBank accession number
14	Madang, PNG, 2000	AF469522 AF469523 AF469524 AF469525 AF469526 AF469527 AF469528 AF469529 AF469530 AF469531 AF469532 AF469533 AF469534 AF469535 AF469536 AF469537 AF469538 AF469539 AF469540 AF469541 AF469542 AF469543 AF469544 AF469545 AF469546 AF469547 AF469548 AF469549 AF469550 AF469551 AF469552 AF469553 AF469554 AF469555 AF469556 AF469557 AF469558 AF469559 AF469560 AF469561 AF469562 AF469563 AF469564 AF469565 AF469566 AF469567 AF469568 AF469569 AF469570 AF469571 AF469572 AF469573 AF469574 AF469575 AF469576 AF469577 AF469578 AF469579 AF469580 AF469581 AF469582 AF469583 AF469584 AF469585 AF469586 AF469587 AF469588 AF469589 AF469590 AF469591 AF469592 AF469593 AF469594 AF469595 AF469596 AF469597 AF469598 AF469599 AF469600 AF469601 AF469602
15	Madang, PNG, 2005	AY970848 AY970849 AY970850 AY970851 AY970852 AY970853 AY970854 AY970855 AY970856 AY970857 AY970858 AY970859 AY970860 AY970861 AY970862 AY970863 AY970864 AY970865 AY970866 AY970867 AY970868 AY970869 AY970870 AY970871 AY970872 AY970873 AY970874 AY970875 AY970876 AY970877 AY970878 AY970879 AY970880 AY970881 AY970882 AY970883 AY970884 AY970885 AY970886 AY970887 AY970888 AY970889 AY970890 AY970891 AY970892 AY970893 AY970894 AY970895 AY970896 AY970897 AY970898 AY970899 AY970900 AY970901 AY970902 AY970903 AY970904 AY970905 AY970906 AY970907 AY970908 AY970909 AY970910 AY970911 AY970912 AY970913 AY970914 AY970915 AY970916 AY970917 AY970918 AY970919 AY970920 AY970921 AY970922 AY970923 AY970924 AY970925
16	Wosera Utara, PNG, 2000	AF291096
17	PNG, 2005	DQ156519
18	Thailand (THA), 2002	EF368163
		EF368159 EF368161 EF368170 EF368172 EF368174 EF368175 EF368179 EF368180 EF379128 EF379129 EF379131 EF379132 EF379133 EF379135
		EF368160 EF368162 EF368163 EF368164 EF368165 EF368166 EF368167 EF368168 EF368169 EF368171 EF368173 EF368176 EF368177 EF368178 EF379127 EF379130 EF379134 EF219451
19	Brazil (BRA), 2005	DQ156520

Lampiran 8

GenBank accession number (sambungan)

NO	Nama	GenBank accession number
20	Brazil (BRA), 2008	EU395588 EU870443 EU870444 EU870445
21	Iran Selatan (IRI), 2003	EU860428 EU860429 EU860430 EU860431 EU860432 EU860433 EU860434 EU860435 EU860436
22	Iran Utara (IRI), 2001	EU860437 EU860438
23	Palo Alto (USA), 2008	EU551130 EU551131 EU551132 EU551133 EU551134 EU551135 EU551136 EU551137
24	Simium, 2008	EU551138 EU551139 EU551140 EU551141 EU551142
25	Belem, 2008	EU395587
26	Chesson, 2008	EU395589
27	Palo Alto (USA), 2008	EU395593
28	Simium, 2008	EU395594
29	Bangladesh (BAN), 2005	DQ157473
30	Honduras (HON), 2005	DQ156517
31	Mauritania (MTN), 2005	DQ157472
32	Sal-I, 1991	M61095
33	SrilankaCPV (SRI), 2009	GU143914 GU143915 GU143916 GU143917 GU143918 GU143919 GU143920 GU143921 GU143922 GU143923 GU143924 GU143925 GU143926 GU143927 GU143928 GU143929 GU143930 GU143931 GU143932 GU143933 GU143934 GU143935 GU143936 GU143937 GU143938 GU143939 GU143940 GU143941 GU143942 GU143943 GU143944 GU143945 GU143946 GU143947 GU143948 GU143949
34	SrilankaAP (SRI), 2009	GU143950 GU143951 GU143954 GU143966 GU143968
35	SrilankaASA (SRI), 2009	GU143952 GU143953 GU143955 GU143956 GU143957 GU143958 GU143959 GU143960 GU143961 GU143962 GU143963 GU143964 GU143965 GU143967 GU143969 GU143970 GU143971 GU143972 GU143973

Lampiran 8

GenBank accession number (sambungan)

NO	Nama	GenBank accession number
36	SrilankaKTPV (SRI), 2009	GU143974 GU143975 GU143976 GU143977 GU143978 GU143979 GU143980 GU143981 GU143982 GU143983 GU143984 GU143985 GU143986 GU143987 GU143988 GU143989 GU143990 GU143991 GU143992 GU143993 GU143994 GU143995 GU143996 GU143997 GU143998 GU143999 GU144000 GU144001 GU144002 GU144003 GU144004 GU144005 GU144006 GU144007 GU144008 GU144009 GU144010
37	SrilankaLA (SRI), 2009	GU144011 GU144012 GU144013
38	BrazilAC (BRA), 2008	EU812839 EU812840 EU812841 EU812842 EU812843 EU812844 EU812845 EU812846 EU812847 EU812848 EU812849 EU812850 EU812851 EU812852 EU812853 EU812854 EU812855 EU812856 EU812857 EU812858 EU812859 EU812860 EU812861 EU812862 EU812863
39	BrazilAP (BRA), 2008	EU812864 EU812865 EU812866 EU812867 EU812868 EU812869 EU812870 EU812871 EU812872 EU812873 EU812874 EU812875 EU812876 EU812877
40	BrazilAM (BRA), 2008	EU812878 EU812879 EU812880 EU812881 EU812882 EU812883 EU812884 EU812885 EU812886 EU812887 EU812888 EU812889 EU812890 EU812891 EU812892 EU812893 EU812894 EU812895 EU812896 EU812897
41	BrazilMT (BRA), 2008	EU812898 EU812899 EU812900 EU812901 EU812902 EU812903 EU812904 EU812905 EU812906 EU812907 EU812908 EU812909 EU812910 EU812911 EU812912 EU812913 EU812914 EU812915 EU812916 EU812917 EU812918 EU812919 EU812920 EU812921 EU812922
42	BrazilPA (BRA), 2008	EU812923 EU812924 EU812925 EU812926 EU812927 EU812928 EU812929 EU812930 EU812931 EU812932 EU812933 EU812934 EU812935 EU812936 EU812937 EU812938 EU812939 EU812940
43	BrazilIRO (BRA), 2008	EU812941 EU812942 EU812943 EU812944 EU812945 EU812946 EU812947 EU812948 EU812949 EU812950 EU812951 EU812952 EU812953 EU812954 EU812955 EU812956 EU812957 EU812958 EU812959 EU812960