

IDENTIFIKASI MUTASI GEN PVK12 PENANDA RESISTENSI PLASMODIUM VIVAX TERHADAP ARTEMISIN PADA PENDERITA MALARIA SUKU ANAK DALAM DI KABUPATEN BATANG HARI PROVINSI JAMBI

Sri Wiyani, Charil Anwar, Dwi Handayani, Ahmad Ghiffari

Program Studi Ilmu Biomedik FK Universitas Sriwijaya (UNSRI), Departemen Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya (UNSRI), Universitas Muhammadiyah Palembang, Indonesia

Email: sriwiyani76@gmail.com, chairil53@fk.unsri.ac.id, dwih.dr@gmail.com, dokter.ghi@gmail.com

Abstrak

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit famili Plasmodium yang ditularkan oleh nyamuk Anopheles betina. Enam spesies Plasmodium pada manusia adalah *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* dan *P. cynomolgi* (WHO, 2016). Suku anak dalam (SAD) atau orang rimba yang hidup di pedalaman hutan Jambi secara geografik menempati wilayah utara sekitar Taman Nasional Bukit 30 selain itu menempati wilayah selatan Provinsi Jambi di daerah Taman Nasional Bukit 12. Wilayah tinggal SAD berada di dalam hutan sehingga mereka sangat rentan terhadap penyakit malaria (Dinas Kesehatan Provinsi Jambi Tahun 2015). Tujuan penelitian ini mengetahui adanya mutasi gen Pvk12 pada sampel darah yang diambil dari penderita Suku Anak Dalam yang positif *P. vivax* di kabupaten Batang Hari Provinsi Jambi. Jenis penelitian ini adalah deskriptif obeservasional dengan desain survei. Dari hasil pemeriksaan Nested PCR dari 35 sampel yang positif malaria *P. vivax* didapat dua positif ada pita di 792 bp yang selanjutnya disekuensing hasilnya hanya ada satu sampel saja yang dapat diidentifikasi dan yang lainnya tidak dapat diidentifikasi. Hasil sekuensing menunjukkan mutasi pada titik 1253, mutasi yang terjadi pada titik bukan penanda resistensi artemisin. Dari hasil diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa belum terjadi resistensi *P. vivax* pada SAD Kabupaten Batang Hari Jambi terhadap artemisin.

Kata Kunci: *P. vivax*; Gen Pvk12; SAD; resistensi; artemisin

Abstract

Malaria is caused by parasites of the Plasmodium family, which is transmitted by the female Anopheles mosquito. The six Plasmodium species in humans are P. vivax, P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. knowlesi and P. cynomolgi (WHO, 2016). The tribe of anak dalam (SAD) or jungle people who live in the interior of Jambi forest geographically occupies the northern area around the Bukit 30 National Park besides occupying the southern region of Jambi Province in the Bukit National Park area 12. SAD's living area is in the forest so they are very

vulnerable against malaria (Jambi Provincial Health Office 2015). The purpose of this research knowing the presence of Pvk12 gene mutations in blood samples taken from patients with P.vivax in Batang Hari district, Jambi Province. This type of research was a descriptive observation survey design. From the results of the Nested PCR examination of 35 positive samples of Plasmodium vivax malaria, it was found that two were positive, there was a band at 792 bp, then the results were sequenced, only one sample could be identified and the others could not be identified. The results of the screening showed mutation points at 1253 and 1958 at codons 448, 517, 568 and 576. From the results above, it can be concluded that there was a mutation of the PvK12 gene in the tribal children in Batang Hari Regency, Jambi Province but did not show artemisin resistance.

Keywords: *P. vivax; Gen PVK12; SAD; resistance; artemisin*

Received: 2021-11-20; Accepted: 2021-12-05; Published: 2021-12-20

Pendahuluan

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit famili *Plasmodium* yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Enam spesies *Plasmodium* pada manusia adalah *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* dan *P. Cynomolgi* (WHO,2016). *P. vivax* merupakan spesies yang paling banyak menginfeksi manusia dari plasmodium lainnya sekitar 40 % penderita malaria ditemukan *P. vivax*. *P. vivax* bertanggung jawab hingga 400 juta infeksi setiap tahun, mewakili spesies plasmodium paling luas bahkan *P. vivax* bertanggung jawab atas morbiditas yang signifikan bahkan penyakit parah yang menyebabkan kematian (Deida *et al.*, 2018).

Sejak lima dasawarsa upaya pengendalian malaria di Indonesia telah membuahkan hasil. Hal ini ditandai dengan menurunnya angka kejadian malaria (*Annual Parasite Incidence-API*) dari 1,75 pada tahun 2011 menjadi 0,85 pada tahun 2015 (Infodatin Kemenkes RI, 2016). Pada tahun 2017 sebesar 0,99 per 1000 penduduk tahun 2018 menjadi 0,68 per 1000 penduduk dengan total positif malaria adalah 180.205 orang. Propinsi Jambi tahun 2018 adalah 0,03 per 1000 penduduk dengan jumlah total 121 orang positif malaria, Kabupaten Batang Hari API yaitu 0,042 per 1000 penduduk (Dinas Kesehatan Provinsi Jambi, 2017).

Resistensi artemisinin beserta derivatnya pada *P. vivax* diketahui salah satunya berkaitan dengan *single nucleotide polymorfisme* (SNP) multiple pada kromosom 12 *P. vivax* yaitu *kelch12 (K12)* (Tresnawati, Kusuma, Wijaya, & Hasibuan, 2019). Mutasi pada domain *propeller* dari gen *Plasmodium vivax Kelch12 (PvK12)* erat kaitannya dengan resistensi artemisin. Adanya mutasi gen ini akan mengubah respon *P. vivax* terhadap stress oksidatif yang ditimbulkan oleh artemisin dengan melibatkan jalur *proteasome-ubiquitin*. Mutasi pada gen ini terletak pada baling-baling domain *propeller* bilah ketiga. Protein K12 terdiri dari 3 domain spesifik *Plasmodium* yaitu domain Tho2 super family, BTB-POZ, dan sebuah domain *propeller* dengan 6-blade, dimana kejadian mutasi terkait resistensi artemisin mayoritas terletak pada domain *propeller* dari protein tersebut (Tripura *et al.*, 2017).

Identifikasi Mutasi Gen *Pvk12* Penanda Resistensi *Plasmodium Vivax* Terhadap Artemisin Pada Penderita Malaria Suku Anak dalam Di Kabupaten Batang Hari Provinsi Jambi

Suku Anak Dalam (SAD) atau orang rimba yang hidup di pedalaman hutan Jambi secara geografik menempati wilayah utara sekitar Taman Nasional Bukit 30 selain itu menempati wilayah selatan Provinsi Jambi di daerah Taman Nasional Bukit 12, populasi SAD ditahun 2010 berjumlah 3205 orang yang hidup di wilayah administrasi Kabupaten Merangin, Kabupaten Sarolangun, Batang Hari, Tanjung Jabung Barat, Tebo dan Muaro Bungo. Wilayah tinggal SAD berada di dalam hutan sehingga mereka sangat rentan terhadap penyakit malaria ([Dinas Kesehatan Provinsi Jambi Tahun 2015](#)).

Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan desain survey Penelitian ini dilakukan di daerah Suku Anak Dalam di Kabupaten Batang Hari Provinsi Jambi ([Andini, 2013](#)). Penelitian dilakukan mulai bulan Oktober 2019 sampai dengan bulan Oktober 2020. Sampel isolate DNA SAD diperiksa di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran UnsriGen kelch pada *Plasmodium vivax* diamplifikasi menggunakan nested PCR. Primer spesifik yang digunakan untuk amplifikasi domain baling-baling kelch merujuk jurnal Plos One sebagai berikut:

P.vivax

K13_Pvx_F1 5'CATTTCCTCAACTTCTCCGTC-3'

K13_Pvx_R1 5' TATCTGCCACTCATTCGTG-3' K13_Pvx_F2 5'
CGAAAGTGAGGCTTTACTA-3'

K13_Pvx_R2 5' CCACCAGTGATGATGTAC -3'

Spesifik primer ini dirancang oleh Talundzic et al., 2015, spesifik primer ini muncul pita pada 792 bp.

A. *Nested PCR*

Komposisi campuran yang digunakan sebanyak volume total 25 μ L PCR *Mix Go Taq* (Promega USA) terdiri dari: 9 μ L ddH₂O, 10 μ L *Green Go Taq* dan 5 μ L DNA cetakan (*template*) serta primer oligonukleotida *reverse* (R) dan *forward* (F) masing-masing 0,5 μ L. Melalui teknik ini, fragmen DNA target yang spesifik diperbanyak secara *in vitro* dengan menggunakan pasangan primer oligonukleotida sintetik yang membatasi daerah yang akan diperbanyak. Amplifikasi DNA dilakukan 2 tahap (*nested*), yaitu:

- PCR pertama, untuk amplifikasi gen *pvk12* parasit *P. vivax* dengan menggunakan sepasang primer spesifik. Tiap campuran mengandung 5 μ L DNA hasil ekstraksi sebagai cetakan (*template*). Ditambahkan kedalam 20 μ L reaksi PCR yang terdiri dari: 9 μ L ddH₂O, 10 μ L *Green Go Taq*, dan 1 μ L primer (0,5 μ L primer R1 dan 0,5 μ L primer F1). Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Thermal Cycler*. Campuran diamplifikasi sebanyak 34 siklus dengan kondisi sebagai berikut: predenaturasi pada 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing 59 °C, ekstensi 72 °C selama 6 menit dan diakhiri dengan 12 °C selama 12 menit ([Talundzic et al., 2015](#)).
- PCR kedua (*nested PCR*), untuk memperbanyak DNA yang sudah diamplifikasi pada PCR yang pertama agar dapat divisualisasi. Produk DNA hasil amplifikasi

pada PCR pertama, diamplifikasikan kembali menggunakan internal primer untuk gen *pvkelch12 P.vivax*. Untuk reaksi yang kedua digunakan ddH₂O 12 µL, 10 µL *Green Go Taq*, dan 1µL primer (0,5 µL primer R2 dan 0,5 µL primer F2) kemudian amplikon dimasukan kedalam mesin thermal cycle lalu diulang pada 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing 58,2 °C sebanyak 34 siklus, ekstensi 72 °C selama 6 menit dan diakhiri dengan 12 °C selama 7 menit (Talundzic *et al.*, 2015).

B. Deteksi Hasil PCR

Kualitas hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilihat dengan menggunakan teknis elektroforesis gel agarose (konsentrasi 2%). Elektroforesis dilakukan di dalam appartus elektroforesis (*Horizontal MiniSub DNA Biorad*) yang berisi TBE 1x (Tris-Boric acid-EDTA: 10,8 g/L. Tris pH 8,0 yang mengandung 5.5 g/L Boric Acid dan 0,5 M EDTA pH 8,0) dan ditambahkan zat interkalator Ethidium Bromide 0,1%.

DNA hasil PCR sebanyak 5 µL dimasukkan dalam sumuran yang terdapat pada gel agarose 2 %. Sebagai penanda ukuran pita-pita DNA hasil elektroforesis pada gel Marker (100bp DNA ladder Cat no: 15628-019 LOT NO. 1289697 sebanyak 3µg/µL; Promega) yang di campur 2 µL *loading dye* dan 4,5 µL 1x TBE buffer.

Gel dielektroforesis pada tegangan listrik 100 volt,400 mA selama 30 menit. Selanjutnya dideteksi dengan menggunakan *Gel Doc 1000* (Biorad USA) untuk divisualisasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam.

Hasil dan Pembahasan

A. Hasil Penelitian

Sampel penelitian yang positif *P. vivax* berjumlah 35 sampel kemudian di amplifikasi dengan nested PCR lalu di elektroforesis dengan menggunakan agarose 2% kemudian dibaca dengan geldoc dengan hasil sebagai berikut.

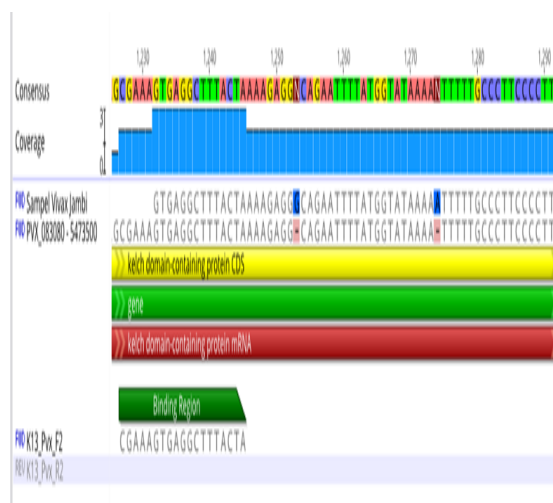


Gambar 1
Visualisasi PCR No.8 dan 33

Identifikasi Mutasi Gen Pvk12 Penanda Resistensi Plasmodium Vivax Terhadap Artemisin Pada Penderita Malaria Suku Anak dalam Di Kabupaten Batang Hari Provinsi Jambi

1. Sekuensing

Dari hasil yang didapat ada 2 sampel positif menunjukkan pita pada 792 bp yaitu sampel no.8 dan 33, Setelah sampel didapat langkah selanjutnya dilakukan sekuensing untuk memperoleh urutan basa. Untuk persiapan sekuensing sampel terlebih dahulu dilakukan pretreatmen yaitu dengan melakukan *nested* PCR kembali. Kemudian 2 sampel positif yang muncul pita dan sudah di pretreatmen dikirim ke PT. Genetica Science di Jakarta selanjutnya sampel dikirim ke Apical 1st Base Malaysia. Hasil yang didapat ternyata hanya satu sampel yang dapat dibaca yaitu sampel no.8, satu sampel lagi tidak bisa dibaca. Berikut hasil sekuensing.



Gambar 2 Hasil sekuensing dengan titik mutasi 1253

B. Pembahasan

Dari hasil amplifikasi 35 sampel yang positif malaria *P. vivax* pada SAD di kabupaten Batang Hari hanya muncul 2 sampel yang menunjukkan hasil positif atau pita pada 792 bp, yang menandai adanya alel mutan gen *Pvk12* sebagai penanda resistensi artemisin. Selebihnya 33 sampel negatif atau tidak muncul pita. Pada sampel no.8 hasil sekuensing menunjukkan adanya mutasi pada titik 1253, mutasi tersebut tidak terjadi pada titik penanda resistensi *P. vivax* terhadap artemisin.

Mutasi lain telah terjadi pada sampel *P. vivax* Jambi, namun tidak pada titik penanda. Mutasi ini tidak dapat disimpulkan sebagai penanda resistensi obat malaria pada pasien Jambi, karena diambil bukan dari isolat pasien yang mengalami resistensi melainkan dari hasil surveilans. Hal ini menunjukkan bahwa belum terjadi resistensi *P. vivax* terhadap artemisin pada SAD, sehingga obat artemisin masih dapat digunakan pada SAD di kabupaten Batang hari jambi.

Resistensi artemisin memiliki pola posisi mutasi yang berbeda di setiap wilayah endemis malaria. Mutasi pada gen ini akan menyebabkan respon stress oksidatif sehingga sel tidak terdegradasi walaupun telah diberikan artemisin.

Resistensi terhadap artemisin dapat ditanggulangi dengan memperpanjang durasi pengobatan (Tantiamornkul, Pumpaibool, Piriyaongsa, Culleton, & Lek-Uthai, 2018).

Resistensi *P. vivax* terhadap artemisin disebabkan oleh mutasi gen PvK12 dengan cara yaitu artemisin yang masuk kedalam tubuh dalam bentuk inaktif yang akan diaktivasi oleh Fe⁺² (hasil degradasi hemoglobin) untuk menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif dan akan bereaksi dengan protein parasit menyebabkan alkilasi protein. Alkilasi dapat menyebabkan kematian sel dan kematian parasit. Tetapi pada *P. vivax* dengan mutasi K12 terjadi peningkatan respon stress akibat keterlibatan jalur *proteasome-ubiquitin*, sehingga sel tetap bertahan hidup (Popovici & Ménard, 2015). Protein K12 Pada parasit yang sensitive terhadap artemisin akan berikatan dengan sebuah factor transkripsi dan mengatur terjadinya degradasi sedangkan parasit yang resistensi terhadap artemisin, K12 tidak dapat berikatan dengan faktor transkripsi tersebut sehingga menyebabkan *upregulasi* dari gen yang terkait respon anti oksidan. Dalam kondisi ini parasit mampu mengatasi stress oksidatif dari artemisin secara lebih baik.

Menurut (Popovici & Ménard, 2015) Polimerfisme PvK12 *P. vivax* di Kamboja sangat terbatas dibandingkan dengan polimorfisme *P. falciparum* gen PfK13. Hanya 2 dari 284 sampel yang memiliki mutasi pada kodon 552 (V552I) pada sampel yang dikumpulkan dari tahun 2013, begitu juga di Indonesia polimorfisme pvk12 *p. vivax* masih jarang dilakukan penelitian. Mutasi yang terjadi pada SAD di Kabupaten Batang Hari jambi yaitu pada titik G1253A.

Kesimpulan

Terjadi mutasi gen Pvk12 pada Suku Anak Dalam di kabupaten Batang Hari Provinsi Jambi, ditemukan pada titik mutasi 1253. Mutasi yang terjadi di titik 1253, CAG menjadi GCA glutamin menjadi arginine. Meskipun telah terjadi mutasi gen PvK12, namun hasil analisa menunjukkan tidak terjadi resistensi artemisin pada Suku Anak Dalam tersebut karena mutasi tidak pada titik penanda resistensi artemisin. Untuk pengobatan malaria yang positif pada Suku Anak Dalam di Kabupaten Batang Hari Propinsi Jambi masih dapat menggunakan artemisin.

BIBLIOGRAFI

- Andini, Restian Febi. (2013). *Mikrostruktur Enamel Gigi Bovine Setelah Perendaman Dalam Ekstrak Teh Hijau Dan Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (Penelitian Deskriptif Observasional)*. Universitas Airlangga. [Google Scholar](#)
- Dinas kesehatan Provinsi Jambi. (2017). 7(2), 1–16.
- Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030 - World Health Organization - Google Books*. (n.d.). [Google Scholar](#)
- Jambi, Dinas Kesehatan Provinsi. (2015). Dinas Kesehatan Provinsi Jambi Tahun 2015. In *Dinas Kesehatan Provinsi Jambi 2014*.
- Mint Deida, Jemila, Ould Khalef, Yacoub, Mint Semane, Emal, Ould Ahmedou Salem, Mohamed Salem, Bogreau, Hervé, Basco, Leonardo, Ould Mohamed Salem Boukhary, Ali, & Tahar, Rachida. (2018). Assessment of drug resistance associated genetic diversity in Mauritanian isolates of Plasmodium vivax reveals limited polymorphism. *Malaria Journal*, 17(1), 1–7. [Google Scholar](#)
- Popovici, Jean, & Ménard, Didier. (2015). Challenges in Antimalarial Drug Treatment for Vivax Malaria Control. *Trends in Molecular Medicine*, 21(12), 776–788. [Google Scholar](#)
- Talundzic, Eldin, Chenet, Stella M., Goldman, Ira F., Patel, Dhruviben S., Nelson, Julia A., Plucinski, Mateusz M., Barnwell, John W., & Udhayakumar, Venkatachalam. (2015). Genetic analysis and species specific amplification of the artemisinin resistance-associated kelch propeller domain in *P. falciparum* and *P. vivax*. *PLoS ONE*, 10(8), 1–11. [Google Scholar](#)
- Tantiamornkul, Kritpaphat, Pumpaibool, Tepanata, Piriyaongsa, Jittima, Culleton, Richard, & Lek-Uthai, Usa. (2018). The prevalence of molecular markers of drug resistance in Plasmodium vivax from the border regions of Thailand in 2008 and 2014. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(2), 229–237. [Google Scholar](#)
- Tresnawati, Lina Herlina, Kusuma, Wisnu Ananta, Wijaya, Sony Hartono, & Hasibuan, Lailan Sahrina. (2019). Asosiasi Single Nucleotide Polymorphism pada Diabetes Mellitus Tipe 2 Menggunakan Random Forest Regression. *Jurnal Nasional Teknik Elektro Dan Teknologi Informasi (JNTETI)*, 8(4), 320–326. [Google Scholar](#)
- Tripura, Rupam, Peto, Thomas J., Veugen, Christianne C., Nguon, Chea, Davoeung, Chan, James, Nicola, Dhorda, Mehul, Maude, Richard J., Duanguppama, Jureeporn, & Patumrat, Krittaya. (2017). Submicroscopic Plasmodium prevalence in relation to malaria incidence in 20 villages in western Cambodia. *Malaria Journal*, 16(1), 1–12. [Google Scholar](#)

Copyright holder:

Sri Wiyani, Charil Anwar, Dwi Handayani, Ahmad Ghifari (2021)

First publication right:

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

This article is licensed under:

