



PENGEMBANGAN EPITOP PMSA1 *Plasmodium falciparum* ISOLAT LOKAL SIKKA ENDEMIK MALARIA

Aura Rahima¹ dan Fitri Elfata^{2*}

^{1&2}Program Studi Pendidikan Biologi, FPMIPA, IKIP Muhammadiyah Maumere,
Indonesia

*E-Mail : el_fata1@gmail.com

ABSTRAK: Prevalensi malaria di Provinsi Nusa Tenggara Timur hingga kini tergolong tinggi, salah satu penyebabnya adalah polimorfisme genom *Plasmodium Merozoite Surface Antigen 1* (PMSA1) pada *plasmodium* yang menginvasi eritrosit. Pengembangan epitop PMSA1 isolat Sikka belum banyak dilaporkan, sehingga perlu diidentifikasi lebih mendalam antigen PMSA1 dan epitopnya untuk desain vaksin malaria. Pemeriksaan parasit melalui mikroskop, DNA genomik *P. falciparum* diisolasi kemudian gen pengkode PMSA1 diamplifikasi PCR dan dikloning menggunakan pGEM-Teasy dan *E. coli* TOP'10. DNA target dikonfirmasi dengan koloni PCR dan sekuensing, konstruksi pohon filogenetik, dan analisis epitop. Sebanyak 15 isolat DNA genomik dan produk PCR sepanjang ± 1049 bp berhasil dideteksi. Hasil konstruksi filogenetik menunjukkan bahwa, PMSA1 terdistribusi menjadi tiga kelompok alel, yaitu: K1 (8); MAD20 (1); dan PMSA1_Sikka (11), yang didominasi alel tunggal PMSA1_Sikka. Penelitian ini telah mendapatkan satu kelompok PMSA1 Sikka yang berbeda dengan alel yang telah diidentifikasi sebelumnya, diperkuat dengan studi *in silico* menghasilkan kandidat epitop antigen baru dari isolat Sikka, bersifat imunogenik dengan panjang 17 aa dan diprediksi mampu memicu respon antibodi.

Kata Kunci: Epitop, *Plasmodium falciparum*, PMSA1, Polimorfisme, Studi *in Silico*.

ABSTRACT: The prevalence of malaria in East Nusa Tenggara Province is relatively high, one of the causes is the genomic polymorphism of *Plasmodium Merozoite Surface Antigen 1* (PMSA1) on *plasmodium* that invades erythrocytes. The development of PMSA1 epitopes for Sikka isolates has not been widely reported, so it is necessary to identify PMSA1 antigens and their epitopes in depth for the design of malaria vaccines. Parasite examination through a microscope, genomic DNA of *P. falciparum* was isolated then the gene encoding PMSA1 was PCR amplified and cloned using pGEM-Teasy and *E. coli* TOP'10. Target DNA was confirmed by PCR colony and sequencing, phylogenetic tree construction, and epitope analysis. A total of 15 isolates of genomic DNA and PCR products along ± 1049 bp were detected. The results of the phylogenetic construction showed that PMSA1 was distributed into three allele groups, namely: K1 (8); MAD20 (1); and PMSA1_Sikka (11), dominated by the single PMSA1_Sikka allele. This study has found a different PMSA1 Sikka group with previously identified alleles, strengthened by *in silico* studies to produce a new candidate antigen epitope from Sikka isolates, immunogenic with a length of 17 aa and predicted to trigger an antibody response.

Keywords: Epitope, *Plasmodium falciparum*, PMSA1, Polymorphism, Study in Silico.



Biocaster : Jurnal Kajian Biologi is Licensed Under a CC BY-SA [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit endemis di 105 negara di dunia, dan Indonesia termasuk di dalamnya dengan 60% penduduk yang tinggal di daerah endemis (WHO, 2017a). Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* masih menjadi ancaman serius bagi kesehatan, khususnya bagi anak-anak dan ibu





hamil di daerah endemis (Crompton *et al.*, 2012). Berdasarkan laporan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), sekitar 196-263 juta terkonfirmasi positif dan 945 ribu mengalami kematian (WHO, 2017a). Sebagian besar dari kasus kematian akibat malaria ini menimpa anak-anak berusia kurang dari 5 tahun yang hidup di daerah sub Sahara Afrika, yang menyumbang proporsi kasus tertinggi secara global sekitar 27% dari total penderita (WHO, 2017b).

Penyakit malaria dibawa oleh vektor nyamuk *Anopheles*. Kelenjar ludah yang dikeluarkan *Anopheles* betina berisi *Plasmodium falciparum* akan memasukkan sekitar 5 sampai 20 sporozoit ke dalam kulit atau ke dalam aliran darah secara langsung (Douradinha & Doolan, 2011). Seringkali sulit diatasi, karena malaria disebabkan karena secara genetik. *Plasmodium* mengalami perubahan komposisi genom (mutasi), menghadapi berbagai tekanan faktor eksternal untuk membentuk galur baru yang lebih resisten terhadap obat anti malaria. Di wilayah Indonesia timur, prevalensi penyakit malaria masih sangat tinggi. Tahun 2016 sebanyak 721.524 kasus malaria dilaporkan dan sekitar 51,08% dari jumlah tersebut ditemukan di 5 provinsi di wilayah Indonesia Timur, yaitu: Maluku, Maluku Utara, Nusa Tenggara Timur, Papua, dan Papua Barat (Kemenkes RI, 2016). Berdasarkan laporan dari Dinas Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Timur tahun 2015, malaria dilaporkan endemik di seluruh kabupaten dan kota, di mana *Annual Parasite Incidence* (API) Kupang merupakan yang tertinggi ditemukan di antara seluruh wilayah Indonesia (API = 39,93) (Dinkes Provinsi Nusa Tenggara Timur, 2015; Kemenkes RI, 2016).

Annual Parasite Incidence (API) merupakan jumlah penderita malaria (terinfeksi parasit) yang dikonfirmasi melalui pemeriksaan laboratorium dengan hasil positif terhadap populasi di wilayah tertentu per 1000 penduduk dalam waktu satu tahun. Nilai API yang tinggi berpengaruh terhadap meningkatnya angka morbiditas (terpapar penyakit) dan mortalitas (kematian) pada suatu wilayah (Kemenkes, 2016).

Malaria memiliki spektrum manifestasi klinis yang sangat luas, mulai dari tanpa gejala (*asymptomatic*) sampai kepada bentuk manifestasi klinis berat dengan komplikasi yang berakibat fatal (Miller *et al.*, 2002). Parasit malaria telah teridentifikasi pada beberapa faktor, misalnya resistensi terhadap obat anti malaria, perlekatan pada endotel (*cytoadherence*), polimorfisme gen parasit dengan keanekaragaman antigen. Peran dari keanekaragaman antigen pada parasit terhadap manifestasi klinis sudah banyak diteliti, salah satunya adalah *Plasmodium Merozoite Surface protein* (PMSA) atau dikenal juga dengan nama *Merozoite Surface Protein* (MSP1). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa, variasi genotip PMSA1 dan PMSA2, serta antigen-antigen parasit yang diekspresikan pada membran merozoit, berkaitan dengan tingkat keparahan manifestasi klinis malaria (Ariey *et al.*, 2001; Kun *et al.*, 2002; Amodu *et al.*, 2005; Ranjit *et al.*, 2005; Nicastrì *et al.*, 2008).

PMSA1 sebagai pemicu malaria dikode oleh kromosom ke sembilan pada spesies *Plasmodium falciparum* yang terdistribusi ke dalam 17 blok, di antaranya: 5 blok konservatif, 5 blok semi konservatif, dan 7 blok variatif (Birkenmeyer *et al.*, 2010). Setiap blok bersifat dimorfis dan telah ditandai sebagai alel K1 dan





MAD20, pengecualian pada blok 2 memiliki 3 kombinasi alel, yaitu: K1, MAD20, dan RO33 yang tidak ditemukan pada blok lainnya. PMSA1 pada proses perkembangannya memiliki 7 blok variabel yang terpisah, baik oleh daerah *conserve* atau *semi conserve*. Blok 2 adalah sebuah daerah di dekat ujung terminal N dari protein PMSA1, merupakan bagian antigen yang paling polimorfik dan bagian paling kuat dalam variasi gen. diperkuat dengan adanya kemampuan PMSA1 atau MSP1 yang terbukti berikatan langsung dengan reseptor pada permukaan eritrosit (Cowman *et al.*, 2012; Wiser, 2013). PMSA1 blok 2 menjadi kandidat potensial untuk pengembangan vaksin malaria (Crompton *et al.*, 2012).

Menyikapi kondisi tersebut, diperlukan kajian mendalam mengenai polimorfisme genetik dan prediksi epitop untuk mengembangkan vaksin malaria di Kabupaten Sikka. Hal tersebut menjadi pertimbangan kuat karena didukung oleh temuan Mwingira *et al.* (2011), bahwa polimorfisme tinggi pada *Plasmodium falciparum* telah ditunjukkan pada gen PMSA1, PMSA2, dan Glurp pada lokasi geografis yang berbeda di beberapa daerah endemis penyakit malaria. Terkhusus untuk pembuatan vaksin, perlu adanya identifikasi epitop yang dapat memunculkan respon imun secara *in silico*. Metode ini akan dapat mengurangi waktu terkait penapisan epitop potensial hingga 95% (Groot *et al.*, 2001). Pendekatan *in silico* memberikan gambaran hubungan yang erat antara prediksi epitop menggunakan analisis bioinformatika dengan pengujian berbasis laboratorium secara *in vitro*. Desain vaksin dengan menggunakan epitop memberikan beberapa keuntungan, termasuk ketepatan aktivasi respon imun, kemampuan untuk fokus pada daerah antigen tertentu (lestari dan atau imunogenik), sehingga produk vaksin yang dihasilkan aman (Oyarzun *et al.*, 2013).

Penelitian mengenai protein permukaan PMSA1 isolat *Plasmodium falciparum* Kabupaten Sikka Provinsi Nusa Tenggara Timur sangat menarik untuk dikaji lebih jauh, karena Sikka adalah daerah endemis malaria dengan potensi polimorfisme gen yang tinggi, didukung oleh data dengan nilai API tertinggi di Indonesia (API = 39,93) (Kemenkes, 2016). Oleh karena itu, bahasan tentang analisis polimorfisme genetik dan potensi antigen PMSA1 sebagai kandidat vaksin khusus untuk penyakit malaria Sikka perlu untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk memetakan polimorfisme genetik dan memprediksi kandidat epitop untuk upaya pengembangan vaksin dari gen PMSA1 isolat asli pasien malaria Sikka yaitu jenis antigen *Plasmodium Merozoite Surface Antigen 1* yang mempunyai karakteristik imunogenik, polimorfisme yang tinggi, serta paling banyak ditemukan pada permukaan sel darah merah yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*.

METODE

Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif laboratoris, untuk mengamplifikasi gen PMSA1 dan menganalisis blok 2 dari *Plasmodium falciparum*, juga dilakukan analisis secara *in silico* untuk memprediksi kandidat epitop dengan menggunakan *software* bioinformatika.





Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah semua pasien yang datang ke laboratorium dan telah didiagnosa oleh dokter terkait (*passive case detection*). Sedangkan sampel merupakan pasien yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi (Nursalam, 2003). Adapun Kriteria inklusi meliputi: laki-laki dan perempuan berusia ≥ 12 tahun, infeksi oleh *P. falciparum* dengan jumlah parasit aseksual > 10.000 parasit/ul darah, suhu $\geq 39^{\circ}\text{C}$ atau mempunyai riwayat demam 48 jam sebelumnya, malaria berat dan mempunyai gejala simptomatik. Sementara itu, kriteria eksklusi meliputi: hematologi kronis dan akut, adanya infeksi campuran, malnutrisi atau penyakit berat lainnya, panas yang disebabkan oleh penyakit selain malaria, serta telah mendapat terapi malaria (Sorontou, 2013). Sebanyak lima belas sampel dianalisis lebih lanjut dalam penelitian ini.

Pengamatan Mikroskopis Darah

Pengamatan mikroskopis pada sediaan darah dilakukan oleh dua atau lebih observer. Penentuan darah yang dipilih untuk dijadikan sebagai bahan analisis molekuler adalah yang memiliki parasit *Plasmodium falciparum* melalui pewarnaan giemsa dan pemeriksaan mikrobiologi menggunakan mikroskop. Pewarnaan giemsa dipilih karena teknik pewarnaan yang paling bagus dan sering digunakan untuk mengidentifikasi parasit yang ada di dalam darah (Sacher, 2004). Sediaan yang sudah kering dihemolisis dengan metanol ± 15 menit. Kemudian sediaan ditetesi dengan larutan giemsa 5%, dibiarkan 30 menit. Lalu sediaan dibersihkan dengan air, dikeringkan. Preparat siap untuk diperiksa di bawah mikroskop. Spesies *Plasmodium falciparum* diamati berdasarkan stadium trophozoit, skizon, dan gametosit. Stadium tersebut dapat dibedakan dengan melihat perbedaan inti, sitoplasma, pigmen parasit, ukuran parasit dan eritrosit yang terinfeksi. Hasil pemeriksaan dinyatakan negatif apabila tidak ditemukan parasit pada pengamatan 100 lapangan pandang, yang dinyatakan oleh kedua observer (Sorontou, 2013).

Isolasi DNA Genomik *P. falciparum*

Total 15 sampel klinis pasien positif terinfeksi *P. falciparum* diisolasi DNA genomnya menggunakan protokol dari perusahaan Zymo Research dengan produk *Quick-DNA™ Universal Kit*. Berikut adalah langkah isolasi DNA tersebut: sebanyak 500 μl *buffer* GMO1 dan 20 μl Proteinase K (20 mg/ml) ditambahkan pada sampel darah 200 μl , kemudian divorteks selama 1 menit. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 1 jam dan dikocok setiap 15 menit sekali. Selanjutnya, 200 μl Buffer GMO2 ditambahkan pada campuran dan divorteks selama 1 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruang ($15-25^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit. Campuran disentrifugasi pada 13.800 gram selama 5 menit, kemudian supernatan dipindahkan pada tabung baru. Sebanyak 0,7 volume isopropanol 80% ditambahkan pada supernatan, lalu dihomogenkan dengan cara divorteks (contohnya ditambahkan 350 μl isopropanol 80% pada 500 μl supernatan), disentrifugasi pada kecepatan 13.800 gram selama 3 menit, dan supernatan dibuang. Pelet disimpan untuk digunakan selanjutnya. Sebanyak 700 μl alkohol 70% ditambahkan pada pelet, dihomogenisasi dengan vorteks selama 5 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 13.800 gram, supernatan dibuang





kemudian ditambahkan kembali 700 μ l alkohol 70% , divorteks dan disentrifugasi dengan cara yang sama. Penutup tabung dibuka dan diinkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 10 menit. Selanjutnya, 20-50 μ l *buffer* TE ditambahkan pada pelet dan dihomogenisasi dengan vorteks selama 1 menit. Selanjutnya, hasil isolasi DNA dikonfirmasi dengan elektroforesis *gel agarose* 1%, pada tegangan 70 volt selama 35 menit.

Amplifikasi Gen PMSA1 dengan PCR

Gen PMSA1 blok 2 diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan DNA genomik sebagai cetakan. Kontrol negatif tanpa DNA disertakan untuk memastikan reagen-reagen PCR yang digunakan bebas kontaminasi. Total volume *master mix* 90 μ L yang dibagi ke dalam 5 tabung PCR dengan masing-masing tabung berisi 18 μ L, kemudian setiap tabung ditambahkan DNA cetakan sebanyak 2 μ L lalu dicampur hingga menyatu dengan baik. Primer yang digunakan adalah PfP MSA1_Forward (5'-CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG-3'), dan PfP MSA1_Reverse (5'-CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA-3) dengan gen target *Polimorfik Merozoit Surface Antigen-1* (Saha *et al.*, 2016).

Kloning Gen PMSA1

Jenis bakteri (sel kompeten) yang digunakan dalam penelitian ini adalah *strain* bakteri *E. coli* TOP 10. Bakteri ini menjadi sel inang untuk keberlangsungan proses kloning gen *Plasmodium Merozoite Surface Protein 1* (PMSA1). Prosedur Ligasi Gen PMSA1 meliputi tahapan: reaksi ligase berisi 1 μ L (0,05 pmol) pGEM-T *easy cloning vektor* (50 ng/ μ L), 1 μ L T4DNA ligase (1-3 U/ μ L), PMSA1 hasil purifikasi sebanyak 3 μ L, dan dua kali *rapid ligation buffer* sebanyak 5 μ L. Larutan dihomogenkan dan *disentrifuge* selama 5 detik. Lalu dimasukkan ke inkubator temperatur 4°C (18-24) jam (Promega, 2020). Sedangkan prosedur transformasi menggunakan metode *heat shock transformation* (Das & Dash, 2015).

Isolasi Plasmid Rekombinan

Isolasi Plasmid pGEMT *Easy* dari *E. coli* TOP 10 mengikuti prosedur *Presto Mini Plasmid Kit Geneaid* (Promega, 2020).

Konfirmasi pGEMT Easy Rekombinan

Campuran reaksi PCR diramu dalam *tube* 1,5 ml. Reaksi PCR berisi campuran: *nuclease free water* 7 μ L, *Green Taq PCR Master Mix* 10 μ L, PfPMSA1_Forward (5'-CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG-3') 0,5 μ L, PfPMSA1_Reverse (5'-CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA-3) 0,5 μ L (Saha *et al.*, 2016). Adapun sampel plasmidnya ditambahkan 2 μ L plasmid rekombinan ke dalam masing-masing tabung PCR. Selanjutnya, tabung PCR di *quick spin*. Tabung PCR ditempatkan secara teratur dalam *thermocycler*, lalu diatur kondisi pra-denaturasi suhu 95°C (3 menit), denaturasi 95°C (30 detik), *annealing* (30 detik), *annealing* 56°C, ekstensi suhu 72°C (2 menit), dan final ekstensi 72°C (7 menit).

Analisa Phylogenetic Tree

Sekuensing dilakukan dari dua arah (*forward* dan *reverse*). Data mentah hasil sekuensing diedit dengan program *Seqtrace* versi 0.9.0 (Stucky, 2012) dan *Bioedit* versi 7.2.5 (Hall, 1999). Sekuen konsensus yang dihasilkan kemudian





dicarikan spesies-spesies yang homolog (BLAST) berdasarkan sekuen gen PMSA1nya pada situs jejaring NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Dari hasil BLAST dipilih spesies yang memiliki kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* isolat Sikka, alel K1, MAD 20, dan RO33, serta spesies *Plasmodium vivax* untuk dijadikan kelompok luar (*out group*). Sekuen daerah konsensus PMSA1P. *Falciparum* isolat Sikka dan sekuen yang diunduh dari NCBI dilakukan pensejajaran (*alignment*) dengan metode *alignment* berbasis *Muscle* (Edgar, 2004). Setelah itu, pohon filogenetik dibentuk berdasarkan hasil pensejajaran tersebut. Pembuatan *phylogenetic tree* memakai *Neighbor Joining* dengan pemberian *bootstrap* 1000 pada program MEGA V.6 (Tamura *et al.*, 2013). Data sekuensing yang telah diolah dengan beberapa *software* bioinformatika, disajikan secara naratif deskriptif.

Studi *in Silico* untuk Prediksi Epitop

Prediksi epitop dari antigen tersebut dianalisis dengan *software Epitope Prediction*, yaitu menggunakan *web server online Immune Epitope Database* (IEDB). Adapun parameter yang dikaji ialah aspek antigenisitas, sifat hidrofilik, fleksibilitasnya, dan aksesibilitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi *Plasmodium falciparum*

Hasil pengamatan melalui mikroskop, gambar yang didapat menunjukkan sel-sel darah, baik eritrosit, leukosit, dan jenis parasit *Plasmodium* nya. Preparat apusan darah yang telah selesai terwarnai Giemsa, hasilnya terlihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Tampak inti parasit berwarna ungu tua (biru keunguan), sitoplasma yang berwarna ungu muda, dan terlihat pigmen berwarna ungu kehitaman. Tampak stadium trophozoit pada *Plasmodium falciparum* melalui pengamatan menggunakan mikroskop terlihat pada sediaan darah yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*, eritrositnya tidak mengalami pembesaran. Kondisi ini sejalan dengan ciri khas morfologi eritrosit bahwa ukurannya tidak berubah meskipun telah terinfeksi *Plasmodium falciparum*.

Produk DNA Genomik *Plasmodium falciparum*

Produk isolasi DNA genom dari *Plasmodium falciparum* dielektroforesis untuk mengetahui ada tidaknya DNA. Isolasi sampel medis yang diisolasi berupa *whole blood* yang berasal dari darah pasien positif malaria di RSUD DOK 2 Kabupaten Sikka. Gambar 2 menunjukkan elektroferogram hasil isolasi DNA genom *Plasmodium falciparum*.

Amplikon Gen PMSA1

Proses amplifikasi gen PMSA1 *P. falciparum* menggunakan metode PCR dengan temperatur *annealing* 46⁰C sebanyak 30 siklus. Proses amplifikasi gen PMSA1 berhasil dilakukan pada cetakan DNA genomik. Amplifikasi gen PMSA1 dengan menggunakan sepasang primer menghasilkan pola pita seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.

Hasil Pengamatan Kloning Gen PMSA1

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4, memperlihatkan proses transformasi berhasil dilakukan. Diperoleh sebanyak 33 koloni pada medium LB





padat yang mengandung *Amp*, IPTG, dan *X-gal*. Pada kontrol positif, koloni bakteri tumbuh berwarna biru dan tidak ditemukan adanya kontaminasi, sementara itu pada kontrol negatif tidak ada koloni bakteri yang tumbuh. Sedangkan pada sampel dengan kode PMSA1_1 tumbuh koloni berwarna biru dan putih. Koloni warna putih adalah *E. coli* TOP 10 yang mengandung plasmid rekombinan, sedangkan koloni biru adalah *E. coli* TOP 10 yang mengandung plasmid tanpa sisipan DNA. Gambar 4 memperlihatkan hasil transformasi dan penapisan melalui seleksi biru putih (*blue white screening*).

Hasil Konfirmasi pGEMT Easy Rekombinan

Konfirmasi melalui PCR dilakukan dengan menggunakan DNA cetakan dari koloni bakteri transforman. Tujuan konfirmasi hasil transformasi adalah untuk mengetahui keberadaan gen PMSA1 dalam pGEM-T *Easy*. Ini juga merupakan salah satu cara untuk melihat keberhasilan integrasi gen sisipan dalam plasmid dengan menggunakan primer yang spesifik untuk gen sisipan. Berdasarkan elektroferogram pada Gambar 5, terlihat produk amplikon berukuran $\pm 1,0$ kb yang berukuran sama dengan gen target. Secara umum, konfirmasi keberadaan gen PMSA1 dalam pGEM-T *Easy* hasil transformasi dengan koloni PCR berhasil dilakukan. Dari koloni yang ditumbuhkan dalam kultur cair, kemudian diisolasi plasmid dan diamplifikasi dengan metode PCR didapatkan pita pada hasil elektroforesis berukuran $\pm 1,0$ kb. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen PMSA1 berhasil diinsersi ke dalam pGEM-T *Easy*. Akan tetapi, untuk lebih meyakinkan dan memvalidasi keberadaan gen target tersebut adalah benar, maka sampel tersebut kemudian disekuensing untuk memperoleh urutan DNA yang nantinya disejajarkan dengan *database* NCBI.

Pohon Filogenetik

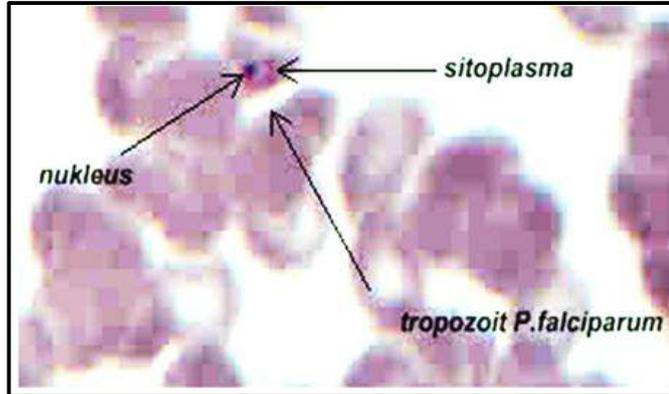
Berdasarkan hasil penginputan data, diperoleh pohon filogenetik yang memperlihatkan tingkat kekerabatan sekaligus derajat keragaman antara sampel PMSA1 Sikka dengan PMSA1 dari bank gen NCBI. Kontruksi filogenetik ditujukan agar kita mengetahui filogeni dan hubungan evolusi antar sampel yang diujikan, dimana sampel mempunyai kesamaan karakter dengan berkerabat terdekat, karena berada dalam jenis yang sama. Desain *phylogenetic tree* dimulai dengan melakukan proses pensejajaran 39 sekuens (20 sekuens PMSA1 Sikka ditambah 19 sekuens PMSA1 dari NCBI) menggunakan program MEGA 6 dengan metode *muscle*. Selanjutnya, program ini akan melakukan pensejajaran terhadap 39 sekuens dengan mempertimbangkan kesamaan dan pola pengulangan sekuens. Pohon filogenetik PMSA1 *Plasmodium falciparum* isolat Sikka ditunjukkan pada Gambar 5.

Hasil Analisis *in Silico* Prediksi Epitop

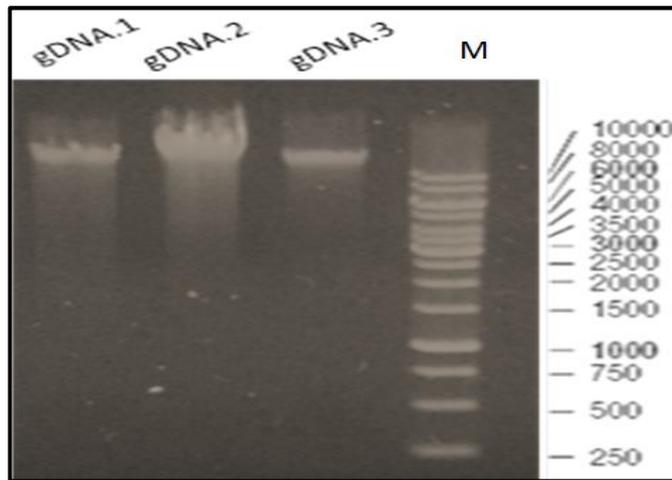
Berdasarkan Gambar 5, diperoleh grafik hasil prediksi epitop yang menunjukkan skor ambang batas (*threshold*), ditandai dengan garis merah horizontal. Grafik warna kuning dan hijau berkaitan langsung dengan nilai ambang batasnya, semakin tinggi grafik kuning (grafik ke atas) maka itu menunjukkan semakin besar pula nilai ambang batas, sebaliknya semakin rendah grafik hijau (grafik ke bawah) maka semakin rendah nilai ambang batas. Nilai



ambang batas yang tinggi menjadi indikasi bahwa sekuens epitop terkategori bagus.



Gambar 1. Hapusan Darah Tipis *Plasmodium falciparum*.



Gambar 2. Elektroferogram DNA Genom *Plasmodium falciparum*.

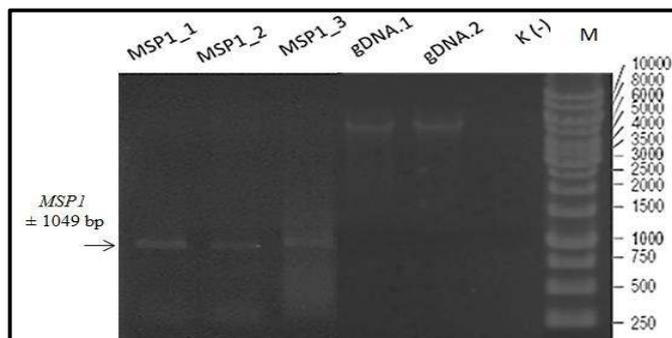
Keterangan:

gDNA1 = DNA genom sampel 1;

gDNA2 = DNA genom sampel 2;

gDNA3 = DNA genom sampel 3; dan

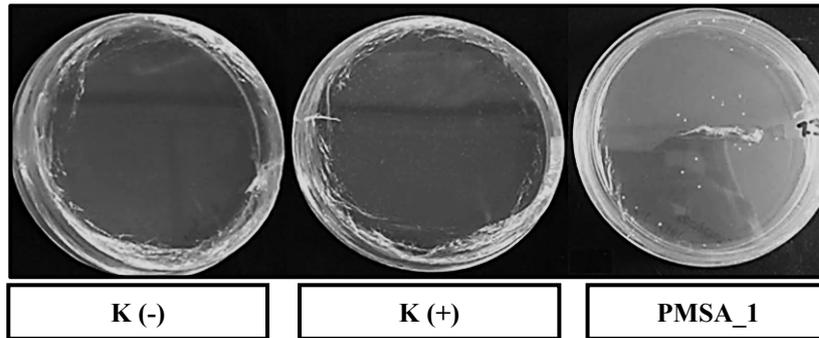
M = Gen ruler 1 kb.



Gambar 3. Elektroferogram Amplikon Gen PMSA1 Menghasilkan Pita Berukuran ± 1049 bp.

Keterangan:

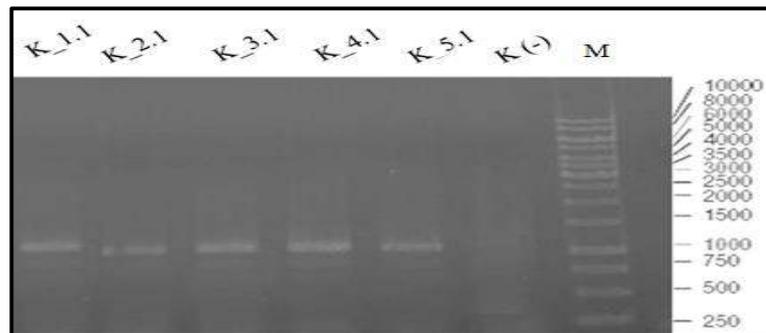
- PMSA1_1 – PMSA1_3 = Hasil PCR gen PMSA1 dari masing-masing sampel klinis 1, 2, dan 3;
 gDNA1-gDNA2 = DNA genom *Plasmodium falciparum* pada masing-masing sampel klinis 1 dan 2;
 K1- = Kontrol negatif; dan
 M = Gen *Ruler* 1 kb.



Gambar 4. Hasil transformasi *E. coli* TOP 10.

Keterangan:

- K (-) = Kontrol negatif;
 K (+) = Kontrol positif; dan
 PMSA_1 = Hasil transformasi dari sampel PMSA1_1.



Gambar 5. Elektroferogram Hasil Konfirmasi Koloni PCR.

Keterangan:

- K_1.1 = Sampel PMSA1_1 koloni 1;
 K_2.1 = Sampel PMSA1_2 koloni 1;
 K_3.1 = Sampel PMSA1_3 koloni 1;
 K_4.1 = Sampel PMSA1_4 koloni 1;
 K_5.1 = Sampel PMSA1_5 koloni 1;
 K(-) = Kontrol Negatif; dan
 M = Gen *ruler* 1 kb.



Tabel 1. Prediksi Epitop.

No.	Asam Amino	Kolaskar (Threshold : 1.012)/ antigenicity	Karplus (Threshold : 0.999) / flexibility	Parker (Threshold : 1.290)/ hidrophilicity	Chou (Threshold: 0.980)/ Beta-Turn	Emini (Threshold: 1.000)/ Surface Accessibility
1	⁴ FTIKEL ⁹	1.039	0.993	-0.747	0.823	0.836
2	²² LTLCDNI ²⁸	1.066	0.952	0.284	1.006	0.223
3	³⁰ GFKYLID ³⁶	1.053	0.963	-0.798	0.838	0.433
4	⁴³ ELLYKLNIFYDLLRA ⁵⁷	1.065	0.952	1.929	0.889	0.585
5	⁵⁹ LNDVCANDYCQIPFNLK ⁷⁵	1.012	1.069	1.371	1.037	1.441
6	⁸¹ LDVLKKIVFGYR ⁹²	1.079	0.973	-0.557	0.874	0.398

Sediaan apusan darah pasien yang positif malaria diberi pewarnaan Giemsa atau pewarnaan Romanowski. Metode pewarnaan ini digunakan karena memudahkan saat mengamati morfologi sel-sel darah merah, sel-sel darah putih, dan mengidentifikasi jenis parasit *Plasmodium* (Maskoeri, 2008). Pewarnaan Giemsa didasarkan pada presipitat hitam yang terbentuk dari penambahan larutan metilen biru dan eosin yang dilarutkan di dalam methanol, berupa dua zat warna yang berbeda yaitu Azur B/ metilen (*Trimetiltionin*) yang bersifat basa dan eosin y (*tetrabromofluorescin*) yang bersifat asam. Penambahan eosin y mampu mewarnai komponen sel yang bersifat basa, seperti: granula, eosinofili, dan hemoglobin. Sementara itu, ikatan eosin y pada azur B menimbulkan warna ungu pada sediaan darah.

Pewarnaan Giemsa dapat membedakan inti sel dan morfologi sitoplasma dari sel darah merah, morfologi sel darah putih, trombosit dan parasit yang ada di dalam sel darah merah. Semakin lama pewarnaan yang dilakukan, maka intensitas warnanya menjadi semakin tua. Terlihat dari hasil pengamatan bahwa pewarnaan ini menimbulkan kontras antara inti yang berwarna ungu tua dengan sitoplasma yang berwarna ungu muda. Ciri khas morfologi eritrosit bahwa ukurannya tidak berubah meskipun telah terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Kondisi tersebut memberikan peluang yang besar terjadinya multi infeksi dalam eritrosit (ada lebih dari satu parasit dalam eritrosit) dan terjadi bentuk *acolle* (inti menempel pada dinding eritrosit) dan *spliting* (inti parasit terpecah dua) (Edgar, 2004; Sorontou, 2013). Selain itu, pada sitoplasma eritrosit terdapat bercak-bercak merah yang tidak teratur disebut titik Maurer.

Berat ringannya infeksi malaria pada seseorang diukur dengan densitas parasit yaitu jumlah parasit dalam 1 µl darah (Sutanto & Pribadi, 2008). Tinggi rendahnya jumlah hitung parasit seorang penderita malaria mengindikasikan tingkat parasitemia yang dialaminya. Tahapan yang diawali dengan pemeriksaan mikroskopis, diperoleh sediaan positif malaria dengan jumlah parasit yang melebihi 10.000 parasit/ µl darah. Jumlah parasit diperoleh melalui kuantifikasi dengan menghitung parasit per 200 leukosit dalam sediaan darah dan jumlah leukosit rata-rata 8.000/µl darah. Pada sampel isolat klinis dengan kode PMSA1_R diperoleh parasit sebanyak 246.520 parasit/µl darah. Nilai ini





didapatkan dari pengamatan 6.163 parasit per 200 leukosit, sedangkan jumlah leukosit 8.000/ μ l, sehingga didapatkan jumlah parasit per μ l darah dengan cara: $8.000/200 \times 6.163$ parasit = 246.520 parasit/ μ l (Sorontou, 2013). Cara yang sama dilakukan untuk memperoleh nilai densitas parasitemia pada sampel klinis lainnya. Isolat sampel klinis yang memenuhi kriteria akan diisolasi DNA genomnya untuk analisis lanjutan.

Pada penelitian ini, proses isolasi DNA dilakukan beberapa kali pengulangan untuk setiap sampel, disebabkan karena hasil isolasi yang pertama masih kurang jelas. Kualitas DNA genom dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti: kualitas spesimen, volume, dan jenis spesimen (darah vena atau darah kering) (WHO, 2008). DNA genomik dari sampel 1, 2, dan 3 parasit *Plasmodium falciparum* diberi simbol masing-masing gDNA1, gDNA2, dan gDNA3. Sedangkan gen ruler 1 kb diberi simbol M sebagai alat ukur kualitatif terhadap produk isolasi berupa DNA genomik. Hasil isolasi DNA genom selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer PfP MSA1_F dan PfP MSA1_R untuk mendeteksi gen PMSA1 dari setiap sampel.

Gen PMSA1 berhasil diamplifikasi pada masing-masing sampel, hal ini juga didukung oleh kualitas DNA genom yang berasal dari darah dengan jumlah parasit yang tinggi untuk identifikasi. Batas minimal kandungan parasit untuk mengidentifikasi gen adalah sekitar 50-100 parasit per reaksi PCR, terutama sampel yang berasal dari lapangan (WHO, 2008). Jumlah parasit pada penelitian ini terkategori tinggi, karena berada pada kisaran 10.846 hingga 246.500/ μ l darah, sehingga memberikan hasil yang baik. Hal tersebut didukung oleh penelitian Brockman *et al.* (1999), yang memperoleh hasil berupa sensitifitas amplifikasi PCR terhadap gen PMSA1 dan penanda genetik lainnya seperti MSP2 dapat mencapai 3 parasit/ μ l darah atau setara dengan 0,04 IRBC dalam 500 leukosit. Pada tahapan ini, gen PMSA1 berhasil diamplifikasi terbukti dengan profil pola pita setelah dielektroforesis dengan ukuran $\pm 1,0$ kb. Sebagai persiapan sebelum melakukan kloning ke dalam plasmid pGEM-T *Easy*, produk reaksi PCR dipurifikasi dengan menggunakan kit purifikasi gel/pcr DNA *fragments extraction kit* DF100 dari Promega untuk menghilangkan segala kontaminan dan inhibitor. Hal tersebut sangat penting, karena produk hasil purifikasi menjadi salah satu faktor yang sangat berperan dalam menentukan reaksi ligasi *insert gene* ke dalam vektor.

Sel kompeten dapat menerima DNA asing berupa plasmid, dan kompetensinya dapat diinduksi lewat penambahan CaCl_2 pada awal pertumbuhan/ fase log (Tu *et al.*, 2005). Jenis sel kompeten yang dipakai adalah *Escherichia coli* TOP 10 koleksi laboratorium analisis molekuler dan kromosom SITH ITB dan koleksi laboratorium biokimia FMIPA ITB. Sel kompeten *E. coli* yang digunakan adalah *E. coli* TOP 10 yang telah diinkubasi pada medium Luria Bertani cair. Penambahan larutan CCMB yang memiliki kandungan Magnesium klorida berguna untuk memperlebar pori-pori membran sel akibat adanya reaksi antar ion Mg^{2+} dan sisi hidrofilik dari membran. Kandungan kalsium klorida juga ikut berperan, dimana ion Cl^- masuk ke dalam membran mengakibatkan pembengkakan sel, sehingga memudahkan sel kompeten mengambil DNA





(Primrose & Twyman, 2006). Sel kompeten membutuhkan penyimpanan pada suhu dingin, hal ini dimaksudkan agar peranannya mampu sebagai sel kompeten dapat dipertahankan dengan baik.

Amplikon hasil PCR yang telah dipurifikasi berhasil diligasikan dengan baik ke dalam plasmid pGEM-T *Easy* dan membentuk plasmid rekombinan. Ligasi dapat terjadi melalui proses penggabungan dua molekul DNA dengan perantara enzim. T4 DNA *ligase* menjadi enzim yang dipakai dalam proses ligasi, karena enzim tersebut dapat mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus 3'-hidroksil pada fragmen DNA gen asing dengan gugus 5'-fosfat pada DNA vektor. Pemberian enzim tersebut mampu membentuk kompleks antara enzim dengan *Adenosin Monofosfat* (AMP) yang selanjutnya terikat pada daerah *nick* (daerah putus) (Sudjadi, 2008). Enzim *ligase* tersebut dihasilkan oleh bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi virus T4. Keberhasilan ligasi target PMSA1 ke dalam vektor pGEMT *Easy* karena pGEMT *Easy* merupakan vektor plasmid yang memiliki beberapa kelebihan, yaitu: 1) berukuran kecil; 2) memiliki *ori* yang akan berperan dalam replikasi di *E. Coli*; 3) membawa gen *amp^r* yang membawa sifat resisten terhadap antibiotik ampisilin; 4) memiliki 19 sisi MCS (*Multiple Cloning Site*) yang akan membantu dalam proses konfirmasi terbentuknya DNA rekombinan; dan 5) membawa gen *lacZ* yang berperan dalam proses seleksi biru putih.

Kloning gen PMSA1 dilakukan dengan menggunakan vektor kloning pGEM-T *Easy* yang mempunyai ukuran 3015 bp. Produk PCR pada ujungnya memiliki *over hangA* sebab enzim yang dipakai adalah *Taq DNA polimerase*. Tipe enzim ini menghasilkan amplikonujung lancip (*sticky end*). Kemudian amplikon yang diinsersikan ke dalam vektor pGEM-T *Easy* memanfaatkan enzim T4 DNA *ligase* yang nantinya menjadi katalisator terikatnya fragmen DNA target dan plasmid melalui *phosfodiester bond* (Thieman & Palladino, 2013). Sebagai langkah untuk mendeteksi proses ligasi berhasil atau tidak, maka dibutuhkan proses transformasi plasmid rekombinan dengan *E. coli* TOP 10. Koloni bakteri yang terlihat pada medium LB menjadi indikator kuat bahwa fragmen DNA telah berhasil diinsesi ke dalam pGEM-T *Easy*.

Metode transformasi yang digunakan adalah metode kejutan panas (*heat shock method*), yaitu mengintroduksi pGEMT *Easy* rekombinan masuk ke *E. coli* TOP 10 melalui pemberian kejutan suhu panas (Tu *et al.*, 2005). Kejutan panas tersebut dimaksudkan agar pori-pori sel terbuka. Temperatur/suhu yang diberikan adalah 42°C, apabila suhunya berlebih maka kemampuan *E. coli* dalam menerima DNA plasmid mengalami penurunan bahkan kematian sel *E. coli* bisa terjadi (Tu *et al.*, 2005). Adapun langkah untuk memvalidasi bahwa transformasi telah berhasil, maka sangat penting proses penumbuhan *E. coli* transforman ke dalam media LB yang diperkaya dengan antibiotik ampisilin. Keberadaan ampisilin akan membantu penyeleksian, karena koloni *E. coli* yang dapat tumbuh hanyalah bakteri tersisipi pGEM-T *Easy* rekombinan, sebab plasmid tersebut memiliki gen *selectable marker* yang membantu untuk *survive E. coli* TOP 10 berhasil menjadi bakteri inang dari plasmid rekombinan pGEMT *Easy*, karena bakteri tersebut mampu mengenali gen *bla* yang menjadikan enzim *beta-laktamase* sebagai





penanda sifat resistensi terhadap ampisilin. Bakteri hasil transformasi memperlihatkan koloni tumbuh dengan masa inkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C dalam media seleksi *Luria Bertani* padat yang telah ditambahkan antibiotik ampisilin, IPTG, dan *X-gal solution* (Padmanabhan *et al.*, 2011).

Hal lainnya yang menjadi faktor keberhasilan dalam transformasi adalah kejutan panas yang sukses dilakukan, sehingga pGEMT *Easy* rekombinan bisa terintroduksi masuk ke *E. coli* TOP 10. Kontrol positif yang diberi kode (+) digunakan sebagai penanda dan menjadi indikator adanya kekeliruan selama proses transformasi, sementara kontrol negatif (-) dimaksudkan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya kontaminasi selama proses transformasi. Sedangkan pada sampel PMSA1_1, hasil transformasi berisi sel kompeten dan hasil ligasi *insert gene* PMSA1. Terdapat tiga kemungkinan yang terjadi dari hasil tersebut, yaitu terdapat sel yang mengandung plasmid rekombinan berisi DNA sisipan, sel yang mengandung plasmid namun tidak berisi DNA sisipan, dan sel yang tidak mengandung plasmid rekombinan sama sekali. Di dalam plasmid PGEM-T *Easy*, terdapat gen *bla* yang menyandikan enzim *beta-laktamase* sebagai penanda sifat resistensi terhadap antibiotik ampisilin, sehingga *E. coli* transforman yang berisi plasmid PGEM-T *easy* tanpa gen target/ sisipan tetap dapat tumbuh pada medium yang telah ditambahkan antibiotik ampisilin. Namun demikian, yang menjadi pembeda adalah transforman yang mampu tumbuh dalam medium kombinasi *Luria Bertani* dan ampisilin dapat diketahui dengan adanya koloni berwarna biru tanpa koloni putih (Padmanabhan *et al.*, 2011).

Koloni bakteri *E. coli* TOP 10 yang mengandung transforman (plasmid rekombinan) diseleksi berdasarkan pembentukan koloni biru-putih. Di dalam vektor kloning pGEM-T *Easy*, terdapat gen *lacZ* pada daerah *multi cloning site*. Gen *lacZ* mengkode β -galaktosidase yang mampu menguraikan substrat *X-gal*. Jika terdapat DNA sisipan di dalam plasmid, maka DNA sisipan tersebut akan merusak *lacZ*, akibatnya tidak diproduksi enzim β -galaktosidase. Koloni yang berwarna biru mengandung plasmid yang tidak berisi gen *insert*, sehingga gen *lacZ* yang menyandikan β -galaktosidase masih aktif terekspresi dan mengubah substrat *X-gal* menjadi biru. Koloni target adalah koloni putih yang mengandung plasmid rekombinan berisi gen *insert*, dimana gen *lacZ* disisipi oleh fragmen PMSA1, sehingga tidak terekspresi dan menyebabkan koloninya berwarna putih. Koloni *E. coli* TOP 10 yang mengandung vektor plasmid pGEM-T *Easy* kosong berwarna biru, karena masih aktifnya gen *lacZ* yang menghasilkan β -galaktosidase yang akan memecah *X-gal* menjadi galaktosa dan 5-bromo-4-chloroindigo yang berwarna biru. Sedangkan bakteri terlihat berwarna putih, karena vektor plasmid pGEM-T *Easy* telah disisipi oleh DNA target PMSA1 pada bagian *lacZ*. Dalam hal ini, *lacZ* tidak berfungsi karena disisipi oleh MSP 1 tersebut. Jadi koloni yang mengandung plasmid rekombinan adalah berwarna putih koloninya (Padmanabhan *et al.*, 2011).

Sampel PMSA1 menghasilkan kategori alel yang beragam, pada kode sampel PMSA1_10 dihasilkan tiga koloni positif dan mendapatkan analisis hasil sekuensing berupa alel K1 pada koloni pertama dan kedua, serta alel PMSA1_Sikka pada koloni ketiga. Jumlah alel pada setiap penanda genetik





bervariatif terutama pada PMSA1 blok kedua yang memang bersifat polimorfik. Penelitian yang serupa menunjukkan bahwa, keragaman PMSA1 bersifat sangat polimorfik dengan banyaknya variasi alel, sehingga baik digunakan untuk penanda adanya multiinfeksi dan untuk membedakan alel secara individu. Total 20 koloni positif yang berisi gen PMSA1 dan semuanya disekuensing. Dalam Penelitian ini, dilakukan analisis pemetaan *Merozoite Surface Protein 1 Plasmodium falciparum* yang berasal dari sampel klinis pasien malaria dengan PMSA1 *Plasmodium falciparum* yang berasal dari *database* NCBI.

Proses sekuensing dilakukan oleh Macrogen. Sebelum dilakukan analisis pensejajaran, dari total 20 hasil sekuensing terlebih dahulu dilakukan *contig* berupa penyusunan ulang sekuens DNA yang telah *overlap* atau tumpang tindih antara sekuens arah *forward* dan *reverse*. Hasil dari *overlap* tersebut akan diperoleh daerah yang lestari atau *consensus sequence* setelah *alignment* 20 sekuens gen yang sama. *Consensus sequence* merupakan hasil dari penggabungan kedua hasil sekuensing dengan arah yang berbeda dari gen yang sama. Sekuen inilah yang digunakan untuk analisis lebih lanjut. Hasil dari *contig* menunjukkan urutan nukleotida gen target yaitu PMSA1 *Plasmodium falciparum*. Total 15 sampel klinis menghasilkan 20 sekuens gen PMSA1 yang selanjutnya dilakukan proses penelusuran melalui *Blast* dan pensejajaran dengan data PMSA1 *Plasmodium falciparum* dari NCBI. Hasil *contig* sekuens nukleotida PMSA1_Sikka bersama sekuens PMSA1 dari NCBI dilakukan pensejajaran melalui *Multiple Sequence Alignment*, hasil yang diperoleh akan dilanjutkan dengan translasi menjadi asam amino beserta analisa alelnya.

Hasil peruntukan dan analisis struktur alel pada Gambar 6 menunjukkan asam amino penyusun PMSA1 blok 2 isolat Sikka berada pada asam amino ke 55-128. Hal tersebut mempunyai kemiripan dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Miller *et al.* (1993), yang menganalisis sekuens keragaman PMSA1 *Plasmodium falciparum*, didapatkan posisi blok 2 PMSA1 berada pada asam amino 54/56 – 138/144. Pada penelitian ini pun dianalisis struktur alel dari sekuens isolat Sikka dan membandingkannya dengan sekuens bank gen untuk memvalidasi dan memverifikasi sekuens yang diperoleh. Hal tersebut terlihat pada struktur dan posisi blok 2 dari alel PMSA1. Ditampilkan perolehan data sekuens asam amino masing-masing dari alel PMSA1 Sikka, K1 Sikka, MAD20 Sikka, serta data bank gen NCBI (K1, MAD20, dan RO33) yang berasal dari beberapa negara endemis malaria. Daerah yang berwarna kuning adalah daerah yang memiliki banyak kemiripan motif pengulangan sekaligus daerah yang paling lestari diantara semua sekuens blok 2.

Daerah warna merah mengindikasikan keunikan asam amino dalam sekuens, atau kesalahan penentuan asam amino dalam proses translasi. Pada blok kedua terdapat motif tripeptida berulang pada beberapa sekuens, baik pada sekuens dari sampel isolat Sikka maupun dari sekuens sampel data bank gen, yaitu masing-masing PMSA1 Sikka, MAD 20 Sikka, MAD 20 Brazil, semua sekuens Tanzania, Papua Nugini AB502697.1, semua sekuens Thailand dan semua sekuens Philipina. Motif tripeptida berulang juga terjadi di daerah berwarna ungu muda pada sekuens K1 Brazil 37, K1 Uganda 117, dan K1 India





3D7. Motif pengulangan pada daerah berwarna ungu berbeda dengan motif pengulangan pada warna kuning. Pengulangan tersebut terjadi secara acak pada sekuens dan berimplikasi pada diversitas gen, tidak mengakibatkan terjadinya degenerasi (Miller *et al.*, 1993).

Daerah yang berwarna biru adalah sekuens daerah lestari yang tidak memiliki motif pengulangan. Variasi pada sekuens berupa tripeptida berulang pada sampel PMSA1_Sikka, tipe pengulangannya menghasilkan diversitas antigen pada blok 2 dibanding sekuens yang telah ditemukan sebelumnya (sekuens bank gen). Pada sekuens PMSA1 Sikka juga ditemukan mutasi delesi yang ditandai dengan adanya daerah *gap* yang kosong pada asam amino ke 57 sampai 77 dan asam amino ke 88 sampai 97. Secara garis besar, keunikan asam amino penyusun *Merozoite Surface Protein 1* dari *Plasmodium falciparum* adalah motif pengulangan tripeptida yang sudah terjadi pada awal sekuens blok 2 yang ditandai dengan daerah berwarna abu-abu. Jika ditinjau dari karakter biokimia, sekuens tersebut berpotensi memiliki motif pengulangan lainnya tetapi masih membutuhkan penelusuran yang lebih kompleks dan menyeluruh. Temuan kelompok alel baru dan *filotype* yang independen pada isolat PMSA1_Sikka juga diperkuat dengan analisis berikutnya, yakni dengan konstruksi pohon filogenetik.

Nilai *bootstrap* yang dipakai adalah 1000. Nilai yang tertera pada pohon filogenetik menjadi parameter sejauh mana tingkat kekokohan posisi sampel dalam pohon filogenetik. Nilai tersebut juga menunjukkan konsistensi dan tingkat kepercayaan posisi serta pengelompokannya pada pohon filogenetik. Berdasarkan pembentukan pohon filogenetik tersebut, seluruh sekuens mengelompok ke dalam empat *clade*, yaitu: kelompok alel K1, MAD20, RO33, dan PMSA1_Sikka. Sampel dengan kode PMSA1_Sikka 4.2 yang merupakan pasien ke-4 koloni ke-2 mengelompok pada *clade* MAD20, bersama dengan sampel dari NCBI yang isolatnya berasal dari India, Brazil, Thailand, Philipina, Papua Nugini, Iran, dan Uganda. Sementara itu, sampel PMSA1 Sikka 1.1, PMSA1 Sikka 2.1, PMSA1 Sikka 6.1, PMSA1 Sikka 7.1, PMSA1 Sikka 8.1, PMSA1 Sikka 9.1, dan PMSA1 Sikka 10.2 dan 10.3 mengelompok pada *clade* yang lain bersama dengan sampel dari bank gen yang isolatnya berasal dari India (K1 india), Brazil (K1 Brazil), dan Uganda (K1 Uganda), semuanya mengelompok dalam alel yang sama yaitu alel K1. Sementara itu, PMSA1 Sikka 1.2, PMSA1 Sikka 3.1, PMSA1 Sikka 4.1, PMSA1 Sikka 5.1, PMSA1 Sikka 10.1, PMSA1 Sikka 11.1, PMSA1 Sikka 12.1, PMSA1 Sikka 12.2, PMSA1 Sikka 13.1, PMSA1 Sikka 13.1, PMSA1 Sikka 14.1., dan PMSA1 Sikka 15.1 mengelompok dalam alel yang terpisah dari data NCBI yaitu alel PMSA1_Sikka.

Isolat lokal dari Sikka terpisah pengelompokan alelnya dari 3 jenis alel yang telah diteliti sebelumnya, yakni: K1, MAD20, dan RO33 yang ketiganya teridentifikasi berada dalam gen PMSA1. Namun, dengan pohon filogenetik yang dihasilkan memberi informasi bahwa ditemukan kemungkinan alel baru pada pasien malaria asal Sikka Provinsi Nusa Tenggara Timur. Ini diperkuat oleh angka yang tertera pada pohon filogenetik, yakni angka 99 terkategori nilai sangat tinggi, yang menjadi indikasi kuat kekokohan posisi dan konsistensi pengelompokan posisi alel PMSA1_Sikka pada pohon filogenetik tersebut.





Protein yang direkomendasikan sebagai kandidat vaksin ideal harus mempunyai epitop dengan karakteristik antigenisitas tinggi, mempunyai fleksibilitas yang baik, bersifat hidrofilik, serta kemampuan berada di struktur permukaan. Sehingga sekuens asam amino penyusun protein PMSA1 harus diuji terhadap kelima parameter tersebut untuk mengetahui secara jelas daerah/sekuens protein yang memiliki kemampuan tinggi untuk menginduksi respons imun atau berperan sebagai epitop. Analisis prediksi epitop ini dilakukan melalui IEDB *Analysis Resource*. Beberapa parameter yang digunakan untuk mengukur efektifitas epitop yang diprediksi melalui pendekatan *in silico* yaitu parameter *antigenicity flexibility*, *hidrophilicity*, *beta-turn*, dan *surfaceaccessibility* (Kolaskar & Tongaonkar, 1990). Dari kombinasi kelima parameter ini berhasil didapatkan epitop pada protein yang merupakan antigen potensial yang mampu menginduksi respon imun. Epitop menjadi bagian penting dari antigen yang dapat memicu respon imun (antibodi) yang spesifik.

Hasil analisis *in silico* PMSA1 isolat lokal Sikka didapatkan enam prediksi epitop dengan perolehan nilai ambang batas (*threshold*) yang beragam. Pada Tabel 2, tampak nilai berwarna merah yang merepresentasikan bahwa nilai *threshold* yang diperoleh terkategori tidak ideal (di bawah ambang batas), sebaliknya nilai berwarna hitam berarti nilai *threshold* yang didapatkan terkategori ideal (di atas ambang batas). Dari keenam epitop, epitop kelima yang mendekati syarat nilai ambang batas (*threshold*) dari masing-masing parameter *antigenicity*, *flexibility*, *hidrophilicity*, dan *surface accessibility*. Parameter antigenisitas dibutuhkan untuk mengetahui kemampuan sekuens epitop dari antigen tersebut dalam memicu dan menstimulasi respon imun serta menginduksi produksi sitokin. Semakin tinggi sifat antigenisitasnya, maka semakin baik peptida epitop tersebut.

Sifat fleksibilitas juga menjadi hal yang ditekankan dalam pemilihan sekuens peptida epitop, fleksibilitas terkait sifat gugus rantai pada ikatannya, epitop yang dipilih adalah yang berpotensi mampu menginisiasi dan memutuskan ikatan antara reseptor antibodi dengan epitop, dengan kondisi demikian antibodi akan lebih mudah dalam pengenalan atau pemutusan antigen. Hidrofilik sebuah epitop juga harus dipenuhi, karena sebagian besar ikatan yang membentuk protein antigen adalah ikatan non kovalen hidrofilik yang bersifat *reversible*. Selain itu, sifat hidrofilik sebagian besar dimiliki sekuens peptida yang berada pada permukaan protein yang nantinya akan berinteraksi reseptor antibodi. Sehingga sifat hidrofilik tentu akan memudahkan interaksi yang lebih kuat. Sementara itu, parameter *surface accessibility* diperlukan agar memudahkan interaksi protein pada reseptor di bagian luar antibodi dengan ligan yang berada di permukaan antigen. Semakin tinggi nilai *surface accessibility* nya, maka akan semakin memperbesar peluang kontak dan transmisi sinyal. Melalui hasil analisis dengan bantuan *software* IEDB, epitop pada urutan kelima yang paling layak untuk direkomendasikan menjadi kandidat epitop, karena memiliki nilai *threshold* tinggi dan paling banyak memenuhi nilai ambang batas dari beberapa parameter bila dibandingkan dengan epitop lainnya. Dengan demikian, studi *in silico* memberikan hasil bahwa *Meorozoite Surface Antigen 1* blok 2 dapat





diproyeksikan sebagai antigen untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi komponen terapi vaksin dan kit diagnostik *Plasmodium falciparum* isolat lokal Sikka, karena gen PMSA1 *Plasmodium falciparum* isolat Sikka mempunyai kelompok alel PMSA1 Sikka yang berbeda dengan alel yang telah diidentifikasi sebelumnya. Dari hasil analisis prediksi epitop menggunakan *software online* IEDB, diperoleh daerah kandidat epitop pada posisi asam amino ke 59-75 yakni peptida LNDVCANDYCQIPFNLK, yang berada dalam sekuen protein PMSA1 di urutan asam amino ke 187 hingga 203.

SIMPULAN

Penelitian ini telah mendapatkan satu kelompok alel PMSA1 Sikka yang berbeda dengan alel yang telah diidentifikasi sebelumnya. Sementara itu, studi *in silico* menghasilkan kandidat epitop antigen baru isolat Sikka, bersifat imunogenik dan diprediksi mampu memicu respon antibodi. Epitop yang diprediksi melalui studi *in silico* memiliki panjang 17 aa pada urutan asam amino ke 187 hingga 203 dari protein PMSA1.

SARAN

Perlunya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui komposisi epitop untuk beberapa jenis *Plasmodium* untuk melihat perbandingannya dengan *Plasmodium falciparum*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan apresiasi yang besar kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) IKIP Muhammadiyah Maumere, yang telah mendanai kegiatan penelitian melalui skema hibah internal perguruan tinggi.

DAFTAR RUJUKAN

- Amodu, O.K., Adeyemo, A.A., Ayoola, O.O., Gbadegesin, R.A., Orimadegun, A.E., Akinsola, A.K., Olumese, P.E., and Omotade, O.O. (2005). Genetic Diversity of The MSP-1 Locus and Symptomatic Malaria in South-West Nigeria. *Acta Tropica*, 95(3), 226-232.
- Ariey, F., Hommel, D., Scanf, C.L., Duchemin, J.B., Peneau, C., Hulin, A., Sarthou, J.L., Reynes, J.M., Fandeur, T., and Puijalon, O.M. (2001). Association of Severe Malaria with a Specific *Plasmodium falciparum* Genotype in French Guiana. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(2), 237-241.
- Birkenmeyer, L., Muerhoff, A.S., Dawson, G.J., and Desai, S.M. (2010). Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(6), 996-1003.
- Brockman, A., Paul, R.E., Anderson, T.J., Hackford, I., Phaihun, L., Looareesuwan, S., Nosten, F., and Day, K.P. (1999). Application of Genetic Markers to the Identification of Recrudescens *Plasmodium*





- falciparum* Infections on the Northwestern Border of Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(1), 14-21.
- Cowman, A.F., Berry, D., and Baum, J. (2012). The Cellular and Molecular Basis for Malaria Parasite Invasion of the Human Red Blood Cell. *Journal of Cell Biology*, 198(6), 961-971.
- Crompton, P.D., Pierce, S.K., and Miller, L.H. (2012). Advances and Challenges in Malaria Vaccine Development. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(12), 4168-4178.
- Das, S., and Dash, H.R. (2015). *Microbial Biotechnology A Laboratory Manual for Bacterial Systems*. India: Springer New Delhi.
- Dinas Kesehatan Propinsi Papua. (2015). *Laporan Perkembangan Kasus Malaria di Papua*. Papua: Dinas Kesehatan Papua.
- Douradinha, B., and Doolan, D.L. (2011). Harnessing Immune Responses Against *Plasmodium* for Rational Vaccine Design. *Trends in Parasitology*, 27(6), 273-282.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Groot, A.S.D., Bosma, A., Chinai, N., Frost, J., Jesdale, B.M., Gonzalez, M.A., Martin, W., and Aubin, C.S. (2001). From Genome to Vaccine: in silico Predictions, ex Vivo Verification. *Vaccine*, 19(31), 4385-4395.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1), 95-98.
- Kemenkes RI. (2016). *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kolaskar, A.S., and Tongaonkar, P.C. (1990). A Semi Empirical Method for Prediction of Antigenic Determinants on Protein Antigens. *FEBS Letters*, 276(1,2), 172-174.
- Kun, J.F.J., Missinou, M.A., Lell, B., Sovric, M., Knoop, H., Bojowald, B., Dangelmaier, O., and Kremsner, P.G. (2002). New Emerging *Plasmodium falciparum* Genotypes in Children During the Transition Phase from Asymptomatic Parasitemia to Malaria. *American Society of Tropical Medicine Hygiene*, 66(6), 653-658.
- Maskoeri, J. (2008). *Ilmu Alamiah Dasar*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The Pathogenic Basis of Malaria. *Nature*, 415(6872), 673-679.
- Miller, L.H., Roberts, T., Shahabuddin, M., and McCutchan, T.F. (1993). Analysis of Sequence Diversity in the *Plasmodium falciparum* Meozoite Surface Protein-1 (MSP-1). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59(1), 1-14.
- Mwingira, F., Nkwengulila, G., Schoepflin, S., Sumari, D., Beck, H.P., Sonounou, G., Felger, I., Olliaro, P., and Mugittu, K. (2011). *Plasmodium falciparum* MSP1, MSP2 and Glurp Allele Frequency and Diversity in Sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*, 10(79), 1-10.





- Nicastri, E., Paglia, M.G., Severini, C., Ghirga, P., Bevilacqua, N., and Narciso, P. (2008). *Plasmodium falciparum* Multiple Infections, Disease Severity and Host Characteristics in Malaria Affected Travellers Returning from Africa. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 205-209.
- Nursalam. (2003). *Konsep & Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan: Pedoman Skripsi, Tesis, dan Instrumen Penelitian Keperawatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Oyarzun, P., Ellis, J.J., Boden, M., and Kobe, B. (2013). Predivac: CD4 + T-cell Epitope Prediction for Vaccine Design That Covers 95% of HLA Class II DR Protein Diversity. *BMC Bioinformatics*, 14(52), 1-11.
- Padmanabhan, S., Banerjee, S., and Mandi, N. (2011). *Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives*. Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology: In Tech.
- Primrose, S.B., and Twyman, R.M. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics 7th edition*. Australia: Blackwell Publishing.
- Promega pGEMT and pGEMT Easy Vector System. (n.d). Retrieved October 15, 2021, from Promega. Interactwebsite: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>.
- Ranjit, M.R., Das, A., Das, B.P., Das, B.N., Dash, B.P., and Chhotray, G.P. (2005). Distribution of *Plasmodium falciparum* Genotypes in Clinically Mild and Severe Malaria Cases in Orissa, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 99(5), 389-395.
- Sacher, R.A. (2004). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Jakarta: Gramedia Pustaka Umum.
- Saha, P., Ganguly, S., and Maji, A.K. (2016). Genetic Diversity and Multiplicity of Infection of *Plasmodium falciparum* Isolates from Kolkata, West Bengal, India. *Infection, Genetics and Evolution*, 43(1), 239-244.
- Sorontou, Y. (2013). *Ilmu Malaria Klinik*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Stucky, B.J. (2012). SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, 23(3), 90-93.
- Sudjadi. (2008). *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sutanto, I., dan Pribadi, W. (2008). *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran: Parasit Malaria (Edisi ke-4)*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Thieman, W.J., and Palladino, M.A. (2013). *Introduction to Biotechnology*. USA: Pearson.
- Tu, Q., Wang, K., and Shu, Q. (2005). Computer-Related Technostress in China. *Communications of the ACM*, 48(4), 77-81.
- Wiser, F.M. (2013). *Cellular and Molecular Biology of malaria*. New Orleans: Tulane University.





Biocaster : Jurnal Kajian Biologi

E-ISSN 2808-277X; P-ISSN 2808-3598

Vol. 2, No. 3, Juli 2022; Hal. 148-167

<https://e-journal.lp3kamandanu.com/index.php/biocaster/>

- World Health Organization. (2008). *Genotyping to Identify Parasite Populations*. Amsterdam: WHO Meeting.
- _____. (2017a). *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 3rd Edition. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- _____. (2017b). *World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization.



Dikelola dan Diterbitkan oleh:
Lembaga Pendidikan, Penelitian, dan Pengabdian
(LP3) Kamandanu