

Identifikasi Mutasi Gen *kelch 13* Penanda Resistensi Pada *Plasmodium falciparum* Dengan Pengobatan ACT Setelah 3 Hari Di Manokwari Papua Barat

Sarlince Agustin Nesan¹, Budi Santosa^{1*} Mudyawati Kamarudin¹

¹ Magister program of Clinical/Medical Laboratory Science, Universitas Muhammadiyah Semarang, Jl Kedungmundu Raya 18 Semarang

*Corresponding author. Email: budisantosa@unimus.ac.id

ABSTRACT

Tanggal Submit:
15 November 2022

Tanggal Review:
18 April 2023

Tanggal Publish
Online:
8 May 2023

Malaria is almost found all over the world, including Indonesia. WHO data on malaria case transmission in 2020, namely 241 million and 627,000 deaths. Female Anopheles mosquitoes are the main factor in the transmission of parasites, one of which is *Plasmodium falciparum* which is most dangerous to cause complications to death. Data from the Ministry of Health 2019 the highest transmission in Papua Province is 216,380 cases. The malaria elimination program uses ACT as a treatment therapy for malaria. The first appearance of ACT resistance in Cambodia was in 2008 to *Plasmodium falciparum* which was associated with the presence of a *Kelch 13* gene mutation. The purpose of this study was to identify a mutation of the *Kelch 13* gene markers of resistance in *Plasmodium falciparum* with ACT treatment after 3 days. This type of exploratory study used a population of all patients at the Amban Manokwari Health Center in West Papua, with a total sampling in August-September 2022. Of the 51 and 11 H3 samples met the inclusion criteria using RDT and Microscopic methods. The DNA isolated sample using Favorgen kit then amplified PCR and electrophoresis gel agarose. Then were 7 amplicons seen in the DNA band (± 200 bp) and confirmed results from PT. Science Genetics (± 100 bp), then 1 amplicon is continued for sequencing. The sequence results were analyzed using the Bioedit and Mega IX software with the alignment of the sequence results. Changes in nucleic acid bases and amino acids were obtained so that the mutation of the *Kelch 13* gene occurred, 3 mutation variants: substitution (transition & transversion), silent mutation (C3T codon 1 cysteine-cysteine), and missense mutation (T4A codon 2 tryptophan-serine). It can be concluded that the *Plasmodium falciparum* treatment ACT carriers the *Kelch 13* gene mutation as one of the markers of resistance.

Keywords: ACT, *Plasmodium falciparum*, *Kelch 13* Gene Mutation.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi parasit yaitu terdapat 5 spesies *Plasmodium* salah satunya *Plasmodium falciparum* yang merupakan spesies paling mematikan karena potensinya dapat menyebabkan komplikasi hingga menyebabkan kematian. Faktor utama dari penyakit malaria adalah melalui gigitan nyamuk *Anopheles betina* sampai

saat ini masih menjadi masalah kesehatan bagi masyarakat dan menjadi ancaman global bagi penduduk didunia (Astin et al., 2020). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2020 terjadi peningkatan jumlah kasus malaria sebesar 241 juta dan terjadi kematian 627.000 orang di seluruh dunia. Lebih dari dua per tiga kematian terjadi pada anak-anak dibawah usia 5 tahun diwilayah Afrika, dibandingkan tahun 2019 jumlah kematian meningkat menjadi 12% hingga tahun 2020 (WHO, 2020).

Di Indonesia data Kemenkes tahun 2019 berdasarkan jumlah penderita malaria (*Annual Parasitise Incidence/API*) kasus malaria masih terkonsentrasi di Kawasan Timur Indonesia. Terdapat 3 Provinsi yang mengalami peningkatan penularan yaitu tertinggi pada Provinsi Papua sebanyak 216.380, diikuti oleh Provinsi Nusa Tenggara Timur 12.909 dan urutan ketiga pada Provinsi Papua Barat 7.079 kasus. Terdata (Kemenkes, 2019) seluruh kasus penularan malaria di Indonesia sebanyak 250.644 dengan kasus tertinggi yaitu 86% terjadi di Provinsi Papua. Pada tahun 2004, *World Health Organization* (WHO) dan Komite Ahli Diagnosis Malaria Indonesia (KOMLI) dalam Program Nasional membuat kebijakan mengenai obat anti malaria (OAM). Kebijakan tersebut dibuat karena dari

pengobatan sebelumnya yaitu klorokuin dan sulfadoksin Pirimetamin yang telah resisten sehingga Kemenkes menjadikan *Artemisinin Chombination Therapy* (ACT) sebagai OAM. ACT merupakan zat aktif yang mempunyai efek terapi sebagai obat anti malaria yang memutus rantai siklus hidup parasit dalam sel darah merah. Didalam ACT mengandung senyawa golongan seskuiterpen laktone yang mempunyai peran sebagai jembatan peroksida dan efektif dalam kerja obat. Kombinasi ACT memiliki beberapa manfaat antara lain kemampuan menurunkan jumlah *tropozit* parasit dengan cepat, menghilangkan gejala dengan cepat, menurunkan pembawa gamet, menghambat transmisi parasit, memiliki efek samping yang minim dan efektif terhadap parasit *resisten multi-drug*. Salah satu kombinasi ACT yaitu Dihidroartemisinin dan Piperakuin (DHP) yang digunakan sebagai pengobatan lini pertama malaria *Plasmodium falciparum* yang diminum hanya selama 3 hari (Kinansi et al., 2017).

Penggunaan ACT saat ini menimbulkan permasalahan baru, yaitu dilaporkan kasus kegagalan terapi atau resistensi ACT pertama kali di Kamboja bagian Barat tahun 2008 dan meluas di beberapa Negara (Mishra et al., 2016). Resistensi terhadap pengobatan ACT pada *Plasmodium falciparum* menjadi

masalah yang serius bagi daerah-daerah yang endemik malaria dimana adanya resistensi ACT, dapat menghambat program dalam mengeliminasi malaria (Rachmad, 2019). Terdapat beberapa faktor penyebab terjadinya resistensi ACT yaitu kandungan obat yang dikonsumsi tidak mempengaruhi penurunan jumlah parasit, terjadinya mutasi gen secara spontan, terjadinya peningkatan respon stress akibat keterlibatan jalur proteasoma ubiquitin yang dapat mempengaruhi struktur aktivitas sasaran obat dan akses obat yang tidak sejalan sehingga sel tetap bertahan hidup (Rachmad, 2019). Penggunaan ACT dalam waktu lama dapat menyebabkan timbulnya strain-strain yang resisten terhadap ACT, hal ini terjadi karena adanya proses adaptasi dari parasit yang berkembang sehingga timbul mutasi-mutasi terhadap satu atau lebih basa nukleotida pada gen-gen. Terdapatnya adaptasi dan mutasi akan meningkatkan kemampuan parasit untuk mentoleransi kerja ACT yang dapat berkembang menjadi strain resisten yang stabil (Suwandi, 2015).

Secara genetik *Plasmodium falciparum* memiliki 14 kromosom dengan ukuran 22,8 mega basa (Mb) dan didalam seluruh kromosom ditemukan sebanyak 5.300 gen yang mengkode berbagai protein (Suwandi, 2015). Saat ini telah ditemukan suatu gen

Plasmodium falciparum yang bertanggung jawab terhadap munculnya resistensi ACT, gen yang pertama dinamakan *Kelch 13* (PF3D7_1343700) yaitu suatu gen *Plasmodium falciparum* pada kromosom 13, ekson ke-1 yang menyandi protein *Kelch* (Ariey *et al.*, 2014) *Kelch* memiliki jumlah urutan nukleotida yaitu 1.724.848bp sampai 1.727.028bp pada gen tersebut terdapat 2180bp sebagai penyandi protein (Suwandi, 2015). Beberapa Negara telah melaporkan penelitian bahwa gen *Kelch 13* berhubungan erat dengan mutasi terhadap resistensi ACT pada *Plasmodium falciparum* (Mohon *et al.*, 2014). Seperti di Bangladesh melaporkan terjadinya titik mutasi pada kodon A578S. Pada penelitian (Ariey *et al.*, 2014) di Kamboja terdapat korelasi antara keberadaan alel adanya variasi pada urutan basa nitrogen akibat peristiwa mutasi pada tingkat ketahanan hidup parasit secara *in vitro* pada gen *Kelch 13* dengan ditemukannya 2 titik mutasi pada kodon M476I dan kodon D56 (Wang *et al.*, 2015), selanjutnya Myanmar melaporkan 17 dari 180 isolat mempunyai mutasi pada titik kodon F446I. Pada penelitian (Mishra *et al.*, 2016) terjadinya titik mutasi C580Y, M476I, A481V, N458Y, dan R539T. (Rachmad, 2019) di Lampung melaporkan 1 sampel yang mengalami mutasi substitusi pada asam amino kodon

G453W, V454C dan E455K. Penelitian lanjutan oleh (Rachmad *et al.*, 2021) pada 23 isolat mengalami perubahan urutan nukleotida terjadi secara substitusi, delesi dan adisi yang dapat mempengaruhi fungsi protein *Plasmodium falciparum* yang disintesis gen *Kelch 13*. Oleh karena itu mutasi dari suatu gen *Plasmodium falciparum* yaitu *Kelch 13* adalah penanda biomolekuler yang penting untuk surveilan parasit malaria yang mengakibatkan banyaknya mutasi dan variasi gen *Kelch 13 Plasmodium falciparum* menyebabkan masalah resistensi tidak pernah selesai (Rachmad, 2019).

Penggunaan ACT pada penelitian (Parambang *et al.*, 2021) terhadap 1.636 sampel di RSUD Supiori Provinsi Papua, melaporkan bahwa seluruh pasien menggunakan ACT dengan kombinasi Dihidroartemisinin-Piperakuin (DHP) + Primakuin sebagai pengobatan lini pertama selama 3 hari. Namun ada beberapa masyarakat Papua yang masih belum rutin dan kurangnya kesadaran dalam mengonsumsi ACT secara tepat dan benar (Kinansi *et al.*, 2017). Beberapa Penelitian diatas mendorong peneliti untuk melakukan pemantauan pengobatan ACT setelah 3 hari terhadap pasien yang terkonfirmasi *Plasmodium falciparum*. Peneliti tertarik mengambil sampel di Puskesmas Amban Manokwari Papua Barat didukung dengan adanya

penelitian (Kinansi *et al.*, 2017) bahwa di Papua hampir semua pasien menggunakan terapi ACT. Didukung dengan data dari Dinas Kesehatan Manokwari Papua Barat bahwa Puskesmas Amban merupakan Puskesmas dengan peningkatan kasus malaria *Plasmodium falciparum* terbanyak. Permasalah diatas bertujuan bagi peneliti untuk mengidentifikasi adanya mutasi gen *Kelch 13* pada *Plasmodium falciparum* dan variasi dari jenis mutasi gen *Kelch 13* sebagai salah satu kriteria penilaian WHO mengenai penanda resistensi terhadap kegagalan pengobatan ACT setelah 3 hari pengobatan.

METODE PENELITIAN

1. Jenis dan rancangan penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah eksploratif.

2. Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Agustus – Oktober 2022. Tempat pengambilan sampel darah dan pemeriksaan (RDT & mikroskopi) di Puskesmas Amban Manokwari Papua Barat. Selanjutnya isolasi DNA, amplifikasi PCR dan elektroforesis gel agarose di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang, sedangkan untuk sekuensing DNA target gen *Kelch 13* di PT. Science Genetika Indonesia.

3. Populasi, besar sampel dan Teknik pengambilan sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua pasien yang datang ke Laboratorium Puskesmas Amban, Dinas Kesehatan Manokwari Papua Barat dengan pemeriksaan malaria. Besar sampel dalam penelitian ini yaitu dari 51 sampel pasien didapatkan 11 sampel pasien yang memenuhi kriteria inklusi yaitu pengobatan ACT selama 3 hari yang masih terlihat parasit *Plasmodium falciparum* dan sampel ditampung pada *blood spot* kering menggunakan kertas *wathman*.

4. Alat dan bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *Swab alkohol*, plester, lanset, *sputum* 3cc, *tourniquet*, kertas *wathman*/ kertas saring 110mm, *micropipet*, *whitetip*, *yellowtip*, *bluetip*, *microcentrifuge*, neraca analitik, *erlenmeyer*, *vortex*, *spindown*, *drybath incubator*, *microwave*, alat elektroforesis BIO RADTM *PowerPac*, alat UV Illuminator BIO-RADTM UVITEC, alat maestro gen, alat PCR T100TM *Thermalcycler*, tabung dan PCR *tube*. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Sampel *blood spot* kering, Kit mini ekstraksi DNA Favorgen yaitu: *Buffer W1* (Konsentrat *wash*), *buffer konsentrat elution*, *buffer*, proteinase K, kolom mini FABG, koleksi tabung, tabung elusi, *Master Mix Kit*

PCR, *agarose* 2%, *TBE Buffer* 1X, *fluorovue*, *loading dye*, marker (Rachmad, 2019).

5. Prosedur Kerja

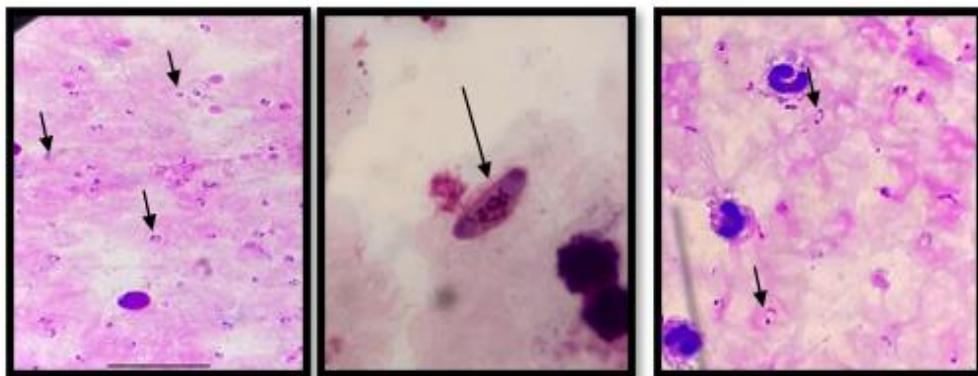
Sampel *Plasmodium falciparum* berasal dari Puskesmas Amban Manokwari Papua Barat sebanyak 51 sampel. Pengambilan sampel darah pada vena dan kapiler, kemudian dilakukan pemeriksaan *Rapid Diagnostic Test* (RDT) didapatkan hasil Positif atau berbentuknya 2 garis pada C dan Pf. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikroskopis sediaan hapusan tipis/tebal untuk melihat adanya morfologi parasit pada mikroskop. Jika ditemukan parasit maka dihitung jumlah parasit kemudian hasil tersebut dilaporkan kepada Dokter untuk diberikan ACT dengan kombinasi Dihydroartemisinin Peperakuin (DHP) + Primakuin dosis sesuai dengan berat badan dan umur pasien. Obat DHP sebagai lini pertama untuk pengobatan *Plasmodium falciparum* diminum sampai hari ke-3. Setelah 3 hari pasien kembali melakukan *followup* pemeriksaan malaria, jika masih terlihat *Plasmodium falciparum* maka sampel ditampung pada kertas *wathman*/saring. Dari 51 pasien *Plasmodium falciparum* didapatkan 11 pasien dengan hasil *follow up* hari ke-3 setelah pemberian ACT masih terlihat *Plasmodium falciparum* dan selanjutnya dilakukan uji molekuler di Laboratorium Biologi Molekuler Univeristas

Muhammadiyah Semarang. Sampel *blood spot* kering diekstraksi DNA menggunakan kit *Favorgen Biotech Corp* dimana DNA dikatakan murni jika memiliki rasio absorbansi 260/280nm antara 1,8 sampai 2.0. Hasil ekstraksi DNA digunakan sebagai *templete* untuk amplifikasi gen *Kelch 13* pada *Plasmodium falciparum* direferensi dengan gen bank NC_004331 dan primer yang sudah dirancang menggunakan *software geneious* (<https://www.genecious.com>) Lin F (5'GCCACCTCTACCCATGCTTT3') LinR (5'AGCGGAAGTAGTAGCGAGAA3'), YenF (5'TCGCCATTCTCTCCTCCTGT'), YenR (5'AAAGCATGGGTAGAGGTGGC3').

Hasil ampifikasi gen *Kelch 13* pada *Plasmodium falciparum* (± 200 bp). Selanjutnya pengiriman sampel produk PCR dikirim ke PT. *Science Genetika Indonesia* untuk dilakukan sekuensing DNA Pengkode gen *Kelch 13* pada *Plasmodium falciparum*, kemudian dilakukan analisa data pada semua hasil dari proses *aligment*, BLAST (pensejajaran suatu sekuen dengan sekuen-sekuen lain yang telah terdaftar pada gen bank yang dapat diketahui sekuen mana yang memiliki persentase kesamaan tertinggi dengan sekuen yang lain) pada sekuen hasil *aligment* dan *consensus* ditampilkan dalam bentuk *mapping* dan dijabarkan dalam bentuk tabel.

HASIL PENELITIAN

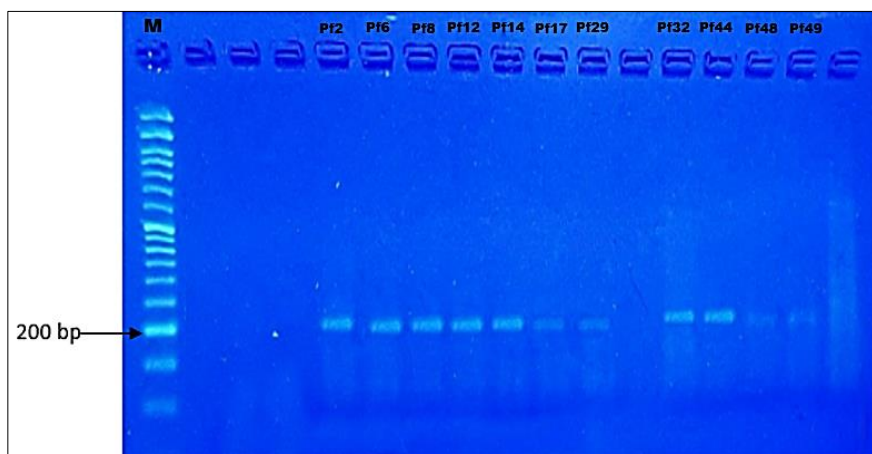
1. Pemeriksaan Mikroskopis *Plasmodium falciparum* HO dan H3



Gambar 1. Hasil pemeriksaan mikroskopis *Plasmodium falciparum* HO sebelum H3 setelah pengobatan ACT.

Keterangan: (A)=Tropozoit *Plasmodium falciparum* HO, (B) = Gametosit *Plasmodium falciparum* H3, (C)= Tropozoit *Plasmodium falciparum* H3 terwakili oleh tanda panah, H3 = Hari pertama belum pengobatan ACT, H3 = Setelah pengobatan ACT.

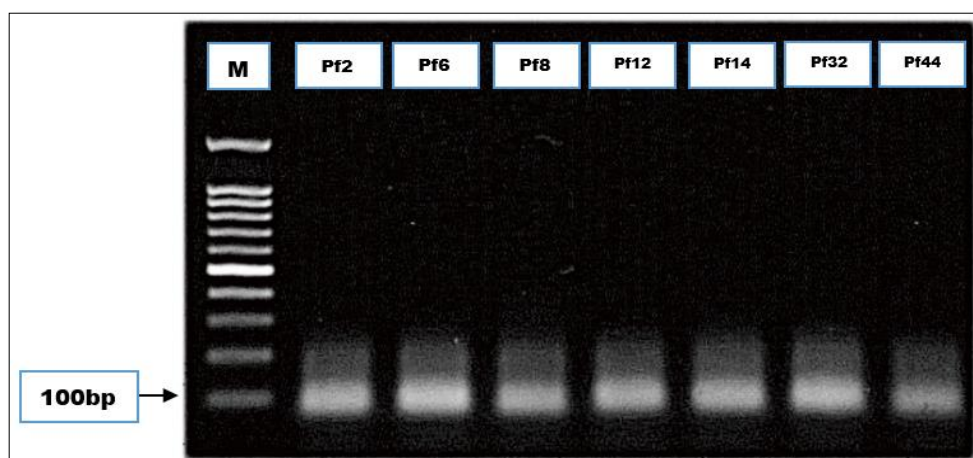
2. Hasil amplifikasi PCR



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR dengan gel agarosa 2% pada sampel DNA *Plasmodium falciparum* oleh peneliti di Laboratorium Biologi molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang.

Keterangan: (M = Marker 1.5kb), (sampel DNA *Plasmodium falciparum* = Pf2, Pf6, Pf8, Pf12, Pf14, Pf17, Pf29, Pf32, Pf44, Pf48, Pf49)

3. Hasil amplifikasi PCR

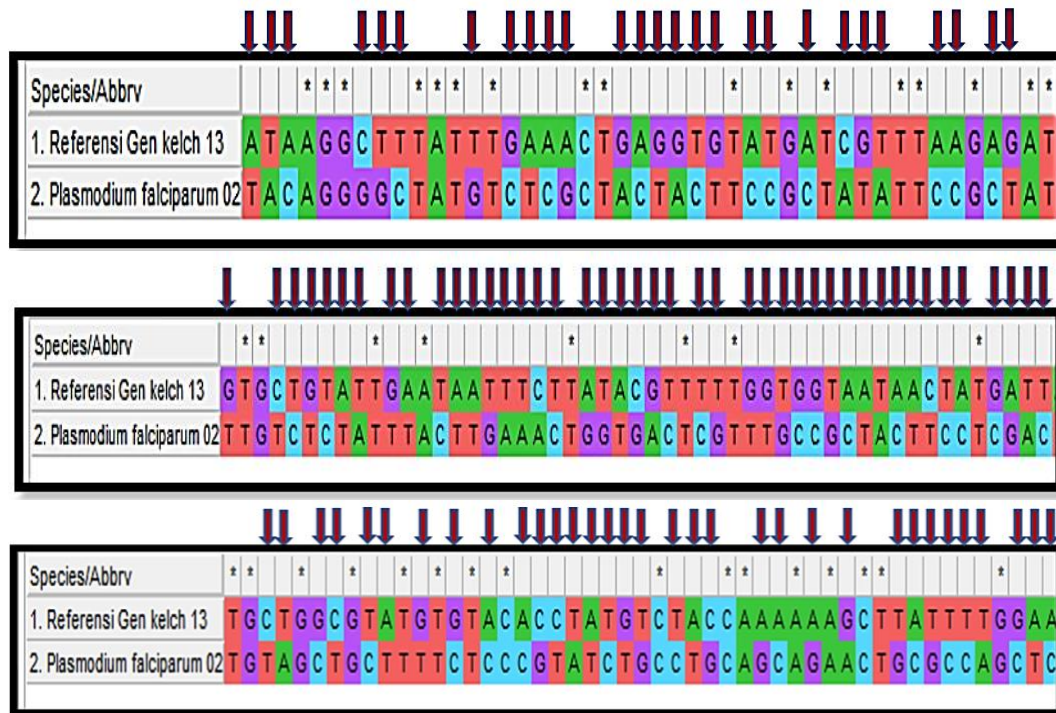


Gambar 3 . Hasil amplifikasi DNA pada gen *Kelch 13* pada sampel *Plasmodium falciparum* oleh PT. Science Genetika menggunakan gel agarosa 0.8%.

Keterangan: (M = Marker DNA 100bp), (Sampel *Plasmodium falciparum* = Pf2, Pf6, Pf8, Pf12, Pf14, Pf32, Pf44).

4. Hasil sekuensing DNA pengkode gen *Kelch 13*

a. Alignment Basa Nukleotida



Gambar 4. Hasil Alignment Basa Nukleotida

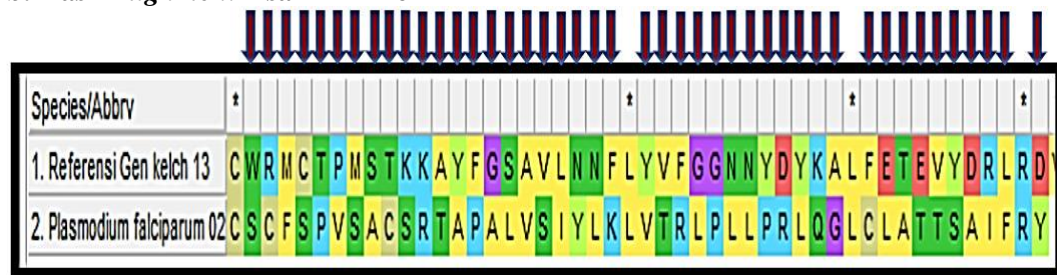
Keterangan : A=Adenin, T=Timin, C=Sitosisin, G=Guanin, Referensi gen *Kelch 13*, *Plasmodium falciparum* (hasil *consensus* sekuen).

Tabel 1. Hasil Mapping Basa Nukleotida

| No | Nukleotida DNA Referensi <i>Kelch 13</i> | Nukleotida DNA Hasil Sekuensing <i>Kelch 13</i> | Titik basa | Jenis mutasi | Keterangan Perubahan Basa Nitrogen |
|----|--|---|------------|------------------------|---|
| 1 | C | T | 3 | Subtitusi (transisi) | Perubahan basa nitrogen yang sejenis. |
| 2 | T | A | 4 | Subtitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 3 | G | C | 6 | Subtitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 4 | C | T | 7 | Subtitusi (transisi) | Perubahan basa nitrogen yang sejenis. |
| 5 | T | C | 9 | Subtitusi (transisi) | Perubahan basa nitrogen yang sejenis. |
| 6 | A | T | 10 | Subtitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 7 | G | T | 12 | Subtitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 8 | C | T | 20 | Subtitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |

| | | | | | |
|----|---|---|----|-------------------------|---|
| 9 | T | C | 23 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 10 | T | C | 27 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 11 | A | G | 32 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 12 | A | G | 35 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 13 | G | A | 37 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 14 | T | C | 43 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 15 | T | C | 44 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |
| 12 | C | T | 53 | Substitusi (transversi) | Perubahan basa nitrogen yang tidak sejenis. |

b. Hasil Alignment Asam Amino



Gambar 5. Hasil Alignment asam amino

Keterangan : Referensi gen *Kelch 13*, sampel *Plasmodium falciparum* (hasil *consensus* sekuens), C (Cystine), W (Triptophan), S (Serine), R (Arginine), C (Cysteine), M (Methionine), F (Phenylalanine), T (Threonine), P (Proline), V (Valine), A (Alanine), K (Lysine), Y (Tyrosine), G (Glycine), L (Leucine), I (Isoleucine), N (Asparagine), D (Aspartic Acid), Q (Glutamine).

Tabel 2. Hasil Mapping basa nukleotida dan asam amino sekuen gen *Kelch 13* pada *Plasmodium falciparum*

| No | Basa Nukleotida | Titik basa | Asam amino | Titik kodon | Jenis mutasi | Keterangan |
|----|-----------------|------------|----------------------------|-------------|-------------------|------------------------------------|
| 1 | Sitosin - Timin | 3 | Cysteine- Cysteine | 1 | Silent mutation | Tidak terjadi perubahan asam amino |
| 2 | Timin- Adenin | 4 | Tryptophan - Serine | 2 | missense mutation | Terjadi perubahan asam amino |
| 3 | Sitosin - Timin | 7 | Arginine menjadi Cysteine | 3 | missense mutation | Terjadi perubahan asam amino |
| 4 | Adenin - Timin | 10 | Methionine - Phenylalanine | 4 | missense mutation | Terjadi perubahan asam amino |
| 5 | Adenin- Sitosin | 95 | Tyrosine menjadi Proline | 32 | missense mutation | Terjadi perubahan asam amino |
| 6 | Adenin- Sitosin | 117 | Glutamic acid -Leucine | 39 | missense mutation | Terjadi perubahan asam amino |

PEMBAHASAN

Bedasarkan hasil pemeriksaan RDT dan mikroskopis sediaan darah tipis/tebal pada tabel 5 dari 51 sampel pasien didapatkan semua positif *Plasmodium falciparum*. Pada pemeriksaan mikroskopis, ditemukan morfologi *Plasmodium falciparum* H0 dalam bentuk stadium *tropozoit* muda pada (gambar 1A & 1C) sebanyak 46 sampel, sedangkan pada stadium *gametosit* ditemukan sebanyak 5 sampel pada (gambar 1B). Pasien yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* diberikan pengobatan kombinasi ACT berupa dihidroartemisinin peperakuin (DHP) + primakuin sebagai pengobatan lini pertama yang diberikan pada hari pertama (H0) dan diminum sampai hari ke-3 (H3). Hasil mikroskopis pasien setelah pengobatan ACT H3 menunjukkan dari 51 pasien didapatkan 11 pasien yang masih terinfeksi *Plasmodium falciparum* dan dari 11 sampel tersebut ditampung pada *blood spot* kering untuk mengujikan lebih lanjut di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang.

Langkah awal untuk uji molekuler yaitu dengan tahapan isolasi DNA *Plasmodium falciparum* (*blood spot* kering). Tujuan isolasi DNA yaitu untuk memisahkan DNA dari bahan lain agar mendapatkan DNA murni dari *Plasmodium falciparum* dengan

menggunakan metode Favorgen kit terdiri dari tiga proses utama yaitu pelisisan, purifikasi dan presipitasi. Hasil isolasi kemudian dilanjutkan dengan mengukur kualitas DNA menggunakan spektrofotometer (*Maestro Gen Nanopro*). DNA dikatakan berhasil jika memiliki nilai perbandingan absorbansi 260/280nm rasio berkisar 1,8 – 2,0 (Fatchiyah *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil uji kuantitatif DNA menunjukkan bahwa 11 sampel isolasi DNA memiliki kualitas kemurnian rata-rata 1,8-1,9 sedangkan didapatkan nilai konsentrasi yang berbeda-beda.. Selanjutnya sampel DNA di proses amplifikasi untuk mengetahui DNA yang di isolasi dapat diperbanyak dan dapat digunakan pada penelitian selanjutnya. Amplifikasi DNA pada sampel Pf2, Pf6, Pf8, Pf12, Pf14, Pf17, Pf29, Pf32, Pf44, Pf48, dan Pf49 menggunakan komposisi campuran reaksi PCR 50µl yaitu primer (*Reverse & Forward*) panjang DNA 1607bp, DNA *templete*, ddH₂O dan *Mastermix* menggunakan program PCR dengan tahap denaturasi, *annealing* dan *extention* (Asif *et al.*, 2021).

Amplifikasi PCR DNA target di elektroforesis dengan agarosa 2% untuk melihat hasil amplifikasi DNA. Hasil amplifikasi gen *Kelch 13* pada (gambar 2) saat disinari menggunakan *UV Transluminator* menunjukkan adanya pita tunggal yang sejajar antara sampel

sampel Pf2, Pf6, Pf8, Pf12, Pf14, Pf32, dan Pf44) menggunakan marker berukuran 1.500bp. Hasil yang didapatkan adanya pita DNA yang sejajar dengan marker berukuran ± 200 bp. Pada uji konfirmasi dari PT. *Science Genetika* hasil elektroforesis terhadap 7 sampel didapatkan pita tunggal yang sejajar berukuran ± 100 bp. Sampel yang mengalami perbedaan ketebalan pita, hal ini disebabkan oleh konsentrasi DNA sampel yang berbeda-beda ketika proses *mixing* PCR sehingga proses optimasi PCR diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan dimana optimasi ini mengangkut suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya untai DNA ganda sehingga tidak memungkinkan terjadinya penempelan primer. Hasil amplifikasi yang kurang spesifik ditandai dengan beberapa hal yaitu pada awal proses PCR peneliti tidak menggunakan metode *Nested-PCR* sehingga amplifikasi PCR yang sudah di elektroforesis mendapatkan hasil yang tidak maksimal sesuai dengan gen target dari *Kelch 13* yaitu 1607bp. Proses selanjutnya yaitu produk hasil PCR akan dikirimkan ke PT. *Science Genetika* dengan melakukan proses identifikasi molekuler meliputi sekuensing DNA. Hasil sekuensing DNA akan mendapatkan fragmen DNA yang

panjang sehingga diperoleh dengan mensejajarkan (*Alignment*) dan menyambungkan (*Assambly*). Amplifikasi gen menggunakan primer *forward* dan *reverse* didapatkan urutan nukleotida yang berupa urutan basa nitrogen. Analisis sekuens dilakukan secara bioinformatika dengan tujuan memperoleh *consensus forward* dan *reverse* dengan menggunakan *software* Bioedit dan Mega XI (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), kemudian dianalisa dengan mencocokkan dengan data di *Gene Bank* melalui <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Pada gambar 3 hasil *alignment* pada beberapa titik basa nitrogen mengalami mutasi gen sehingga membentuk perubahan pada kode genetik, biasanya terjadi pada kodogen (DNA) atau bisa juga pada kodon (triplet). Perubahan yang terjadi pada satu atau beberapa pasangan basa nukleotida disebut dengan mutasi titik sedangkan penggantian satu pasang basa nukleotida dengan pasangan nukleotida lain disebut mutasi substitusi dan pada beberapa mutasi substitusi tidak mempengaruhi pada protein yang dikode (Reece *et al.*, 2021). Mutasi gen atau substitusi dibagi menjadi 2 bagian yaitu: a) Transisi karena adanya perubahan kode genetik basa purin diganti oleh basa purin, atau basa pirimidin diganti oleh basa pirimidin. b) Transversi yaitu

dimana mutasi yang terjadi akibat adanya perubahan kode genetik pada nukleotida basa purin dan diganti oleh basa pirimidin maupun sebaliknya. Basa purin tersusun atas adenin (A) dan guanin (G), sedangkan basa pirimidin tersusun atas sitosin (C) dan timin (T). Hasil *alignment* basa nukleotida adanya perubahan kode genetik, hasil *mapping* pada tabel 1 didapatkan 31 mutasi substitusi transisi dan 73 mutasi transversasi. Mutasi yang tidak merubah satu asam amino ke asam amino lainnya disebut *silent mutation* sedangkan mutasi yang merubah satu asam amino ke asam amino lainnya disebut *missense mutation* (Reece *et al.*, 2021). Selanjutnya pada gambar 4 didapatkan adanya 48 basa nukleotida hasil *alignment* sekuens gen *Kelch 13* yang berubah menjadi asam amino. Pada tabel 2 *mapping* basa nukleotida dan asam amino didapatkan hasil dampak dari mutasi yaitu 5 kodon *Silent mutation* dimana terjadinya perubahan pada basa nukleotida dan tidak terjadi perubahan asam amino. Dimana pada basa nukleotida ke-3 Sitosin (C) berubah menjadi Timin (T) dan pada asam amino tidak terjadi perubahan urutan kodon 1 yaitu *Cysteine* tetap menjadi *Cysteine* terdapat 5 titik mutasi. Selanjutnya disebut dengan *missense mutation* yaitu perubahan urutan basa nukleotida dengan asam amino, pada basa ke-4 Timin (T) menjadi Adenin (A) dan pada asam

amino kodon 2 dimana terjadi perubahan dari *Tryptophan* menjadi *Serine* terdapat 43 titik mutasi.

Pada tingkat molekuler, resistensi ACT disebabkan oleh adanya mutasi pada protein salah satunya *Kelch* kromosom 13 yang dikode oleh PF3D7_1343700 pada *Plasmodium falciparum* dimana mutasi non-sinonim di *Kelch 13* domain dan BTB-POZ (KPBD). Salah satu adanya mutasi gen kemungkinan mengakibatkan berkurangnya sensitivitas *Plasmodium falciparum* terhadap kandungan ACT yang ditunjukkan adanya beberapa studi yaitu uji laboratorium tentang resistensi yang diperoleh secara artifisial, studi asosiasi genetik dari resistensi alami dan eksperimen. Proyek penelitian yang dilakukan oleh komunitas malariaGen *Plasmodium falciparum* di Jerman didapatkan 46 mutasi pada perubahan asam amino (Amato *et al.*, 2016). Berdasarkan lebih dari 200 mutasi non-sinonim telah diidentifikasi dan 9 mutasi sudah divalidasi bahwa gen *Kelch 13* berhubungan erat dengan resistensi ACT pada penelitian (Fairhurst *at al.*, 2016) mutasi tersebut yaitu (F446I, N458Y/I, M476I/V, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H dan C580Y). Pada penelitian (Ariey *et al.*, 2014) didapatkan 75-90% perubahan asam amino yaitu C580Y yang menjadi mutasi terbanyak yang ditemukan. Hasil penelitian (Rachmad,

2019) di Lampung terhadap sampel *Plasmodium falciparum* dengan pengobatan ACT setelah 3 hari didapatkan semua tergolong mutasi titik antara lain terjadi mutasi *Klech 13* pada urutan asam amino kodon G453W (*glycine/G* menjadi *tryptophan/W*), kodon V545C (*valine/V* menjadi *cysteine/C*), dan kodon E455K (*glutamic acid/E* menjadi *lysine/K*). Berdasarkan laporan penelitian diatas ada beberapa penelitian yang berkaitan dengan resistensi ACT terhadap beberapa gen lain yang berkontribusi terhadap munculnya penyebaran kegagalan ACT yaitu *Kelch* kromosom 8 (PF3D7_0801700), protein yang mengandung domain Sec14 kromosom 6 (PF3D7_0626400) (Winzeler, 2017) menganalisis longitudinal menggunakan kombinasi *Genome Wide Association Studies* (WGAS) mendapatkan varian lain dalam gen yang mengandung domain *Kelch* yaitu pada kromosom 10, *Multidrug Resistance Protein 2* (Mdr2), *Ferredoxin* (FD), *Apicoplast Ribosomal Protein S10* (ARPS10), *Multidrug Resistance Protein (PfMDR1)* yang berkaitan dengan resistensi ACT. (Dondorp *et al.*, 2012).

Data laporan beberapa penelitian belum divalidasi oleh WHO karena belum memenuhi kriteria penilaian mengenai resistensi ACT berhubungan dengan mutasi gen *Kelch 13* atau mutasi

gen lainnya. Ada kewajiban untuk melacak terjadinya resistensi ACT atau kegagalan terapi melalui beberapa skrining klinis, epidemiologis dan genomik penilaian tersebut dapat mencakup yaitu (1) adanya data tentang kegagalan pengobatan (2) pembersihan parasit yang tertunda pada hari ke-3 (DPC3) (3) , *Parasite Clearance Halflife* (PCHL) danin – vitro/ *Exviving Stage Survival Assay* (RSA) (4) GWAS data dalam upaya untuk membubuhi keterangan status resistensi parasit (Goel & Sharma, 2019). Upaya ini dapat membantu dalam pengawasan dan pengendalian resistensi ACT atau kegagalan ACT dan dapat berkontribusi pada integrasi dengan Bank data diseluruh dunia yang memantau pertumbuhan resistensi pada obat malaria, sehingga dikatakan resistensi harus memenuhi semua kriteria penilaian dari WHO. Terapi kombinasi berbasis ACT dimana pengobatan ini sangat efektif untuk malaria tetapi munculnya penyebaran *Plasmodium falciparum* dengan kerentanan yang berkurang terhadap ACT dapat mengancam controlnya malaria. Pemantauan ketat terhadap kegagalan ACT melalui pengembangan alat surveilans yang cepat dan ekonomis serta katalog sistematik yaitu epidemiologis, klinis (DPC3 & PCHL) dan data genom (GWAS) yang sangat penting. Diusulkan

penekanan pada sekuensing genom seluruh strain sehingga data yang diperoleh dapat diintegrasikan dengan data genom seperti di India menggunakan Teknologi baru untuk anotasi setiap kasus kegagalan pengobatan ACT (Goel & Sharma, 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa hasil identifikasi mutasi gen *Kelch 13* pada sampel *Plasmodium falciparum* dengan pengobatan ACT setelah 3 hari di Puskesmas Manokwari Papua Barat mengalami perubahan kode genetik. Hasil *alignment* terdapat 3 varian mutasi gen yang ditemukan antara lain mutasi substitusi (transisi dan transversi), dampak dari mutasi yaitu *silent mutation* dan *missense mutation*. Pada beberapa titik basa nitrogen mengalami mutasi didapatkan 31 mutasi substitusi transisi dan 73 mutasi substitusi transversi. Sedangkan hasil *alignment* asam amino didapatkan dampak dari mutasi yaitu 5 kodon terjadinya *Silent mutation* dan 43 kodon terjadinya *missense mutation*. Adanya mutasi pada perubahan kode genetik gen *Kelch 13* terhadap pengobatan ACT merupakan salah satu penanda yang belum bisa disimpulkan terjadinya resistensi. Adanya resistensi harus memenuhi kriteria penilaian

dimana harus mencakup adanya beberapa pemeriksaan yaitu epidemiologis, klinis (DPC3 & PCHL) dan data genom (GWAS). Upaya ini dapat membantu dalam pengawasan dan pengendalian resistensi ACT yang memantau pertumbuhan resistensi pada obat malaria, sehingga dikatakan resistensi harus memenuhi semua kriteria penilaian dari WHO.

DAFTAR PUSTAKA

- Amato, R., Miotto, O., Woodrow, C. J., Almagro-Garcia, J., Sinha, I., Campino, S., Mead, D., Drury, E., Kekre, M., Sanders, M., Amambua-Ngwa, A., Amaratunga, C., Amenga-Etego, L., Andrianaranjaka, V., Apinjoh, T., Ashley, E., Auburn, S., Awandare, G. A., Baraka, V., Kwiatkowski, D. P. (2016). *Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. ELife*, 5(MARCH2016), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.08714>
- Anindita, V., Mutiara, H., & Mutiara, U. G. (2017). Mutasi gen *kelch 13* dan resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap obat antimalaria golongan artemisinin. *Medula*, 7(5), 149–153.
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., Ménard, D. (2014). *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. Nature*, 505(7481), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>

- Asif, S. et al. (2021) "PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide," *Research in Molecular Medicine*, 9(2), hal. 81–102. doi: 10.32598/rmm.9.2.1189.1.
- Astin, N., Alim, A., & Zainuddin, Z. (2020). Studi Kualitatif Perilaku Masyarakat dalam Pencegahan Malaria di Manokwari Barat, Papua Barat, Indonesia. *Jurnal PROMKES*, 8(2), 132. <https://doi.org/10.20473/jpk.v8.i2.2020.132-145>
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., ... Ménard, D. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>
- B Reece, J. et al. (2021) *Campbell Biology Twelfth Edition*. 12th ed. United State of America: Pearson Education.
- Chhibber-Goel, J., & Sharma, A. (2019). *Profiles of Kelch mutations in Plasmodium falciparum across South Asia and their implications for tracking drug resistance*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11(September), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.10.001>
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, M., Imwong, M., Chotivanich, K., & Lim, P. (2012). *Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria*. *New England Journal of Medicine*, 361(17), 1714–1714. <https://doi.org/10.1056/nejmx090050>
- Fairhurst, Rick M. Arjen, D. M. (2016). Tahan artemisinin *plasmodium falciparum* malaria. 1–12. <https://doi.org/10.1128/microbiolsp.ec.E110-0013>.
- Fatchiyah A, Widyarti LE, Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga, Malang.
- Kemenkes RI, 2014. (2014). Pedoman manajemen malaria. In *Pediatrics for Practitioner*. https://doi.org/10.5005/jp/books/12172_38
- Kemenkes RI. (2013). Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 5 Tahun 2013 Tentang Pedoman Tata Laksana Malaria. *Peraturan Menteri Kesehatan RI*, 128, 5–62.
- Kemenkes RI. (2017). *Profil Kesehatan Indonesia 2017* (Vol. 1227, Issue July). <https://doi.org/10.1002/qj>
- Kinansi, R. R., Mayasari, R., & Pratamawati, D. A. (2017). Pengobatan Malaria Kombinasi Artemisinin (ACT) Di Provinsi Papua Barat Tahun 2013. *Balaba: Jurnal Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara*, 13(1), 43–54. <https://doi.org/10.22435/blb.v13i1.4921.43-54>

- Mishra, N., Bharti, R. S., Mallick, P., Singh, O. P., Srivastava, B., Rana, R., Phookan, S., Gupta, H. P., Ringwald, P., & Valecha, N. (2016). Emerging polymorphisms in *falciparum Kelch 13* gene in Northeastern region of India. *Malaria Journal*, *15*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1636-4>
- Mohon, A. N., Alam, M. S., Bayih, A. G., Folefoc, A., Shahinas, D., Haque, R., & Pillai, D. R. (2014). Mutations in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009-2013). *Malaria Journal*, *13*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-431>
- Parambang, S. J., Hasmono, D., & Suwarko, J. (2021). Studi Pola Pemberian Artemisinin-Based Combination Therapy pada Pasien Malaria di RSUD Supiori Papua. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*, *10*(1), 30. <https://doi.org/10.15416/ijcp.2021.10.1.30>
- Phyo, A. P., Nkhoma, S., Stepniewska, K., Ashley, E. A., Nair, S., McGready, R., Moo, C. L., Al-Saai, S., Dondorp, A. M., Lwin, K. M., Singhasivanon, P., Day, N. P. J., White, N. J., Anderson, T. J. C., & Nosten, F. (2012). Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study. *The Lancet*, *379*(9830), 1960–1966. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60484-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60484-X)
- Rachmad, B. (2019). Isolasi dan identifikasi mutasi gen Pfk13 (PFD7_1343700) sebagai penanda resistensi artemisinin pada isolat *Plasmodium falciparum* asal Lampung. *Prosiding Dalam Rangka Rakernas XIV & Temu Ilmiah XXII 2019 ISOLASI*, *13*(1), 25–40.
- Rachmad, B., Antasari, R., Ghiffari, A., (2021). Identifikasi Mutasi Gen PfRPB9 Sebagai Biomarker Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Artemisinin Dan Derivatnya Pada Pasien Malaria Asal Lampung. *Prosiding Dalam Rangka*. 45–53.
- Rachmad, B. (2019). Isolasi dan identifikasi mutasi gen Pfk13 (PFD7_1343700) sebagai penanda resistensi artemisinin pada isolat *Plasmodium falciparum* asal Lampung. *Prosiding Dalam Rangka Rakernas XIV & Temu Ilmiah XXII 2019 ISOLASI*, *13*(1), 25–40.
- Suwandi, J. F. (2015). Gen PfATP6 dan Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Golongan Artemisinin. *Juke Unila*, *5*(9)(9), 141–146.
- Wang, J., Zhang, C. J., Chia, W. N., Loh, C. C. Y., Li, Z., Lee, Y. M., He, Y., Yuan, L. X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z. C., Liu, B., Shen, H. M., Tan, K. S. W., & Lin, Q. (2015). Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10111>
- WHO. (2020). Regional messaging. *World Malaria Report 2020*, 1–12.



Winzeler, E. A. (2017). *Longitudinal study of Plasmodium pathogens identifies new loci associated with artemisinin resistance*. *Genome Biology*, 18(1), 17–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1219-x>