

IDENTIFIKASI MUTASI CODON K76T GEN PFCRT PADA PENDERITA MALARIA FALCIPARUM DI KABUPATEN LAHAT

Jhons Fatriyadi Suwandi¹⁾

¹⁾Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung
Jl. Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145
Surel: yadisuwandi04@gmail.com

ABSTRACT

Most malaria disease cases in Lahat, South Sumatera are caused by *Plasmodium falciparum*. This study was conducted to evaluate polymorphism of PfCRT gene at malaria patient in Lahat General Hospital. PfCRT gene that play a role in the emergence of *P. Falciparum* resistance to chloroquine in Lahat. This study was done in Lahat General Hospital South Sumatera, Indonesia at 2011. The DNA extraction on thirty malarial blood samples which have been microscopically tested was done by chelex methode. Results of DNA extractions was amplified with nested PCR methode by two pairs of TCRP and TCRD primer. The amplified results was detected by electrophoresis. Then, the amplified result was cut by Apo I restriction enzyme. This enzyme cut DNA fragments at 134bpsin K76T codon. Over 30 samples, only 7 samples can be detected by electrophoresis. TheseDNA samples was cut by Apo I restriction enzyme. In the wild type, there was one band of DNA at 134bps, while in themutant type, there was two bands of DNA at 34bpsand 100bps. All of the 7 samples (100%) that had been cut at 34bpsand 100bps indicated that they were themutant types.

Keywords : Codon K76T, Lahat, PfCRT, *Plasmodium falciparum*.

ABSTRAK

Kasus malaria di Kabupaten Lahat, Propinsi Sumatera Selatan sebagian besar disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mutasi pada codon K76T gen PfCRT. Gen ini berhubungan dengan resistensi *P.falciparum* terhadap klorokuin. Pengambilan sampel darah dilakukan pada tahun 2011 di RSUD Kabupaten Lahat dan amplifikasi serta analisis dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UGM. Sebanyak 30 sampel darah penderita malaria dilakukan isolasi DNA dengan metode chelex. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan metode *nested* PCR menggunakan dua pasang primer. Hasil amplifikasi dideteksi dengan elektroforesis. Setelah itu dilakukan analisis dengan metode RFLP menggunakan enzim Apo I sebagai enzim restriksi. Dari 30 sampel darah hanya 7 sampel darah yang dapat diamplifikasi dan kemudian dianalisis dengan metode RFLP. Ketujuh sampel tersebut terpotong menjadi dua fragmen sepanjang 100 bp dan 34 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa ketujuh sampel tersebut tergolong *mutan type*.

Kata kunci : Codon K76T, Lahat, PfCRT, *Plasmodium falciparum*.



PENDAHULUAN

Infeksi malaria di Kabupaten Lahat telah lama menjadi masalah dibidang kesehatan. Infeksi malaria terus menerus ditemukan sepanjang tahun. Spesies Plasmodium yang paling sering ditemukan pada penderita malaria di Kabupaten Lahat adalah *Plasmodium falciparum* dan *P. vivax*. Spesies lain yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. knowlesi* sampai saat ini belum dilaporkan ditemukan di Kabupaten Lahat (Markell *et al.*, 1986; Garcia & Bruckner, 1997; Biggs & Brown 2001; Heelan & Ingersoll 2002; Kemenkes RI, 2011a; Centers for Disease Control and Prevention 2012).

Berdasarkan profil kesehatan Kabupaten Lahat tahun 2007, telah dilaporkan angka AMI (*Annual malaria incidence*) di Lahat sebesar 14,34/1000 populasi (Dinkes Kabupaten Lahat, 2007). Survei pendahuluan pada penderita malaria klinis yang berobat di RSUD Lahat menunjukkan 49% dari 77 sampel darah yang diperiksa pada bulan November 2010 positif malaria (Suwandi, 2011).

Klorokuin merupakan salah satu antimalaria yang masih digunakan di Kabupaten Lahat untuk mengendalikan malaria, walaupun saat ini Kementerian Kesehatan RI sudah tidak merekomendasikan klorokuin sebagai obat standar malaria. Adanya penurunan efektifitas klorokuin menjadi penyebab beralihnya standar pengobatan ke kombinasi berbasis artemisinin. Pada tahun 2000 telah dilaporkan resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin telah ditemukan diseluruh wilayah Indonesia (Zit & Ramdja 2000; Depkes RI 2008; Kemenkes RI 2011; Kemenkes RI 2012). Ditemukannya penderita malaria yang tidak menunjukkan perbaikan klinis atau timbulnya kekambuhan setelah pengobatan dengan klorokuin menunjukkan kemungkinan adanya resistensi terhadap klorokuin.



Penyebab timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin adalah salah satunya adanya mutasi gen PfCRT pada kodon posisi 76. Gen ini berperan pada transportasi kation-anion yang pada kondisi normal mengalirkan asam amino masuk ke dalam vakuola makanan parasit melalui membrannya. Adanya mutasi substitusi pada kodon 76 dari threonine (T) menjadi lysine (K) pada gen ini telah banyak dilaporkan menjadi penyebab resistensi terhadap klorokuin dan amodiakuin. Mutasi pada gen ini akan menyebabkan penurunan pengeluaran asam amino sehingga menyebabkan penurunan pH lisosom. Kondisi ini ditemukan pada parasit yang resisten terhadap klorokuin (Djimdé *et al.*, 2001; Warhurst, 2001; Lopes *et al.*, 2002; Kamelia, 2010). Penurunan pH dalam vakuola makanan akan menyebabkan gangguan pada mekanisme kerja klorokuin. Penelitian ini akan mengkaji mutasi pada *codon 76* gen PfCRT pada penderita malaria di Kabupaten Lahat.

METODE

Sampel penelitian ini di ambil selama bulan Oktober dan November tahun 2011 di RSUD Kabupaten Lahat Propinsi Sumatera Selatan. Sampel penelitian adalah sebagian pasien malaria yang berobat di RSUD Lahat dengan merujuk pada kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel darah yang diperoleh kemudian dilakukan isolasi DNA dengan menggunakan metode chelex (Wooden *et al.* 1992; Moll *et al.* 2008). Amplifikasi DNA dilakukan dengan pendekatan nested PCR. Pada tahap pertama dilakukan amplifikasi sepanjang 537 bp yang mengandung *codon 76* dengan menggunakan primer *forward* CCGTTAATAATAAATACACGCAG dan primer *reverse* CGGATGTTACAAAACACTATAGTTAC. Amplifikasi kedua dilakukan sepanjang 134 bp dengan primer *forward* TGTGCTCATGTGTTTAAACTT, dan



primer *reverse* CAAAACTATAGTTACCAAT TTTG. Hasil amplifikasi dideteksi dengan elektroforesis. Analisis mutasi pada *codon* 76 dengan menggunakan metode *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Hasil PCR pada nested kedua dipotong dengan menggunakan enzim restriksi Apo I. Pada kondisi tidak ada mutasi maka enzim tidak dapat memotong fragmen DNA pada *codon* 76. Pada kondisi mutasi maka enzim akan memotong fragmen DNA pada *codon* 76 menjadi dua potong fragmen masing masing sepanjang 34 bp dan 100 bp (Kamelia, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 30 sampel darah yang diamplifikasi, hanya tujuh sampel darah yang berhasil didapatkan pitanya pada elektroforesis. Ketujuh sampel ini kemudian dilakukan RFLP dengan menggunakan enzim restriksi Apo I. Ketujuh sampel yang dilakukan RFLP menunjukkan semua sampel terpotong menjadi dua fragmen sepanjang 34 bp dan 100 bp. Hal ini menunjukkan bahwa ketujuh sampel ini telah menunjukkan adanya mutasi pada *codon* 76 gen PfCRT. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kamelia (2010) di Lampung yang menunjukkan adanya mutasi pada posisi K76T gen PfCRT pada sampel penelitian di Lampung (Kamelia, 2010). Mutasi yang ditemukan pada *codon* K76T gen PfCRT menyebabkan timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin. Penelitian yang dilakukan oleh Djimdé *et al.* (2001) gen PfCRT merupakan salah satu marker molekuler untuk mendeteksi resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin.

Gen PfCRT adalah gen transporter yang mengatur pH, cairan dan elektrolit pada vakuola makanan Plasmodium. Pada kondisi normal (*wild-type*), klorokuin akan terakumulasi pada vakuola makanan Plasmodium dan akan berikatan dengan

feriprotophorphyrine IX membentuk molekul kompleks. Kompleks molekul ini sangat toksik bagi Plasmodium. Klorokuin juga dapat meningkatkan pH vakuola makanan sehingga polimerisasi heme tidak terjadi. Pada kondisi tanpa klorokuin maka pH di dalam vakuola makanan rendah. Rendahnya pH ini merupakan kondisi yang optimal bagi parasit untuk memecah heme menjadi pigmen yang tidak toksik bagi parasit. Bila penderita mendapat pengobatan dengan klorokuin maka akan menyebabkan perubahan pH pada vakuola makanan. Konsentrasi klorokuin yang optimal akan menyebabkan pH vakuola makanan meningkat sehingga proses polimerisasi hem terhambat. Terhambatnya proses ini akan menyebabkan menumpuknya hem pada vakuola makanan, yang merupakan bahan toksik sehingga dapat menyebabkan kematian Plasmodium (Djimdé *et al.* 2001; Warhurst 2001; Suwandi 2007; Kamelia 2010).

Bila terjadi mutasi pada *codon* K76T gen PfCRT maka klorokuin tidak dapat terakumulasi dalam vakuola makanan. Hal ini disebabkan adanya aliran (*efflux*) cairan termasuk klorokuin dari vakuola makanan ke sitoplasma. Kondisi ini menyebabkan konsentrasi klorokuin dalam vakuola makanan menurun sehingga molekul kompleks yang seharusnya terbentuk menjadi tidak terbentuk. Konsentrasi klorokuin yang rendah juga berakibat peningkatan pH vakuola makanan tidak terjadi. Tetap rendahnya pH vakuola makanan menyebabkan polimerisasi hem menjadi pigmen yang tidak toksik bagi parasit tetap berlangsung. Keseluruhan kondisi ini menyebabkan Plasmodium dapat bertahan dan tidak mati, walaupun dosis klorokuin yang diberikan sudah pada dosis terapi maksimal (Djimdé *et al.* 2001; Warhurst, 2001; Suwandi, 2007; Kamelia, 2010).

Kondisi ini yang kemungkinan terjadi pada penderita yang menjadi subjek penelitian ini. Kekurangan dari penelitian ini adalah tidak mengevaluasi hasil pengobatan dengan mengikuti protokol yang ditetapkan oleh WHO (WHO, 2009).



Asumsi adanya kegagalan terapi hanya dengan melihat adanya beberapa penderita yang berulang berobat dengan diagnosis yang sama yaitu malaria.

KESIMPULAN

Analisis RFLP pada gen PfCRT dari penderita malaria di RSUD Lahat telah ditemukan adanya mutasi pada *codon* 76 dengan perubahan asam amino threonine (T) menjadi lysine (K) yang menyebabkan timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan pada pimpinan Fakultas Kedokteran Unila yang telah memberikan dana penelitian melalui hibah penelitian FK Unila tahun 2011; Pimpinan dan staf medis dan paramedis karyawan RSUD Kabupaten Lahat atas bantuannya saat pengambilan data dan sampel darah penderita malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Biggs BA & Brown GV. 2001. *Malaria dalam Principles and Practice of Clinical Parasitology*, Chichester, England: John Wiley & Sons, LTD.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Malaria. Available at: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.
- Depkes RI. 2008. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dinkes Kabupaten Lahat. 2007. *Profil Kesehatan Kabupaten Lahat Tahun 2007*, Lahat: Dinas Kesehatan Kabupaten Lahat.
- Djimdé A *et al.*, 2001. A molecular marker for chloroquine resistant Falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine* 344(4): 257–263.
- Garcia LS & Bruckner DA. 1997. *Diagnostic Medical Parasitology* 3rd ed., Washington DC: ASM Press.



- Heelan JS & Ingersoll FW. 2002. *Essentials of Human Parasitology*, Albany (NY): Delmar Thomson Learning, Inc.
- Kamelia M. 2010. *Studi Polimorfisme Gen Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr) dari Penderita Malaria di Kotamadya Bandar Lampung dan Kabupaten Lampung Selatan, Provinsi Lampung*. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Kemenkes RI. 2012. *Buku Saku Penatalaksana Kasus Malaria*, Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemenkes RI. 2011. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*, Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan.
- Lopes D. *et al.* 2002. Molecular characterisation of drug resistant Plasmodium falciparum from Thailand. *Malaria journal* 1(12): 1–11.
- Markell EK, Voge M & John DT. 1986. *Medical Parasitology* 6th ed., Philadelphia: WB Saunders Company.
- Moll K. *et al.* 2008. *Methods in Malaria Research* 2008th ed., Manassas: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, University Boulevard, Manassas.
- Suwandi JF. 2007. *AKTIVITAS ANTIPLASMODIUM EKSTRAK DAUN SUNGKAI (Peronema canescens): Kajian aktivitas antiplasmodium in vitro dan in vivo, aktivitas penghambatan polimerisasi hem dan aktivitas sitotoksik terhadap sel vero*. Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis Fakultas Kedokteran UGM.
- Suwandi JF. 2011. Survey Plasmodium falciparum sebagai penyebab malaria di RSUD Kabupaten Lahat Propinsi Sumatera Selatan. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung* 1(1): 22–29.
- Warhurst DC. 2001. A molecular marker for chloroquine resistant Falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine* 344(4): 299–302.
- WHO. 2009. *Methods For Surveillance of Antimalarial Drug Efficacy*. WHO. The Institute.
- Wooden J. *et al.* 1992. Plasmodium falciparum: a simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. *Experimental parasitology* 75(2): 207–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1516668>.
- Zit Z & Ramdja M. 2000. The path of chloroquine resistance. *ZiMajalah Kedokteran Sriwijaya*, 32(3): 21–24.