

## Pengaruh Paparan Artemisinin terhadap Ekspresi Gen *PART* pada *Plasmodium falciparum* Galur Papua 2300

Hani Plumeriastuti,<sup>1</sup> Lilik Maslachah,<sup>2</sup> Chairul A. Nidom<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, <sup>2</sup>Lab. Farmasi Veteriner Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, <sup>3</sup>Lab. Biokimia Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

### Abstrak

*Plasmodium* resisten terhadap artemisinin menjadi salah satu permasalahan kesehatan di dunia karena belum ada obat baru pengganti artemisinin. Resistensi *P. falciparum* terhadap obat antimalaria artemisinin dapat terjadi karena dipengaruhi oleh faktor internal dari *P. falciparum*, antara lain induksi ekspresi gen yang mengekspresikan protein. Salah satu gen tersebut adalah gen *Tryptophan-rich Protein (PART)*. Fungsi *Tryptophan-rich Protein* penting dalam *membrane-spanning protein* dan berperan dalam *folding* protein untuk menjaga kontak hidrofobik. Penelitian ini bertujuan membuktikan overekspresi gen *Tryptophan-rich Protein P. falciparum* galur Papua 2300 yang disebabkan oleh paparan artemisinin berulang *in vitro*. Waktu penelitian dilaksanakan bulan Februari sampai November 2013. Tempat penelitian di Rumah Sakit Penyakit Tropik dan Infeksi Universitas Airlangga. Desain penelitian yang digunakan adalah *experimental design* dengan *post test only control group design*. Kultur *in vitro P. falciparum* galur Papua 2300 dibagi dalam kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang, yaitu paparan artemisinin ke-1 (PO1), paparan artemisinin ke-2 (PO2) dan paparan artemisinin ke-3 (PO3) menggunakan konsentrasi IC<sub>50</sub>. Ekspresi gen *Tryptophan-rich Protein (PART)* diukur dengan qRT-PCR. Hasil menunjukkan paparan artemisinin berulang pada *P. falciparum* dapat meningkatkan level ekspresi gen *Part* (2<sup>ΔΔCT</sup>) relatif terhadap kontrol. Simpulan, paparan artemisinin *in vitro* menyebabkan overekspresi gen *Tryptophan-rich Proteins (PART)* oleh promotor *P. falciparum* galur Papua 2300. [MKB. 2015;47(3):129–36]

**Kata kunci:** Artemisinin, fenotip, gen *Tryptophan-rich Protein (PART)*, *P. falciparum* galur Papua 2300

## Effect of Artemisinin Exposure toward *PART* Gene Expression in *Plasmodium falciparum* Papua 2300 Strain

### Abstract

Artemisinin resistant *Plasmodium* has become one of the worldwide health problems, since there is currently no new therapeutic medicine to replace artemisinin. Even though the mechanism of artemisinin resistance has not been clearly understood, the resistance of *P. falciparum* towards the antimalaria artemisinin may occur due to the influence of by the internal factors of *P. falciparum*, including the induction of the protein-expressing gene expression. One of the genes is the *Tryptophan-rich Protein (PART)* gene that is important in the membrane-spanning protein and plays a role in protein folding to maintain hydrophobic contact.. This study aimed to prove that *Tryptophan-rich Protein* overexpression in *P. falciparum* Papua 2300 strain may cause repeated artemisinin exposure *in vitro*. This study was performed in a period from February to November 2013 in Infection and Tropical Diseases Hospital, Airlangga University. The design used was experimental study with post-test only control group design. *In-vitro* culture of *P. falciparum* Papua 2300 strain were divided into a control group (K) and treatment groups that were treated regularly with artemisinin, i.e. artemisinin exposure 1 (PO1), artemisinin exposure 2 (PO2) and artemisinin exposure 3 (PO3) using IC<sub>50</sub> concentration. The *Tryptophan-rich Protein* gene expression level was detected using qRT-PCR. The result showed that *in vitro* repeated artemisinin exposure in *P. falciparum* Papua 2300 strain relatively increased the expression level of the *Tryptophan-rich Protein (PART)* genes (2<sup>ΔΔCT</sup>) when compared with control. In conclusion, *in vitro* artemisinin exposure may cause *Tryptophan-rich Proteins (PART)* gene overexpression by *P. falciparum* Papua 2300 strain promoter. [MKB. 2015;47(3):129–36]

**Key words:** Artemisinin, phenotype, *Tryptophan-rich Protein (PART)* gene, *P. falciparum* Papua 2300

**Korespondensi:** Hani Plumeriastuti, dr., Sp.PA, Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, mobile 08563044094, e-mail: plumeriastuti@yahoo.co.id

## Pendahuluan

Penyakit malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang tersebar di seluruh dunia. Sampai saat ini penyakit malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat (*public health problem*) di 104 negara endemik malaria. Laporan yang dikeluarkan oleh WHO diperkirakan terjadi 219 juta kasus malaria dan kematian akibat penyakit tersebut sekitar 660.000 orang pada tahun 2010.<sup>1</sup>

Indonesia merupakan negara tropik, sebanyak 35% penduduknya tinggal di daerah berisiko tinggi malaria, dari 293 kabupaten/kota yang ada di Indonesia, 167 kabupaten/kota merupakan wilayah endemis malaria. Diperkirakan terjadi sekitar 30 juta kasus malaria setiap tahunnya, Walaupun telah dilakukan program pelaksanaan dan pemberantasan penyakit malaria sejak tahun 1959, namun hingga saat ini angka kesakitan dan kematian masih tinggi. Sebagian besar kematian oleh infeksi malaria di Indonesia disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*).<sup>2</sup>

Upaya penanggulangan terhadap penyakit malaria telah banyak dilakukan, namun angka kesakitan dan kematian malaria di beberapa negara masih tetap tinggi. Di antara faktor-faktor penyebab kesulitan penanggulangan terhadap penyakit malaria, faktor resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria merupakan faktor yang paling sulit diatasi karena mutasi yang bervariasi pada beberapa gen *Plasmodium* sulit dikendalikan.<sup>3</sup>

Sampai saat ini belum terdapat vaksin yang dapat memberikan perlindungan penuh pada infeksi malaria sehingga penanggulangan penyakit malaria masih bergantung pada obat antimalaria (OAM). Obat antimalaria yang saat ini digunakan yaitu artemisinin dan derivatnya, tetapi penggunaan monoterapi artemisinin per oral telah diidentifikasi sebagai salah satu faktor yang dapat menimbulkan resistensi terhadap obat artemisinin. Hal ini menjadi masalah serius dalam penatalaksanaan penyakit malaria karena belum terdapat obat baru pengganti artemisinin.<sup>4</sup> Hasil penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa paparan artemisinin berulang pada *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 dapat meningkatkan nilai  $IC_{50}$  artemisinin dan mempercepat waktu viabilitas.<sup>5</sup> Selain itu, juga paparan artemisinin berulang *in vitro* dapat menyebabkan perubahan morfologi dorman pada *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300.<sup>6</sup>

Kecepatan rekudesensi mempunyai korelasi positif dengan jumlah parasit dorman yang terjadi pada *host*. Data penelitian ini memperlihatkan

bahwa stadium dorman yang terjadi *in vivo* dan perannya pada rekudesensi sesudah diterapi dengan artesunat diyakini sebagai mekanisme baru pertahanan parasit terhadap obat anti-malaria.<sup>7</sup> Hasil penelitian yang dilakukan oleh Veiga dkk.<sup>8</sup> menyatakan bahwa perlambatan perkembangan siklus hidup dalam stadium ring dengan morfologi dorman dan induksi ekspresi gen yang mengekspresikan protein (overekspresi protein) sebagai salah satu mekanisme penting bagi parasit *Plasmodium* untuk membebaskan diri dari pengaruh obat antimalaria dan bertahan hidup. Meskipun mekanisme terjadi resistensi obat artemisinin belum diketahui dengan pasti, tetapi diduga resistensi obat antimalaria terjadi karena peningkatan regulasi ekspresi transkripsi gen, antara lain *Tryptophan-rich Protein* (*PART*) maka masalah ini masih perlu untuk dilakukan pembuktian.

## Metode

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai dengan November 2013. Tempat penelitian di Rumah Sakit Penyakit Tropis Infeksi (RSPTI) Universitas Airlangga Surabaya.

*Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) galur Papua 2300 yang sudah disimpan dalam nitrogen cair dilakukan *thawing* menggunakan Metode Rowe. Diambil setiap 1 mL larutan suspensi eritrosit tersebut dan dicampurkan dengan 9 mL medium komplet plus 15% serum manusia golongan O dan dimasukkan ke dalam botol biakan (*cultur flask*) dan diinkubasi di dalam inkubator  $CO_2$  pada suhu  $37^\circ C$ ,  $CO_2$  5%,  $O_2$  5%, dan  $N_2$  90%. Penggantian medium dilakukan setiap 48 jam dengan hati-hati memakai pipet Pasteur yang steril, kemudian ditambahkan 9 mL medium baru untuk setiap botol biakan dan juga diinkubasi kembali. Untuk mengetahui pertumbuhan parasit, dibuat hapusan darah tipis difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan Giemsa dan dihitung tingkat parasitemia dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1.000 eritrosit di bawah mikroskop.

Hasil uji  $IC_{50}$  ( $10^{-8}$  M) digunakan sebagai dosis awal pemaparan obat artemisini I, setelah 48 jam terpapar obat, *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 dilakukan pencucian dari obat dengan cara ditambahkan medium komplet dengan perbandingan 1:4, kemudian disentrifus 200 rpm 5 menit. Supernatan dibuang, diulang

2 kali, dan juga ditumbuhkan kembali dengan di inkubasi kembali di dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 5%, dan N<sub>2</sub> 90% sampai mencapai parasitemia lebih dari 5%. Setelah mencapai parasitemia >5% yang dipapar obat artemisini ke-2 dengan cara yang sama begitu juga untuk paparan obat ke-3 dengan hasil IC<sub>50</sub> baru.

*Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 resisten klorokuin dari perlakuan kontrol (K) dan dari setiap perlakuan paparan obat ke-1 (PO1), paparan obat ke-2 (PO2), dan paparan obat ke-3 (PO3) yang sudah tumbuh mencapai parasitemia >5% dipanen, kemudian disentrifus 2.500 rpm 5 menit. Pellet dilisiskan dalam 5x volume dengan trizol. Proses ekstraksi RNA mempergunakan metode konvensional dengan memakai reagen trizol (invitrogen). *Whole blood* sebanyak 0,5 mL+trizol 1 mL ditampung dalam tabung falcon 15 mL dan diresuspensi hingga homogen, kemudian ditampung campuran darah dan trizol dalam tabung mikrosentrifus masing-masing 0,5 mL. Homogenat diinkubasi pada suhu ruang (30°C) selama 5 menit dan ditambahkan 0,2 mL kloroform, kemudian diinversi (tabung dibolak-balik) selama 15 detik. Selanjutnya, diinkubasi selama 2–3 menit pada suhu ruang (30°C). Disentrifus 12.000 rpm x 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril, lalu ditambahkan 0,5 mL isopropanol. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (30°C). Disentrifus 12.000 rpm x 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan dengan aspirator. Precipitat dilarutkan dengan mempergunakan 1 mL etanol 75%. Disentrifus 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan supernatan dipindahkan memakai aspirator, kemudian tabung mikrosentrifus dikeringkan. Precipitat RNA dilarutkan dengan 10 µL aqua destilata steril (*free-RNA* dan DNA) dan inkubasi pada suhu 55–60°C selama 10 menit

Pengukuran kadar RNA itu dapat dihitung menggunakan metode spektrofotometri sebagai berikut: sampel RNA 1 µL dicampurkan dengan 99 µL *distilled water* (*free-RNA* dan DNA). Pengukuran kadar RNA dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri pada OD<sub>260</sub> dan OD<sub>280</sub>; perhitungan kadar RNA (µg/µL) = [OD<sub>260</sub>] X 0,04

Pemeriksaan RT PCR *tryptophan-rich protein* mempergunakan RNA yang didapatkan diubah menjadi cDNA. Kuantitatif *real time* PCR cDNA menggunakan *Rotorgene Q* dengan 40 siklus (95°C 15 detik, 55°C 15 detik, dan 60°C 45 detik). Reaksi dikerjakan dalam 20 µL volume menggunakan SYBR *green* PCR *master mix*.

Primer yang digunakan untuk gen *Tryptophan-Rich Protein (Part)*<sup>9</sup> sebagai berikut:

F 5'

TTTAATTTTATCCTATTGTTTTGCCATATC.3' R 5'

TTTTTAAGCACAAATATACATAAAGAGGGA.3'

Untuk normal endogen yang diduga transporter menggunakan primer PF10425w

F :5' AATACTACGAAAAAATCGATGAATC 3'

R :5' TCTTCACCTACAGGCTCTATATCAG 3'

Proses *real time* ini menggunakan *two-step* RT-PCR dengan cetakan bersumber dari cDNA. Adapun langkah-langkahnya, yaitu dengan *superscript* II RT menggunakan random *hexamers*, preekstension 10 menit 25°C, ekstension 50 menit 42°C.

Untuk melakukan *two step RT-PCR (iTaq Sybr Green, Biorad)* sebelumnya disiapkan dahulu dalam boks dingin reagen PCR (*iTaq SybrGreen*), Primer (*forward* dan *reverse* 10 pmol), ddH<sub>2</sub>O steril, DNA *template/cDNA*. Sebanyak 5 µL PCRMix (*iTaq SybrGreen*) ditampung dalam tabung PCR (0,2 mL) ditambahkan *forward primer* (10 pmol) dan *reversed primer* (10 pmol) sebanyak 0,5 µL. Kemudian, sampel DNA yang sudah dipersiapkan ditambahkan 2 µL pada masing-masing sampel uji dan sampel kontrol (positif dan negatif). Ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 2 µL. Setelah semua komponen dipastikan dalam tabung PCR, dilakukan pencampuran (1.600 rpm), kemudian *spindown* cairan dalam tabung PCR. Sampel diletakkan dalam rotor sesuai nomor urutnya. Diatur program set dalam mesin (*Rotorgene Q*), kemudian dilakukan analisis hasil. Analisis hasil kuantifikasi jumlah kopi DNA target dalam sampel yang perlu diperhatikan, yaitu penggunaan kontrol yang telah terkuantifikasi jumlah DNA (konsentrasi terendah dan tertinggi). Jika tidak menggunakan kontrol tersebut maka analisis ini tidak dapat digunakan, analisis hasil berupa kurva *melting (melting curve)*. Data yang didapatkan dari hasil pemeriksaan *tryptophan-rich protein P. falciparum* galur Papua 2300 dengan kuantitatif *real time* PCR dianalisis dengan rumus Livak.<sup>10</sup>

## Hasil

Hasil perhitungan kadar RNA dan cDNA *P. falciparum* galur Papua 2300 pada Tabel 1 menggunakan spektrofotometri, hasilnya nilai konsentrasi rasio A<sub>260/280</sub> yang menunjukkan nilai kemurnian RNA dan cDNA sangat kecil di bawah standar kemurnian RNA, yaitu 2.0 dan cDNA 1.8. Keadaan ini bergantung pada kualitas sampel

**Tabel 1 Perhitungan Kadar RNA dan cDNA *P. falciparum* galur 2300**

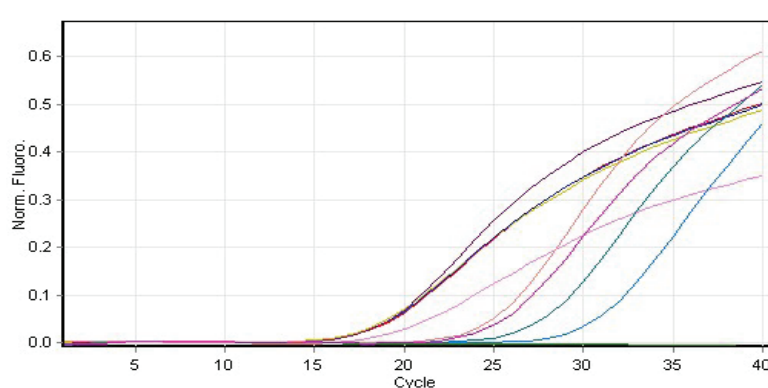
Perlakuan	A <sub>260/280</sub> RNA	Konsentrasi <sub>RNA</sub> (µg/mL)	A <sub>260/280</sub> cDNA	Konsentrasi <sub>cDNA</sub> (µg/mL)
Kontrol	1,4809	0,0207	1,5448	0,1095
PO1	1,0615	0,0030	1,1001	0,1107
PO2	1,0651	0,0254	0,9314	0,1693
PO3	0,6994	0,0049	1,8660	0,0723

dan efektivitas proses RNA dan sintesis cDNA.

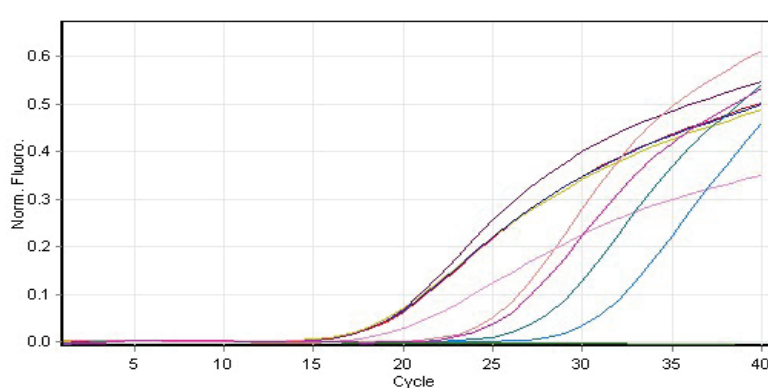
Gambar 1 menunjukkan proses *annealling* dari primer pada sekuens target untuk amplifikasi RNA *P. falciparum* galur Papua 2300 yang terjadi setelah siklus ke-15. Pada Gambar 2 ditunjukkan *peak* tunggal pada analisis kurva *melting* yang menunjukkan hasil produk PCR sudah tunggal yang mengonfirmasikan bahwa amplicon dari hasil amplifikasi sudah sesuai dengan ukuran

yang dikehendaki. Pergeseran suhu optimum *melting point* RNA *P. falciparum* galur Papua 2300 terjadi pada primer yang berbeda. Primer untuk standar PF10425w berkisar 71–72°C dan primer untuk gen *Tryptophan-rich Protein (Part)* mengalami pergeseran yaitu berkisar 68–69°C

Tabel 2 memperlihatkan hasil *C<sub>T</sub> real time* PCR *P. falciparum* galur 2300 untuk berbagai perlakuan memperlihatkan ekspresi gen target

















**Gambar 1 Data Kuantifikasi Siklus Amplifikasi RNA *P. falciparum* Galur 2300**



**Gambar 2 Kurva *Melting point* RNA *P. falciparum* Galur 2300**

**Tabel 2 Hasil  $C_T$  Real Time PCR *P. falciparum* Galur 2300 untuk Berbagai Perlakuan**

Warna	Nama	Jenis	Konsentrasi yang Diberikan (ug/uL)	Konsentrasi Terhitung (ug/uL)	Intensitas Flourescen
	K1	Standar	.3530000	.3530000	0,70
	K2	Standar	.0353000	.0353000	0,51
	K3	Standar	.0035300	.0035300	1,13
	K4	Standar	.0003530	.0003530	1,04
	K5	Standar	.0000353	.0000353	1,00
	K Part	Kontrol		.2614498	0,78
	K(-)	Kontrol (-)		.0041518	0,14
	PO1 Part	Perlakuan		.0014689	1,07
	PO2 Part	Perlakuan		.0066808	1,21
	PO3 Part	Perlakuan		.0943879	0,92
	K PF10425w	Kontrol		.2386594	0,80
	PO1 PF10425w	Perlakuan		.3084469	0,74
	PO2 PF10425w	Perlakuan		.1492592	0,58
	PO3 PF10425w	Perlakuan		.2934845	0,75

*Tryptophan-rich Protein (PART)* pada semua kelompok perlakuan paparan obat antimalaria artemisinin dan normal endogen (PF10425) yang tidak terpengaruh oleh paparan obat.

Tabel 3 dan Gambar 3 menunjukkan nilai  $\Delta C_T$  untuk kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang (PO1, PO2, dan PO3) dan kelompok kontrol nilai  $\Delta \Delta C_T$  merupakan  $\Delta C_T$  kontrol -  $\Delta C_T$  perlakuan untuk masing-masing perlakuan dan  $2^{\Delta \Delta C_T}$  yang merupakan perbandingan level ekspresi gen *Part*. Hasil tersebut menunjukkan

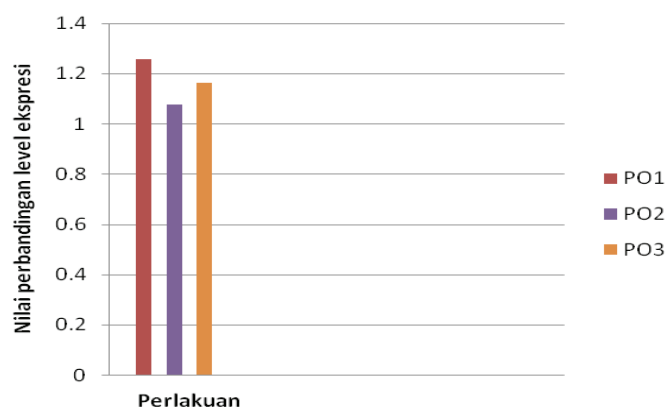
bahwa perbandingan level ekspresi gen *Part* ( $2^{\Delta \Delta C_T}$ ) relatif terhadap kontrol masing-masing perlakuan yaitu PO1 1.2568 dari kontrol, PO2 1.0757 dari kontrol dan PO3 1.663 dari kontrol.

### Pembahasan

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan artemisinin berulang pada *P. falciparum* dapat meningkatkan level ekspresi gen *Part*

**Tabel 3 Hasil Analisis Gen *Tryptophan-rich Protein (PART)* dan Normal Endogen (PF10425) dengan Metode *Comparative Threshold Cycle Analysis* ( $\Delta \Delta C_T$ )**

Perlakuan	$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ endogen}$	$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ kontrol} - \Delta C_T \text{ perlakuan}$	Level Perbandingan Ekspresi Gen ( $2^{\Delta \Delta C_T}$ )
PO1	-0.3069	0.3298	1.2568
PO2	-0.0825	0.1052	1.0757
PO3	-0.1990	0.2219	1.1663
Kontrol	0.0228	-	-



**Gambar 3 Kurva Perbandingan Level Ekspresi Gen *PART***

( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) relatif terhadap kontrol tetapi antar-kelompok paparan artemisinin berulang yaitu paparan artemisinin ke-1, 2, dan 3 atau (PO1, PO2, dan PO3) memperlihatkan level ekspresi gen *Part* ( $2^{\Delta\Delta CT}$ ) relatif yang hampir sama. Seperti hasil penelitian yang dilakukan oleh Deplaine dkk.<sup>9</sup> peningkatan *PART* pada tekanan obat artesunat ditunjukkan dengan cara studi transkriptomik yang menggambarkan kadar protein. Peningkatan paparan artesunat 40 ng/mL selama 3 jam meningkat 5 sampai 6 kali pada 400 ng/mL pada protein referensi seperti histon H3 dan PfHSP70, sedangkan kadar RNA setelah 3 jam paparan artesunat mulai dosis 80 ng/mL meningkat 3 sampai 4 kali pada 400 ng/mL. Hasil overekspresi *PART* setelah 72 jam paparan obat antimalaria artesunat menunjukkan 100% pada transgenic *PART* overekspresi gen semua parasit dapat hidup dibanding dengan kontrol. Keadaan ini menunjukkan bahwa *PART* berperan pada mekanisme pertahanan parasit dalam merespons induksi obat yang mampu merusak pertumbuhan dan perkembangannya sehingga pada parasit transgenic *PART* overekspresi mampu untuk bertahan dari kematian. Overekspresi *PART* dapat memperlambat pertumbuhan dan perkembangan parasit dari efek kematian akibat paparan obat. Hal ini ditunjukkan juga dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Witkowki dkk.<sup>11</sup> pada *P. falciparum* yang sudah toleran terhadap artesunat (F32-ART) yang diseleksi selama 3 tahun dengan pemberian artesunat, dengan peningkatan dosis menunjukkan bahwa parasit masuk dalam stadium istirahat dalam bentuk dorman, yaitu gambaran morfologi seperti bentukan titik dengan inti yang memadat. Bentukan seperti ini adalah merupakan suatu

*quiescence mechanism* dari *P. falciparum* untuk diam dan tidak bergerak pada stadium ring sehingga tetap dapat bertahan hidup dengan cara memperlambat proses metabolismenya untuk membatasi efek obat, karena pada keadaan ini tidak terjadi sintesis DNA. Penelitian yang dilakukan oleh Teuscher dkk.<sup>12</sup> memperlihatkan bahwa *quiescence* atau dorman stadium ring setelah paparan obat akan mampu untuk berkembang dengan normal setelah paparan obat dihilangkan dan dapat tumbuh kembali normal setelah 4–20 hari, dengan sekitar 0,044% sampai 1,313% parasit mengalami pemulihan kembali untuk tumbuh normal yang bergantung pada konsentrasi obat dan galurnya.

*Tryptophan-rich Protein* atau *PART* adalah suatu gen yang mempunyai struktur dua ekson yang mengkode protein dengan berat molekul sekitar 118 kDa. *Tryptophan-rich Protein (PART)* juga terdapat pada regio *interfacial* dari *lipid bilayer* dan mempunyai peran penting dalam *membrane-spanning protein*, dan juga berperan dalam *folding* protein untuk menjaga kontak hidrofobik.<sup>13,14</sup> *Tryptophan-rich Protein (PART)* juga memiliki peran pada pengaturan perkembangan stadium di hati pada parasit malaria. Defisiensi *tryptophan-rich protein* menyebabkan gangguan pada perkembangan parasit pada stadium di hati.<sup>15</sup> Selain itu, *Tryptophan-rich Protein* dari beberapa spesies *Plasmodium* mempunyai peran penting pada interaksi *host* dan parasit.<sup>16–19</sup> Hasil penelitian terbaru menunjukkan efek protektif pada tikus terinfeksi sporozoit yang diimunisasi dengan *Tryptophan-rich Protein* sehingga ada indikasi bahwa *tryptophan-rich protein* dapat digunakan sebagai vaksin yang potensial.<sup>15</sup>

*PART* berperan pada toleransi obat, tetapi

efek protektifnya ditunjukkan pada konsentrasi obat yang tinggi (pertahanan pada konsentrasi obat yang tinggi), perubahan pada peningkatan nilai  $IC_{50}$  diikuti juga peningkatan jumlah kopi, ekspresi mRNA, dan ekspresi protein dari gen *pfmdr1* dan *Part* merupakan salah satu faktor dari beberapa faktor seperti *pfmdr1*.<sup>20</sup> Simpulan hasil penelitian ini bahwa paparan obat antimalaria artemisinin secara *in vitro* dapat menyebabkan overekspresi target aksi *tryptophan-rich protein* oleh promoter *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tataran proteomik untuk mengetahui profil protein dan level transkripsi gen (*mRNA*) yang lain dari target aksi artemisinin sebagai marker resistensi *P. falciparum* galur Papua 2300 pada artemisinin *in vitro*.

#### Daftar Pustaka

1. WHO. World Malaria Report: (Online Journal) 2012 (diunduh 9 Juni 2015). Tersedia dari: [http://www.who.int/malaria/publication/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_full\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/publication/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf)
2. DepKes. Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit Dan Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.
3. WHO. Drug resistance in malaria. Department of communicable disease surveillance and response. Malaria Epidemiology Branch. Chamblee, GA. United States of America; Centers for Disease Control and Prevention; 2001.
4. Jain P, Chakma B, Patra S, Goswami P. Potential biomarkers and their applications for rapid and reliable detection of malaria. *BioMed Research International*. 2014; ID.852645.
5. Maslachah L, Dachlan YP, Nidom CA, Fitri LE. Profil fenotipik *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 akibat paparan antimalaria artemisinin *in vitro*. *MKB*. 2015;47(1):1-9.
6. Maslachah L, Dachlan YP, Nidom CA, Fitri LE. Induction of *Plasmodium falciparum* strain 2300 *dorman* forms by artemisinin. *Universa Medicina*. 2015;34:25-34.
7. LaCrue AN, Scheel M, Kennedy K, Kumar N, Kyle DE. Effects of artesunate on parasite recrudescence and dormancy in rodent malaria model *Plasmodium vinckei*. *Plos One*. 2011;6(10):e26689.
8. Veiga MI, Ferreira PE, Schmidt BA, Schmidt BA, Ribacke U, Bjorkman A, dkk. Antimalarial exposure delays *Pfalciparum* intra erythrocytic cycle and drives drug transporter genes expression. *Plos One*. 2010;5(8):e12408.
9. Deplaine G, Lavazec C, Bischoff E, Natalang O, Perrot S, Guillotte-Blisnick M. Artesunate tolerance in transgenic *Plasmodium falciparum* parasites overexpressing a tryptophan rich protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2576-84.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001;25:402-8.
11. Witkowski B, Lelievre J, Barragan MJL, Laurent V, Su X, Berry A, dkk. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):187-7.
12. Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin induced dormancy in *Plasmodium falciparum*; duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *JID*. 2010;202(9):1362-8.
13. Koeppe RE. Concerning tryptophan and protein-bilayer interactions. *J Gen Physiol*. 2007;130(2):223-4.
14. Klein SJ. Long range interactions within an non native protein. *Science*. 2002;295:1719-22.
15. Jaijyan DK, Singh H, Singh AP. Asporozoit and liverstage expressed tryptophan rich protein plays an auxiliary role in plasmodium liver stage development and is a potential vaccine candidate. *J Biol Chem*. 2015;290(32):19496-511.
16. Bora H, Tyagi RK, Sharma YD. Defining the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* tryptophan rich antigen 33.5. *Plos One*. 2013;8(4):e62829.
17. Bora H, Garg S, Sen P, Kumar D, Kaur P, Khan RH, dkk. *Plasmodium vivax* tryptophan rich antigen PvTRAg33.5 contains alpha helical structure and multidomain architecture. *Plos One*. 2011;6(1):e16294.
18. Ntumngia FB, Bahamontes RN, Kun JF. Genes coding for tryptophan rich proteins are transcribed throughout the asexual cycle of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2005;96(6):347-53.
19. Ntumngia FB, Bouyou Akotet MK, Uhlemann AC, Mordmuller B, Kremsner PG. Characterisation of tryptophan rich *Plasmodium falciparum* antigen associated with merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;137:349-53.

20. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, Kyle DE. Role of *pfmdr1* amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(6):2455–64.