

Perubahan Profil Proteomik *Plasmodium falciparum* Galur Papua 2300 Akibat Paparan Antimalaria Artemisinin *In Vitro*

Proteomic Profile Changes of Plasmodium falciparum Papua 2300 Strain due to Exposure of Antimalarial Artemisinin In Vitro

Lilik Maslachah

Laboratorium Farmasi Veteriner Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRAK

Perkembangan resistensi *Plasmodium falciparum* dan penurunan kepekaan parasit terhadap obat antimalaria artemisinin menjadi salah satu permasalahan kesehatan di dunia. Sampai saat ini belum ada obat baru pengganti artemisinin. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa paparan obat antimalaria artemisinin berulang *in vitro* dapat menyebabkan perubahan profil protein melalui pendekatan proteomik *P. falciparum* galur Papua 2300. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Pebruari sampai dengan Nopember 2014. Tempat penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. *Airlangga Influenza Research Center*, Laboratorium bersama Kimia Universitas Negeri Surabaya (UNESA) dan jurusan Kimia Politeknik Malang. Desain penelitian yang digunakan adalah *Experimental Design* dengan *Post test only control group design*. Kultur *P. falciparum* galur Papua 2300 dipapar antimalaria artemisinin berulang dengan menggunakan *Inhibitory Concentration 50* (IC_{50}). Pengamatan dilakukan terhadap profil protein dengan SDS Page 2 dimensi, FT-IR dan LCMS. Hasil penelitian menunjukkan ada variasi berat protein, spektrum infra merah (bilangan gelombang) dan nilai massa molekul ion (m/z) antara kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (PO1, PO2, PO3, PO4). Dapat disimpulkan bahwa paparan obat antimalaria artemisinin berulang secara *in vitro* dapat mempengaruhi pola ekspresi protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300.

Kata Kunci: Artemisinin, *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300, proteomik, resistensi

ABSTRACT

The development of the Plasmodium falciparum parasite resistance and the decrease of antimalarial drug artemisinin efficacy becomes one of the world's health problems. To date, there hasn't been a new drug to replace artemisinin. This research aimed to give evidences that repeated exposure of artemisinin in vitro may cause a change in proteomic profile of P. falciparum Papua 2300 strain. The research had been conducted from February to November 2014. The study was conducted at Biomedical Laboratory Faculty of Medicine University of Brawijaya, Faculty of Veterinary Airlangga University, Airlangga Influenza Research Center, Chemistry Public Laboratory Surabaya University (UNESA), and Chemistry Department of Polytechnic Malang. Research design used was Experimental Design with Post-test only control group design. In-vitro culture of P. falciparum Papua 2300 strain was repeatedly exposed to artemisinin using Inhibitory Concentration 50 (IC50). Observations to proteomic profile were done using two dimensions SDS page, FT-IR and LCMS. The results showed that there were variations in protein weight, infrared spectrum and ion molecule mass between control group (K) and treatment groups (PO1, PO2, PO3, PO4). It can be concluded that repeated exposure of artemisinin influences proteomic profiles of P. falciparum Papua 2300 strain.

Keywords: Artemisinin, proteomic, *Plasmodium falciparum* Papua 2300, resistance

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Lilik Maslachah. Laboratorium Farmasi Veteriner Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Kampus C.Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Tel. (0341) 5992785 Email: lilik.maslachah@yahoo.com

PENDAHULUAN

Plasmodium falciparum merupakan parasit protozoa yang dapat menyebabkan malaria berat pada manusia. Penyakit malaria ini bisa menyebabkan kematian sekitar 708.000 sampai dengan 1.003.000 setiap tahunnya, sebagian besar terjadi di Afrika pada anak-anak (1).

Beberapa obat antimalaria telah digunakan untuk pengobatan dan profilaksis di daerah endemik malaria, akan tetapi penyebaran resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap obat antimalaria menjadi masalah yang serius. Obat terbaru untuk terapi malaria yang sampai saat ini yang digunakan adalah artemisinin dan derivatnya, obat ini mempunyai efek kerja lebih cepat dari obat antimalaria yang lain karena mempunyai mekanisme kerja yang lebih kompleks, tetapi telah ada indikasi bahwa parasit *Plasmodium* telah resisten terhadap obat ini (2).

Data klinik sudah mengidentifikasi dua pasien terinfeksi *Plasmodium falciparum* yang telah resisten terhadap artesunate di Cambodia (3). Penelitian yang dilakukan oleh Wongsrichanalai and Meshnick, 2008 menunjukkan adanya penurunan kepekaan malaria *falciparum* terhadap kombinasi artesunate-meflokuin di Cambodia. Hal ini menjadi salah satu permasalahan kesehatan di dunia yang belum dapat diselesaikan sampai saat ini, karena belum ada obat baru pengganti artemisinin (4).

Mekanisme resistensi artemisinin belum diketahui dengan pasti. Dilaporkan adanya fenomena resistensi artemisinin melalui mekanisme *dorman* setelah terpapar artemisinin *in vitro* (5). Ada korelasi positif antara jumlah parasit dengan rekrudensi pada vertebrata sehingga akan menjadi masalah baru pada pemberantasan penyakit malaria (6). Pendekatan fenotipik, genotipik dan proteomik penting untuk dikembangkan dan diteliti lebih dalam pada *Plasmodium falciparum* resisten artemisinin untuk pengembangan alat diagnosis cepat pada deteksi dini dan survey epidemiologi di lapangan.

Perubahan pada pola transkripsi akan berpengaruh terhadap ekspresi protein sehingga pendekatan proteomik ini nantinya dapat digunakan sebagai marker yang menandai adanya resistensi pada *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 terhadap obat antimalaria artemisinin. Protein yang didapatkan dari *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 terhadap obat antimalaria artemisinin dapat digunakan untuk membuat kit diagnostik sebagai *rapid test* yang bersifat cepat, tepat dan akurat untuk pendeteksi *Plasmodium falciparum* yang resisten pada obat antimalaria artemisinin

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Pebruari sampai dengan Nopember 2014. Tempat penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk kultur dan paparan artemisinin, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Airlangga Influenza Research Center* untuk ekstraksi protein dan pemeriksaan SDS page 2 dimensi, Laboratorium bersama Kimia Universitas Negeri Surabaya untuk pemeriksaan FT-IR dan jurusan Kimia Politeknik Malang untuk pemeriksaan LCMS.

Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *Experimental*

Design dengan Post test only control group design. Kultur *P. falciparum* galur Papua 2300 dipapar antimalaria artemisinin berulang dengan menggunakan *Inhibitory Concentration 50* (Ic_{50}). Penelitian ini terdiri dari kelompok kontrol tidak dipapar artemisinin (K), kelompok perlakuan paparan artemisinin 1 kali (PO1), kelompok perlakuan paparan artemisinin 2 kali (PO2), kelompok perlakuan paparan artemisinin 3 kali (PO3) dan kelompok perlakuan paparan artemisinin 4 kali (PO4). Pengamatan dilakukan pada semua kelompok terhadap profil protein dengan SDS Page 2 dimensi, FT-IR dan LCMS.

Isolasi Protein *Plasmodium falciparum* Galur Papua 2300 dari Eritrosit

Biakan *falciparum* galur Papua (2300) dicuci dengan medium PBS 1500g selama 5 menit, pelet parasit dilisis dengan lisis saponin 0,1%100 μ l selama 10 menit, disentrifus 1500g selama 5 menit. Pencucian selanjutnya dilakukan didalam 100 μ l PBS disentrifus 1500 g selama 5 menit. Pelet disuspensikan dengan 4% (w/v) CHAPS (Sigma) dan disonikasi dengan ultrasonikasi 5 kali masing-masing selama 60 detik pada suhu dingin dengan amplitudo maksimum. Hasil sonikasi disentrifus 16000 selama 15 menit. Supernatan dipresipitasi dengan *acetone* 100%. Total protein disuspensikan buffer lisis (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30mM Tris base). Konsentrasi protein diencerkan dengan lisis *buffer* sampai kandungannya 2,5 μ g/ μ L. Protein yang didapatkan diambil untuk pemeriksaan profil protein *Plasmodium* (7).

Pemeriksaan *Two-Dimensional Gel Electrophoresis* (2 D PAGE)

Sampel protein 110ug dicampur dengan buffer rehidrasi (7mol/Lurea, 2mol/lthiourea, 4% CHAPS, 0,2% ampholit (pH 3-10) dan 0,2% DTT bromophenol blue sampai volum total 350 μ l. Sampel kemudian digunakan untuk linier IPG (pH 3-10 Bio-Rad) selama 1 jam. Ditutup dengan *mineral oil* untuk rehidrasi semalam pada suhu ruang *isoelectric focusing* (IEF) yang dilakukan dalam protean IEF cell (Bio_Rad). Programnya selama 1 jam pada 100 volt, 1 jam pada 500 volt, 2 jam pada 1000 volt dan 8000 volt dengan total 32000 volt. Dimensi elektrophoretik sekunder dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit dalam buffer yang mengandung 50 mmol/L Tris HCL (pH 8,8), 6mol/Lurea, 30% v/v gliserol, 2% SDS dan 10g/L DDT kemudian diinkubasi dengan mengganti DTT dengan 40g/L iodoacetamide dan protein diiquilibrasi dengan 12,5% SDS-Page dalam protein II chamber (BIO-Rad) pada 100V/4°C

Visualisasi Protein

Gel diwarnai dengan silver. Setelah difiksasi gel dicuci dan diinkubasi dalam larutan silver nitrat (20% silver nitrat dan 0,026 formaldehyde) selama 20 menit pada suhu ruang, dilanjutkan dengan pencucian 3 kali masing-masing 20 detik dalam destilat water. Gel kemudian diletakkan dalam larutan pengembang (6% *sodium carbonate*, 0,018526% *formaldehyde*, dan 6% *sodium thiosulfate*) sampai marker standar terwarnai sempurna dan spot dapat divisualisasi. Spot protein yang terwarnai silver diambil dengan *scalpel* dan dicuci 2 kali dengan 100mmol/L *ammonium bicarbonate/acetone* (1:1v/v) selama 10 menit sampai warna menghilang, kemudian gel dikeringkan dengan vakum sentrifus danditambahkan larutan tripsin 10ng/ μ l dalam 100mmol/L *ammonium bicarbonate* semalam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi supernatan dipindahkan dalam *tube* ditambahkan 50 μ l 0,1% *trifluoroacetic acid* (TFA) disonikasi selama 30 menit. Setelah sonifikasi

supernatan ditambahkan 0,1% TFA dalam 30% dan 60% acetonitrile (ACN) kemudian dikeringkan dalam vakum dan ditambahkan 0,1% asam formic dan siap dianalisis dengan mass spektrometri.

Pemeriksaan Protein dengan Spektroskopi Infra Merah (FT-IR)

Masing-masing kelompok perlakuan diambil 200µl selanjutnya ditambahkan serbuk Kalium Bromida (KBr) secukupnya dan dihaluskan dalam mortar. Selanjutnya dibuat menjadi sediaan tablet sesuai cetakan yang tersedia dan dimasukkan dalam unit analisator dan siap dianalisis menggunakan perangkat FT-IR (8).

Identifikasi Protein dengan Mass Spektrometri

Sampel dari hasil visualisasi protein 1 µl masukkan dalam µ precolum, fase geraknya menggunakan larutan A.(0.1 % asam formic dalam ACN) dan larutan B (0,1% asam formic dalam 95% ACN) running sampel dalam 60 menit dan kecepatan aliran pompa 5µl/menit. Gradien eksponensial dimulai 5 menit setelah loading dari 10-95% untuk periode 50 menit. Hasil identifikasi protein dengan Mass spektrometri dianalisis dengan protein Lynx bioinformatik.

Cara Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian *Two-Dimensional Gel Electrophoresis* (2D SDS Page) FT-IR dan identifikasi protein dengan menggunakan Mass spektrometri (MS Sptrometri) dianalisis secara diskriptif.

HASIL

Hasil penelitian ekstraksi protein dilakukan pengukuran kadar protein *Plasmodium falciparum* galur 2300 dengan nanodrop dengan panjang gelombang 280. Data hasil pengukuran protein seperti pada Tabel 1. Hasil ekstraksi protein ini selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan SDS Page 2 dimensi untuk mengetahui profil berat protein *Plasmodium falciparum* galur 2300 akibat paparan obat antimalaria artemisinin berulang secara *in vitro* hasilnya seperti Tabel 1. Pada tabel tersebut menunjukkan ada pola protein dengan berat protein yang sama (26,39,47Kd)

yang selalu muncul baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang, tetapi ada protein dengan berat protein 50,55,60,80,120,140Kd yang tidak selalu muncul baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang.

Tabel 1. Kadar protein dan hasil profil berat protein *P. falciparum* galur 2300 dengan SDS Page 2 dimensi

	Kelompok				
	K	PO1 (10 ⁻⁸ M)	PO2 (5.10 ⁻⁸ M)	PO3 (7.5.10 ⁻⁷ M)	PO4 (2.5.10 ⁻⁵ M)
	1,148	0,461	1,224	1,014	0,870
Kadar protein (mg/ml)	26	26	26	26	26
	39	39	39	39	39
	47	47	47	47	47
	50	50	50	-	-
Berat protein (Kd)	55	55	-	-	-
	60	60	60	-	60
	-	80	80	-	80
	-	120	-	120	120
	-	-	140	140	140

Untuk mengetahui gugus fungsi dari metabolit protein yang terbentuk dilakukan uji spektrum infra merah (*Infrared: IR*) antara kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (PO1,PO2,PO3,PO4) hasilnya menunjukkan bilangan gelombang (cm⁻¹) dan intensitas transmitsen (% T) seperti pada Tabel 2 dan Gambar 2.

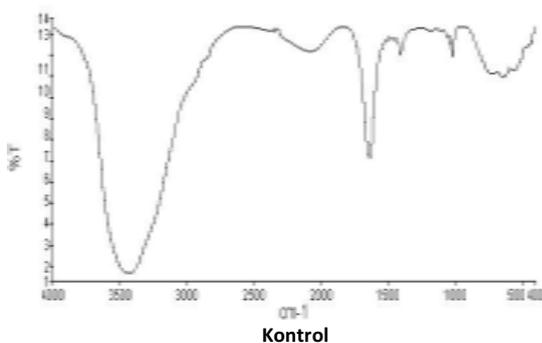
Hasil pemeriksaan FT-IR protein *Plasmodium falciparum* galur papua 2300 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan paparan obat antimalaria berulang (PO1,PO2,PO3, dan PO4) tampak daerah bilangan gelombang yang bervariasi. Pada kelompok kontrol tampak pada bilangan gelombang 3435,77 cm⁻¹ mengindikasikan adanya kandungan senyawa OH, bilangan gelombang 2074,82 cm⁻¹ mengindikasikan adanya kandungan senyawa CH, bilangan gelombang 1637,29-1401,24 cm⁻¹ mengindikasikan adanya kandungan

Tabel 2. Bilangan gelombang (cm⁻¹) dan intensitas transmitsen (% T) protein antara *P.falciparum* galur 2300 kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (PO1,PO2,PO3,PO4)

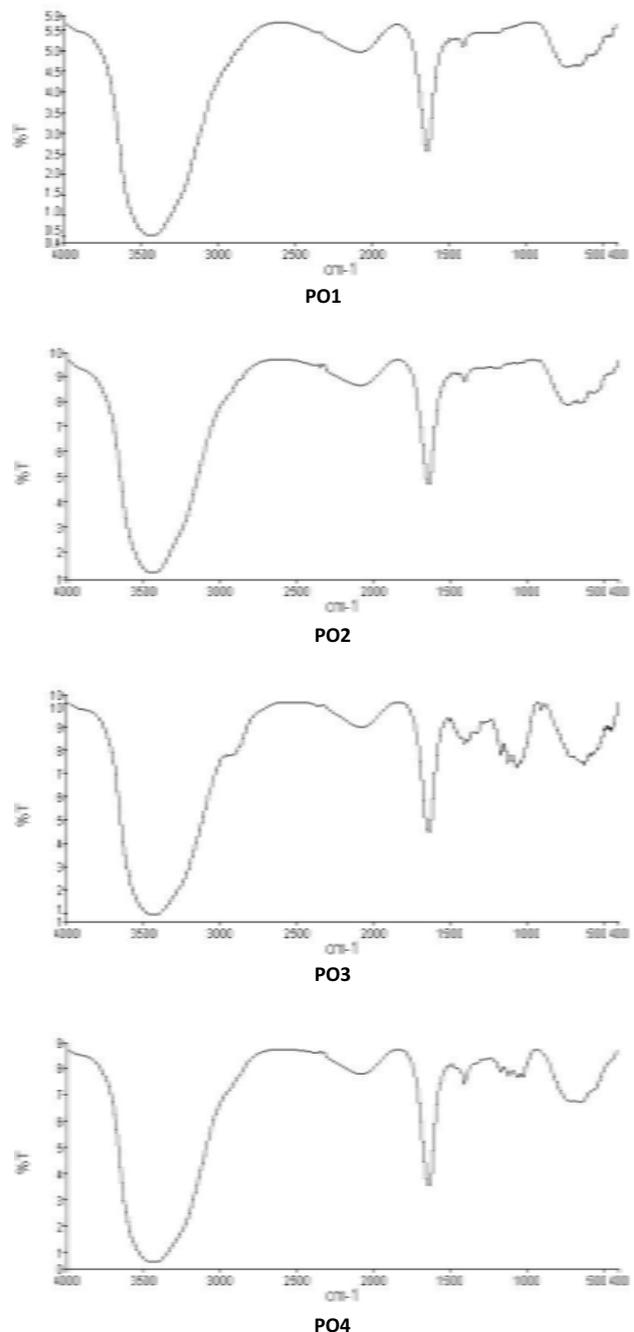
	Kelompok										Gugus fungsi
	K		PO1		PO2		PO3		PO4		
	cm ⁻¹	% T	cm ⁻¹	% T	cm ⁻¹	% T	cm ⁻¹	% T	cm ⁻¹	% T	
	3435,77	1,63	3435,93	0,49	3436,41	1,14	3435,35	0,88	3435,02	0,68	OH
	2074,82	12,25	2080,42	4,99	2087,08	8,67	2069,90	9,05	2074,76	7,82	CH
	1637,29	7,14	1638,82	2,57	1636,95	4,70	1637,18	4,48	1636,30	3,55	C=C
	1401,24	12,04	1404,19	5,11	1404,43	8,83	1401,06	8,31	1401,28	7,42	(cincin aromatik)
	1015,65	12,03	-	-	-	-	1164,45	7,83	1164,15	7,89	C-O
	-	-	-	-	-	-	1113,42	7,48	1113,40	7,75	C-O
	-	-	-	-	-	-	1059,69	7,28	1055,15	7,69	C-O
	-	-	-	-	-	-	897,12	9,80	-	-	C-H alkana
	-	-	722,89	4,52	722,42	7,88	-	-	-	-	C-H Aromatik
	636,70	11,4	-	-	-	-	619,24	7,41	643,86	6,75	C-H alkana
	-	-	-	-	-	-	437,38	8,98	-	-	C-H Aromatik
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C-H alkana
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C-H Aromatik

senyawa cincin aromatik (C=C), bilangan gelombang 1015,65 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-O dan bilangan gelombang 636,70 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik (Tabel 2). Kelompok perlakuan paparan obat 1 kali (PO1) tampak pada bilangan gelombang 3435,93 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa OH, bilangan gelombang 2080,42 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa CH, bilangan gelombang 1638,82 dan 1404,19 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa cincin aromatik (C=C), bilangan gelombang 722,89 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik. Kelompok perlakuan paparan obat 2 kali (PO2) tampak pada bilangan gelombang 3436,41 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa OH, bilangan gelombang 2087,08 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa CH, bilangan gelombang 1636,95 dan 1404,43 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa cincin aromatik (C=C), bilangan gelombang 722,42 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik. Kelompok perlakuan paparan obat 3 kali (PO3) tampak pada bilangan gelombang 3435,35 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa OH, bilangan gelombang 2069,90 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa CH, bilangan gelombang 1637,18 dan 1401,06 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa cincin aromatik (C=C), bilangan gelombang 1164,45, 1113,42 dan 1059,69 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-O dan bilangan gelombang 897,12, 619,24, dan 437,38 mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik. Kelompok perlakuan paparan obat 4 kali (PO4) tampak pada bilangan gelombang 3435,02 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa OH, bilangan gelombang 2074,76 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa CH, bilangan gelombang 1636,18 dan 1401,28 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa cincin aromatik (C=C), bilangan gelombang 1164,15, 1113,40, dan 1055,15 cm^{-1} mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-O dan bilangan gelombang 643,86 mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik.

Spektrometri infra merah penting dalam penentuan struktur senyawa organik. Spektum FT-IR pada gambar 2 dapat memberikan gambaran mengenai gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam suatu molekul.



Gambar 2. Spektrum FT-IR bilangan gelombang (cm^{-1}) dan intensitas transmittan (%T) antara protein *P.falciparum* galur 2300 kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang (PO1, PO2, PO3, PO4)



Gambar 2. Spektrum FT-IR bilangan gelombang (cm^{-1}) dan intensitas transmittan (%T) antara protein *P.falciparum* galur 2300 kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang (PO1, PO2, PO3, PO4) (Lanjutan)

Gambar 2 Hasil spektrum FT-IR dengan bilangan gelombang (cm^{-1}) antara 400-4000 merupakan daerah infra merah pertengahan dan %T merupakan intensitas transmittan antara protein *P.falciparum* galur 2300 kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan artemisinin berulang (PO1, PO2, PO3, PO4). Pada gambar tersebut gugus-gugus fungsional yang dimiliki oleh suatu molekul seperti pada Tabel 2 dapat ditentukan dari puncak-puncak spesifik berdasarkan bilangan gelombang (cm^{-1}) yang dihasilkan oleh suatu molekul.

Hasil pemeriksaan LCMS menunjukkan bahwa pada *retention time* (RT) antara 3,79 sampai 6,49 menit menunjukkan hasil seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil LCMS protein antara *P.falciparum* galur 2300 kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (Po1, Po2, Po3, PO4)

RT	m/z Kelompok				
	K	PO1	PO2	PO3	PO4
3,79 – 4,47	226,45	226,27	226,28	226,22	226,32
	227,26	227,05	227,30	227,16	227,02
	234,18	275,77	228,24	275,73	227,55
	275,84	276,82	275,75	339,37	234,18
	339,32	239,42	282,77	340,11	243,79
	342,22	342,17	339,27	346,76	275,76
	351,09	349,44	340,06	358,28	339,06
	358,37	358,24	342,07	-	339,91
	-	-	350,40	-	342,16
	-	-	395,93	-	343,10
	-	-	-	-	350,19
	-	-	-	-	358,40
	-	-	-	-	365,48
	5,26 – 5,53	229,25	229,33	229,25	229,34
229,83		232,14	230,21	273,28	230,20
273,34		273,30	237,25	274,18	239,28
274,25		274,27	274,25	275,07	273,30
-		276,11	289,26	289,10	274,21
-		-	-	-	275,90
-		-	-	-	-
625-6,49	226,34	227,73	226,57	228,27	226,71
	227,94	234,16	22900	234,08	231,22
	234,54	235,84	23427	238,85	234,17
	236,25	236,40	23623	240,29	236,33
	248,13	237,25	245,33	248,16	237,13
	249,42	248,70	250,34	250,47	241,19
	255,10	250,97	252,27	255,22	244,96
	-	254,54	255,56	-	251,77
	-	329,82	258,10	-	258,60
	-	-	263,86	-	-
	-	-	272,34	-	-
	-	-	276,36	-	-
	-	-	280,13	-	-
	-	-	295,60	-	-
	-	-	338,42	-	-
	-	-	339,31	-	-
	-	-	340,27	-	-

Pemeriksaan dengan LC ESI-MS pada protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 dapat memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya dan setelah campuran senyawa tersebut terpisah, maka senyawa yang murni akan diidentifikasi berdasarkan berat molekulnya (Tabel 3). Hasil pemeriksaan kualitatif menggunakan metode LC ESI-MS pada protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan paparan obat antimalaria berulang dapat memberikan gambaran adanya variasi isotop yang muncul dengan nilai molekul ion (m/z) yang bervariasi. Meskipun demikian, pada semua kelompok perlakuan paparan obat antimalaria artemisinin berulang (PO1, PO2, PO3, dan PO4) dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) menunjukkan makin banyak isotop yang dihasilkan atau muncul pada kelompok perlakuan jika diandingkan dengan kelompok kontrol pada waktu tambat (*Retention Time*: RT) antara 3,79 sampai 6,49 menit. Disisi lain pada hasil ini juga menunjukkan adanya persamaan isotop atau unsur-unsur senyawa yang mirip yang selalu muncul baik pada kelompok kontrol (K) maupun pada semua kelompok perlakuan (PO1, PO2, PO3, dan PO4) yaitu pada waktu tambat 3,79-4,47 dengan nilai molekul ion disekitar: 226, 227, dan 275. Waktu tambat 5,26-5,53 menit dengan nilai

molekul ion disekitar 229 dan 274. Waktu tambat 6,25-6,49 menit dengan nilai molekul ion disekitar 234.

Pada hasil pemeriksaan kualitatif menggunakan metode LC ESI-MS pada protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan paparan obat antimalaria berulang (PO1, PO2, PO3, dan PO4) memberikan gambaran adanya variasi isotop yang muncul dengan nilai molekul ion (m/z) yang bervariasi dengan waktu tambat (*retention time* (RT)) yang berbeda yaitu 3,79-4,47, 5,26-5,53, 6,25-6,49 menit.

DISKUSI

Untuk mengetahui profil protein *Plasmodium falciparum* galur papua 2300 pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan obat antimalaria berulang (PO1, PO2, PO3, dan PO4) dilakukan pemeriksaan protein SDS page 2 dimensi yang menunjukkan pada kelompok kontrol didapatkan protein dengan berat molekul 26, 39, 47, 50, 55, dan 60kDa. Kelompok perlakuan paparan obat 1 kali (PO1) didapatkan protein dengan berat molekul 26, 39, 47, 50, 55, 60, 80, dan 120kDa. Kelompok perlakuan paparan obat 2 kali (PO2) didapatkan protein dengan berat molekul 26, 39, 47, 50, 60, 80 dan 140kDa. Kelompok perlakuan paparan obat 3 kali (PO3) didapatkan protein dengan berat molekul 26, 39, 47, 60, 80, 120, dan 140kDa. Kelompok perlakuan paparan obat 4 kali (PO4) didapatkan protein dengan berat molekul 26, 39, 47, 60, 80, 120, dan 140kDa. Hasil identifikasi profil protein diatas menunjukkan adanya variasi protein yang diekspresikan. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Maslachah bahwa adanya variasi protein bisa disebabkan karena paparan obat antimalaria artemisinin berulang yang menyebabkan mutasi yang bervariasi pada gen *pfatpase6*. Mutasi titik (*point mutation*) yang terjadi berupa penggantian satu pasang basa nukleotida yang bervariasi pada letak dan basa nukleotida mulai dari exon 1 sampai exon 2 pada gen *pfatpase6* dalam bentuk transisi dan transversi. Hasil dari mutasi pada gen *pfatpase6* bisa menyebabkan perubahan asam amino penyusun protein dan protein yang diekspresikan (5). Perubahan transkripsi terkait dengan gambaran fenotip yang disebabkan oleh mutasi pada gen yang merupakan kunci dalam regulator protein seperti faktor transkripsi (9).

Gambaran spektrum FT-IR yang diperiksa adalah di bilangan gelombang antara 4000-500 cm^{-1} yang merupakan wilayah radiasi elektromagnetik IR menengah. Hasil spectrum protein *Plasmodium falciparum* galur papua 2300 antara paparan obat antimalaria 1 kali dan 2 kali (PO1 dan PO2) artemisinin menunjukkan kesamaan spektrum dan hanya berbeda pada intensitas spektrumnya (%T) tetapi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) kedua kelompok perlakuan tersebut selain ada perbedaan pada intensitas spektrumnya (%T) juga ada bagian bilangan gelombang yang hilang atau tidak tampak dengan IR yaitu bilangan gelombang antara 1100 sampai 1000 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-O, sedangkan pada kelompok paparan obat 3 kali dan 4 kali (PO3 dan PO4) tampak spektrum IR daerah bilangan gelombangnya lebih banyak yaitu pada bilangan gelombang antara 1100 sampai 1000 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-O dan daerah bilangan gelombang antara 800-400 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya kandungan senyawa C-H alkena dan C-H aromatik. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan paparan

obat 1 kali dan 2 kali (PO1 dan PO2) serta perlakuan paparan obat 3 kali dan 4 kali (PO3 dan PO4). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi perubahan daerah spektrum IR pada protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 yang telah terpapar obat artemisinin berulang yaitu dengan hilangnya daerah bilangan gelombang atau tidak muncul pada kelompok PO1 dan PO2. Hal ini disebabkan karena adanya delesi, sedangkan pada daerah bilangan gelombang yang muncul lebih banyak pada kelompok PO3 dan PO4 disebabkan oleh adanya fenomena *frank condon state* (pasangan elektron yang hilang) yang menyebabkan pasangan elektron mudah putus sehingga akan terbentuk senyawa baru yang reaktif. Hal ini menunjukkan pada *Plasmodium falciparum* galur papua 2300 yang terpapar obat antimalaria artemisinin berulang terjadi peningkatan kapasitas sintesis protein yang mempunyai peran pada perkembangan resistensi terhadap artemisinin, yaitu dengan cara mencegah kerusakan protein yang disebabkan oleh stres oksidatif atau efek alkilasi protein dari obat antimalaria artemisinin dan akibat adanya mutasi titik pada gen *pfatpase6* (5,9). Mutasi titik bisa menyebabkan delesi (*frameshift by deletion*) sehingga terjadi perubahan kerangka pembacaan kodon setelah bagian yang termutasi mengalami perubahan atau pergeseran total pembacaan kodon. *Frameshift mutation* ini selalu menghasilkan fenotip mutan (10).

Hasil pemeriksaan kualitatif menggunakan metode LC ESI-MS pada protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan paparan obat antimalaria berulang dapat memberikan gambaran adanya variasi isotop yang muncul dengan nilai molekul ion (m/z) yang bervariasi. Pada hasil penelitian ini semua kelompok perlakuan paparan obat antimalaria artemisinin berulang (PO1, PO2, PO3, dan PO4) dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) menunjukkan makin banyak isotop yang dihasilkan atau muncul pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada hasil ini juga menunjukkan adanya persamaan isotop atau unsur-unsur senyawa yang mirip yang selalu muncul baik pada kelompok kontrol (K) maupun pada semua kelompok perlakuan (PO1, PO2, PO3, dan PO4). Hal ini menunjukkan bahwa ada isotop dan kandungan unsur-unsur senyawa asam amino yang stabil dalam kandungan protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 meskipun telah terpapar obat antimalaria artemisinin berulang. Adanya kandungan protein yang stabil ini kemungkinan merupakan protein yang berperan terhadap kehidupan basal atau protein tersebut untuk metabolisme basal *Plasmodium* sehingga *Plasmodium* tetap bertahan hidup. Pertahanan *Plasmodium* dengan adanya gambaran morfologi dorman pada *P.falciparum* yang dipapar obat anti malaria artemisinin merupakan suatu mekanisme pertahanan parasit untuk dapat bertahan dari paparan obat anti malaria artemisinin. Parasit akan mampu tumbuh normal setelah tekanan obat dihilangkan. Pada periode dorman ini parasit tetap dapat bertahan hidup dalam beberapa hari dengan cara memperlambat proses metabolismenya untuk

membatasi efek obat, karena pada keadaan ini tidak terjadi sintesis DNA (11). Perlambatan perkembangan siklus hidup dan induksi ekspresi gen yang mengekspresikan protein (overekspresi protein) sebagai salah satu mekanisme penting bagi parasit *Plasmodium* untuk membebaskan diri dari pengaruh obat anti malaria dan bertahan hidup (12). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa 100 % parasit dapat bertahan hidup dengan overekspresi *Tryptophan-Rich protein* (Part) setelah diberi obat anti malaria artesunat. Hal ini menunjukkan bahwa *Tryptophan-Rich protein* (Part) berperan pada mekanisme pertahanan parasit dalam merespon obat yang dapat menginduksi kerusakan yang mengakibatkan kematian parasit (13).

Adanya isotop-isotop baru yang muncul dengan nilai molekul ion yang bervariasi pada kelompok perlakuan paparan obat antimalaria artemisinin berulang. Hal ini disebabkan karena adanya peningkatan jumlah kopi, ekspresi mRNA dan ekspresi protein dari gen *pfmdr1* pada *Plasmodium* yang resisten dengan peningkatan nilai IC_{50} (14). Paparan obat antimalaria meflokuin yang dilakukan pada 3 galur *Plasmodium* (W2, 3D7 dan FCB) dibandingkan dengan perlakuan kontrol, 40% morfologi sel mengalami perlambatan perkembangan. Paparan obat anti malaria tersebut dapat menginduksi ekspresi gen *pfmdr1*, *pfprt*, *pfmrp1* dan *pfmrp2* dengan peningkatan 1,5 kali (12). Perubahan peningkatan nilai IC_{50} bisa terjadi sampai 12 kali pada parasit yang sudah terseleksi dengan obat yang diikuti juga dengan adanya amplifikasi pada gen *pfmdr1* setelah mengalami tekanan obat selama 3 bulan (15).

Pendekatan proteomik dengan menggunakan 2D-LC-MS/MS dan pengembangan aplikasinya dalam penelitian bermanfaat dalam analisis bermacam-macam interaksi patogen, progres tumor dan perkembangan penyakit. Pada penyakit malaria studi proteomik memberikan prospek terhadap aspek biologi dari *Plasmodium* seperti patofisiologi, diagnostik, profilaktik dan mekanisme terapeutik dari penyakit (16,17). Pada penelitian paparan *salicylhydroxamic acid* pada *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan analisis proteomik menunjukkan bahwa *salicylhydroxamic acid* dapat mengaktifkan glikolisis dan menurunkan sistem pertahanan terhadap stress sehingga data proteomik ini dapat memberikan pengetahuan tentang biologi dari parasit (18). Hasil penelitian pada protein nuklear pada parasit malaria *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan analisis nuklear proteomik dapat digunakan sebagai sumber yang sangat penting untuk mempelajari aspek evolusi dari biologi nuklear (19).

Paparan obat antimalaria artemisinin berulang secara *in vitro* dapat mempengaruhi pola ekspresi protein *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300. Ada variasi berat protein, spektrum bilangan gelombang pada senyawa gugus fungsi dan nilai massa molekul ion protein yang diekspresikan *Plasmodium falciparum* galur Papua 2300 akibat paparan obat antimalaria artemisinin berulang secara *in vitro*

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2009*. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2009.
2. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, et al. *Malaria Parasites Can Develop Stable Resistance to Artemisinin but Lack*

3. *Mutations in Candidate Genes atp6 (Encoding the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase) tctp, mdr1, and cg10*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006; 50(2): 480-489.
3. Noedl H, Se Y, Schaefer K, et al. *Evidence of Artemisinin Resistant Malaria in Western Cambodia*.

- The New England Journal of Medicine. 2008; 359(24): 2619-2620.
4. Wongsrichanalai C and Meshnick SR. *Declining Artesunate-Mefloquine Efficacy against Falciparum Malaria on Cambodia-Thailand Border*. Emerging Infectious Diseases. 2008; 14(5): 716-719.
 5. Maslachah L. *Efek Paparan Artemisini Berulang terhadap Perkembangan Plasmodium falciparum Resisten In Vitro*. [Disertasi]. Universitas Airlangga, Surabaya. 2013.
 6. LaCru AN, Scheel M, Kennedy K, Kumar N, and Kyle DE. *Effect of Artesunate on Parasite Recrudescence and Dormancy in the Rodent Malaria Model Plasmodium Vinckei*. PLoS One. 2011; 6(10): e26689.
 7. Torrentino-Madamet MT, Almeras L, Desplans J, et al. *Global Response of Plasmodium Falciparum to Hyperoxia: A Combined Transcriptomic and Proteomic Approach*. Malaria Journal. 2011; 10(4): 1-15.
 8. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, and Bryce DL. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8th edition. Danvers; John Wiley & Sons Inc; 1998; 87.
 9. Mok S, Imwong M, Mackinnon MJ, et al. *Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum is Associated with an Altered Temporal Pattern of Transcription*. BMC Genomics. 2011; 12: 391-405.
 10. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: WH Freeman and Co; 2002; pp. 246-928.
 11. Witkowski B, Lelievre J, Barragan MJ, et al. *Increased Tolerance to Artemisinin in Plasmodium falciparum is Mediated by a Quiescence Mechanism*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54(5): 1872-1877.
 12. Veiga MI, Ferreira PE, Schmidt BA, et al. *Antimalarial Exposure Delays Plasmodium Falciparum Intraerythrocytic Cycle and Drives Drug Transporter Genes Expression*. Plos One. 2010; 5(8): e12408.
 13. Deplaine G, Lavazec C, Bischoff E, et al. *Artesunate Tolerance in Transgenic Plasmodium Falciparum Parasites Overexpressing a Tryptophan Rich Protein*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011; 55(6): 2576-2584.
 14. Chavchich M, Gerena L, Peters J, Chen N, Cheng Q, and Kyle DE. *Role of Pfmdr1 Amplification and Expression in Induction of Resistance to Artemisinin Derivatives in Plasmodium Falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54(6): 2455-2464.
 15. Chen N, Chavchich M, Peters JM, Kyle DE, Gatton ML, and Cheng Q. *Deamplification of Pfmdr1-Containing Amplicon on Chromosome 5 in Plasmodium Falciparum is Associated with Reduced Resistance to Artelinic Acid in Vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54(8): 3395-3401.
 16. Tao D, King JG, Tweedell RE, Josts PJ, Boddey JA, and Dinglasan RR. *The Acute Transcriptomic and Proteomic Response of HC-04 Hepatoma Cell To Hepatocyte Growth Factor and its Implications for Plasmodium Falciparum Sporozoite Invasion*. Molecular & Cellular Proteomics. 2014; 13(5): 1153-1164.
 17. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Mendonca EG, et al. *Plasmodium falciparum Malaria: Proteomic Studies*. The Revista Brasileira de Terapia Intensiva. 2012; 24(4): 394-400.
 18. Madamet MT, Almeras L, Travaille C, et al. *Proteomic Analysis Revealed Alterations of the Plasmodium Falciparum Metabolism Following Salicylhydroxamic Acid Exposure*. Tropical Medicine. 2011; 2: 109-119.
 19. Oehring SC, Woodcroft BJ, Moes S, et al. *Organelle Proteomics Reveals Hundreds of Novel Nuclear Proteins in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum*. Genome Biology. 2012; 13(11): R108-R129.