

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
TAHUN 2008**

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



**KLONING EKSPRESI DAN KARAKTERISASI  
PROTEIN DOMAIN IMMUNOGENIK PfsERA ISOLAT INDONESIA,  
SUATU CALON SUBUNIT VAKSIN MALARIA KHAS INDONESIA**

**Peneliti :**

1. Prof.Dr.Indri Safitri, dr.,MS.
- 2.Dr.G.A.Nidom, drh.,MS.
- 3.Heny Arwati, dra.,MSc.,Ph.D.

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Nomor : DIG/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tanggal 29 Maret 2007

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN 2009

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. **Judul Penelitian** : Kloning ekspresi dan karakterisasi protein domain imunogenik PfSERA isolat Indonesia, suatu calon subunit vaksin malaria khas Indonesia

### 2. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Prof.Dr.Indri Safitri,dr.MS  
b. Jenis kelamin : Perempuan  
c. NIP : 130 933 211  
d. Jabatan Fungsional : Guru Besar  
e. Jabatan Struktural : -  
f. Bidang Keahlian : Ilmu Biokimia / Biologi Molekuler  
g. Fakultas / Jurusan : Kedokteran / -  
h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
i. Tim Peneliti

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr.Chairul A.Nidom,drh.,MS	Biokimia / Biologi molekuler	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2.	Heny Arwati,dra.MSc.,Ph.D	Parasitologi	Kedokteran	Universitas Airlangga

### 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun  
b. Biaya total yang diusulkan tahun ke 2 : Rp. 50.000.000,-  
c. Biaya yang disetujui : Rp. 35.000.000,00

Surabaya, 9 Maret 2009

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Airlangga,

Prof.Dr.Muhammad Amin, dr.,Sp.P(K)  
NIP. 130 517 186

Ketua Peneliti,

Prof.Dr.Indri Safitri,dr.,MS  
NIP. 130 933 211

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Airlangga



Prof. Dr.Bambang Sektiari L.,DEA.,Drh.  
NIP. 131 837 004

## RINGKASAN

Salah satu penyebab belum ditemukannya vaksin yang efektif terhadap penyakit malaria adalah adanya variasi genetik kandidat vaksin. SERA (*Serine – Repeat Antigen*) *Plasmodium falciparum* (PfSERA) merupakan salah satu kandidat *asexual blood stage vaccine* yang diharapkan potensial terhadap infeksi oleh *Plasmodium falciparum*, sehingga diharapkan dapat menjadi subunit dari *multistage vaccine* untuk penyakit oktamer sampai regio ulangan serin PfSERA merupakan bagian yang immunogenik dan di beberapa daerah endemis malaria di Indonesia (P.Halmahera, P.Buru, Jayapura, Maumere, P.Kangean di Kabupaten Sumenep dan di desa Dongko Kabupaten Trenggalek Propinsi Jawa Timur) variasi genetiknya ternyata tidak sebesar calon vaksin yang lain. Oleh karena itu sangat potensial sebagai calon sub unit vaksin malaria khas Indonesia.

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah sampel K48 yang diperoleh dari penelitian Hibah Bersaing XII/1 dan XII/2 yang lalu. Dilakukan amplifikasi gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA terletak di exon II gen PfSERA, dan diperoleh hasil PCR sekitar 1.025 bp. Kemudian dilakukan pemurnian hasil PCR dengan memakai *high pure PCR product purification kit* dan hasil PCR diinsersikan ke vektor pTE101/D-TOPO, selanjutnya di insersikan ke sel kompeten *E.coli* TOP 10. Untuk ekspresi gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA, plasmid rekombinan di transformasikan ke sel kompeten *E.coli* BL-21 star. Setelah dimurnikan dengan *Ni-NTA spin kit*, terhadap protein yang diperoleh dilakukan SDS-PAGE dan *Western blot*. Diperoleh protein sebesar sekitar 47 kD.

(Indri Safitri, C.A.Nidom, Heny Arwati, 2009)

## PRAKATA

Pertama – tama penulis panjatkan puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tahun pertama dari penelitian dengan judul “Kloning ekspresi dan karakterisasi protein domain immunogenic PfSERA isolat Indonesia, suatu calon subunit vaksin malaria khas Indonesia”.

Dengan selesainya penelitian ini, perkenankanlah penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi / DP3M Ditjen Dikti Depdiknas, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Kepala Departemen Biokimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini. Tak lupa penulis juga mengucapkan terima kasih yang se tinggi tingginya kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis untuk mendapatkan sampel serta penderita penyakit malaria di daerah penelitian yang merelakan diri untuk menjadi sampel penelitian ini..

Harapan penulis agar penelitian ini dapat bermanfaat sebagai usaha untuk mendapatkan sub unit vaksin terhadap penyakit malaria yang khas untuk Indonesia, mengingat sampai saat ini penyakit malaria masih sulit dikendalikan yang antara lain disebabkan oleh belum ditemukannya vaksin yang efektif. Juga diharapkan penelitian ini dapat dipakai sebagai tambahan pengetahuan bagi penelitian di masa mendatang, maupun penggunaannya dalam masyarakat pada umumnya.

Sebagai akhir kata, semoga Tuhan selalu melimpahkan karunia dan rakhmat-Nya kepada semua yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Surabaya, Maret 2009

**Penulis**

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
 <b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1. Penyakit Malaria .....	4
2.1.1. Situasi global penyakit malaria .....	4
2.1.2. Situasi malaria di Indonesia .....	6
2.2. Parasit Malaria .....	8
2.3. SERA <i>P.falciparum</i> (PfSERA) .....	11
2.3.1. Struktur molekul PfSERA .....	11
2.3.2. Fungsi PfSERA .....	13
2.3.3. Gen PfSERA .....	13
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	16
IV. METODE PENELITIAN .....	17
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	27
DAFTAR PUSTAKA .....	28

## BAB I

### PENDAHULUAN

*Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) merupakan penyebab penyakit malaria yang dapat memberikan gejala paling berat, dan menginfeksi penderita penyakit malaria di beberapa daerah endemis malaria di Indonesia. Perlu diketahui bahwa penyakit malaria sampai saat ini masih merupakan masalah di dunia (Riccio, 2005), termasuk di Indonesia (Brown, 2002). WHO memperkirakan sekitar 300 - 500 juta penduduk di dunia terserang penyakit yang menyebabkan kematian 3 juta penduduk dunia setiap tahun dan 1/4 diantaranya adalah anak berumur 1 - 4 tahun (WHO, 2000). Di Indonesia, walaupun pernah terjadi tendensi penurunan jumlah kasus penyakit malaria di Pulau Jawa dan Pulau Bali, tetapi di luar daerah tersebut terjadi hal yang sebaliknya. Pada tahun 1997 sebanyak 93,5 juta penduduk di Indonesia terancam terkena penyakit malaria (WHO, 1997c). Setelah tahun 1998, angka kejadian penyakit malaria cenderung meningkat, bahkan pada beberapa daerah di Jawa Timur telah terjadi Kejadian Luar Biasa (KLB) penyakit malaria, misalnya di Pulau Kangean, Kabupaten Pacitan dan Kabupaten Tulungagung (Oemijati, 1998., Depkes Prop.Jatim, 1998., Kuntarijanto, 2000). Lebih dari 50 % penyebab penyakit malaria di Indonesia adalah *P.falciparum* (WHO, 1997b). Jika hal ini tidak segera diantisipasi, akan menurunkan kualitas sumber daya manusia (SDM) yang saat ini sangat diperlukan dalam menghadapi era globalisasi.

Salah satu penyebab kegagalan penanggulangan penyakit malaria, terutama terhadap penyakit malaria yang diakibatkan oleh *P.falciparum* adalah belum ditemukan vaksin yang efektif (Tine *et al.*, 1996, Carvalho *et al.*, 2002., Ballou *et al.*, 2004). Vaksin diperlukan untuk menginduksi terjadinya imunitas yang protektif terhadap terjadinya penyakit malaria, sehingga seseorang yang mendapat imunisasi menjadi kebal terhadap infeksi oleh *P.falciparum*. Hal ini sangat diperlukan di daerah endemis malaria, terutama untuk anak-anak kurang dari 5 tahun serta wanita hamil, yang sangat peka terhadap penyakit malaria (Moreno dan Patarroyo, 1995., Engers dan Godal, 1998., Waters *et al.*, 2005).

SERA (*Serine – Repeat Antigen*) *P. falciparum* (PfSERA), merupakan salah satu kandidat *asexual blood stage vaccine* yang potensial terhadap infeksi oleh *P. falciparum*

(Li *et al.*, 2002., Wipasa *et al.*, 2002., Millert *et al.*, 2002), sehingga diharapkan dapat menjadi subunit dari *multistage vaccine* (Tine *et al.*, 1996). PfSERA berfungsi dalam invasi merozoit ke dalam sel darah merah (Perkins dan Ziefer, 1994), diduga PfSERA juga berperan pada pelepasan merozoit dari skizont yang telah masak dalam sel darah merah (Debrabant *et al.*, 1992). Pada percobaan secara *in vitro*, antibodi monoklonal ataupun poliklonal yang spesifik terhadap PfSERA dapat menghambat invasi *P.falciparum* ke dalam sel darah merah (Fox *et al.*, 1997, Aoki *et al.*, 2002) sehingga terjadi hambatan pertumbuhan parasit (Knapp *et al.*, 1989). Antibodi terhadap PfSERA menyebabkan terjadinya aglutinasi merozoit (Fox *et al.*, 1997., Soe *et al.*, 2002) dan menghambat penyebaran merozoit pada saat pecahnya skizont yang telah masak dalam sel darah merah (Lyon *et al.*, 1989). Tingginya antibodi terhadap PfSERA berhubungan dengan kekebalan terhadap penyakit malaria pada anak di Uganda (Okech, 2006). Pada percobaan dengan berbagai kera menunjukkan terjadinya proteksi baik sebagian ataupun menyeluruh terhadap infeksi oleh *P.falciparum* jika diimunisasi dengan PfSERA (Inselburg *et al.*, 1991).

Gen PfSERA yang terletak pada kromosom 2 *P.falciparum* terdiri dari 4 ekson dan 3 intron. Salah satu fragmen PfSERA adalah fragmen 47-kDa yang sangat imunogenik, terutama di ujung amino fragmen 47-kDa dan antibodi yang timbul akibat imunisasi dengan fragmen 47-kDa pada binatang percobaan ternyata mempunyai efek protektif terhadap infeksi *P.falciparum* (Suzue *et al.*, 1997). Gen penyandi fragmen 47 kDa yang imunogenik tersebut terletak pada ekson II, dan bagian yang imunogenik gen ini terletak di regio ulangan oktamer (OR) dan regio ulangan serin.

Pada penelitian yang lalu (didanai PHB XII) ditemukan bahwa variasi genetik gen penyandi domain immunogenik PfSERA (yang terletak pada exon II gen PfSERA yaitu gen penyandi regio ulangan oktamer dan regio ulangan serin) tidaklah terlalu besar dan dengan analisis komputer dapat diprediksi adanya epitop sel B yang immunogenik, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sub unit vaksin yang potensial khas Indonesia (Indri *et al.*, 2005). Pada penelitian yang lalu juga telah didapatkan *P.falciparum* yang PfSERA nya mempunyai epitop paling banyak dan paling conserved.

Dalam penelitian ini akan dilakukan kloning ekspresi dan karakterisasi protein domain immunogenik PfSERA yang didapat pada penelitian yang lalu. Penelitian ini

sangat penting karena dari protein rekombinan tersebut sangat mungkin dikembangkan sebagai bahan dalam pembuatan sub unit vaksin terhadap penyakit malaria yang khas untuk Indonesia.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Penyakit Malaria

Penyakit malaria merupakan penyakit parasit tropik yang dapat disembuhkan dan dapat dicegah, tetapi tetap merupakan penyakit yang mematikan jutaan orang (Brown, 2002). Hal ini dikarenakan secara umum banyak orang yang tidak mempunyai pengetahuan yang cukup mengenai penyebab, penyebaran maupun pencegahan penyakit malaria (WHO, 1997c). Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa bersel tunggal yang termasuk genus *Plasmodium*, dan ada 4 spesies yang dapat menginfeksi manusia yaitu *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, dan *P.ovale* (Strickland, 1991., Kaplan *et al.*, 1993).

Penyakit malaria ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi atau terjadi inokulasi langsung oleh darah yang terinfeksi, misalkan pada saat transfusi, penyuntikan dengan jarum suntik yang terkontaminasi atau malaria kongenital (Strickland, 1991., Kaplan *et al.*, 1993).

#### 2.1.1. Situasi global penyakit malaria

Setiap tahunnya sekitar 300 – 500 juta penduduk dunia menderita penyakit malaria dan sekitar 3 juta diantaranya meninggal (WHO, 1997a). Jumlah penderita yang mati karena penyakit malaria setiap tahunnya, sama dengan penderita penyakit AIDS yang meninggal dalam 15 tahun terakhir, sehingga dikatakan bahwa penyakit malaria lebih mematikan dari penyakit AIDS. Pada saat ini sekitar 90 negara di dunia terancam oleh penyakit malaria, dan hampir separuhnya adalah negara di Afrika. Walaupun jumlah ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan tahun lima puluhan, yaitu sekitar 140 negara merupakan daerah malaria, hal ini cukup mencemaskan karena sekitar 41% dari jumlah penduduk di seluruh dunia terancam penyakit malaria (Trigg dan Kondrachine, 1998).

Penyakit malaria terutama ditemukan di daerah terpencil, hutan, daerah berbukit, maupun di daerah yang baru dikembangkan (daerah transmigrasi maupun perkembangan proyek). Daerah transmigrasi dengan fasilitas kesehatan yang sangat terbatas dan jumlah penduduk yang banyak akan memperburuk keadaan ini. Banyaknya penyakit malaria di daerah perbatasan negara seperti perbatasan Myanmar dan Thailand menyebabkan

penyakit malaria menjadi masalah kesehatan yang sangat penting (WHO, 1997c). Pada tahun 1990, 75% kasus penyakit malaria yang didapat di luar benua Afrika terkonsentrasi pada 9 negara yaitu India, Brasil, Afghanistan, Srilanka, Thailand, Indonesia, Vietnam, Cambodia, dan China (WHO, 2000).

Daerah dengan transmisi malaria serta terjadinya kasus baru sepanjang tahun disebut daerah endemis malaria. Transmisi dapat terjadi di daerah dengan suhu rata-rata di atas 15<sup>0</sup>C setidaknya selama sebulan dalam 1 tahun. Ini merupakan daerah antara 64<sup>0</sup>LU dan 31<sup>0</sup>LS. Daerah yang terbebas dari penyakit malaria adalah daerah dengan ketinggian di atas 3.000 m dan daerah gurun pasir yang kering (Knell, 1991).

Pada tahun empat puluhan, diharapkan penyakit malaria dapat dibasmi dari permukaan bumi dalam waktu yang singkat terutama dengan penggunaan insektisida yang sangat intensif. Pada akhir tahun lima puluhan dan awal tahun enam puluhan program eradikasi penyakit malaria dengan menggunakan DDT mencapai sukses yang luar biasa (Knell, 1991). Di 8 negara di Asia Tenggara terjadi penurunan jumlah kasus penyakit malaria yang sangat drastis, yaitu dari jumlah kasus 110 juta menjadi 228.000 pada tahun 1965. Tetapi hal ini tampaknya tidak berlangsung lama. Pada pertengahan tahun tujuh puluhan mulai tampak timbulnya epidemi penyakit malaria, sehingga pada tahun 1976 tercatat penderita penyakit malaria sejumlah 7,2 juta penderita. Dalam satu dekade angka ini relatif selalu sama, tetapi pada tahun 1995 angka ini meningkat menjadi 6 kali lipat (WHO, 1997c).

Banyak hal yang berperan dalam timbulnya lagi penyakit malaria, antara lain adalah :

1. Resistensi parasit terhadap pengobatan, yang setiap tahunnya semakin banyak dan meluas di daerah endemis malaria (Laserson *et al.*, 1994., Olliaro *et al.*, 1996., Enserink, 2005, Pal-Bhowmick, 2006).
2. Timbulnya *multi drug resistance* seperti di daerah fokus malaria di daerah antara Myanmar, Cina, Laos dan Thailand, yang semula berasal dari perbatasan Kamboja dan Thailand (WHO, 1997c) dan daerah Amazon (Huaman *et al.*, 2004a), maupun timbulnya resistensi terhadap chloroquin di beberapa daerah di Indonesia seperti di Jawa Tengah (Safruddin *et al.*, 2003), Pulau Lombok (Huaman *et al.*, 2004b) dan Papua (Nagesha *et al.*, 2003).

3. Resistensi nyamuk terhadap insektisida (Rich *et al.*, 1997., Doolan dan Hoffman, 1997).
4. Pembukaan daerah baru terutama di daerah hutan tropis (Oemijati, 1998).
5. Akibat dari perubahan iklim yang memungkinkan vektor untuk berkembang biak di daerah dengan iklim yang baru dan dapat menyebabkan penyakit malaria semakin menyebar (WHO, 1997c).

Strategi baru dalam penanggulangan penyakit malaria dimulai setelah diadakannya *Ministerial Conference* di Amsterdam pada tahun 1992 berdasar pada kenyataan bahwa distribusi penyakit malaria sangat bervariasi antara negara yang satu dengan negara yang lain, maupun di antara daerah yang satu dengan daerah yang lain dalam suatu negara. Strategi kontrol terhadap penyakit malaria dituangkan dalam *World Declaration* yang dibuat *Ministerial Conference* untuk melakukan penanggulangan penyakit malaria secara terpadu yang melibatkan Pemerintah, Dinas Kesehatan, pekerja, dan penduduk. Semua negara endemik malaria di Asia Tenggara mengadopsi strategi global terhadap penyakit malaria tersebut pada tahun 1995. Tujuan dari strategi global terhadap pemberantasan penyakit malaria adalah mencegah terjadinya kematian, mengurangi angka kesakitan, serta mengurangi penurunan nilai sosial ekonomi penduduk akibat penyakit malaria yang akan dicapai antara lain dengan deteksi dini dan pengobatan cepat, merencanakan dan mengimplementasikan strategi pencegahan terhadap penyakit malaria, deteksi terjadinya epidemik secara cepat, dan meningkatkan kapasitas lokal dengan penilaian kembali situasi lokal secara terus menerus (WHO, 1997c).

### **2.1.2. Situasi malaria di Indonesia**

Penyakit malaria merupakan penyakit protozoa paling penting di Indonesia, terutama di Indonesia Timur yang menimbulkan masalah kesehatan masyarakat yang besar (WHO, 1997b). Diperkirakan hampir separuh dari penduduk di Indonesia berisiko untuk menderita penyakit malaria (WHO, 1997c). Dari hasil survey yang pernah dilakukan dikatakan bahwa prevalensi penyakit malaria di Indonesia bervariasi antara 1 – 34% (Oemijati, 1998). Lebih dari 50% penyebab penyakit malaria di Indonesia adalah *P.falciparum*. Diperkirakan jumlah kasus penyakit malaria di seluruh Indonesia pada tahun 1994 sebanyak 575.000 (WHO, 1997b).

Walaupun sampai tahun 1992 terjadi tendensi penurunan jumlah kasus penyakit malaria di Jawa dan Bali yang dapat ditunjukkan dengan terjadinya penurunan API (*Annual Parasite Incidence*), tetapi pada tahun berikutnya tampak tendensi terjadinya peningkatan API. API di daerah Jawa dan Bali yang pada tahun 1983 sebesar 1,34 ‰ menurun menjadi 0,12 ‰ pada tahun 1992 dan menjadi 0,19 ‰ pada tahun 1993 (Dep.Kes.RI, 1994), sedangkan pada tahun 1998 mencapai 0,3 ‰ (Dachlan, 2000). Di luar daerah Jawa dan Bali belum pernah tampak adanya penurunan jumlah kasus penyakit malaria yang berarti. *Parasite Rate* (PR) di luar Jawa dan Bali yang semula 4,5% pada tahun 1984, menjadi 4,47% pada tahun 1992 dan meningkat menjadi 5,52% pada tahun 1994. Kenaikan PR terutama terjadi di wilayah Indonesia bagian Timur akibat banyaknya pembukaan daerah baru. PR tertinggi terjadi di daerah Irian Jaya yaitu sebesar sebesar 14,87% pada tahun 1992 dan meningkat menjadi 16,64% pada tahun 1993 (Dep.Kes.RI, 1994).

Walaupun banyak kota besar di Indonesia yang dikatakan sebagai daerah bebas malaria, tetapi akhir-akhir ini mulai banyak ditemukan kasus malaria impor dari daerah endemis malaria. Pegawai pemerintah, pelaku bisnis, mahasiswa yang melakukan penelitian ataupun wisatawan yang melakukan perjalanan ke daerah endemis malaria, banyak yang menderita penyakit malaria dan hal ini akan meningkatkan terjadinya kasus penyakit malaria impor (Oemijati, 1998). Mobilitas penduduk yang sangat tinggi merupakan penyebab mudahnya terjadi penyebaran serta sulitnya pemberantasan penyakit malaria di Indonesia. Prevalensi penyakit malaria yang tinggi banyak ditemukan pada penduduk baru seperti di daerah transmigrasi karena pembukaan daerah baru menyebabkan banyaknya tempat biakan nyamuk *Anopheles*.

Pulau Flores dan Pulau Timor di Propinsi Nusa Tenggara Timur, dan Irian Jaya merupakan daerah malaria dengan endemisitas yang tinggi (Oemijati, 1998), demikian juga dengan Pulau Halmahera yang mempunyai *Parasite Rate* (PR) dan *GR Gametocyte Rate* (GR) tinggi (Soekirno, 1996). Tingginya GR menunjukkan tingkat transmisi penyakit malaria di Pulau Halmahera cukup tinggi. Propinsi Maluku terdiri dari banyak pulau, banyak ditemukan gunung berapi dengan curah hujan yang tinggi dan kelembaban 83,5% (*Department of Information Republic of Indonesia*, 1997).

## 2.2. Parasit Malaria

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit protozoa bersel tunggal / uniseluler yang termasuk genus *Plasmodium*. Genus *Plasmodium* merupakan anggota dari phylum *Apicomplexa*, klas *Hematozoa*, ordo *Haemosporida*, familia *Plasmodiidae* (Ayala *et al.*, 1998). Seluruh anggota dari *Apicomplexa* bersifat parasitik, dan pada proses invasi dari parasit ini ke sel hospes diperlukan kompleks organel yang terdapat pada bagian ujung apikal dari parasit sehingga parasit ini dikenal dengan nama *Apicomplexa* (Kaplan *et al.*, 1993). Dalam siklus hidupnya, *Plasmodiidae* mempunyai stadium aseksual di dalam hati, sel darah merah, atau organ lain dari hospes vertebrata, dan stadium seksual yang dimulai di sel darah merah vertebrata yang disempurnakan dalam hospes nyamuk (Lopez-Antunano dan Schmunis, 1993). Lebih dari 100 spesies dari genus *Plasmodium* dapat menginfeksi reptil, burung maupun mamalia. Dari sejumlah tersebut hanya 4 spesies yang dapat menginfeksi manusia yaitu *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, dan *P.ovale* (Kaplan *et al.*, 1993).

*P.falciparum* merupakan penyebab penyakit malaria yang paling berbahaya karena dapat menyebabkan terjadinya infeksi akut dan berat serta seringkali berakibat fatal, sedangkan penyakit malaria yang disebabkan oleh spesies yang lain walaupun menyebabkan terjadinya penyakit yang serius, tetapi sangat jarang berakibat fatal (Knell, 1991).

Siklus hidup dari *Plasmodium* sangat kompleks, terdiri dari 4 stadium yaitu 3 stadium aseksual dengan multiplikasi dan 1 stadium seksual tanpa multiplikasi. Stadium seksual (fertilisasi) dan stadium aseksual pertama (sporogoni) hanya terjadi di tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Stadium aseksual kedua (skizogoni hepatik / *hepatic schizogony*) dan stadium aseksual ketiga (skizogoni eritrositik / *erythrocytic schizogony*) terjadi di tubuh manusia yaitu di jaringan hati dan di sel darah merah. Masing-masing stadium aseksual dimulai dari adanya parasit intraseluler yang mengambil makanan dari sel hospes serta tumbuh pesat, dilanjutkan dengan pembelahan parasit menjadi beberapa bentuk invasif dan akan berakhir dengan terbentuknya beberapa parasit baru yang invasif. Bentuk invasif dari parasit mempunyai struktur khusus yang khas yaitu bagian anterior yang berperan pada proses invasi yaitu kompleks apikal, sitoskeleton yang berperan dalam mempertahankan bentuk parasit dan 3 lapis *external pellicle* yang tebal (*a thick*

*three-layered external pellicle*). Pada stadium aseksual ketiga beberapa parasit menjadi sel seksual dengan terbentuknya gametosit yang siap untuk memulai siklus hidup yang baru di tubuh nyamuk (Knell, 1991).

Sporozoit yang merupakan bentuk invasif yang infeksius, masuk ke dalam kapiler subkutan dari hospes (manusia) melalui gigitan nyamuk betina yang terinfeksi. Dalam peredaran darah, sporozoit akan mengalami fagositosis, walaupun ada beberapa yang lolos dan dapat masuk ke dalam sel parenkim hati (hepatosit), tempat terjadinya multiplikasi aseksual yang dikenal sebagai skizogoni eksoeritrositik (*exoerythrocytic schizogony*) atau skizogoni hepatic, yang merupakan salah satu fase aseksual yang terjadi dalam tubuh manusia. Waktu sporozoit berada di dalam peredaran darah sangat singkat, hanya sekitar 30 menit kemudian akan menghilang dari peredaran darah. Di dalam hati, sporozoit segera menjadi tropozoit hati.

Tropozoit akan mengabsorpsi nutrisi dari sel hati sehingga dapat tumbuh dengan cepat, kemudian mulai terjadi pembelahan internal menjadi skizon yang berinti banyak, sehingga dapat menggeser nukleus dari sel hepatosit, walaupun tidak terjadi reaksi peradangan di sekitar jaringan hati (Manson-Bar dan Bell, 1987., Knell, 1991). Enam sampai 16 hari setelah terinfeksi, tergantung spesies maupun galur *Plasmodium*, sel hepatosit yang mengandung skizon yang telah matang akan pecah, sehingga merozoit dapat masuk ke dalam peredaran darah (Strickland, 1991). Sejauh ini tidak terjadi gejala apapun pada hospes yang terinfeksi dan disebut sebagai masa inkubasi atau masa pre-patent infeksi (*pre-patent period of infection*) (Knell, 1991).

Pada infeksi oleh *P.vivax* beberapa tropozoit di dalam sel hati tidak berkembang, tetapi menjadi bentuk parasit *dormant* yang dikenal dengan hipnozoit. Hal ini dapat terjadi selama beberapa bulan atau beberapa tahun untuk kemudian berkembang lagi sehingga dapat menyebabkan terjadinya *delayed relapse* yang khas terjadi pada infeksi oleh *P.vivax*. Bentuk parasit *dormant* juga terjadi pada infeksi oleh *P.ovale*, sedangkan pada infeksi oleh *P.falciparum* ataupun *P.malariae* tidak dikenal bentuk *dormant* (Knell, 1991). Pada infeksi oleh *P.falciparum* maupun *P.malariae*, skizon yang telah matang akan pecah pada saat yang bersamaan, dan tak ada yang tetap utuh di dalam sel hepatosit, sehingga tidak dikenal adanya relaps (Manson-Bar dan Bell, 1987).

Adanya interaksi antara reseptor yang spesifik pada sel darah merah dan merozoit, menyebabkan merozoit yang dikeluarkan dari hati dalam beberapa menit akan dapat masuk ke dalam sel darah merah, dan mulailah fase skizogoni eritrositik, yang merupakan stadium aseksual terakhir di dalam tubuh manusia (Knell, 1991). Bentuk muda di dalam sel darah merah merupakan tropozoit yang melingkar dan dikenal sebagai bentuk cincin (*ring form*), yang dalam pertumbuhannya akan menjadi irreguler dan amoeboid. Selama masa pertumbuhan ini parasit memerlukan hemoglobin, dan membuang pigmen hematin atau hemozoin, sehingga akan tampak adanya granul yang gelap dalam sitoplasmanya (Kaplan *et al.*, 1993). Setelah 2 atau 3 hari tergantung dari spesies *Plasmodium*, akan terbentuk roset. Akhirnya sel darah merah yang terinfeksi skizon yang telah masak tersebut akan pecah, dan mengeluarkan 8 – 16 merozoit baru. Merozoit baru tersebut siap untuk menginvasi sel darah merah yang lain untuk dapat meneruskan siklus hidupnya (Knell, 1991). Diduga pecahnya skizon dalam sel darah merah ini merupakan suatu fenomena yang aktif dan memerlukan aktivitas enzim (Debrabant *et al.*, 1992).

Satu siklus skizogoni eritrositik pada infeksi oleh *P.falciparum*, *P.vivax* dan *P.ovale* memerlukan waktu 2 hari, sedangkan untuk *P.malariae* memerlukan waktu 3 hari. Pecahnya sel darah merah dengan bebasnya merozoit ditandai dengan serangan demam yang tinggi dan gejala akut yang lain. Siklus ini juga menyebabkan terjadinya anemia karena rusaknya sel darah merah. Terlepasnya bahan intraseluler / debris akibat pecahnya sel darah merah dapat menimbulkan kompleks imun yang antara lain berdampak terhadap fungsi ginjal (Kaplan *et al.*, 1993., Doolan dan Hoffman, 1997). Siklus skizogoni eritrositik ini akan berlangsung terus menerus sampai terjadi kematian hospes, atau yang lebih sering terjadi adalah aktivasi sistim imun dari hospes yang memungkinkan parasit mati atau tertekan pertumbuhannya (Kaplan *et al.*, 1993).

Setelah beberapa siklus, pada saat tertentu merozoit akan berdiferensiasi menjadi bentuk seksual (gametosit), yaitu makrogametosit sebagai bentuk betina dan mikrogametosit sebagai bentuk jantan. Gametosit membutuhkan waktu sekitar 4 hari untuk pematangannya, tetapi dapat menjadi bentuk *dormant* dan tetap beredar di sirkulasi darah dalam waktu yang lama (Knell, 1991). Gametosit inilah yang nantinya

akan dapat meneruskan siklus hidupnya jika masuk ke vektor, yaitu nyamuk *Anopheles* betina melalui gigitan nyamuk tersebut (Strickland, 1991).

Di dalam lambung vektor, yaitu nyamuk *Anopheles* betina, akan terjadi satu-satunya stadium seksual dari *Plasmodium*. Nukleus dari mikrogametosit akan mengalami pembelahan menjadi 4 sampai 8, dan masing-masing bergabung dengan sitoplasma untuk membentuk semacam flagela. Flagela yang sebenarnya adalah spermatozoa (Knell, 1991) akan terlepas (mikrogamet) dan membuahi makrogametosit sehingga terjadilah makrogamet, dan untuk selanjutnya terjadi proses mitosis (Ghosh *et al.*, 2000). Hasilnya adalah zigot yang merupakan satu-satunya bentuk diploid dari *Plasmodium* (Lanzer *et al.*, 1994), yang dalam beberapa jam akan membentuk ookinet. Zigot merupakan bentuk yang sangat penting dalam siklus hidup dari *Plasmodium*, karena dalam bentuk ini kromosom akan berpasangan dan mudah terjadi rekombinasi, sehingga memungkinkan terjadinya suatu varian baru (Lanzer *et al.*, 1994). Ookinet yang merupakan bentuk invasif dari parasit dalam tubuh vektor, akan mencapai dinding lambung, menembus sel epitel untuk mencapai membran basalis (Knell, 1991). Di dinding lambung inilah akan terjadi stadium aseksual dalam tubuh vektor yaitu stadium sporogoni. Parasit akan tumbuh dengan pesat membentuk ookista dalam suatu kista yang terbentuk oleh protein yang disekresi oleh parasit dan membran basalis lambung nyamuk. Ookista yang jumlahnya sangat bervariasi dari beberapa sampai ratusan, akan membesar secara progresif dan nukleusnya akan cepat membelah dan terbentuklah sporozoit. Akhirnya ookista pecah dan mengeluarkan ribuan sporozoit ke dalam rongga tubuh nyamuk, yang akhirnya dapat masuk ke dalam kelenjar air liur, sehingga terbentuklah nyamuk yang infeksius (Manson-Bar dan Bell, 1987., Strickland, 1991).

### **2.3. SERA *P.falciparum* (PfSERA)**

#### **2.3.1. Struktur molekul PfSERA**

SERA (*Serine – Repeat Antigen*) *P.falciparum* (PfSERA), merupakan salah satu kandidat *asexual blood stage vaccine* yang potensial terhadap infeksi oleh *P.falciparum* (Li *et al.*, 2002., Wipasa *et al.*, 2002), sehingga diharapkan dapat menjadi subunit dari *multistage vaccine* (Tine *et al.*, 1996). PfSERA yang berdasarkan berat molekul dari



prazat proteinnya dikenal pula sebagai P126 (Delplace *et al.*, 1985), P113, P105 (Banic *et al.*, 1994), Pf140 (Li *et al.*, 1989) atau SERP (*serin rich protein*) (Knapp *et al.*, 1989) merupakan suatu protein yang larut dalam air (Delplace *et al.*, 1987). Antigen ini dapat dideteksi dalam supernatan dari kultur *P.falciparum* maupun di peredaran darah penderita penyakit malaria yang terinfeksi *P.falciparum* (Banic *et al.*, 1994). Protein ini disintesis oleh stadium akhir *P.falciparum* dalam sel darah merah dan disekresikan ke dalam vakuola parasitofor (Delplace *et al.*, 1987., Fox dan Bzik, 1994). PfSERA yang bukan merupakan bagian dari membran vakuola parasitofor tidak terikat kuat pada permukaan skizon dan merupakan komponen dari vakuola parasitofor (Delplace *et al.*, 1987). PfSERA adalah salah satu *blood stage antigen* yang disintesis dalam jumlah banyak (Morimatsu *et al.*, 1997) selama 4 jam antara jam ke 32 dan 36 dari 42 jam siklus *P.falciparum* galur FCR3 dalam sel darah merah (Banic *et al.*, 1998). Protein ini ditranslokasikan dengan cepat dari tempat sintesisnya ke vakuola parasitofor melalui endoplasmik retikulum (Ragge *et al.*, 1990), sehingga PfSERA terdeteksi di vakuola parasitofor (Delplace *et al.*, 1987).

PfSERA terdiri dari sekitar 984 - 989 asam amino dengan berat molekul 111 - 128 kDa (Bhatia *et al.*, 1987., Bzik *et al.*, 1988., Knapp *et al.*, 1989). Sekitar 11% dari asam amino yang dikandung PfSERA adalah serin, dan 57% dari residu serin tersebut merupakan 21 - 37 residu serin yang berurutan dan dimulai pada urutan asam amino sekitar nomor 200 (Horii *et al.*, 1988., Bzik *et al.*, 1988., Knapp *et al.*, 1989). Karena mengandung poliserin inilah maka protein tersebut disebut sebagai PfSERA (Bzik *et al.*, 1988).

Salah satu fragmen dari PfSERA yaitu fragmen 47 kDa merupakan bagian yang sangat imunogenik, terutama di ujung amino fragmen 47 kDa dan antibodi yang timbul akibat imunisasi dengan fragmen 47 kDa pada binatang percobaan ternyata mempunyai efek protektif terhadap infeksi *P.falciparum* (Suzue *et al.*, 1997). Gen penyandi fragmen 47 kDa yang imunogenik tersebut terletak pada ekson II, dan bagian yang imunogenik dari gen ini terletak di regio ulangan oktamer (OR) dan regio ulangan serin (Morimatsu *et al.*, 1997).

### 3.3.2. Fungsi PfSERA

Fungsi dari PfSERA yang disintesis pada stadium akhir *P.falciparum* dalam sel darah merah (stadium trofozoit dan skizon) masih belum jelas (Delplace *et al.*, 1987., Fox dan Bzik, 1994). Diduga PfSERA merupakan suatu protease karena fragmen 50kDa menunjukkan homologi dengan *serin / cysteine protease active-site* (Knapp, 1989). Oleh karena itu PfSERA sangat berperan dalam pecahnya skizon sehingga merozoit dapat keluar dari sel darah merah dan PfSERA dapat ditemukan pada permukaan merozoit tersebut (Delplace *et al.*, 1987). Hal ini dibuktikan dengan terjadinya ICM (*immune cluster of merozoite*) dan hambatan pertumbuhan parasit jika pada biakan sel darah merah yang terinfeksi skizon diberi antibodi terhadap PfSERA (Lyon *et al.*, 1989). Terjadinya akumulasi skizon yang telah matang pada biakan yang diberi leupeptin juga menunjukkan bahwa PfSERA berperan pada pecahnya skizon yang telah matang di dalam sel darah merah (Debrabant *et al.*, 1992).

PfSERA mula-mula teridentifikasi oleh antibodi monoklonal yang menghambat invasi merozoit ke dalam sel darah merah (Fox *et al.*, 1997., Aoki *et al.*, 2002). Imunisasi kera *Aotus* atau kera *Squirrel* dengan fragmen rekombinan dari PfSERA membuat kedua kera tersebut menjadi kebal terhadap infeksi oleh *P.falciparum* (Inselburg *et al.*, 1991, Morimatsu *et al.*, 1997). Oleh karena itu PfSERA diduga sangat berperan dalam proses invasi merozoit ke dalam sel darah merah (Perkins dan Ziefer, 1994., Soe *et al.*, 2002). Setelah berakhirnya proses invasi merozoit ke dalam sel darah merah, PfSERA ditemukan di dalam sel darah merah yang terinfeksi yaitu di vakuola parasitofor. Hal ini tidak berarti bahwa PfSERA disintesis pada stadium ini, karena pada saat itu tidak ditemukan adanya mRNA PfSERA. mRNA PfSERA baru ditemukan 24 – 29 jam setelah proses invasi merozoit ke dalam sel darah merah untuk kemudian ditranslasikan menjadi PfSERA (Fox and Bzik, 1994). Setidaknya 1,5% dari total mRNA pada trofozoit maupun skizon adalah mRNA dari PfSERA (Li *et al.*, 1989).

### 2.3.3. Gen PfSERA

Gen PfSERA terletak pada kromosom 2 *P.falciparum* merupakan gen dengan jumlah salinan (*copy*) sebanyak 1 setiap parasit (Li *et al.*, 1989) dan terdiri dari 4 ekson dan 3 intron pendek yang terletak di tengah (Knapp *et al.*, 1989., Li *et al.*, 1989). Panjang

intron pada gen PfSERA berturut – turut adalah 152, 175 dan 125 bp (Knapp *et al.*, 1989), dengan komposisi basa maupun kandungan AT yang berbeda (Bzik *et al.*, 1992). Urutan *splice site* pada ketiga intron tersebut diatas sama dengan konsensus urutan intron pada organisme eukariota maupun pada kebanyakan intron pada gen *P.falciparum* yang telah diketahui yaitu dimulai dengan GT dan diakhiri dengan AG (Li *et al.*, 1989., Knapp *et al.*, 1989).

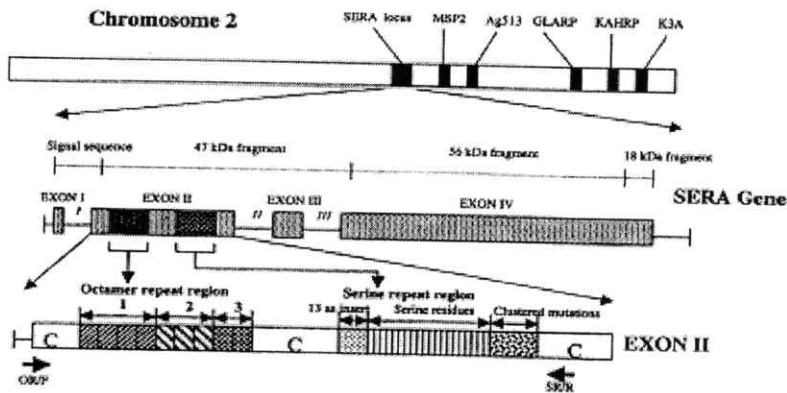
HB3 yang merupakan galur dari *P.falciparum* yang tersebar luas dan banyak didapatkan di daerah Asia Tenggara, Pulau Solomon (Liu *et al.*, 2000) serta di Amerika Tengah (Morimatsu *et al.*, 1997), banyak dipakai sebagai dasar dalam melakukan analisis genetik dari *P.falciparum*. Ternyata gen PfSERA dari *P.falciparum* galur HB3, sama dengan *P.falciparum* galur FCR3 maupun SL3.

Ekson I gen PfSERA yang dimulai dari kodon inisiasi AUG, menyandi 11 asam amino. Sebelas asam amino tersebut ditambah dengan 5 asam amino awal yang disandi oleh ekson II merupakan *hydrophobic core* yang tipikal untuk peptida sinyal (Knapp *et al.*, 1989).

Ekson II gen PfSERA menyandi fragmen 47 kDa PfSERA yang ujung aminonya mengandung 2 regio ulangan yang terpisah yaitu regio ulangan oktamer (*octamer repeat region*) dan regio ulangan serin (*serin repeat region*) yang dikatakan sangat imunogenik (Morimatsu *et al.*, 1997). Ekson II gen PfSERA regio ulangan oktamer menyandi 2 unit yaitu unit oktamer I yang terdiri dari 4 subunit oktapeptida dan unit oktamer II yang terdiri dari 2 - 4 subunit oktapeptida (Knapp *et al.*, 1989., Li *et al.*, 1989., Liu *et al.*, 2000). Pada *P.falciparum* galur HB3, urutan 4 subunit oktapeptida dari unit oktamer I adalah (S/G/D)Q(T/A)GNT(G/V)G, sedangkan unit oktamer II hanya terdiri dari 2 subunit oktapeptida dengan urutan SPQGSTGA dan SQPGSSEP (Morimatsu *et al.*, 1997). Berdasarkan ekson II gen PfSERA II galur HB3, Liu *et al* (2000) membagi ekson II gen PfSERA regio ulangan oktamer menjadi 18 tipe allele yaitu tipe allele I (yang merupakan galur HB3) sampai tipe allele XVIII. Perbedaan ke 18 tipe allele tersebut adalah pada terjadinya delesi, insersi ataupun mutasi titik yang non-sinonim. Ekson II gen PfSERA regio ulangan serin menyandi fragmen polipeptida yang terdiri dari 3 bagian yaitu bagian insersi 13 asam amino (P-1), bagian ulangan serin (P-2) yang terdiri dari 35 - 37 ulangan residu serin dan bagian yang banyak terjadi mutasi titik non-sinonim (P-3).

Residu serin disandi oleh kodon AG(T atau C) dan TC(A atau T) (Knapp *et al.*, 1989., Li *et al.*, 1989., Liu *et al.*, 2000). Pada *P.falciparum* galur HB3, ekson II gen PfSERA regio ulangan serin tidak mengandung insersi 13 asam amino (P-1) dan pada ulangan serin yang berjumlah 34 terdapat asam amino asparagin (N) pada ulangan serin ke 8 (Morimatsu *et al.*, 1997).

Ekson III yang menyandi 46 asam amino dan ekson IV yang panjangnya 1986 pb dan menyandi 662 asam amino tidak mengandung regio ulangan (Knapp *et al.*, 1989).



Gambar 2.1. Gen PfSERA secara skematik (Liu *et al.*, 2000).

*Open reading frame* dari gen PfSERA dimulai dari ATG pada nukleotida ke 2407 dan berakhir pada TAA pada nukleotida ke 5836. Kandungan AT pada keseluruhan gen penyandi PfSERA berjumlah 85 – 89%, jauh lebih tinggi dari kandungan AT pada ketiga ekson yang berjumlah 71% (Li *et al.*, 1989).

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

##### **3.1.1. Tujuan umum**

Mendapatkan protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia, dalam rangka menciptakan subunit vaksin yang efektif khas Indonesia.

##### **3.1.2. Tujuan khusus**

1. Mendapatkan gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia
2. Mendapatkan hasil amplifikasi gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia yang murni.
3. Mendapatkan kloning gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia.
4. Mendapatkan protein hasil ekspresi gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia.
5. Mendapatkan hasil karakterisasi protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia.

#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Dengan ditemukannya protein domain immunogenik PfSERA isolat Indonesia, protein ini dapat digunakan sebagai dasar bahan pembuatan vaksin subunit yang spesifik khas Indonesia.

## BAB IV METODA PENELITIAN

Penelitian ini yang dilaksanakan selama 2 tahun ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Tropical Disease Centre Universitas Airlangga.

### 4.1. Amplifikasi Gen Penyandi Protein Domain Immunogenik PfSERA

Dari DNA *P.falciparum* isolat terpilih yang telah ada, dilakukan amplifikasi gen protein domain immunogenik PfSERA. Primer yang dipakai adalah sepasang primer yang spesifik yaitu 5'CACCGGCTGCAGACGCATACACACAAACATTGTCATTA3' dan 5'GGGGATCCTTCAAGTTGGTAGTATATATTAAGGA3'. Pada reaksi amplifikasi diperlukan template sebanyak 5 ul, dalam larutan akhir sebanyak 100 ul yang mengandung 200 uM dNTP, 0,5 uM masing-masing primer spesifik, 0,8 U enzim AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin Elmer, USA) dan 10 ul larutan buffer 10x. Dalam melakukan reaksi amplifikasi disertakan kontrol negatif (menggunakan aquadest).

Adapun kondisi reaksi amplifikasi adalah sebagai berikut:

- Satu siklus pada 94<sup>0</sup>C selama 10 menit
- Empat puluh siklus pada :      94<sup>0</sup>C selama 30 detik  
  55<sup>0</sup>C selama 1 menit  
  72<sup>0</sup>C selama 3 menit
- Satu siklus pada 72<sup>0</sup>C selama 7 menit

Untuk mengevaluasi hasil PCR yang panjangnya sekitar 1.025 bp, dilakukan elektroforesis dari 5 ul hasil PCR pada agarose 2% dalam larutan TBE 0,5% yang mengandung *ethidium bromide*. Dokumentasi dilakukan dengan menggunakan film polaroid pada kamera merk Mamiya.

#### **4.2.Purifikasi Hasil Amplifikasi Gen Penyandi Protein Domain Immunogenik PfSERA**

Pada hasil elektroforesis dilakukan pemurnian hasil PCR dengan menggunakan *high pure PCR product purification kit* dengan cara sebagai berikut :

1. Pada 100 ul hasil PCR ditambahkan 500 ul *binding buffer*,
2. Masukkan sampel tersebut ke *upper reservoir* pada *high pure filter tube* yang telah dipasang di *collection tube*
3. Sentrifus 10.000 rpm selama 30 detik
4. Buang cairan pada *collection tube* kemudian *collection tube* dipasang lagi
5. Tambahkan 500 ul *wash buffer* ke *upper reservoir*
6. Ulangi tahap 3 dan 4
7. Tambahkan 200 ul *wash buffer* ke *upper reservoir*
8. Ulangi tahap 3
9. Buang cairan pada *collection tube*
10. Masukkan *high pure filter tube* ke 1,5 ml *reaction tube*
11. Masukkan 100 ul *elution buffer*
12. Sentrifus 10.000 rpm selama 30 detik

#### **4.3. Inseri hasil PCR gen protein domain immunogenik PfSERA ke vektor pTE101/D-TOPO**

Hasil PCR yang telah dipurifikasi di insersikan ke vektor pET101/D-TOPO.

1. Terhadap 3 ul hasil PCR ditambahkan 1 ul vektor pET101/D-TOPO. dan 2 ul buffer
2. Inkubasi 5 menit pada suhu kamar
3. Rekombinan yang terbentuk siap untuk ditransformasikan ke *E.coli* TOP 10

#### **4.4. Mempersiapkan Sel Kompeten *E.coli* TOP 10 dan *E.coli* BL-21 star**

1. Kultur *E.coli* yang telah diinkubasi selama 16 jam
2. Ambil 4 ml, dimasukkan dalam media LB baru, di inkubasi 37<sup>0</sup>C hingga mencapai OD<sub>600</sub> -0,4.

3. Kultur diletakkan ke dalam wadah berisi es selama 10 menit.
4. Dua ml kultur dimasukkan ke tabung eppendorf, sentrifuse pada 4<sup>0</sup>C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatant di buang.
5. Pelet di resuspensi dengan 1 ml buffer CCMB 80 dingin, dicampur dengan menggoyang tabung
6. Inkubasi dalam wadah berisi es selama 20 menit.
7. Sentrifus pada 4<sup>0</sup>C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang
8. Pellet diresuspensi dengan 80 µl buffer CCMB 80 dingin, kemudian di vortex.
9. Sel kompeten disimpan pada suhu – 80<sup>0</sup>C sampai dilakukan penelitian. Untuk ekspresi gen dilanjutkan dengan menggunakan *E.coli* BL-21 star.

#### **4.5. Transformasi plasmid rekombinan pada sel kompeten *E.coli* TOP 10**

1. Tiga µl rekombinan secara perlahan ditambahkan pada 100 µl sel kompeten. *E.coli* TOP 10
2. Inkubasi pada wadah berisi es selama 30 menit
3. Inkubasikan pada wadah 42<sup>0</sup>C selama tepat 30 detik
4. Pindahkan ke dalam es dengan segera
5. Tambahkan 250 ul *pre-warmed* media SOC, letakkan di rak dan diinkubasi pada shaker incubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 jam pada 225 rpm.
6. Sebarkan 200 ul sel transforman pada medium selektif yang mengandung ampicillin.
7. Inkubasi pada 37<sup>0</sup>C semalam.

#### **4.6. Isolasi plasmid rekombinan dari *E.coli* TOP 10**

Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan *High-speed plasmid mini kit*.

1. Sebanyak 1,5 ml kultur rekombinan *E.coli* TOP 10 dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus, dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit, kemudian supernatan di buang.



2. Tambahkan 200  $\mu$ l bufer PD1 yang mengandung Rnase A dan di resuspensi dengan pipeting.
3. Tambahkan 200  $\mu$ l PD2 dan dicampur perlahan, biarkan selama 2 menit pada suhu kamar sampai jelas kelihatan lisis.
4. Tambahkan bufer PD3 dan segera dicampur, disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.
5. Kolom PD ditempatkan pada tabung penampung, kemudian supernatan diletakkan pada kolom PD.
6. Tambahkan 400  $\mu$ l bufer W1 pada kolom PD, sentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Cairan *flow through* dibuang.
7. Tambahkan 600  $\mu$ l bufer pencuci yang mengandung ethanol, sentrifus dengan kecepatan 13,000 rpm selama 30 detik. Cairan *flow through* dibuang kemudian kolom PD diletakkan pada tabung penampung baru.
8. Tambahkan buffer elusi sebanyak 50 – 100  $\mu$ l pada kolom PD, biarkan selama 2 menit sampai bufer terserap oleh matrik
9. Sentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit.
10. Tampung cairan yang mengandung plasmid rekomban.

#### 4.7. Transformasi plasmid rekombinan pada sel kompeten *E.coli* BL-21 star

1. Tiga  $\mu$ l rekombinan secara perlahan ditambahkan pada 100  $\mu$ l sel kompeten. *E.coli* BL-21 star
2. Inkubasi pada wadah berisi es selama 30 menit
  1. Inkubasikan pada wadah 42<sup>0</sup>C selama tepat 30 detik
  2. Pindahkan ke dalam es dengan segera
3. Tambahkan 250 ul *pre-warmed* media SOC, letakkan di rak dan diinkubasi pada shaker incubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 jam pada 225 rpm.
4. Sebarkan 200 ul sel transforman pada medium LB yang mengandung ampicillin.
5. Inkubasi pada 37<sup>0</sup>C semalam.

#### 4.8. Ekspresi protein rekombinan

Setelah kultur sel transforman diinkubasikan pada 37°C selama semalam

1. Kultur sebanyak 500 ul ditanam ke 30 ml medium LB cair dan di inkubasi di *shaker incubator* pada suhu 37°C hingga tercapai  $OD_{600} = 0,6$ .
2. Tambahkan IPTG untuk induksi hingga konsentrasi 1mM dan diinkubasi selama 4 jam.
3. Sel dipanen dengan sentrifus 4.000 x g selama 15 menit. Pelet dapat disimpan pada suhu -70°C hingga digunakan.

#### 4.9. Purifikasi protein rekombinan

Purifikasi protein rekombinan dilakukan dengan Ni-NTA spin kit.

1. Sel dicairkan dan diresuspensi dengan 1 ml buffer (8 M urea; 0.1 M  $NaH_2PO_4$ ; 0.01 M Tris-Cl; pH 8.0), digoyang pada suhu kamar selama 1 jam.
2. Lisat disentrifuge pada 10.000 x g selama 30 menit untuk mengendapkan debris seluler, kemudian ambil supernatan.
3. Equilibrasikan Ni-NTA spin column dengan 600 ul buffer (8 M urea; 0.1 M  $NaH_2PO_4$ ; 0.01 M Tris-Cl; pH 8.0) dan disentrifuge 700 x g selama 2 menit., dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C.
4. Ekstrak sel disentrifus 10.000 x g selama 30 menit dan supernatan dikoleksi. Membran Ni-NTA di *prekuilibrasi* dengan 600 µl bufer lisis, inkubasi semalam
5. Sentrifus lagi dengan kecepatan 700 x g selama 2 menit.
6. Masukkan 600 µl supernatan secara bertahap pada kolom Ni-NTA kemudian sentrifus lagi dengan kecepatan 700 x g selama 2 menit.
7. Protein yang terikat pada membran Ni-NTA dicuci dengan bufer pencuci untuk menghilangkan protein yang tidak spesifik.
8. Elusi protein rekombinan dilakukan dengan menambahkan bufer elusi
9. Sentrifus dengan kecepatan 2.000 rpm selama 2 menit.

#### 4.10. Identifikasi Protein Rekombinan

#### 4.10.1. SDS-PAGE

1. Pelet dicairkan dengan 80 ul buffer 1 x SDS-PAGE
2. Panaskan pada air mendidih selama 5 menit yang dilanjutkan dengan sentrifuge 4.000 rpm selama 5 menit
3. Sampel 10 ul dimasukkan ke dalam sumur SDS-PAGE (gel poliakrilamid 12%)
4. *Running*
5. Pewarnaan dengan *commasie brilliant blue* selama 1 jam dengan digoyang
6. Cuci dengan aquabidest dan dilakukan de staining dengan larutan yang mengandung metanol 50%, asam asetat 10% dan aquabidest 40%
7. Berat molekul protein rekombinan ditentukan dengan membandingkan berat molekul marker

#### 4.10.2. Western Blot

1. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquabidest dan direndam dalam buffer blotting
2. Membran selulosa di potong dan dibasahi dengan PBS selanjutnya direndam dalam buffer blotting
3. Pada blotter susun 5 lapis kertas whatman, membran selulosa, gel agarose, 5 lapis kertas whatman
4. *Running* selama 40 menit pada 100V dan 40 mA
5. Membran selulose dimasukkan TBS tween 0,05% yang mengandung BSA 1% dan diinkubasi semalam, selanjutnya di cuci 5 x dengan TBS tween 0,05%
6. Inkubasi dengan antibodi terhadap protein PfSERA dengan titer 1 : 1.000 selama 1 jam
7. Cuci dengan TBS tween 5 x
8. Inkubasi dengan immunoglobulin *anti mouse* yang dilabel Alkaline Phosphatase selama 1 jam
9. Cuci dengan TBS tween 0,05% selama 5 x
10. Tambahkan substrat BCIP/NBT
11. Setelah pita muncul, reaksi dihentikan dengan memasukkan membrane dalam aquades

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

*P.falciparum* yang dipakai pada penelitian ini adalah *P.falciparum* yang di dapat pada penelitian yang lalu, yaitu *P.falciparum* yang diperoleh dari Pulau Kangean Kabupaten Sumenep Jawa Timur (K48). *P.falciparum* ini merupakan salah satu dari *P.falciparum* yang pada penelitian yang lalu diketahui mempunyai gen penyandi protein domain immunogenik PfSERA dengan urutan nukleotida yang paling konserve. Pada penelitian yang lalu, sampel diperoleh dari penderita malaria yang didapat dari beberapa daerah endemis di Indonesia yaitu di P.Halmahera, P.Buru, Jayapura, Maumere, P.Kangean di Kabupaten Sumenep dan di desa Dongko Kabupaten Trenggalek Propinsi Jawa Timur.

Dilakukan amplifikasi gen protein domain immunogenik PfSERA. Primer yang dipakai adalah sepasang primer yang spesifik yaitu 5'CACCGGCTGCAGACGCATACACACAAACATTGTCATTA3' dan 5'GGGGATCCTTCAAGTTGGTAGTATATATTAAG GA3' dan didapatkan hasil PCR sekitar 1.025 bp. Untuk primer forward, telah ditambahkan nukleotida CACC pada ujung 5' yang nantinya akan berikatan dengan vektor pTE101/D-TOPO yang mempunyai overhang GTGG yang komplementer dengan CACC.

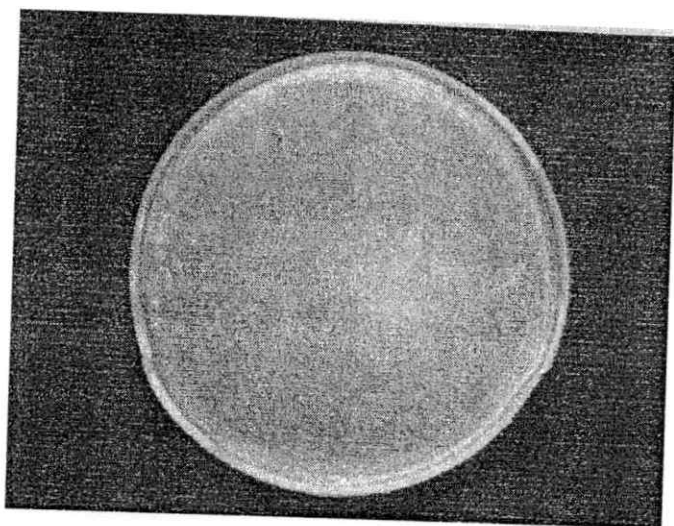


Gambar 5.1. Elektroforesis hasil PCR amplifikasi gen protein domain immunogenik PfSERA.

M : marker ladder 100 bp, 1 adalah sampel dari pulau Kangean

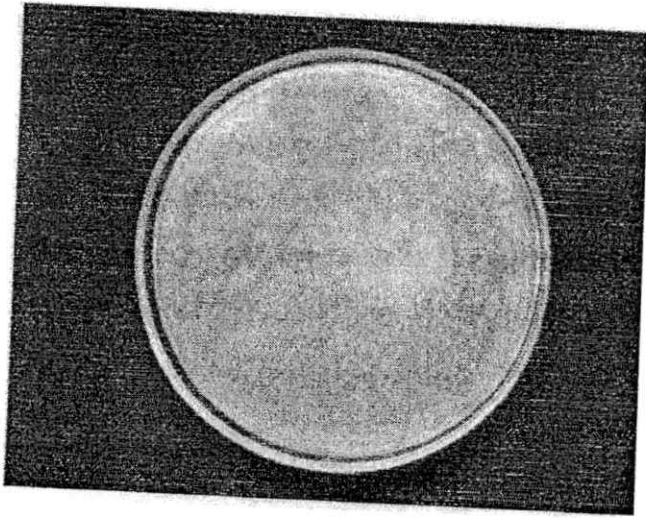
Selanjutnya dilakukan pemurnian hasil PCR yang didapat dengan menggunakan *high pure PCR product purification kit*. Kemudian hasil PCR yang telah dimurnikan dapat disimpan pada  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk selanjutnya dilakukan kloning dan ekspresi.

Hasil PCR yang telah dipurifikasi di insersikan ke vektor pET101/D-TOPO. Vektor pET101/D-TOPO (Situmeang, 2007) mempunyai ukuran sebesar 5753 bp dan berbentuk linier. Vektor plasmid ini mempunyai gen resisten terhadap ampicillin, sehingga jika plasmid rekombinan ini berhasil ditransformasikan pada *E.coli* TOP 10, bakteri tetap tumbuh walau dibiakkan dalam media selektif yang mengandung ampicillin. Bakteri akan memperbanyak diri yang diikuti dengan vektor yang telah disisipi hasil PCR, sehingga akhirnya akan diperoleh sel transforman beserta plasmid rekombinan yang dikandungnya.



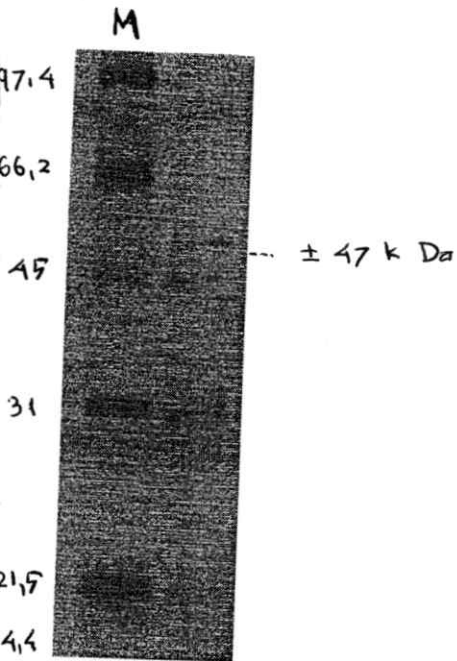
Gambar 5.2. Kultivasi sel transforman (*E.coli* TOP 10 yang mengandung plasmid rekombinan)

Untuk mengekspresikan protein PfSERA perlu di transformasikan ke *E.coli* BL-21 *star*. Oleh karena itu harus dilakukan isolasi plasmid rekombinan yang ada da sel transforman. Untuk ini digunakan *High-Speed Plasmid Mini Kit* (IBI). Plasmid rekombinan yang diperoleh selanjutnya ditransformasikan ke *E.coli* BL-21 *star* untuk diekspresikan (Situmeang, 2007).

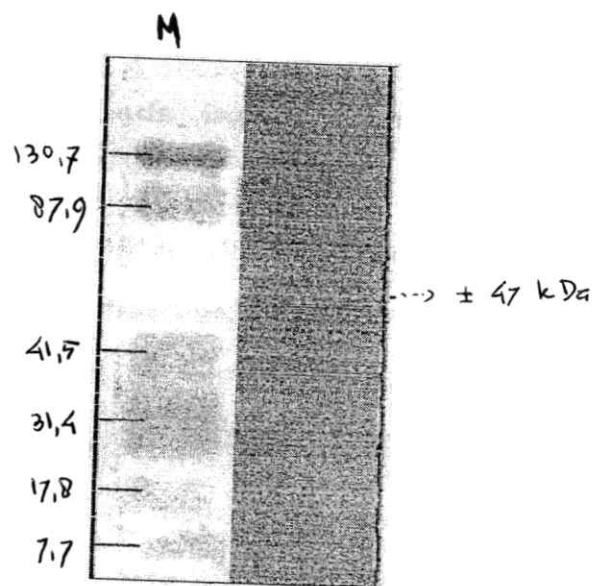


Gambar 5.3. Kultivasi sel transforman (*E. coli* BL-21 *star* yang mengandung plasmid rekombinan)

Setelah dilakukan purifikasi protein rekombinan, dilakukan karakterisasi dengan menggunakan SDS-PAGE yang dilanjutkan dengan Western Blot.



Gambar 5.4. SDS-PAGE protein rekombinan. Lane 1 Marker, 2 Protein rekombinan



Gambar 5.5. Western blot protein rekombinan.

Dari analisis yang telah dilakukan ditemukan protein rekombinan dengan berat molekul 47 kDa. Hal ini sesuai dengan yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu.

Pemakaian PfSERA sebagai kandidat vaksin terhadap penyakit malaria yang disebabkan oleh *P.falciparum* sangat menjanjikan karena diversitas genetiknya tidak terlalu besar (Indri *et al.*, 2005), dibandingkan dengan kandidat vaksin yang lain seperti MSP1 yang mempunyai diversitas genetik yang sangat besar (Ferreira *et al.*, 1998a., Ferreira *et al.*, 1998b). Dengan diperolehnya protein rekombinan PfSERA diharapkan dapat diperoleh vaksin yang khas untuk Indonesia dalam hal ini adalah Indonesia Timur.

Sampel yang dipakai pada penelitian ini berdasarkan sampel yang diperoleh pada penelitian terdahulu yang diambil dari daerah endemis malaria di Indonesia bagian Timur (dari Propinsi Jawa Timur ke arah Timur). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian serupa yang sampelnya diambil dari daerah endemis malaria di Indonesia bagian Barat.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Pada penelitian ini telah berhasil diekspresikan gen protein domain immunogenik PfSERA dan diperoleh protein rekombinan dengan berat molekul 47kD.

#### **6.2. Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji potensi protein rekombinan PfSERA.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aoki S, Li J, Itagaki S, Okech BA, Egwang TG, Matsuoka H, Palacpac NM, Mitamura H, Horii T, 2002. Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *P.falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. *Journal of Biological Chemistry* 277 (49) : 47533 - 40.
- Ayala FJ, Escalante AA, Lal AA, Rich SM, 1998. Evolutionary relationships of human malaria parasites. In (Sherman IW eds). *Malaria : parasite biology, pathogenesis and protection*. Washington DC : ASM Press, pp.285 - 300.
- Ballou WR, Herrera MA, Carucci D, Richi T, Corradin G, Diggs C, Druilhe P, Giersing BK, Saul A, Heppner DG, Kester KE, Lanar DE, Lyon J, Hill AVS, Pan W, and Coehen JD, 2004. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (Suppl 2) : 239 - 247).
- Banic DM, Delplace P, Mazingue C, and Camus D, 1994. H-2<sup>b</sup> restriction of the immune response to the p126 *Plasmodium falciparum* antigen. *Clinical Experimental of Immunology* 95 : 472 - 478.
- Banic DM, Oliveira-Ferreira JD, Pratt-Riccio LR, Conseil V, Goncalves D, Fialho RR, Gras-Masse H, Daniel-Ribeiro CT, Camus D, 1998. Immune response and lack of immune response to *Plasmodium falciparum* P126 antigen and its amino - terminal repeat in malaria infected humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58 (6) : 768 - 774.
- Bhatia A, Delplace P, Fortier B, Dubremetz JF, 1987. Immunochemical analysis of a major antigen of *Plasmodium falciparum* (P126) among ten geograhpic isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36 (1) : 15 - 19.
- Brown GV, 2002. Malaria : a global crisis. *Dev Biol* 110 : 37 - 45.
- Bzik DJ, Li W, Horii T, Inselburg J, 1988. Amino acid sequence of the serin repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30 : 279 - 288.
- Bzik DJ, Peck JY, Fox BA, 1992. Mung bean nuclese exhibits an exon-excision activity upon the *Plasmodium falciparum* SERA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 56 : 185 - 188.
- Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H, 2002. Malaria vaccine : candidate antigens, mechanism, constraints and prospects. *Scandinavian Journal of Immunology* 56 (4) : 327 - 43.
- Dachlan YP, 2000. Situation and diagnosis of malaria in Indonesia. The Toyota Foundation Mini-Symposium on malaria : Diagnosis and control of malaria in Asia and Brazil. Faculty of Tropical Medicine Mahidol University, Bangkok, January 13 - 14.
- Debrabant A, Maes P, Delplace P, Dubremetz F, Camus D, 1992. Intramolecular mapping of *P.falciparum* p126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Moleculat and Biochemical Parasitology* 53 : 89 - 95.

- Delplace P, Dubremetz JF, Fortier B, Vernes A, 1985. A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release – reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 17 : 239 – 251.
- Delplace P, Fortier B, Tronchin G, Dubremetz JF, Vernes A, 1987. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23 : 193 – 201.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1994. Profil Kesehatan Indonesia. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pusat Data Kesehatan, Jakarta.
- Department of Information Republic of Indonesia, 1997. Indonesia 1997 An official handbook. Perum Percetakan Negara RI.
- Dinas Kesehatan Daerah Tingkat I Propinsi Jawa Timur, 1998. Profil Kesehatan Propinsi Jawa Timur 1998, Surabaya.
- Doolan DL, Hoffman SL, 1997. Multi-gene vaccination against malaria : a multistage, multi-immune response approach. *Parasitology Today* 13 (5) : 171 – 178.
- Engers HD, Godal T, 1998. Malaria vaccine development : Current status. *Parasitology Today* 14 (2) : 56 – 64.
- Enserink M, 2005. Source of new hope against malaria is in short supply. *Science* 307 : 33.
- Ferreira MU, Liu Q, Kimura M, Ndawi BT, Tanabe K, Kawamoto F, 1998a. Allelic diversity of the merozoite surface protein 1 and epidemiology of multiple clone *Plasmodium falciparum* infections in Northern Tanzania. *Journal Parasitology* 84 : 1286 – 1289.
- Ferreira MU, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Thien HV, Isomura S, Tanabe K, Kawamoto F, 1998b. Stable patterns of allelic diversity at the merozoite surface protein 1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolate from Southern Vietnam. *Journal Eukaryotic Microbiology* 45 : 131 – 136.
- Fox BA, Bzik DJ, 1994. Analysis of stage specific transcripts of the *Plasmodium falciparum* serin repeat antigen (SERA) gene and transcription from the SERA locus. *Molecular and Biochemical Parasitology* 68 : 133 – 144.
- Fox BA, Xing-Li P, Suzue K, Horii T, Bzik DJ, 1997. *Plasmodium falciparum* : an epitope within a highly conserved region of the 47-kDa amino terminal domain of the serin repeat antigen is a target of parasite – inhibitory antibodies. *Experimental Parasitology* 85 : 121 – 134.
- Ghosh A, Edwards, Jacob-Lorena M, 2000. The journey of the malaria parasite in the mosquito : Hopes for the new century. *Parasitology Today* 16 (5) : 196 – 201.
- Fox BA, Xing-Li P, Suzue K, Horii T, Bzik DJ, 1997. *P.falciparum* : an epitope within a highly conserved region of the 47-kDa amino terminal domain of the serine repeat antigen is a target of parasite – inhibitory antibodies. *Experimental Parasitology* 85 : 121 – 134.

- Horii T, Bzik DJ, Inselburg J, 1988. Characterization of antigen – expressing *Plasmodium falciparum* cDNA clones that are reactive with parasite inhibitory antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30 : 9 – 18.
- Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Ailong TT, Gerena L, Garcia T, Solari L, Magili AJ, Kanbara H, 2004a. Polymorphism of the *P.falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 70 (5) : 461 -466.
- Huaman MC, Yoshinaga K, Suryanatha A, Suarsana N, Kanbara H, 2004b. Short report : polymorphism in the chloroquine resistance transporter gene in *P.falciparum* isolate from Lombok, Indonesia. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. In Press
- Indri S, Nidom CA, Dachlan YP, Arwati H., 2005. Analisis variasi sekuens regio ulangan oktamer dan regio ulangan serin gen SERA pada isolat *P.falciparum*, suatu calon subunit vaksin potensial khas Indonesia. *Penelitian Hibah Bersaing XII*.
- Inselburg J, Bzik DJ, Li WB, Green KM, Kansopon J, Hahm BK, Bathurst IC, Barr PJ, Rossan RN, 1991. Protective immunity induced in *Aotus Monkeys* by recombinant SERA proteins of *P.falciparum*. *Infection and Immunity* 59 (4) : 1247 – 1250.
- Kaplan JM, Burns Jr JM, Vaidya AB, Webster HK, Weidanz WP, 1993. Malaria. In (Warren KS eds) *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, Blackwell Scientific Publication, pp.302 - 351.
- Kaplan JM, Burns Jr JM, Vaidya AB, Webster HK, Weidanz WP, 1993. Malaria. In (Warren KS eds) *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, Blackwell Scientific Publication, pp.302 - 351.
- Knapp B, Hundt E, Nau U, Kupper HA, 1989. Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *P.falciparum* characterized by serine stretch. *Molecular and Biochemical Parasitology* 32 : 73 – 84.
- Knell AJ, 1991. *Malaria*. Oxford, Oxford University Press, pp. 1 - 89.
- Kuntarijanto, 2000. Strategi program pemberantasan penyakit malaria di Propinsi Jawa Timur tahun 2000 – 2005. Pelatihan mikroskopis malaria. TDC Universitas Airlangga, 22 – 27 Juni 2000.
- Lanzer M, de Bruin D, Wertheimer SP, Ravetch JV, 1994. Organization of chromosomes in *Plasmodium falciparum* : A model for generating karyotypic diversity. *Parasitology Today* 10 (3) : 114 -117.
- Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Raquel A, Fuentes M, Carrasquel A, Barker Jr RH, 1994. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazone. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50 (2) : 169 – 180.

- Li J, Mitamura T, Fox BA, Bzik DJ, Horii T, 2002. Differential localization of processed fragments of *P.falciparum* serine repeat antigen and processing of its N-terminal 46 kDa fragment. *Parasitology International* 51 (4) : 343 - 52.
- Liu Q, Ferreira MU, Ndawi BT, Ohmae H, Adagu IS, Morikawa T, Horii T, Isomura S, Kawamoto F, 2000. Sequence diversity of serine repeat antigen gene exon II of *P.falciparum* in worldwide collected wild isolates. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health* 31 (4) ; 808 - 817.
- Li WB, Bzik DJ, Horii T, Inselburg J, 1989. Structure and expression of the *Plasmodium falciparum* SERA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33: 13 - 26.
- Lopez-Antunano FJ and Schmunis GA, 1993. Plasmodia of human. In (Kreier JP eds) *Parasitic protozoa*. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Academic Press Inc, pp.135 - 266.
- Lyon AL, Thomas AW, Hall T, Chulay JD, 1989. Specificities of antibodies that inhibit merozoite dispersal from malaria infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36 : 77 - 86.
- Manson-Bar PEC, Bell DR, 1987. *Manson Tropical Disease*. 19<sup>th</sup> edition. London: ELBS/Bailliere Tindal, pp. 3 - 51.
- Millert SK, Good RT, Drew DR, Delorenzi M, Sanders PR, Hodder AN, Speed TP, Cowman AF, de Koning-Ward TF, 2002. A subset of *P.falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (49) : 47524 - 47532.
- Moreno A, Patarroyo ME, 1995. Malaria vaccines. *Current Opinion in Immunology* 7 : 607 - 611.
- Morimatsu K, Morikawa T, Tanabe K, Bzik DJ, Horii T, 1997. Sequence diversity in the amino terminal 47 kDa fragment of the *P.falciparum* serine repeat antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 86 : 249 - 254.
- Nagesha HS, Casey GJ, Rieckmann KH, Friyauff DJ, Laksana BS, Reeder JC, Maguire J, Baird JK, 2003. New haplotypes of the *P.falciparum* chloroquine resistance transporter (PFCRT) gene among chloroquine-resistant parasite isolates. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 68 (4) : 398 - 402.
- Okech B, Mujizi G, Ogwal A, Shirai H, Horii T, Egwang T, 2006. High titer of IgG antibodies against *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SERA %) are associated with protection against severe malaria in Ugandan children. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 74 (2) ; 191- 197
- Oemijati S, 1998. Parasitic infection in Indonesia. Dipresentasikan pada WHO Seminar on new concepts for old diseases : Innovative approaches in research on parasitic diseases, Jakarta 1 September 1998.
- Olliaro P, Cattani J, Wirth D, 1996. Malaria, the submerged disease. *JAMA SEA* (June) : 25 - 28.

- Pal-Bhowmick I., Hardeep KV, Jaya R, Shobhona, and Gotam KJ, 2006. Generation and characterisation of monoclonal antibodies specific to *Plasmodium falciparum* enolase. *J Vect Borne Dis* 43 (June) : 43–52
- Perkins ME, Ziefer A, 1994. Preferential binding of *P.falciparum* SERA and Rhoptry proteins to erythrocyte membrane inner leaflet phospholipids. *Infection and Immunity* 62 (4) : 1207 – 1212.
- Ragge K, Aronold HH, Tummler M, Knapp B, Hundt E, Lengelbach K, 1990. In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serin rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochem Parasitology* 42 : 93 – 100.
- Riccio EKP, Zalis MG, Guedes HCB, Banic DM, Souza JM, Alecrim W, Camus D, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF, 2005. Genetic polymorphism of the serine rich antigen N-terminal region in *Plasmodium falciparum* field isolates from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 100 (1) : 47 – 49.
- Rich SM, Hudson RR, Ayala FJ, 1997. *P.falciparum* antigenic diversity : Evidence of clonal population structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 94 : 13040 – 13045.
- Safuruddin D, Asih PBS, Aggarwal SL, Shanka AH, 2003. Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *P.falciparum* in Purwokerto District, Central Java Province, Indonesia. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 69 (6) : 614 - 620.
- Situmeang R, 2007. Klonong, ekspresi dan karakterisasi molekuler gen penyandi protein E2 virus Hog cholera isolat lokal sebagai kandidat vaksin subunit. Disertasi PPs Universitas Airlangga.
- Soekirno M, 1996. Endemisitas malaria di Halmahera, Maluku Utara, Indonesia bagian Timur. *Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia, Th. XXIV* (6) : 398 – 401.
- Soe S, Singh S, Camus D, Horii T, Druilhe P, 2002. *P.falciparum* serine repeat protein, a new target of monocyte-dependent antibody-mediated parasite killing. *Infection and Immunity* 70 (12) : 7182 – 7184.
- Strickland GT, 1991. Infection of the blood and reticuloendothelial system. In (Strickland GT eds) *Tropical Medicine*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia : W.B.Saunders Company, pp. 586 - 602.
- Suzue K, Ito M, Matsumoto Y, Tanioka Y, Horii T, 1997. Protective immunity induced in *squirrel monkeys* with recombinant serine repeat antigen (SERA) of *P.falciparum*. *Parasitology International* 46 : 17 – 25.
- Tine JA, Lanar DE, Smith DM, Wellde BT, Schultheiss P, Ware LA, Kauffman EB, Wirtz RA, Taisne CD, Hui GS, Chang SP, Church P, Hollingdale MR, Kaslow DC, Hoffman S, Guito KP, Ballou WR, Sadoff JC, Paoletti E, 1996. NYVAC-Pf7 : a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *P.falciparum* malaria. *Infection and Immunity* 64 (9) : 3833 – 3844.

- Trigg PI and Kondrachine AV, 1998. The current global malaria situation. In (Sherman IW eds). Malaria : parasite biology, pathogenesis and protection. Washington DC : ASM Press, pp.11 - 22.
- Waters AP, Mota MM, Dijk MR, and Janse CJ, 2005. Malaria vaccine : Back to the future ? Science 2005 : 528 – 530.
- Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF, 2002. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. Immunol Cell Biol 80 (5) : 401 - 14.
- WHO, 1997a. World malaria situation in 1994. Weekly Epidemiological Record 72 (36): 269 – 275.
- WHO, 1997b. World malaria situation in 1994. Weekly Epidemiological Record 72 (38): 285 – 290.
- WHO, 1997c. Malaria : In the Southeast Asia region. 50 years : commemorative series - 1. New Delhi : Regional Office for Southeast Asia.
- WHO, 2000. Malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. <http://www.micro.msb.le.ac.uk/224/Malaria.html>.

