

# BIOTEKNOLOGI SEBAGAI SENJATA MENGHADAPI SERANGAN MALARIA



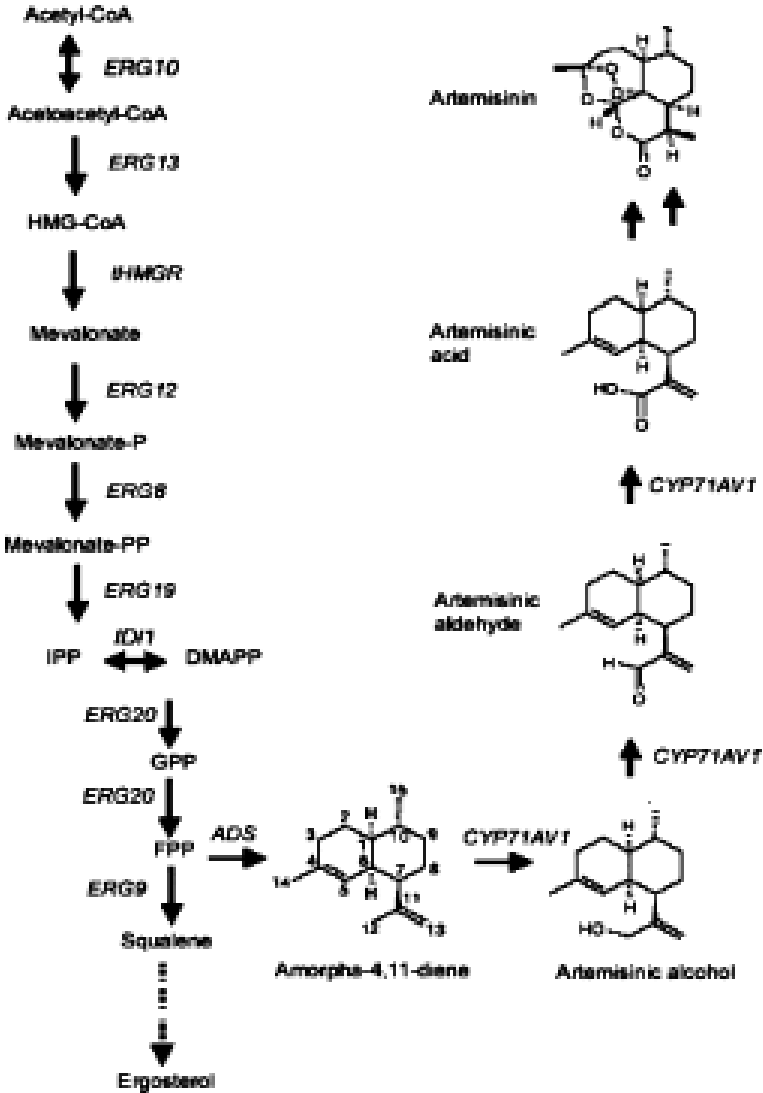
**ERIS SEPTIANA**  
 Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI  
 Jl Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911  
 Telp.0218754587; Fax. 0218754588  
 Email: septiana.eris@gmail.com

Penyakit malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina. Malaria masih merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dengan hampir separuh populasi dunia yang beresiko terjangkit. Sekitar 300-500 juta kasus malaria telah dilaporkan di seluruh dunia dan lebih dari 1 juta orang meninggal tiap tahunnya (Murray dkk. 2012). Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit malaria, salah satunya dengan penggunaan obat-obatan. Kloroquin, quinin, sulfodaxin, dan artemisinin merupakan obat antimalaria yang digunakan secara luas di seluruh dunia. Penggunaan obat antimalaria ternyata masih menimbulkan resistensi parasit, bahkan telah dilaporkan adanya resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria terbaru yaitu artemisinin (Jiazhong dkk. 2013). Oleh karena itu, upaya yang bisa dilakukan selain dengan pencarian bahan obat baru ialah dengan mengintervensi fase pertumbuhan parasit melalui siklus hidupnya.

Perkembangan parasit dalam tubuh nyamuk sangat kompleks dan melibatkan tahap-tahap perkembangan yang rumit (dimulai dengan fase gametogenesis, fertilisasi, zygot,

ookinet, dan pembentukan oosis) dan melewati dua lapisan epitelium nyamuk (perut dan

kelenjar air liur) (Taylor 1999). Tahap selanjutnya ialah perbanyakkan jumlah parasit yang



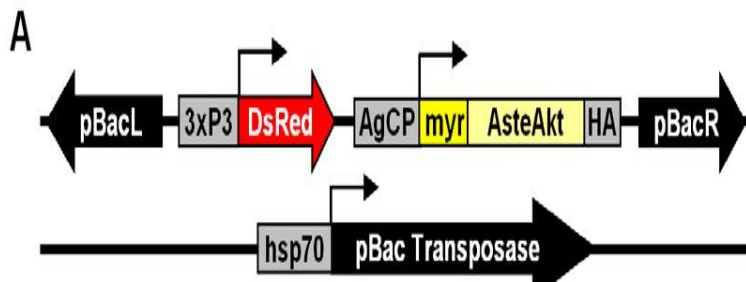
**Gambar 1.** Jalur biosintesis artemisinin dengan bantuan khamir *Saccharomyces cerevisiae* hasil rekayasa genetika (Ro dkk. 2006).

signifikan dan kemudian masing-masing oosit mengeluarkan ribuan sporozoit ke dalam hemocoel lalu masuk ke dalam kelenjar air liur nyamuk. Parasit kemudian menyebar melalui gigitan nyamuk yang terinfeksi. Nyamuk mempunyai peran yang sangat penting dalam penyebaran parasit, oleh karena itu upaya menghalangi kemampuan nyamuk dalam mendukung perkembangan parasit akan menurunkan atau menghilangkan penyebaran malaria (Wang & Jacobs-Lorena 2013). Perkembangan ilmu bioteknologi memberikan peluang bagi pengembangan penanggulangan penyakit malaria. Beberapa aspek bioteknologi yang dapat digunakan antara lain produksi artemisinin dengan

sudah mulai dikembangkan. Artemisinin merupakan sebuah senyawa lakton endoperoksida yang diisolasi dari trikoma glandular daun *Artemisia annua* L. yang sampai saat ini memiliki permintaan pasar yang besar sebagai obat antimalaria. Akan tetapi, keterbatasan rendemen ekstrak yang didapatkan dari daun *Artemisia annua* dan belum ditemukannya senyawa kimia turunan dari artemisinin yang memiliki aktivitas lebih baik merupakan kendala terpenting dari produksi artemisinin (Al-Qurainy & Khan 2010). Senyawa artemisinin yang dihasilkan sangat bergantung pada jumlah dan umur daun dimana hanya daun yang sudah tua yang memiliki kandungan artemisinin tertinggi.

pencarian gen dan telah berhasil mengklon beberapa gen dari *Artemisia annua* yang bertanggung jawab dalam biosintesis artemisinin yaitu HMGR/HMG, FDPS/FPS, ADS, dan CPR yang diisolasi dari sitosol, DXS dan DXR yang diisolasi dari plastida serta CYP71AVI dan SS/QS yang diisolasi dari retikulum endoplasma (Zeng dkk. 2008). Lebih lanjut enzim *Amorpha-4,11-diene synthase* dan *Cytochrome P450 monooxygenase* bertanggung jawab secara langsung terhadap biosintesis artemisinin, sedangkan enzim *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase* dan *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase* bertanggung jawab secara tidak langsung. Selain itu, pemanfaatan mikroba juga digunakan dalam produksi artemisinin (Zeng dkk. 2008).

Penggunaan khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang telah direkayasa genetika mampu memproduksi asam artemisinat melalui transfer multi gen (Ro dkk. 2006). Dalam penelitian mereka, gen ADS dan HMGR ditransfer ke dalam sel khamir masing-masing untuk menstimulasi *amorpha-4,11-diene* dan meningkatkan kadar FPP. Selanjutnya tingkat FPP dan *amorpha-4,11-diene* didapatkan melalui reduksi biosintesis sterol dengan cara menekan ekspresi gen SS dengan sebuah promoter metionin. Selanjutnya gen CYP71AVI dan CPR ditambahkan ke dalam sel khamir agar mampu melakukan oksidasi tiga tahap dari *amorpha-4,11-diene* menjadi asam artemisinat (Gambar 1). Penggunaan khamir transgenik dapat menghasilkan tingkat asam artemisinat yang sama dengan *Artemisia annua* dalam hal jumlah



**Gambar 2.** Skema konstruksi gen-gen penyandi pada rekayasa genetika dalam tubuh nyamuk *Anopheles stephensi* (A) dan perbandingan antara larva nyamuk instar IV transgenik sebelah kanan dan non-transgenik sebelah kiri yang disinari oleh cahaya putih, dibawah cahaya floresensi dan filter *DsRed*, serta gabungan dari keduanya (B) (Corby-Harris dkk. 2010).

memanfaatkan mikroorganismenya termodifikasi, rekayasa genetika nyamuk antiplasmodium, paratransgenesis, dan pengembangan vaksin.

### Rekayasa genetika produksi artemisinin

Artemisinin merupakan obat malaria yang masih digunakan sampai sekarang dan bahkan turunan dari artemisinin juga

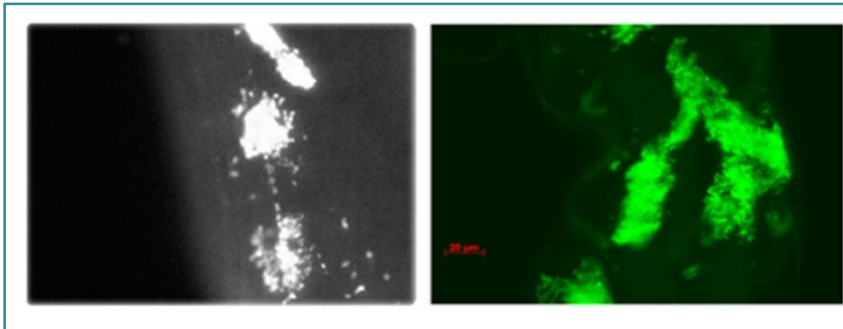
Artemisinin tidak dijumpai di bagian lain dari tanaman *Artemisia annua* selain di daun (Lommen dkk. 2006). Untuk mengatasi jumlah ekstrak artemisinin yang terbatas, maka para peneliti mulai melakukan rekayasa genetika untuk mendapatkan artemisinin yang lebih banyak dan cepat.

Sejak sekitar 20 tahun yang lalu, para peneliti telah melakukan

tetapi dalam waktu yang lebih singkat dari selama beberapa bulan menjadi hanya 4-5 hari. Selain itu, pemanfaatan khamir transgenik menunjukkan kelebihan dalam skala besar. Terlebih, sekresi asam artemisinin ke dalam media oleh sel khamir lebih mudah dalam hal pemisahan dan pemurnian produk (Zeng dkk. 2008).

insulin dalam perut nyamuk vektor. Lebih lanjut, ekspresi protein *Akt* yang berlebih dalam perut nyamuk *Anopheles stephensi* telah dilaporkan secara signifikan mengurangi intensitas parasit *Plasmodium falciparum* dengan cara memperkuat sistem kekebalan nyamuk (Corby-Harris dkk. 2010). Oleh karena itu penyebaran sporozoit penyebab

proliferasi mikroba flora normal, dan meningkatkan ketahanan nyamuk terhadap serangan bakteri Gram negatif yang berada dalam tubuh nyamuk (Dong dkk. 2011). Selain rekayasa genetika pada nyamuk untuk menanggulangi persebaran penyakit malaria, rekayasa genetika flora normal yang bersimbiosis dengan nyamuk vektor juga bisa dilakukan. Teknik rekayasa ini dikenal dengan istilah paratransgenesis.



**Gambar 3.** Bakteri *Asaia* tanpa protein penanda floresen hijau (kiri) dan dengan protein penanda floresen hijau (kanan) di dalam perut nyamuk *Anopheles stephensi* dewasa (Favia dkk. 2012).

### Rekayasa genetika nyamuk antiplasmodium

Kompleksitas dari daur hidup parasit dan cepatnya reproduksi nyamuk vektor memberi pengaruh besar pada penyebaran malaria. Nyamuk antimalaria hasil rekayasa genetika merupakan salah satu cara dalam menanggulangi penyebaran penyakit malaria. Parasit penyebab malaria dapat ditekan dengan cara mengaktifkan protein penyandi *Akt* dalam tubuh nyamuk vektor (Gambar 2). Protein *Akt* ini merupakan protein yang sangat penting dalam pengaturan proses di dalam sel yang meliputi metabolisme glukosa, apoptosis, dan sintesis antioksidan. Selain itu protein *Akt* ini juga berperan dalam pengaturan mekanisme fisiologis seperti reproduksi dan produksi

infeksi melalui nyamuk vektor dapat dihilangkan.

Penelitian lain juga melaporkan bahwa nyamuk hasil rekayasa genetika *Anopheles stephensi* yang menyandikan protein transgenik *Re12* di dua tempat yaitu perut dan jaringan lemak setelah menghisap darah, dimana saat tersebut akan mengaktifkan ekspresi beberapa antiplasmodium gen efektor. Lebih lanjut dijelaskan bahwa pengaruh protein *Re12* dapat meningkatkan respon imun alamiah pada tubuh nyamuk terhadap perkembangan parasit dan ekspresi yang berlebih dari beberapa gen efektor antiplasmodium (*TEP1*, *APL1*, *LRRD7*) dalam tubuh nyamuk transgenik. Adanya ekspresi yang berlebih dari protein *Re12* baik di perut maupun jaringan lemak tubuh nyamuk akan membatasi

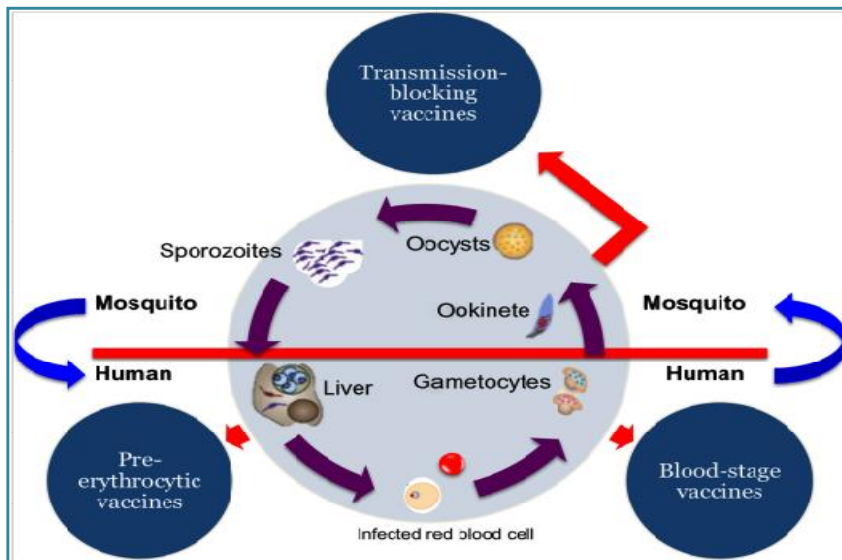
### Paratransgenesis

Paratransgenesis merupakan rekayasa genetika terhadap mikroorganisme yang berasosiasi dengan serangga inang. Inti dari teknik paratransgenesis yang digunakan untuk mengendalikan malaria ialah bahwa dalam kenyataannya mikrobiota nyamuk dan parasit *Plasmodium* berbagi ruang yang sama yaitu di bagian perut, dimana tahap yang paling riskan dari perkembangan parasit terjadi. Dengan pertimbangan tersebut maka dimungkinkan sebuah metode yang dapat bersinggungan langsung dengan penyebaran malaria melalui rekayasa genetika mikroorganisme simbiosis dalam perut nyamuk untuk mengirimkan molekul antiplasmodium (Hurwitz dkk. 2011). Percobaan paratransgenesis pertama kali dilakukan untuk mengendalikan persebaran penyakit Chagas. Vektor penyakit ini berupa kumbang *Rhodnius prolixus* yang terinfeksi oleh *Trypanosoma cruzi*. Dalam perut kumbang terdapat beberapa jenis bakteri yang menyediakan nutrisi kepada kumbang. Bakteri tersebut kemudian ditumbuhkan di luar tubuh kumbang, dimodifikasi untuk mengekspresikan molekul

spesifik antiparasit dan diinfeksi kembali ke dalam kumbang vektor. Setelah diamati ternyata kumbang paratransgenik tersebut menunjukkan ketidakmampuan dalam menyebarkan parasit (Beard dkk. 2001).

Selain menggunakan bakteri, paratransgenesis juga menggunakan fungi. Fungi transgenik *Metharizium anisopliae* diinfeksi ke dalam tubuh nyamuk vektor melalui lapisan kutikula. Strain rekombinan dari fungi ini mengekspresikan tiga

replikasi pada tahap dalam darah, parasit mengalami perubahan morfologi dan memperlihatkan variasi antigen. Hal ini menjadikan parasit dapat menghindari respon imun dari inangnya. Sebagai dampaknya, respon imun alami inang yang biasanya terjadi pada kasus penyakit infeksi tidak terlihat pada kasus infeksi malaria. Walaupun terdapat beberapa kendala, bukti yang paling meyakinkan bahwa vaksinasi melawan malaria bisa dilakukan berdasarkan penelitian pada tikus, monyet, dan manusia yang diinfeksi dengan sporozoit yang dilemahkan akan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh (Arama & Troye-Blomberg 2014). Tiga tipe kandidat vaksin berdasarkan perbedaan target dalam tahap siklus hidup parasit yang telah dikembangkan yaitu *transmission-blocking vaccines* (TBVs), *pre-erythrocytic vaccines*, dan *blood-stage vaccines* (gambar 4).



**Gambar 4.** Situs target dalam siklus hidup malaria yang dapat diganggu oleh tiga tipe kandidat vaksin (Arama & Troye-Blomberg 2014).

Bakteri *Asaia* yang diisolasi dari nyamuk *Anopheles stephensi* merupakan salah satu bakteri simbiosis nyamuk vektor malaria yang digunakan dalam teknik paratransgenesis (Gambar 3). Bakteri ini ditemukan dalam perut, kelenjar liur, dan organ reproduksi nyamuk jantan dan betina serta terdeteksi di semua tahap perkembangan nyamuk vektor malaria. Bakteri ini juga mudah ditumbuhkan dalam media di luar habitat aslinya. Bakteri simbiosis ini menghasilkan molekul antiparasit di dalam tubuh nyamuk untuk menghambat penyebaran parasit. Lebih lanjut, bakteri ini juga dapat disebarkan dari induk ke anaknya dan antara jantan dan betina lewat perkawinan (Damiani dkk. 2010).

molekul efektor (SM1, antibodi untaun tunggal yang dinamakan PfNPNA-1 dan sebuah peptida antimikroba yang dinamakan *scorpine*) yang menyerang sporozoit parasit selama perjalanannya melewati hemolimfa menuju kelenjar liur yang digunakan untuk menghisap darah yang mengandung plasmodium sebelas hari sebelumnya (Fang dkk. 2011).

#### Vaksin

Pengembangan vaksin untuk penyakit malaria merupakan tema penelitian yang sangat dinamis dengan banyak sekali tantangan. Saat parasit berkembang mulai dari sporozoit yang berada dalam fase di dalam hati sampai siklus

*Transmission-blocking vaccines* (TBVs) bekerja dengan sasaran antigen dalam fase gamet, zygote, dan ookinete untuk mencegah perkembangan parasit di dalam perut nyamuk. Tujuan dari vaksin tipe ini ialah mengaktifkan antibodi untuk melawan antigen pada tahap seksual guna menghalangi transisi dari ookinete menjadi oosis dan menghentikan generasi selanjutnya dari sporozoit penyebab infeksi (Carter dkk. 2000). Salah satu vaksin golongan ini ialah antigen permukaan ookinete *P. falciparum* Pfs25. Golongan vaksin yang kedua ialah *pre-erythrocytic vaccines* yang bekerja dengan sasaran parasit pada tahap di dalam sel hati inang. Salah satu vaksin golongan ini ialah RTS,S yang terdiri atas sebuah protein *circumsporozoite protein* (CSP)

diperpendek yang secara langsung digabungkan ke antigen permukaan hepatitis B. Meskipun mekanisme kerja vaksin ini secara pasti belum diketahui, namun diduga vaksin ini mengaktifkan perlindungan terhadap malaria dengan cara mereduksi secara sementara jumlah merozoit yang muncul dari sel hati inang (Alonso dkk. 2004). Golongan ketiga ialah *blood-stage vaccines* yang didesain untuk mengekskresikan respon antiinvasi dan antipenyakit. Prinsip utamanya ialah jika vaksin dapat memblokir invasi eritrosit oleh merozoit, maka akan mencegah penyakit malaria. Salah satu vaksin terbaru yang sedang dikembangkan ialah antigen MSP3 yang terekspresi tinggi pada permukaan merozoit (Jepsen dkk. 2013.)

#### Daftar Pustaka

- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mnadomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M, Bassat Q, Aide P, Ofori-Anyinam O, Navia MM, Corachan S, Ceuppens M, Dubois MC, Demoitie MA, Dubovsky F, Menendez C, Tornieporth N, Ballou WR, Thompson R, dan Cohen J. (2004): Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial, *Lancet*, **364**, 1411-1420.
- Al-Qurainy F dan Khan S. (2010): Mutational approach for enhancement of artemisinin in *Artemisia annua*, *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**, 1714-1726.
- Arama C dan Troye-Blomberg M. (2014): The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives, *Journal of Internal Medicine*, **275**, 456-466.
- Beard CB, Dotsona PM, Pennington S, Eichler C, Cordon-Rosales R, dan Durvasula RV. (2001): Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease, *International Journal for Parasitology*, **31**, 621-627.
- Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, dan Saul A. (2000): Malaria transmission-blocking vaccines: how can their development be supported?, *Natural Medicine*, **6**, 241-244.
- Corby-Harris V, Drexler A, de Jong LW, Antonova Y, Pakpour N, Ziegler R, Ramberg F, Lewis EE, Brown JM, Luckhart S, dan Riehle MA. (2010): Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes, *PLoS Pathogen*, **6**, e1001003.
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Capone A, Ullisi U, Epis S, Genchi M, Sagnon N, Faye I, Kang A, Chouaia B, Whitehorn C, Moussa GW, Mandrioli M, Esposito F, Sacchi L, Bnadi C, Daffonchio D, dan Favia G. (2010): Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*, *Microbial Ecology*, **60**, 644-654.
- Dong Y, Das S, Cirimotich C, Souza-Neto JA, McLean KJ, dan Dimopoulos G. (2011), Engineered *Anopheles* immunity to *Plasmodium* infection, *PLoS Pathogen*, **7**, e1002458.
- Fang W, Vega-Rodriguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A, dan St Leger RJ. (2011): Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes, *Science*, **331**, 1074-1077.
- Favia G, Ricci I, Scuppa P, Damiani C, Rossi P, Capone A, De Freece C, Valzano M, Cappelli A, Mosca M, dan Ullisi U. 2012. Facing malaria parasite with mosquito symbionts, *Malaria Parasites*, Dr. Omolade Okwa (Ed.), ISBN: 978-953-51-0326-4. In Tech. <http://www.intechopen.com/books/malaria-parasites/facing-malaria-parasite-with-mosquito-symbionts>
- Hurwitz I, Fieck A, Read A, Hillesland H, Klein N, Kang A, dan Durvasula R. (2011): Paratransgenic control of vector borne diseases, *International Journal of Biological Science*, **7**, 1334-1344.
- Jepsen MP, Jogdand PS, Singh SK, Esen M, Christiansen M, Issifou S, Hounkpatin AB, Ateba-Ngoa U, Kremsner PG, Dziegiel MH, Olesen-Larsen S, Jepsen S,



- Mordmuller B, dan Theisen M. (2013): The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas, *Journal of Infectious Diseases*, **208**, 479-488.
- Jiazhong L, Li S, Bai C, Liu H, dan Gramatica P. (2013): Structural requirements of 3-carboxyl-4(1H)-quinolones as potential antimalarials from 2D and 3D QSAR analysis, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **44**, 266-277.
- Lommen WJ, Schenk E, Boumeester HJ, dan Verstappen FW. (2006): Trichomes dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves, *Planta Medica*, **72**, 336-345.
- Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, dan Lopez AD. (2012): Global malaria mortality between 1980-2010: a systematic analysis, *Lancet*, **379**, 413-431.
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, dan Keasling JD. (2006): Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast, *Nature*, **440**, 940-943.
- Taylor LH. (1999): Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles* mosquitoes in Tanzania, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **93**, 659-662.
- Wang S dan Jacobs-Lorena M. (2013): Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes, *Trends in Biotechnology*, **31**, 185-193.
- Zeng Q, Qiu F, dan Yuan L. (2008): Production of artemisinin by genetically-modified microbes, *Biotechnology Letters*, **30**, 581-592.