

## **ANALISIS GEN PENYANDI *Schistosoma japonicum* Gluthation s Transferase (SJ26GST) DI DATARAN TINGGI LINDU, SULAWESI TENGAH INDONESIA**

Anis Nurwidayati, Triwibowo A Garjito, Phetisya Pamela Frederika Sumolang, dan Risti

Balai Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang  
(P2B2) Donggala - Sulawesi Selatan Indonesia  
Email : [anisnurw21@gmail.com](mailto:anisnurw21@gmail.com)

## **ANALYSIS OF *Schistosoma japonicum* GLUTATHIONE S TRANSFERASE (SJ26GST) CODING GENE IN LINDU HIGHLAND, CENTRAL SULAWESI, INDONESIA.**

### **Abstract**

*Schistosomiasis is only found at Napu and Lindu highland, Central Sulawesi in Indonesia. Schistosomiasis still as a public health problem, with its prevalence increase every year. The large scale by mass drug treatment using praziquantel has done to reduce the prevalence since 1980. To look for the possibility evidence of the development of resistance in S. japonicum to praziquantel in endemic areas by analysis of Schistosoma japonicum Gluthation S Transferase (Sj26gst) Coding Gene. Moleculer laboratory study was conducted to analyse the sequences of S. japonicum gluthation s transferase gene (Sj26GST). DNA was extracted from adult S. japonicum using isopropanol. Sj26GST gene was amplified used gradient PCR. The PCR result then run with electrophoresis and viewed using gel-doc. The Sj26GST band was cut and purified using Gene Aid Purification kit and amplified by PCR cycle sequencing, and the product was sequenced using Abi PRISM 310 Genetic analyser. The gene sequences of Sj26GST analysis showed that the homology was very high between isolate from Indonesia and several isolates from China that known still susceptible to praziquantel.. The results indicate that there was no evidence for reduced susceptibility of S. japonicum to praziquantel despite its extensive use in the endemic areas of Napu and Lindu for more than 20 years.*

*Keywords : Drug Resistance, Praziquantel, Schistosoma Japonicum, Schistosomiasis*

### **Abstrak**

Schistosomiasis di Indonesia ditemukan di Dataran Tinggi Lindu, Napu, dan Bada Sulawesi Tengah. Schistosomiasis masih menjadi masalah kesehatan dengan angka kasus yang berfluktuasi setiap tahun. Obat praziquantel telah digunakan secara massal sejak tahun 1980an, sehingga perlu dilakukan analisis kerentanan cacing *Schistosoma japonicum* terhadap praziquantel. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kerentanan cacing *S. japonicum* terhadap praziquantel di Dataran Tinggi Lindu, dengan analisis secara molekuler gen penyandi *S. japonicum* yaitu *Gluthation S Transferase* (Sj26gst) yang merupakan target obat praziquantel. Analisis molekuler dilakukan untuk menganalisis sekuen gen Sj26GST (cacing *S. japonicum gluthation s transferase*). DNA cacing dewasa yang diperoleh dari pembedahan tikus di Dataran Tinggi Lindu diekstraksi dengan menggunakan isopropanol, kemudian diamplifikasi dengan PCR gradien. Produk PCR dielektroforesis dan pita DNA yang terbentuk dilihat dengan gel doc dan UV viewer. Pita DNA yang menunjukkan Sj26GST pada gel kemudian dipotong dan dipurifikasi menggunakan *Gene Aid Purification kit*, selanjutnya diamplifikasi dengan *PCR cycle sequencing*. Produk PCR kemudian disekuensing menggunakan *Abi PRISM 310 Genetic analyser*. Analisis sekuensing gen Sj26GST menunjukkan tidak ditemukan perubahan susunan basa penyusun titik katalis yang mempengaruhi perlekatan dengan substrat, yaitu tyrosin 7 menjadi phenilalanin sebagai indikator adanya mutasi. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa tidak ditemukan perubahan susunan gen penyandi Sj26GST pada cacing *S. japonicum* dari Dataran Tinggi Lindu.

Kata kunci : Resistensi Obat, Praziquantel, *Schistosoma Japonicum*, Schistosomiasis

## PENDAHULUAN

Schistosomiasis atau penyakit demam keong di Indonesia diketahui terdapat di Dataran Tinggi Lindu, Dataran Tinggi Napu, dan Dataran Tinggi Bada Sulawesi Tengah. Kasus penyakit ini pertama kali ditemukan oleh Muller dan Tesch (1937). Hospes perantara schistosomiasis ditemukan pada tahun 1971 dan diidentifikasi sebagai *Oncomelania hupensis lindoensis*.<sup>1</sup> Schistosomiasis masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di tiga wilayah endemis tersebut dengan prevalensi yang berfluktuatif setiap tahunnya, dan beberapa tahun terakhir ini cenderung meningkat. Pada tahun 2004, prevalensi pada manusia sebesar 0,52%, pada tahun 2005 prevalensi infeksi manusia mengalami peningkatan menjadi 1,03%. Prevalensi schistosomiasis di Dataran Tinggi Napu dan Dataran Tinggi Lindu meningkat sampai di atas 2% pada tahun 2008.<sup>2</sup> Prevalensi di daerah endemis baru Dataran Tinggi Bada mencapai diatas 2%.<sup>3</sup> Prevalensi schistosomiasis pada tahun 2010 di Dataran Tinggi Napu mencapai 4,78%, sedangkan di Dataran Tinggi Lindu mencapai 3,22%.<sup>2</sup>

Upaya kuratif yang dilakukan sejak tahun 1978 dalam upaya menurunkan kasus schistosomiasis pada manusia di Indonesia adalah dengan melakukan pengobatan selektif maupun massal dengan menggunakan *Praziquantel* (PZQ). PZQ adalah obat pilihan dan kemungkinan merupakan satu-satunya obat yang efektif yang tersedia untuk mengobati schistosomiasis pada manusia saat ini.

Penggunaan PZQ yang berlangsung lama dan terus menerus sebagai obat schistosomiasis dikhawatirkan akan dapat meningkatkan kekebalan *Schistosoma japonicum* dan dikhawatirkan sensitifitasnya akan menurun, dan dapat menimbulkan resistensi obat. Resistensi terhadap PZQ telah dilaporkan sehingga perlu dilakukan penelitian untuk penemuan obat baru.<sup>4</sup> Hasil penelitian yang dilakukan di Mesir pada tahun 1999 menunjukkan munculnya resistensi *S. mansoni* terhadap PZQ dosis normal.<sup>5</sup> Kerentanan cacing *S. japonicum* terhadap PZQ belum diketahui di Indonesia. Sehubungan dengan hal tersebut, perlu dilakukan kajian untuk mengetahui sensitifitasnya setelah pemakaiannya sejak tahun 1980-an di Indonesia.

Gen penyandi protein Sj26GST diketahui sebagai enzim detoksifikasi yang utama pada *S. japonicum*. Dalam kepentingan fisiologis, Sj26GST merupakan suatu protein detoksifikasi dan menjadi target obat serta vaksin, suatu protein *nonsubstrate* yang berperan dalam *ligand-binding* yang kemampuannya menghindarkan diri dari serangan sistem pertahanan tubuh hospes.

Resistensi terhadap inhibitor Sj26GST yaitu PZQ telah dilaporkan sehingga perlu dilakukan penelitian untuk penemuan obat baru.<sup>4</sup> Hasil penelitian yang dilakukan di Mesir pada tahun 1999 menunjukkan munculnya resistensi *S. mansoni* terhadap PZQ dosis normal.<sup>5</sup> Sejak diperkenalkan pertama kali di Indonesia pada tahun 1978, PZQ telah digunakan terus-menerus sepanjang tahun sampai dengan saat ini. Penggunaan PZQ yang berlangsung lama dan terus menerus sebagai obat schistosomiasis dikhawatirkan akan dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh pada *S. japonicum* dan dikhawatirkan sensitifitasnya akan menurun, atau bahkan dikhawatirkan dapat menimbulkan resistensi obat. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan identifikasi ada tidaknya perubahan susunan asam amino *Glutation S-Transferase* pada *S. japonicum* di Indonesia yang dapat mempengaruhi kerentanan terhadap penggunaan obat praziquantel.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan sampel cacing *Schistosoma japonicum*

Penelitian dilaksanakan di Dataran Tinggi Lindu dan Dataran Tinggi Napu. Sampel cacing dewasa diperoleh dengan cara melakukan penangkapan tikus di daerah fokus. Cacing yang ditemukan dipisahkan menurut jenisnya lalu dimasukkan dalam botol yang berisi formalin 10%, dan dipisahkan menurut asal dan jenis kelaminnya, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang diberi label LB cacing dari Lindu-Betina, LJ cacing dari Lindu-Jantan.

### Isolasi DNA cacing *Schistosoma japonicum*

Isolasi DNA/gena sampai dengan sekuensing dilakukan di Laboratorium Teknologi Gen, BPPT Tangerang. Isolasi DNA dilakukan menurut metode pearson H dan Stirling, D yang dimodifikasi.<sup>10</sup> Isolasi dimulai dengan

mencuci sampel dengan PBS sebanyak 2 kali untuk menghilangkan formalin. Masing-masing tabung sampel cacing ditambahkan 500 µl TE kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama ± 3 jam. Setelah sampel larut dengan sempurna, sampel disentrifugasi selama 10 menit. Hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung baru, ditambahkan 500 µl isopropanol dingin dan dicampurkan dengan cara membolak-balikkan tabung secara perlahan. Sampel diinkubasi overnight pada suhu -20°C dalam Revco, pada hari berikutnya sampel dikeluarkan sampel dari Revco dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 20 menit. Cairan supernatant dibuang dengan cara dipipet perlahan, sisakan sedikit di dekat dasar tabung, disentrifugasi dengan mini spin sebentar. Endapan / pellet yang terbentuk dicuci dengan alkohol 70% (500 µl), disentrifugasi pada kecepatan 1200 rpm, selama 10 menit dan diulang dua kali. Cairan dibuang, dan tabung dimasukkan ke *vacuum desiccator*. Pellet yang sudah bersih, kemudian ditambahkan eluen buffer (TE buffer, @ 20 µl), diinkubasi pada incubator suhu 55°C. Setelah proses isolasi selesai, sampel DNA disimpan di suhu -20°C. (Pearson H dan Stirling D, 2002)

#### Amplifikasi DNA Sj26GST

Konsentrasi DNA yang digunakan adalah 20ng ditambah 3 µL ddH<sub>2</sub>O. Selanjutnya ditentukan 8 suhu gradient antara 62-55°C, yaitu (62; 61,7; 61,3; 60,6; 59,8; 59; 58,1; 57,3; 56,4; 55,7; 55,4; dan 55) °C. Kondisi PCR gradient adalah denaturasi awal (94°C; 2 menit), denaturasi keseluruhan (94°C, 10 detik), *annealing* (suhu gradasi: 62°C – 55°C, @ 1 menit 30 detik), ekstension (72°C, 1 menit), elongasi (72°C, 7 menit), dan hold pada (4°C, ~). Amplifikasi dengan PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. (metode dari teknisi lab Teknologi Gen BPPT)

Untuk melihat hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan konsentrasi gel 1%, dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah itu dilakukan pemurnian DNA target dengan “*Gene Aid Purification kit*”. Proses selanjutnya adalah PCR *cycle sequencing*. Kondisi PCR *cycle sequencing* adalah sebagai berikut: pre-denaturasi (96°C, 2 menit), denaturasi (96°C, 10 detik), *annealing* (50°C, 5 detik), elongasi (60°C,

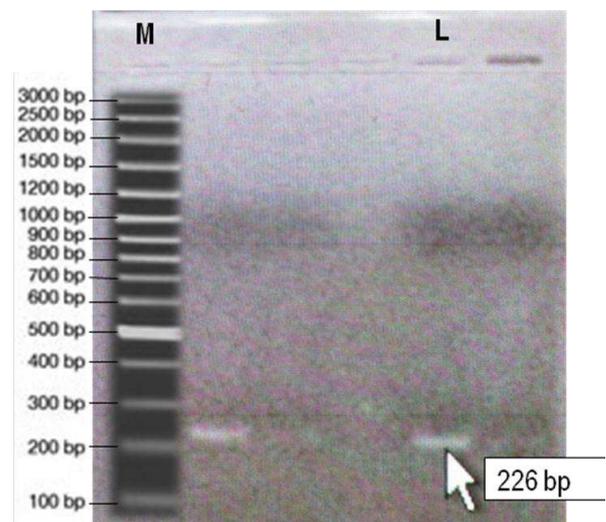
4 menit), hold (4°C, ∞). PCR berlangsung selama 25 siklus. (metode dari teknisi lab Teknologi Gen BPPT).

Setelah diperoleh produk PCR *cycle sequencing*, dilanjutkan dengan proses *sequencing* menggunakan “*Abi PRISM 310 Genetic analyser*”. Sampel diambil dari -20°C, kemudian disentrifuse dengan spin down sampai dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu tutup sampel digunting, ditempatkan di rak sampel *sequencer*, ditutup dengan tutup “Septa”. Setelah sampel selesai dimasukkan, maka proses sekuensing dijalankan. Hasil sekuen dicopy, kemudian dipaste di note pad, setelah itu dimasukkan ke program “blast” dan dilakukan analisis produk sekuen. (metode dari teknisi lab Teknologi Gen BPPT)

#### HASIL

Hasil analisis molekuler gen intron *Sj26GST* sebagai berikut. (Gambar.1)

#### 1. Hasil PCR Gen Intron *Glutation S Transferase (Sj26GST)* sampel cacing *S. japonicum* jantan dari Lindu (LJ)



**Gambar 1. Profil elektroforesis hasil PCR Gen *Glutation S Transferase (Sj26GST)* sampel cacing *S. Japonicum* jantan dari Lindu (LJ)**

Pada penelitian ini DNA total dari cacing *S.japonicum* betina tidak berhasil diisolasi karena jumlah sampel terlalu sedikit, sehingga

tidak dapat ditampilkan hasilnya.

**2. Hasil sekuensing Gen *Glutation S Transferase (Sj26GST)* sampel cacing *S. japonicum* jantan dari Lindu (LJ)**

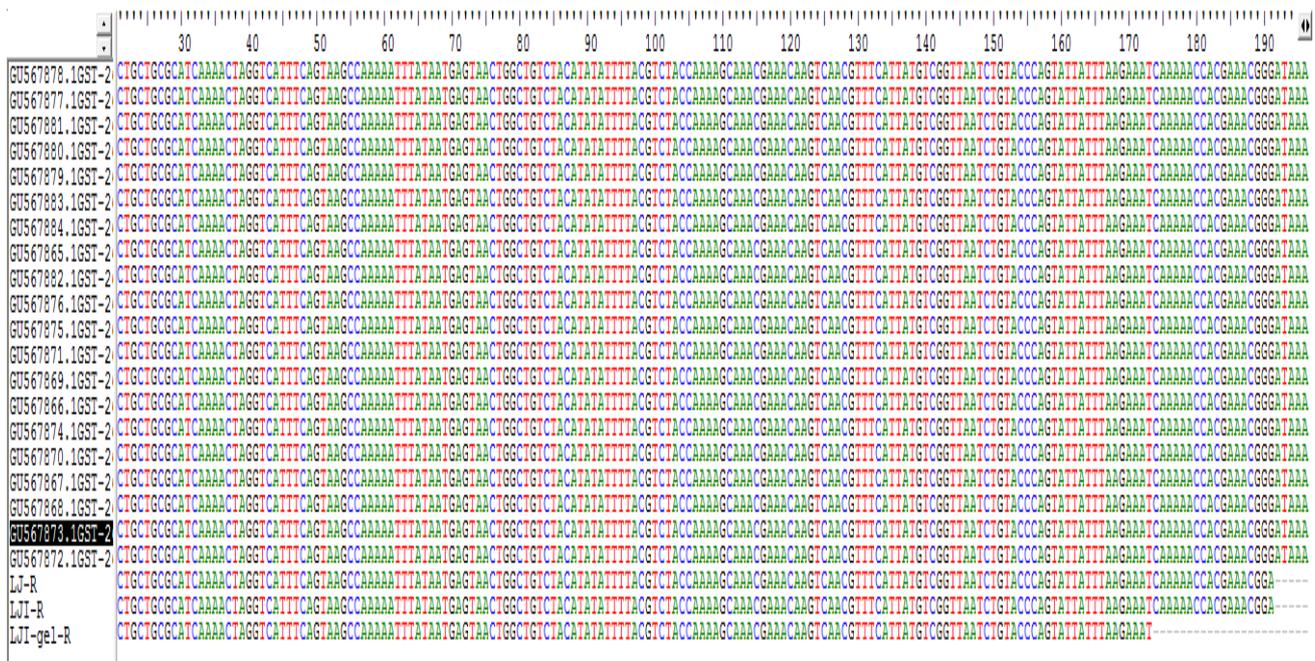
> LJ-Left primer

GTGGGGGGGTCGATTACCGACATA-  
ATGAAACGTTGACTTGTTTCGTTT-  
GCTTTTGGTAGACGTAAAATATATGTAGA-  
CAGCCAGTTACTCATTATAAATTTTGG-  
GCTTACTGAAATGACCTAGTTTTGATGC-  
GCAGCAGTTTAAAAGCCGATCAGCT-  
TAGAAAGAGAAGCCAAGCACTACTTG-  
GATGCACGCCCTC

> LJ-Right primer

GGTTCTTTTTTTGCTGATCGGCTTT-  
TAACTGCTGCGCATCAAACCTAGGT-  
CATTTCAGTAAGCCAAAAATTTATAAT-  
GAGTAACTGGCTGTCTACATATATTTAC-  
GTCTACCAAAGCAAACGAAACAAGT-  
CAACGTTTCATTATGTCTGGTTAATCTG-  
TACCCAGTATTATTAAGAAATCAAAAAC-  
CACGAAACGGA

Hasil analisis alignment dengan program ClustalX antara sekuen gen Sj26GST sampel cacing *S. japonicum* dari Lindu dengan beberapa gen Sj26GST isolat dari China disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2. Hasil alignment antara gen *Sj26GST* sampel cacing *S. japonicum* dari Lindu dengan beberapa gen *Sj26GST* isolat dari China**

**PEMBAHASAN**

Sejak tahun 1980an PZQ merupakan obat pilihan yang digunakan untuk pengobatan schistosomiasis di daerah endemis Dataran Tinggi Napu dan Dataran Tinggi Lindu, Sulawesi Tengah Indonesia. Penelitian sebelumnya mengenai kemoterapi pada manusia menunjukkan bahwa dosis 40 atau 50 mg/kg dapat mencapai angka kesembuhan 97,6 – 100%.<sup>5</sup>

*Glutation S-Transferase (GST)* merupakan

enzim yang memiliki peran penting dalam mekanisme detoksifikasi berbagai senyawa eksogen endogen yang berbahaya, termasuk obat – obatan melalui jalur asam mercapturat. GST merupakan mekanisme pertahanan utama pada *Schistosoma* karena *Schistosoma* hanya memiliki enzim detoksifikasi lain dengan kadar yang sangat sedikit. Enzim GST merupakan target dari obat anti *Schistosoma*, seperti PZQ atau obat lainnya.<sup>6</sup> Resistensi terhadap PZQ mulai berkembang,

meskipun mekanisme resistensinya belum diketahui secara pasti, PZQ diperkirakan meningkatkan permeabilitas kulit cacing terhadap ion kalsium. PZQ kemudian menyebabkan kontraksi otot cacing yang menghasilkan paralisis pada tahap kontraksi.<sup>7,8</sup>

Gena Sj26GST memiliki residu katalitik yang sangat penting yaitu tyrosin di posisi nomor 7, apabila terjadi mutasi pada gen Sj26GST, letaknya berada pada titik katalitik enzim yang terletak di bagian intron. Mutasi yang terjadi pada titik katalitik aktif tyrosin 7 menjadi fenilalanin di SjGST menghasilkan kehilangan aktivitas untuk menempel pada substrat. Hal tersebut menunjukkan peran penting Tyr7 sebagai aktivitas katalitik pada enzim tersebut.<sup>9</sup>

Berdasarkan analisis secara molekuler di laboratorium terhadap sampel cacing *S. japonicum* dari Dataran Tinggi Lindu tidak ditemukan perubahan urutan basa pada titik katalis tyrosin no 7 menjadi fenil alanin. Urutan basa DNA gen penyandi *glutathion s transferase* sampel cacing *S. japonicum* (Sj26GST) dari Dataran Tinggi Lindu memiliki kemiripan hampir 100% dengan urutan basa DNA gen Sj26GST dari beberapa isolat *S. japonicum* dari China yang diketahui belum terjadi mutasi pada susunan gen penyandi Sj26GST.<sup>11</sup>

GST pada cacing diproduksi terutama di sitoplasma, meskipun GST sekretori juga ditemukan (Carniard, 2010),<sup>9</sup> yang memungkinkan GST cacing menjadi target perkembangan vaksin. GST pada *S. japonicum* memiliki dua isozyme, yaitu monomer dengan berat molekul 26kDa dan 28kDa. Enzim GST dengan berat molekul 26kDa memiliki peran besar di bidang bioteknologi dan banyak digunakan sebagai protein fusi, memungkinkan ekspresi protein yang kandungannya sangat rendah, serta purifikasi protein glutathion yang sederhana dengan cara imobilisasi glutathion.

## KESIMPULAN

Berdasarkan analisis secara molekuler tidak ditemukan perubahan susunan basa gen penyandi *glutathion s transferase* sampel cacing *S. japonicum* (Sj26GST) dari Dataran Tinggi Lindu, sehingga cacing *S. japonicum* dari Lindu

masih sensitif terhadap praziquantel.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih sebesar – besarnya kami ucapkan kepada Kepala Balai Penelitian dan Pengembangan Penyakit Bersumber Binatang (Litbang P2B2) Donggala, Bapak Jastal, SKM, M.Si atas izin dan dukungan pembiayaan atas penelitian ini. Terima kasih kami ucapkan kepada seluruh staf di Laboratorium Teknologi Gen BPPT (Dr. Wahyu Purbowasito, Indra Rachmawati, S.Si., M.Si) atas bantuan analisis molekuler yang diberikan.

Ucapan terimakasih juga kami sampaikan kepada Pak Pinus, Pak Amos, Pak Arwin, serta seluruh staf Laboratorium Schistosomiasis Lindu. Terima kasih kami ucapkan kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu penelitian ini sampai dengan selesai.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Pindari, Hadidjaja, *Schistosomiasis di Sulawesi Tengah, Indonesia*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: 1985. Hal: 12
2. Anonim, *Prevalensi Schistosomiasis di Sulawesi Tengah*. Program Pemberantasan Schistosomiasis, Seksi P2M, Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. 2010.
3. Jastal, Triwibowo A.G, Mujiyanto, Sitti Chadijah, Rosmini, dkk. Analisis Spasial Epidemiologi Schistosomiasis Dengan Menggunakan Penginderaan Jarak Jauh dan Sistem Informasi Geografis di Sulawesi Tengah. Laporan Penelitian. Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Donggala. 2008.
4. G.H. Zhao, et al, *Genetic variability among Schistosomajaponicum isolates from different endemic regions in China revealed by sequences of three mitochondrial DNA genes*. 2009.
5. Fu S, Xiao SH & Catto BA. *Clinical use of praziquantel in China*. Parasitology Today 4, (1988) : 312-315.
6. Andrews P. *Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity*. Pharmacology and Therapeutics 29. 1985 : 129-156.
7. Caffrey, C.R., *Chemotherapy of schistosomiasis: present and future*. Curr Opin Chem Biol, 2007. 11(4): p. 433-9.

8. Brindley, P.J., *The molecular biology of schistosomes*. Trends Parasitol, 2005. 21(11): p. 533-6.
9. Carniard Anne M. *Glutathione Transferase: Probing For isoform specificity using Dynamic Combinatorial Chemistry*. A thesis presented for the degree of PhD in Biological Chemistry. University of Edinburgh. 2010.
10. Pearson, H and Stirling, D. DNA extraction from tissues. *Methods in Molecular Biology*. Vol 226 (Bartlett and Sterling Ed). Humana Press Inc. Totowa. NJ. hal.33-34. 2002.
11. Liang, SY, Jian-Rong Dai, An Ning, Dong-Bao Yu, Xing-Jian Xu, Yin-Chang Zhu and Gerald C. Coles. *Susceptibility of S.japonicum to praziquantel in China*. 2001. Tropical Medicine and International Health. Volume 6 no 9 hal 707-714. 2001.