IDENTIFIKASI MUTASI GEN Pfcrt PADA *Plasmodium falciparum* YANG BERHUBUNGAN DENGAN TERJADINYA RESISTENSI KLOROKUIN DI SUMATERA SELATAN

Telah diseminarkan di Bagian Parasitologi FK Unsri sebagai syarat pemenuhan angka kredit pengajuan fungsional asisten ahli

Oleh

Dwi Handayani
NIP. 198110042009122001

BAGIAN PARASITOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
JANUARI 2013

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Tesis	:Identifikasi Mutasi Gen Pfcrt pada *Plasmodium falciparum* yang Berhubungan dengan Terjadinya Resistensi Klorokuin di Sumatera Selatan
Nama	: dr. Dwi Handayani, MKes
NIP	: 198110042009122001
Bagian	: Parasitologi Kedokteran

Menyetujui:
Kepala Bagian Parasitologi
Fakultas Kedokteran Unsri

Drh. Muhaimin Ramdja, MSc
NIP. 19610227199003 1 002

ABSTRAK

Kegagalan pengobatan menggunakan klorokuin sebagai lini pertama obat antimalaria telah menyebar ke berbagai belahan dunia. Studi molekuler ini dilakukan untuk mengidentifikasi mutasi genetik dari isolat *Plasmodium falciparum* di Sumatera Selatan yang berhubungan dengan terjadinya resistensi pengobatan. Sebanyak 30 pasien diambil darahnya, kemudian dilakukan isolasi DNA, dan susunan nukleotida dari gen (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter/pfcrt dianalisis dengan menggunakan *polymerase chain reaction* dan *restriction fragment length polymorphism* untuk mendeteksi adanya polimorfisme yang terkait dengan terjadinya resistensi. Hasil penelitian menunjukkan polimorfisme pada gen Pfcrt 76-Thr ditemukan pada semua isolat. Temuan ini menunjukkan pemakaian klorokuin di Sumatera Selatan sudah tidak adekuat lagi.

Kata kunci: pfcrt; klorokuin; Sumatera Selatan.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian ini. Penulisan ini merupakan salah satu persyaratan dalam pemenuhan angka kredit pengajuan fungsional asisten ahli di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang.

Penelitian ini mengambil judul Identifikasi Mutasi Gen Pfcrt pada *Plasmodium falciparum* yang Berhubungan dengan Terjadinya Resistensi Klorokuin di Sumatera Selatan. Dengan penelitian ini, penulis bertujuan untuk dapat memberikan gambaran mengenai resistensi terhadap pengobatan malaria yang sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan di dunia.

Penulis menyadari bahwa dalam makalah ini masih terdapat kelemahan dan kekurangan baik dalam materi maupun teknik penulisan. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan.

Palembang, Januari 2013

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PENGESAHAN ii
ABSTRAK iii
KATA PENGANTAR iv
DAFTAR ISI v
DAFTAR GAMBAR.. … vii
DAFTAR TABEL viii
DAFTAR LAMPIRAN ix
BAB I PENDAHULUAN 1
A. Latar Belakang 3
B. Masalah Penelitian 4
C. Tujuan Penelitian 4
D. Manfaat Penelitian .....

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
A. *Plasmodium falciparum* 5
1. Taksonomi 5
2. Morfologi 8
3. Siklus Hidup 9
4. Manifestasi Klinis 11
5. Pengobatan 13
6. Resistensi terhadap Antimalaria .....
B. Klorokuin 15
1. Struktur 16
2. Mekanisme Kerja 18
3. Mekanisme Molekuler terhadap Resistensi Klorokuin……...

BAB III METODE PENELITIAN 23
A. Desain Penelitian 23
B . Tempat dan Waktu Penelitian 23
C. Populasi, Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel 24
D. Variabel Penelitian 24
E. Definisi Operasional .....
F. Prosedur Pemeriksaan 25
1. Sediaan Apusan Darah Giemsa 28
2. Pemeriksaan Metode PCR 30
3. RFLP 31
G. Cara Pengolahan dan Analisis Data 32
H. Alur Penelitian .....

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 33
A. Hasil Amplifikasi dan Digesti Gen Pfcrt, Pfmdr1, Dhps, dan Dhfr
B. Profil Genotip dan Variasi Alel Gen Pfcrt, Pfmdr1, Dhps, dan Dhfr *P. falciparum* 34

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 38
A. Kesimpulan…….. 38
B. Saran ....
39
DAFTAR PUSTAKA 43
LAMPIRAN .....

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Apusan Darah Tipis *P. falciparum* Bentuk Trofozoit	6
2	Apusan Darah Tipis *P. falciparum* Bentuk Skizon	7
3	Apusan Darah Tipis *P. falciparum* Bentuk Gametosit.	7
4	Siklus Hidup *Plasmodium*	9
5	Struktur Kimia Klorokuin.....	15
6	Fungsi Vakuola Makanan terhadap Klorokuin	16
7	Struktur Molekul Pgh1	19
8	Model Peran Pgh1	20
10	(a) Struktur Gen Pfcrt	21
	(b) Peran Gen Pfcrt	21
12	Visualisasi Gen Pfcrt dengan Nested PCR……	33
13	Visualisasi Gen Pfmdr1 dengan Nested PCR……	34

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Hasil Positif Amplifikasi dan Frekuensi Distribusi Alel Mutan.....	34
2	Profil Genotip Alel-alel Mutan pada Isolat *P. falciparum*	35
3	Penelitian Mutasi Genetik Gen *P. falciparum* Terkait Resistensi Klorokuin.	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Sekuen Primer yang Digunakan…….. 43
2. Enzim Restriksi yang Digunakan beserta Situs Pengenalannya…….. 44
3. Komposisi Campuran Reaksi PCR Nested……. 45
4. Komposisi Campuran Reaksi RFLP……... 46
5. Kondisi PCR……... 47
6. *Informed consent*……. 48
7. Gambar-gambar Penelitian…….. 49

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi parasit genus *Plasmodium*. Terdapat beberapa spesies *Plasmodium* yang lazim menyebabkan penyakit pada manusia yaitu *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae* dan *P. ovale*. Keempat spesies ini ditemukan di Indonesia (Sutanto dan Pribadi, 2008). Di antara keempat spesies tersebut, *P. falciparum* merupakan spesies yang paling mematikan karena potensinya yang dapat menyebabkan komplikasi serebral. Malaria sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat terutama di negara tropik sekaligus menjadi ancaman global bagi penduduk bumi. Menurut *World Health Organization* (WHO), malaria endemis di 105 negara di dunia dan menyebabkan 300-500 juta kasus serta kematian 1,5-2,7 juta setiap tahunnya. Indonesia merupakan daerah endemis malaria dengan 60% penduduknya tinggal di daerah endemis (WHO, 2005).

Angka kejadian malaria setiap tahunnya diukur dengan *Annual Malaria Incidence* (AMI). AMI di pulau Jawa-Bali terus mengalami peningkatan yaitu 16 per 1000 penduduk pada tahun 1997, 31 per 1000 penduduk pada tahun 2001, dan menjadi 46,5 per 1000 penduduk pada tahun 2003 (Depkes RI, 2006). Di Sumatera Selatan sendiri pada tahun 2009 tercatat AMI sebesar 8,45 per 1000 penduduk dengan sebaran Kabupaten Ogan Komering Ulu 27,07 per 1000 penduduk, Lahat 22,08 per 1000 penduduk dan Musi Banyuasin 15,42 per 1000 penduduk (Dinkes Provinsi Sumsel 2010).

Upaya pemberantasan malaria di dunia dan Indonesia telah dilakukan sejak tahun 1930. Upaya tersebut berupa tindakan pemberantasan tempat perindukan nyamuk *Anopheles spp* sebagai kontrol terhadap vektor dan penerapan standar pengobatan malaria

yang baik telah memberikan hasil yang cukup memuaskan. Dari semua obat antimalaria, klorokuin merupakan obat antimalaria yang efektif untuk semua spesies parasit malaria, karena kerjanya cepat, harganya murah dan efek samping relatif lebih ringan serta dapat diberikan pada ibu hamil dan anak-anak. Oleh karena itu klorokuin telah digunakan secara luas sejak Perang Dunia II dan sampai saat ini masih dianggap sebagai *first line drug* dalam pengobatan dan pencegahan semua jenis malaria dalam program pengendalian malaria di Indonesia (Chwatt, 1991; Achmad dan Sutanto, 2003).

Namun sejak tahun 1950-an terdapat kecenderungan meningkatnya kembali kasus malaria walaupun telah dilakukan pengobatan pada penderita dan pengendalian vektor. Hal ini bersamaan pula dengan adanya laporan dari berbagai negara di dunia tentang beberapa kasus malaria falciparum yang resisten terhadap pengobatan klorokuin. Kasus tersebut berasal dari dua fokus, pertama kali dilaporkan dari Amerika Selatan (Kolombia) dan pada tahun 1961 dilaporkan pula kasus yang sama dari daerah Asia Tenggara (daerah perbatasan Thailand dan Kamboja), kemudian dari sini kasus resistensi diduga menyebar ke berbagai negara lain (Rieckmann *et al*., 1989; Viana *et al*., 2006). Di Indonesia telah dilaporkan pula adanya beberapa fokus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin dari 26 propinsi (Pribadi, 1997). Kasus resistensi di Indonesia pertama kali dilaporkan di Kalimantan dan Papua pada tahun 1975 oleh Ebisawa and Fukuyama (Huaman *et al*., 2004; Syafrudin *et al*., 2005).

Teori mengenai mekanisme resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria mengalami perkembangan sesuai dengan kemajuan ilmu pengetahuan. Pada awalnya, meluasnya kasus resistensi terhadap klorokuin diduga karena pemakaian obat yang tidak terkontrol oleh masyarakat yang mengakibatkan perubahan jalur metabolik klorokuin (*alternative metabolic pathway*) sehingga obat antimalaria yang masuk ke dalam *Plasmodium* tidak mengalami metabolisme sebagaimana mestinya (Chwatt, 1991).

Dengan berkembangnya teknologi biologi molekuler, para peneliti mempelajari mekanisme resistensi tersebut pada tingkat molekuler.

. Studi molekuler dalam beberapa dekade terakhir telah mengidentifikasi beberapa titik mutasi pada gen *P. falciparum* terkait resistensi klorokuin (Syafrudin *et al*., 2003 dan 2005). Gen Pfcrt yang terletak pada kromosom 7 berperan penting dalam munculnya fenotip yang resisten terhadap klorokuin yaitu mutasi *Lys76Thr*. Mutasi pada gen tersebut menyebabkan *efflux* klorokuin ke dalam sitoplasma dan terjadi modifikasi derajat keasaman yang berperan penting dalam transport klorokuin ke dalam vakuola makanan.

Studi epidemiologi di semua daerah endemis malaria di dunia telah dilakukan untuk membuktikan adanya mutasi pada gen tersebut dan hubungannya dengan kegagalan atau resistensi pengobatan (Syafrudin *et al*., 2005). Uji sensitivitas terhadap klorokuin di berbagai daerah endemis malaria dengan teknik *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan adanya resistensi terhadap obat tersebut dan semua isolat *P. falciparum* yang resisten tersebut membawa alel mutan dari gen diatas (Triglia and Cowman., 1990; Triglia *et al*., 1998; Syafrudin *et al*., 2005). Di Sumatera Selatan belum tersedia data mengenai adanya mutasi pada gen pfcrt *P. falciparum*. Identifikasi terhadap mutasi pada gen Pfcrt *P. falciparum* ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai terjadinya kegagalan atau resistensi pengobatan di daerah endemis malaria di Sumatera Selatan.

B. Masalah Penelitian

1. Apakah pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Sumatera Selatan sudah terjadi mutasi pada gen pfcrt *P. falciparum*?
2. Bagaimana genotip *Lys76Lys, Lys76Thr* dan *Thr76Thr* gen pfcrt *P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Sumatera Selatan?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui adanya mutasi pada gen pfcrt *Plasmodium falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Sumatera Selatan.

Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi genotip *Lys76Lys, Lys76Thr* dan *Thr76Thr* gen pfcrt *P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Sumatera Selatan.

D. Manfaat Penelitian

1. Memberi landasan dasar teoritis tentang genotip dan alotip mutasi *Lys76Thr* gen pfcrt *P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Sumatera Selatan.
2. Sebagai bahan/informasi bagi klinisi dalam upaya memberikan obat antimalaria selain klorokuin bila diketahui *P. falciparum* di daerah tersebut resisten terhadap klorokuin dan kombinasi pirimetamin-sulfadoksin.
3. Sebagai masukan bagi Dinas Kesehatan Kabupaten dan Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan tentang kasus resistensi terhadap klorokuin di Sumatera Selatan serta perumusan langkah antisipatif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Plasmodium falciparum*

P. falciparum merupakan penyebab malaria tropika atau malaria falciparum. Spesies ini paling berbahaya dibandingkan keempat spesies lainnya karena dapat menyebabkan komplikasi malaria serebral. Parasit ini menyerang setiap eritrosit tanpa memandang umur, sehingga angka infeksi eritrosit (derajat parasitemia) sangat tinggi dan sering menyebabkan komplikasi berat antara lain syok, malaria serebral, gagal ginjal akut, hemolisis intravaskular, dan edema paru (Gardner *et al*., 2002).

1. Taksonomi

Filum : Apicomplexa

Kelas : Aconoidasida

Ordo : Haemosporida

Famili : Plasmodiidae

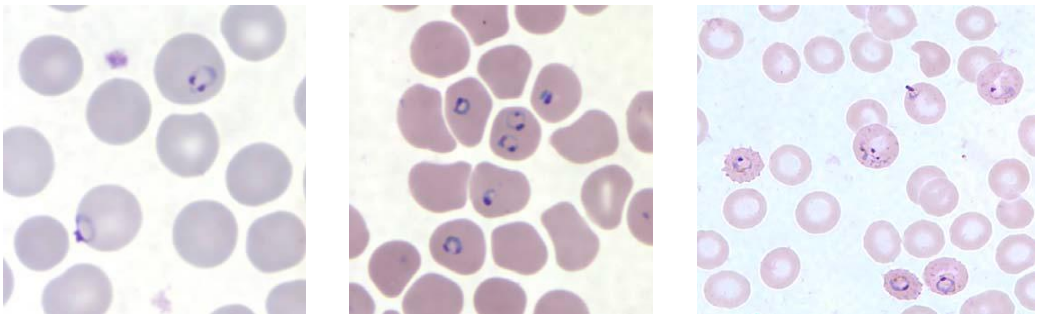
Genus : *Plasmodium*

Spesies : *Plasmodium falciparum*

2. Morfologi

Pada sediaan darah tebal atau tipis, parasit akan terlihat dalam beberapa bentuk sesuai dengan stadiumnya, yaitu bentuk cincin atau trofozoit muda, trofozoit tua (*older trofozoit)*, skizon muda, skizon matang, dan gametosit. Pada infeksi *P. falciparum* eritrosit yang terinfeksi tidak membesar. Di dalam darah bentuk cincin stadium trofozoit muda *P. falciparum* sangat kecil, halus, dengan ukuran kira-kira seperenam diameter eritrosit.

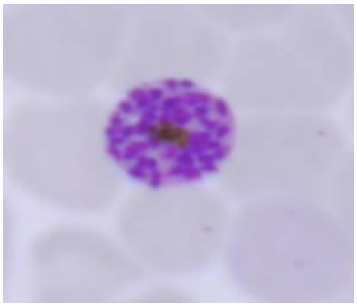
Dalam satu eritrosit dapat ditemukan lebih dari satu cincin (*double infections* atau *multiple infections)*. Pada membran eritrosit dapat ditemukan parasit dalam bentuk *accole* atau marginal. Inti (kromatin) berwarna merah atau violet dan beberapa cincin dapat memiliki inti lebih dari satu (*double dots)*. Sitoplasma parasit halus, berwarna biru dan dapat ditemukan pigmen yang disebut *Maurer's dot* (Sutanto dan Muljono, 2008; Pusarawati dan Tantular, 2008).

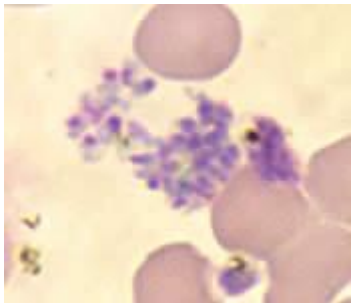


(a) (b) (c)

Gambar 1. Apusan darah tipis *P. falciparum*, tampak RBC tidak membesar (a) tampak cincin yang halus dan tipis, ditemukan *double kromatin dots*; (b) *multiple infections*; (c) *Maurer's dot* pada trofozoit tua. (www.dpd.cdc.gov)

Stadium skizon muda *P. falciparum* dapat dikenal dengan mudah oleh adanya satu atau dua butir pigmen yang menggumpal. Bila skizon sudah matang, akan mengisi kira-kira dua pertiga eritrosit dan membentuk 8-24 buah merozoit, dengan jumlah rata-rata 16 buah merozoit. Skizon matang *P. falciparum* lebih kecil daripada skizon matang parasit malaria yang lain (Sutanto dan Muljono, 2008).

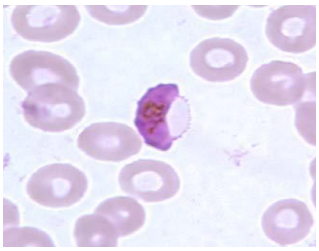




(a) (b)

Gambar 2. Apusan darah tipis *P. falciparum* (a) Skizon matang; (b) Skizon yang ruptur mengeluarkan merozoit. (www.dpd.cdc.gov)

Gametosit muda mempunyai bentuk agak lonjong, kemudian menjadi lebih panjang atau berbentuk elips dan akhirnya mencapai bentuk khas seperti sabit atau pisang sebagai gametosit matang. Gametosit untuk pertama kali tampak di darah tepi setelah beberapa generasi mengalami skizogoni, biasanya 10 hari setelah parasit pertama kali tampak dalam darah. Gametosit betina atau makrogametosit biasanya lebih langsing dan lebih panjang dari gametosit jantan atau mikrogametosit dan sitoplasmanya lebih biru dengan pulasan Romanowsky/Giemsa. Intinya lebih kecil dan padat, berwarna merah tua dan butir-butir pigmen tersebar di sekitar inti. Mikrogametosit berbentuk lebih lebar dan seperti sosis. Sitoplasmanya biru pucat atau agak kemerah-kemerahan dan intinya berwarna merah muda, besar dan tidak padat, butir-butir pigmen tersebar di sitoplasma sekitar inti (Sutanto dan Muljono, 2008)..



Gambar 3. Makrogametosit pada sediaan apusan darah tipis. (www.dpd.cdc.gov)

3. Siklus Hidup

Parasit malaria memerlukan dua hospes untuk siklus hidupnya, yaitu manusia yang bertindak sebagai hospes perantara dan nyamuk *Anopheles* betina sebagai hospes definitif.

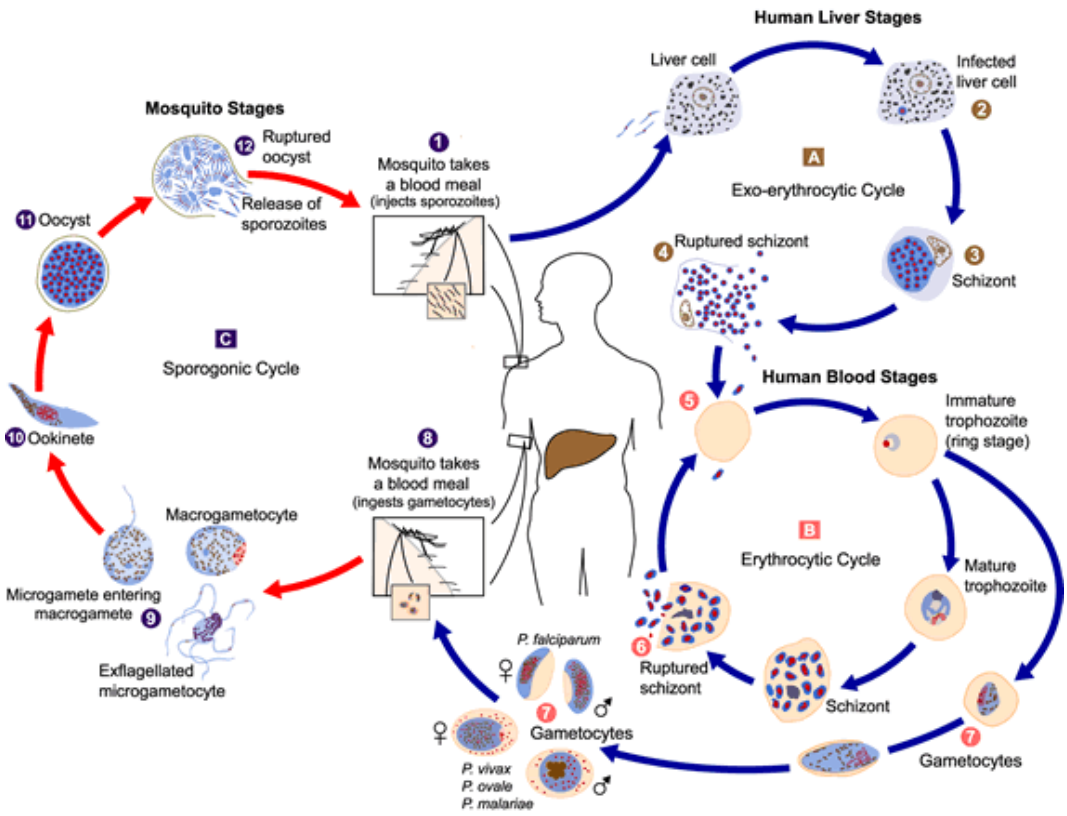
1. Siklus pada manusia (Fase aseksual)

Pada waktu nyamuk *Anopheles* betina infektif menghisap darah manusia, sporozoit yang berada dalam kelenjar liur nyamuk akan masuk ke dalam peredaran darah selama lebih kurang 30 menit. Setelah itu sporozoit akan masuk ke dalam sel hati dan menjadi tropozoit hati. Kemudian berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10.000 sampai 30.000 merozoit hati. Siklus ini disebut siklus eksoeritrositer yang berlangsung selama lebih kurang 2 minggu (Nugroho dan Tumewu, 2000; Depkes RI, 2006).

Merozoit yang berasal dari skizon hati yang pecah akan masuk ke dalam peredaran darah dan menginfeksi sel darah merah (Ashley *et al*., 2005). Di dalam sel darah merah, parasit tersebut berkembang dari stadium tropozoit sampai skizon (8-30 merozoit). Proses perkembangan aseksual ini disebut skizogoni. Skizogoni terjadi di dalam kapiler organ-organ dalam. Skizon yang sudah matang akan mengisi 2/3 eritrosit dan membentuk 8-24 merozoit. Pertambahan volume merozoit terjadi karena merozoit melakukan metabolisme aktif termasuk menelan sitoplasma eritrosit hospes dan menghancurkan hemoglobin menjadi asam amino. Selanjutnya eritrosit yang terinfeksi (skizon) pecah dan merozoit yang keluar akan menginfeksi sel darah merah lainnya (Sedigheh *et al*., 2002). Siklus ini disebut siklus eritrositer. Setelah 2 sampai 3 siklus skizogoni darah, sebagian merozoit yang menginfeksi sel darah merah dan membentuk stadium seksual yaitu gametosit jantan dan betina (Nugroho dan Tumewu, 2000; Depkes RI, 2006).

2. Siklus pada nyamuk *Anopheles* betina

Apabila nyamuk *Anopheles* betina menghisap darah yang mengandung gametosit, di dalam tubuh nyamuk, gamet jantan dan betina melakukan pembuahan menjadi zigot. Zigot berkembang menjadi ookinet kemudian menembus dinding lambung nyamuk. Pada dinding luar lambung nyamuk ookinet akan menjadi ookista dan selanjutnya menjadi sporozoit. Sporozoit ini akan bersifat infektif dan siap ditularkan ke manusia (Nugroho dan Tumewu, 2000; Depkes RI, 2006).



Gambar 4. Siklus hidup *Plasmodium*. (www.dpd.cdc.gov)

4. Manifestasi Klinis

Secara klinis, gejala dari penyakit malaria terdiri atas beberapa serangan demam dengan interval tertentu yang diselingi oleh suatu periode dimana penderita bebas sama sekali dari demam. Terjadinya demam diduga berkaitan dengan pengaruh *glycosyl*

phosphatidyl inositol (GPI) atau terbentuknya sitokin. Malaria tropika merupakan bentuk malaria yang paling berat yang ditandai dengan demam yang irregular, anemia, splenomegali, hiperparasitemia, dan sering berakhir dengan komplikasi bahkan kematian. Masa inkubasi berlangsung 9-14 hari. Gejala prodromal yang sering dijumpai yaitu sakit kepala, lesu, dingin, mual, muntah, dan diare. Demam bersifat irregular dan tidak periodik, sering terjadi hiperpireksia dengan temperatur diatas 40 ^{0}C (Asih *et al*., 2009).

Limpa membesar dengan cepat dan biasanya teraba pada minggu pertama setelah infeksi. Komplikasi ikterik lebih banyak ditemukan dibandingkan dengan komplikasi lainnya. Hampir semua kematian akibat penyakit malaria disebabkan oleh *P.falciparum*. Infeksi *P. falciparum* dapat menimbulkan malaria berat yang menurut WHO didefinisikan sebagai infeksi *P. falciprum* stadium aseksual dengan satu atau lebih komplikasi sebagai berikut (Harijanto, 2006; Syafrudin *et al*., 2009):

1. Malaria serebral, derajat kesadaran berdasarkan *Glasgow Coma Scale* (GCS) kurang dari 11.
2. Anemia berat (Hb < 5 gr%)
3. Gagal Ginjal Akut
4. Edema paru atau ARDS (*Adult Respiratory Distress Syndrome*)
5. Hipoglikemia, kadar gula darah < 40 mg%
6. Gagal sirkulasi atau syok.
7. Perdarahan spontan dari hidung, gusi, traktus digestivus, dan atau disertai kelainan laboratorik adanya gangguan koagulasi intravaskuler.
8. Kejang berulang lebih dari 2x dalam 24 jam setelah pendinginan pada hipertermia.
9. Asidemia.
10. Makroskopik hemoglobinuria oleh karena infeksi malaria akut bukan karena obat anti malaria pada kekurangan Glukosa 6 Phospat Dehidrogenase (G6PD).

11. Diagnosa postmortem dengan ditemukannya parasit yang padat pada pembuluh kapiler pada jaringan otak.

5. Pengobatan

Berdasarkan suseptibilitas berbagai stadium parasit malaria, maka obat malaria dibagi dalam 5 golongan (Sutanto dan Pribadi, 2008):

1. Skizontosida jaringan primer. Obat golongan ini dapat membasmi parasit praeritrosit sehingga mencegah masuknya parasit ke dalam eritrosit dan dapat digunakan untuk profilaksis kausal. Yang termasuk golongan ini adalah proguanil dan pirimetamin.
2. Skizontosida jaringan sekunder. Dapat membasmi parasit daur eksoeritrositer atau stadium jaringan *P. vivax* dan *P. ovale* dan digunakan untuk pengobatan radikal sebagai obat anti relaps. Contohnya primakuin.
3. Skizontosida darah. Kina, amodiakuin, halofantrine, artemisin, proguanil dan primetamin adalah obat-obat yang termasuk kelompok ini. Cara kerjanya dengan membasmi parasit stadium eritrosit dan dapat mengeliminasi stadium seksual pada *P. vivax*, *P. malariae,* dan *P. ovale,* tapi tidak efektif untuk gametosit *P. falciparum* yang matang.
4. Gametositosida. Dapat mengeliminasi semua stadium seksual termasuk gametosit *P. falciparum*, juga mempengaruhi stadium perkembangan parasit malaria dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Primakuin adalah gametositosida untuk keempat spesies, sedangkan kina, klorokuin, amodiakuin adalah gametositosida untuk *P. vivax*, *P. malariae,* dan *P. ovale*.
5. Sporontosida. Bekerja dengan mencegah atau menghambat gametosit dalam darah untuk membentuk ookista dan sporozoit dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina. Yang termasuk dalam golongan ini adalah primakuin dan proguanil.

Berdasarkan struktur kimianya, obat anti malaria terdiri dari (Sutanto dan Pribadi, 2008):

1. Golongan 4-aminokuinolin, yaitu klorokuin dan amodiakuin.
2. Golongan obat antifolat, yaitu kombinasi sulfadoksin- pirimetamin.
3. Golongan 4-quinoline-methanol, yaitu kina.
4. Artemisin dan derivatnya.
5. Primakuin.
6. Antibiotik, yaitu: doksisiklin, tetrasiklin, dan klindamisin.
7. Atovakuon-proguanil

Berdasarkan tujuan penggunaannya, obat anti malaria dapat dibedakan menjadi (Sutanto dan Pribadi, 2008):

1. Pengobatan pencegahan (profilaksis).

   Obat diberikan dengan tujuan mencegah terjadinya infeksi atau timbulnya gejala. Pencegahan absolute terhadap infeksi adalah dengan membasmi sporozoit, segera setelah sporozoit tersebut masuk melalui gigitan nyamuk *Anopheles* yang infektif. Namun tidak ada obat yang dapat segera membunuh sporozoit. Obat yang ada ialah obat yang dapat membasmi parasit stadium dini dalam hati, sebelum merozoit dilepaskan ke darah perifer. Obat yang mengurangi jumlah parasit malaria dalam darah sedemikian rendahnya sehingga tidak menimbulkan gejala klinis disebut obat supresif atau profilaksis klinis, selama obat tersebut diminum terus oleh penderita dalam dosis yang adekuat.

2. Pengobatan teraupetik.

   Obat ini digunakan untuk tujuan penyembuhan infeksi, penanggulangan serangan akut,

dan pengobatan radikal. Pengobatan serangan akut dapat dilakukan dengan skizontosida darah. Pada infeksi parasit malaria yang dapat menyebabkan relaps, penyembuhan permanen dapat dicapai dengan pengobatan radikal, yang memerlukan obat yang efektif terhadap parasit daur eritrosit dan eksoeritrosit, yaitu skizontosida darah dan skizontosida jaringan sebagai kombinasi.

3. Pengobatan pencegahan transmisi.

   Obat yang efektif terhadap gametosit, sehingga dapat mencegah infeksi pada nyamuk atau mempengaruhi perkembangan sporogonik pada nyamuk adalah gametositosida atau sporontosida.

6. Resistensi Antimalaria

Resistensi adalah kemampuan strain parasit untuk tetap hidup dan atau berkembangbiak walaupun pemberian dan absorpsi obat sesuai dosis standar atau lebih tinggi dari dosis yang direkomendasikan tetapi masih dapat ditoleransi oleh hospes (Sutanto dan Pribadi, 2007; Sony, 2007). Berbagai faktor yaitu obat, parasit, dan manusia sebagai hospes saling berinteraksi yang menyebabkan perkembangan dan penyebaran resistensi *Plasmodium* terhadap obat. Resistensi terhadap antimalaria menjadi suatu tantangan besar pada pengendalian malaria saat ini. Resistensi obat ini berimplikasi pada penyebaran malaria ke daerah-daerah baru dan munculnya kembali pada daerah yang dulunya telah di eradikasi. Resistensi obat juga memegang peranan penting dalam terjadinya epidemik dan memberatnya manifestasi penyakit pada beberapa daerah (Depkes, 2002).

Secara umum mekanisme resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria disebabkan oleh mutasi spontan pada level molekul yang mempengaruhi struktur dan

aktivitas target obat atau mempengaruhi *access* obat terhadap parasit target (Sony, 2007; Sutanto dan Pribadi, 2008). Keadaan ini menyebabkan penurunan sensitivitas parasit terhadap obat atau kelompok obat yang digunakan. Mutasi ini tidak menyebabkan peningkatan kemampuan hidup atau perkembangbiakan parasit, tetapi menekan pengaruh obat terhadap parasit. Proses resistensi ini terjadi karena penggunaan antimalaria secara monoterapi atau juga kombinasi yang tidak rasional serta ketidakpatuhan dalam pengobatannya (Sony, 2007).

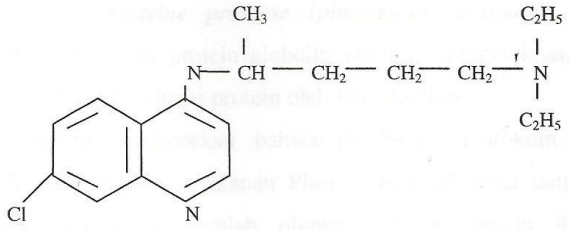
Kombinasi antimalaria adalah pemakaian dua jenis atau lebih anti malaria yang bersifat skizontosida serta mempunyai cara kerja farmakologi yang berbeda. Tujuan pemakaian kombinasi antimalaria, selain untuk meningkatkan efek obat secara sinergis dan adaptif, juga mencegah timbulnya resisten. Hal ini diperkirakan karena dengan penggunaan secara kombinasi, peluang untuk menjadi resisten terhadap kedua obat yang dikombinasikan tersebut semakin kecil. Pada saat ini penggunaan kombinasi derivat artemisin telah terbukti efektif dalam mengurangi morbiditas dan mortilitas akibat penyakit malaria (WHO, 2006; Sony 2007).

Pada tahun 2003, WHO mengklasifikasikan derajat resistensi terhadap anti malaria, yaitu (WHO, 2003):

- *Early Treatment Failure* (ETF) bila pasien tetap memperlihatkan gejala klinis dan atau parasitemia dalam tiga hari pertama pengobatan.
- *Late Treatment Failure* (LTF) bila pasien tetap memperlihatkan gejala klinis dan atau parasitemia antara hari ke-4 sampai hari ke-28 pengobatan, tetapi tidak didahului oleh ETF.
- *Adequate Clinical and Parasitological Response* (ACPR) bila penderita tidak memperlihatkan ETF dan LTF setelah 28 hari pasca pengobatan.

B. Klorokuin

1. Struktur

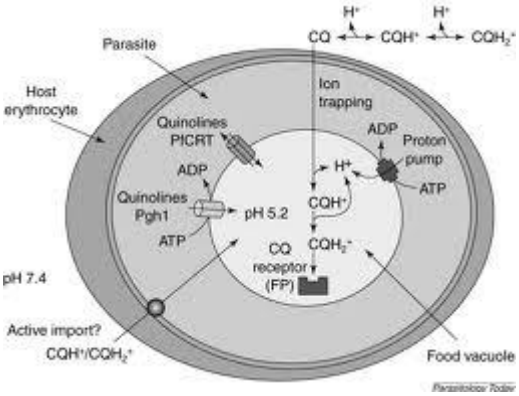


Gambar 5. Struktur kimia klorokuin (Cotton S. The Mighty Quinine; available from: http://www.chm.bris.ac.uk).

Klorokuin merupakan obat anti malaria golongan 4-aminokuinolin (Gambar 5) yang bersifat *skizontisida* darah terhadap semua jenis plasmodia pada manusia dan *gametositosida* untuk *p.vivax, P.ovale,* dan *P.malariae*. Klorokuin bersifat basa lemah dan aktifitasnya di dalam *Plasmodium* terjadi dalam vakuola makanan parasit stadium aseksual. Klorokuin yang dimakan per oral diabsorbsi melalui saluran cerna ke dalam plasma darah kemudian berdifusi ke dalam sitoplasma parasit karena adanya perbedaan tekanan dan konsentrasi. Di dalam sitoplasma parasit, klorokuin dimasukkan (*uptake*) ke dalam vakuola makanan melalui aktifitas suatu *protein carrier* pada membran vakuola makanan yang homolog dengan *protein carrier* pada manusia yang disebut p-glikoprotein homolog-1 (Pgh1) yang berfungsi sebagai pompa (*ATP binding transport protein*). Selain itu aktifitas Pgh1 juga berfungsi mengeluarkan klorokuin (*efflux*) kembali dari vakuola makanan ke sitoplasma (Bayoumi *et al*., 1994; Reed, 2000). Namun kecepatan uptake yang terjadi lebih besar daripada kecepatan *efflux* sehingga tercapai konsentrasi obat yang tinggi dalam vakuola makanan (Krogstad, 1987; Reed, 2000). Karena vakuola makanan bersifat asam maka klorokuin (yang berada dalam bentuk basa) akan terprotonisasi menjadi bentuk dikationik yang dianggap tidak dapat larut dalam lipid sehingga klorokuin akan terperangkap di dalam vakuola makanan kecuali sedikit yang dikeluarkan oleh Pgh1.

2. Mekanisme Kerja

Vakuola makanan yang terdapat pada *Plasmodium* berfungsi sebagai lisosom sekunder dengan pH sekitar 5.0. Hemoglobin yang terdapat di dalam sitoplasma sel darah merah dimakan oleh parasit melalui mekanisme endositosis dan masuk ke dalam vakuola makanan. Di dalam vakuola makanan, hemoglobin mengalami degradasi oleh enzim *aspartate protease* dan *cysteine protease* (*plasmepsin*, *falsipain*) yang berfungsi melepaskan ikatan peptida dari protein globulin sehingga terbentuk asam amino-asam amino yang diperlukan untuk sintesis protein oleh *Plasmodium*.

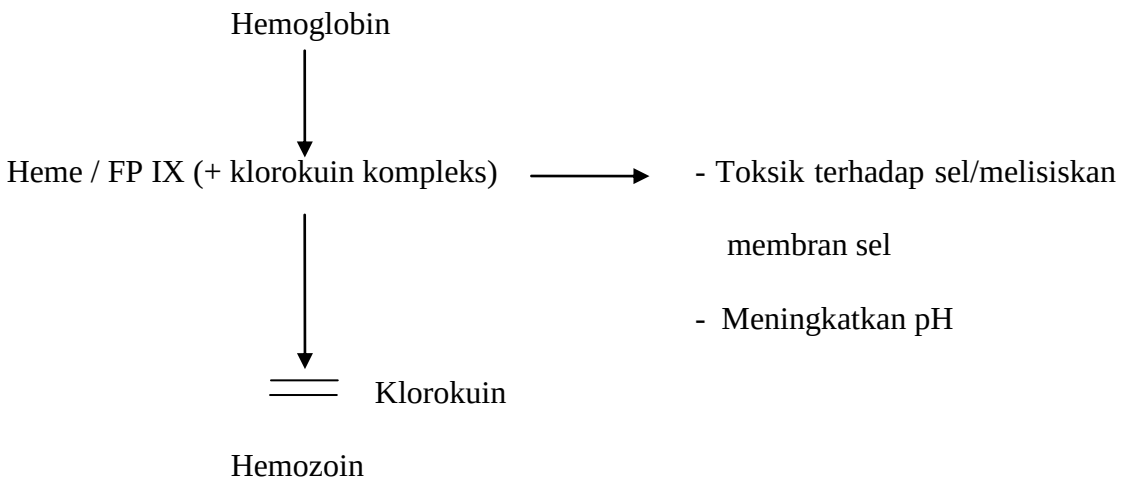


Gambar 6. Fungsi vakuola makanan terhadap klorokuin (www.sciencedirect.com)

Beberapa peneliti melaporkan bahwa pemberian klorokuin mengakibatkan perubahan bentuk pada vakuola makanan *Plasmodium*, sehingga tampak mengalami pembesaran serta menurunnya jumlah pigmen malaria. Selain itu terjadi pula pengelompokan ribosom, pembengkakan mitokondria dan retikulum endoplasma. Perubahan morfologi ini menunjukkan bahwa klorokuin menghambat maturasi *Plasmodium* dengan mengganggu fungsi normal dari vakuola makanan (Krogstad, 1987). Ada beberapa hipotesa mengenai mekanisme kerja klorokuin di dalam vakuola makanan, yaitu:

a. Hipotesis Feriprotoporpirin IX

Energi yang digunakan oleh parasit berasal dari hemoglobin sel darah merah yang dihancurkan di dalam vakuola makanan. Hemoglobin tersebut mengalami degradasi menjadi heme bebas dan protein globin. Heme mengandung feriprotoporpirin IX yang bersifat toksik dan dapat melisiskan parasit. Melalui mekanisme pertahanan tubuh dari parasit, heme tersebut mengalami detoksifikasi dengan cara polimerase heme menjadi hemozoin (β hematin = pigmen malaria) yang bersifat nontoksik. Mekanisme kerja klorokuin di dalam vakuola makanan adalah menghambat reaksi polimerase sehingga heme tidak mengalami detoksifikasi. Feriprotoporpirin IX yang terdapat di dalam heme bila berikatan dengan klorokuin akan membentuk satu molekul komplek yang bersifat toksik terhadap sel dan pada konsentrasi tertentu dapat melisiskan membran parasit. Hal ini disebabkan karena komplek klorokuin-feriprotoporpirin IX mengganggu permeabilitas membran parasit dan pompa proton membran. Selain itu klorokuin sendiri ataupun bersama-sama komplek klorokuin-feriprotoporpirin IX meningkatkan pH dalam vakuola makanan yang mengakibatkan gangguan pada metabolisme di dalam vakuola makanan sehingga parasit menjadi mati (Krogstad, 1987) (Skema 1).



Skema 1. Hipotesis FP IX

b. Hipotesis Basa Lemah

Sebagaimana diketahui bahwa klorokuin bekerja di dalam vakuola makanan parasit yang bersifat asam, karena itu masuknya klorokuin yang bersifat basa ke dalam vakuola makanan akan meningkatkan pH organela tersebut. Perubahan pH ini akan menghambat aktifitas *aspartate* dan *cysteine protease enzyme* yang terdapat di dalam vakuola makanan sehingga metabolisme parasit terganggu. Peningkatan pH ini diduga juga menghambat transport intraseluler seperti jalur *endocytic vesicles* yang membawa hemoglobin ke dalam vakuola makanan atau jalur enzim lisosom (enzim protease) ke dalam vakuola makanan. Keadaan ini mengakibatkan parasit menjadi mati.

c. Hipotesis Pengikatan DNA

Hipotesis ini menduga bahwa aktifitas klorokuin adalah dengan cara mengikat DNA parasit sehingga menghambat proses replikasi dan sintesis protein. Hipotesa ini banyak ditentang karena untuk menghambat sintesi asam nukleat diperlukan konsentrasi klorokuin yang lebih tinggi daripada dosis terapi.

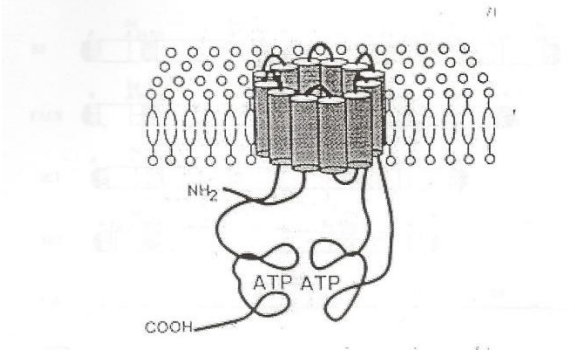
3. Mekanisme Molekuler Terhadap Resistensi Klorokuin

1. Peran Protein P-Glikoprotein Homolog I

a. Struktur Molekul Protein Pgh I

Protein Pgh I berada pada membran vakuola makanan *Plasmodium*. Protein ini terdiri dari 6 regio transmembran yang bersifat hidrofobik yang dipisahkan oleh 2 regio hidrofilik yang mengandung *ATP-binding site* (Gambar 7). Daerah hidrofilik ini memperlihatkan tingkat homologi yang signifikan terhadap protein transport pada hewan tingkat tinggi dan dengan menggunakan daerah konservatif ini dapat diidentifikasi adanya dua alel gen pada kromosom V dari *P. falciparum*, yaitu pfmdr1 dan pfmdr2. Gen pfmdr1

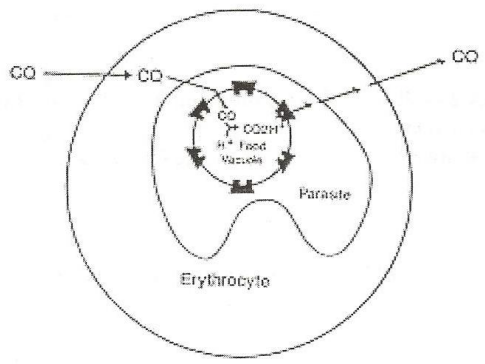
terdiri dari *continous open reading frame* sebesar 4257 basa. Gen ini memilik tingkat homologi sebesar 54% dengan gen mdr1 pada manusia dan mengkode protein sebesar 162 yang juga sangat homolog dengan p-glikoprotein pada mammalia. Gen pfmdr2 telah diisolasi dari *P. falciparum* dan terdiri atas bagian dari domain yang diduga mengikat ATP namun fungsinya sampai saat ini belum jelas (Cowman, 1991)



Gambar 7. Struktur molekul Pgh1

b. Mekanisme Resistensi Oleh Pgh I

Pada tahun 1897, Krogstad membandingkan *P. falciparum* strain resisten dengan strain sensitif terhadap klorokuin. Ternyata jumlah *uptake* klorokuin ke dalam vakuola makanan *Plasmodium* sama antara strain sensitif dengan strain resisten, namun pada strain resisten terjadi *over expressed* pada Pgh I yaitu meningkatnya *efflux* klorokuin dari vakuola makanan ke dalam sitoplasma sebesar 40-50 kali lebih cepat dibandingkan dengan strain yang sensitif. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya konsentrasi klorokuin pada sitoplasma strain resisten. Selain itu Krogstad juga memperlihatkan bahwa pemberian kalsium antagonis (verapamil dan calmodulin antagonis) dapat mengembalikan strain resisten menjadi sensitif kembali secara *in vitro* dengan cara menghambat aktifitas *efflux* oleh p-glikoprotein sehingga terjadi akumulasi klorokuin di dalam vakuola makanan sebagaimana pada strain sensitif (Krogstad, 1987; Saladin *et al*., 1999).



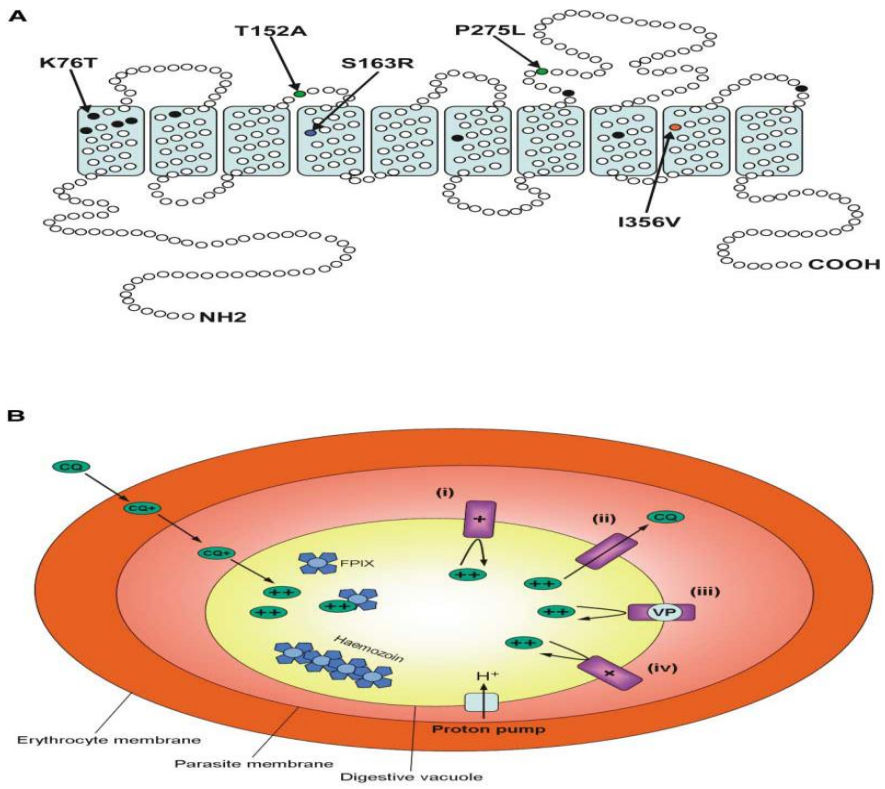
Gambar 8. Model peran Pgh1

2. Gen Pfcrt

Gen pfcrt merupakan gen yang terletak pada kromosom 7 parasit *P. falciparum* dan berhubungan erat dengan penurunan sifat resistensi melalui uji *genetic crossing* (Wellems and Plowe, 2001). Pfcrt merupakan protein membran integral yang terletak pada membran vakuola makanan *P. falciparum*. Dengan analisis sekuensing diprediksi bahwa pfcrt memiliki sepuluh rantai segmen transmembran (Bray *et al*., 2005; Johnson *et al*, 2004; Chaijaroenkul *et al*, 2011). Pfcrt merupakan target ideal bagi obat antimalaria karena tidak ada gen homolog yang serupa dengan pfcrt. Gen ini menyandi suatu protein transporter putatif sepanjang 425 asam amino yang terletak pada membran vakuola makanan parasit dan diperkirakan berperan dalam influks dan efluks obat ke dan dari dalam vakuola makanan serta berperan dalam pengaturan pH intra-vakuola.

Saat ini telah dipetakan delapan mutasi titik pada gen pfcrt yang menyebabkan perubahan asam amino; M74I, N75I, K76T, A220S, Q271E, N326S, I356T dan R371I yang bertanggungjawab terhadap munculnya resistensi terhadap klorokuin. Pada penelitian dengan metode *genetic complementation*, kodon 76 dibuktikan berperanan penting dalam kejadian resistensi terhadap klorokuin yaitu terkait dengan suseptabilitas terhadap klorokuin (Thomas *et al*., 2002; Syafrudin *et al*., 2005). Waller *et al.,* telah

mendemonstrasikan bahwa adanya alel pfcrt yang terkait dengan resistensi klorokuin menyebabkan pengurangan ekspresi protein sebanyak 30-40% (Chaijaroenkul *et al*, 2011).



Gambar 10. (A) Struktur gen Pfcrt*;* (B) Peran gen Pfcrt terhadap resistensi klorokuin (Molecular cell, vol. 15, September 2004).

4. Faktor Lain Yang Mungkin Mempengaruhi Terjadinya Resistensi

- Mutasi gen *cg2*

Pada tahun 1991, Wellems memberikan hasil penelitian yang berbeda dengan Foote. Beliau menyatakan bahwa gen pfmdr1 dan *pfmdr2* tidak berhubungan dengan resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa berbeda dengan *P. falciparum*, resistensi pada sel tumor mamalia

tidak terjadi akibat induksi oleh obat sebelumnya, selain itu pada *genetic cross* kedua gen tersebut tidak berhubungan dengan proses resistensi. Berdasarkan analisa genetik, diduga gen yang bertanggung jawab terhadap resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin berada pada 1 lokus sebesar 36 kb di dalam segmen sepanjang 400 kb pada kromosom VII, gen ini kemudian dikenal sebagai gen *cg2* yang menyandi komplek protein dengan berat molekul sekitar 330 KD (Viana *et al*., 2006). Hubungan gen *cg2* pada resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin sampai saat ini masih diperdebatkan.

- Faktor Geografi

Singh berpendapat bahwa daerah yang berbeda menunjukkan distribusi mutasi yang berbeda. Hal ini didasarkan atas hasil yang berbeda pada lokasi penelitian yang berbeda. Sebagian membuktikan adanya hubungan antara gen pfmdr1 dengan resistensi pada isolat *P. falciparum* dari Malaysia, Papua New Guinea, Nigeria dan Sub Sahara Afrika sedangkan pada isolat dari Sudan, Thailand dan Kamboja memperlihatkan tidak ada hubungan antara gen pfmdr1 dengan resistensi parasit (Singh *et al*., 1995).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah uji molekuler berupa studi deskriptif laboratoris untuk mengidentifikasi mutasi gen pfcrt *P. falciparum*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Dalam penelitian ini diambil 3 kabupaten endemis malaria di Sumatera Selatan, yaitu Sekayu, Baturaja, dan Lahat. Sampel darah diambil dari darah pasien yang diterima laboratorium melalui poli dan pasien rawat inap di RSUD Lahat, Sekayu, dan Baturaja dari bulan Mei 2012 sampai dengan Juli 2012. Selain itu sampel darah juga diambil dari pasien yang diterima Laboratorium Parasitologi FK Unsri Palembang. Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSMH Palembang.

C. Populasi, Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi adalah semua tersangka malaria (klinis malaria) yang datang ke Laboratorium Parasitologi FK Unsri Palembang, RSUD Lahat, Sekayu dan Baturaja dan telah diperiksa oleh dokter di poliklinik atau dibagian rawat inap. Sampel adalah semua tersangka malaria yang memenuhi kriteria inklusi penelitian. Besarnya sampel tidak terbatas sampai batas waktu yang ditentukan.

1. Kriteria inklusi dan eksklusi

a. Kriteria inklusi

- Tersangka malaria yang datang ke laboratorium Laboratorium Parasitologi FK Unsri Palembang, RSUD Lahat, Sekayu dan Baturaja melalui poliklinik rawat

jalan dan atau rawat inap dengan keluhan demam atau riwayat demam dalam waktu 48 jam terakhir dan pada pemeriksaan darah tepi ditemukan positif tunggal *P. falciparum*.

b. Kriteria eksklusi

- Tersangka penderita malaria yang menolak sebagai sampel penelitian.
- Tersangka malaria yang pada pemeriksaan darah tepi ditemukan infeksi campuran.
- Tersangka malaria dengan hasil pemeriksaan darah tepi negatif untuk *P falciparum.*.

2. Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *passive case detection* (PCD) yaitu menunggu pasien tersangka malaria datang ke laboratorium dan sampel yang dibawa oleh petugas. Pencatatan kriteria inklusi dilakukan oleh paramedis yang sudah terlatih dengan cara mengisi kuesioner (Depkes RI, 2007).

D. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah gambaran genotip *Ser76Ser, Ser76Thr* dan *Thr76Thr* gen p*fcrt P. falciparum*.

E. Definisi Operasional

- Klinis malaria adalah penderita yang sudah diperiksa oleh dokter dengan gejala demam secara berkala, menggigil, sakit kepala dan juga sering disertai dengan

gejala diare pada anak balita atau sakit otot pada orang dewasa, anemia dan splenomegali (Depkes RI, 2006).

- Pemeriksaan sediaan apusan darah Giemsa positif adalah ditemukan *P. falciparum* pada preparat tebal/sediaan tipis dengan pengecatan Giemsa (Depkes RI, 2006).
- *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau reaksi polimer berantai adalah suatu metode *in vitro* untuk memperbanyak DNA spesifik secara enzimatik menggunakan primer. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada agarose dan mendapat band amplikon pada pasang basa (pb) tertentu yang dapat dibandingkan dengan kontrol dan marker (Yuwono T, 2008).
- Genotipe adalah susunan genetik yang dimiliki oleh makhluk hidup. Diberi simbol dengan dua huruf, bisa homozigot bila genotipenya terdiri dari gen-gen yang sama dari tiap jenis gen (misalnya CC), atau heterozigot bila genotipenya terdiri dari gen-gen yang berlainan dari tiap jenis gennya (misalnya CA) (Yuwono T, 2008). Alel adalah bentuk pasangan alternatif dari gen yang menempati satu lokus pada kromosom (Yuwono T, 2008).
- Resistensi adalah kemampuan parasit untuk bertahan hidup akibat terjadi mutasi gen pada p*fcrt P. falciparum* sehingga *P. falciparum* menjadi kebal terhadap klorokuin (WHO, 2006).

F. Prosedur Kerja

1. Sediaan Apusan Darah Giemsa

1.1. Pengambilan Darah Kapiler:

a. Bersihkan ujung jari tangan bagian tengah dengan kapas alkohol 70%.

b. Biarkan mengering, tusuk jari menggunakan lanset.

c. Tetes darah pertama dibuang.

d. Tetes darah selanjutnya diteteskan di atas objek glas, di buat sediaan darah tebal dan tipis.

e. Tutup bagian bekas tusukan dengan kapas kering.

1.2. Pembuatan Apusan Darah Giemsa

Alat dan bahan

- Objek glass + Mikroskop
- Kapas alkohol
- Torniquet
- Lanset
- Tabung kapiler

Cara Pembuatan Apusan Darah Giemsa (Ngurah, 1984)

a. Bersihkan objek glas dengan tissue untuk menghilangkan debu/kotoran.

b. Lewatkan di atas nyala api untuk menghilangkan lemak.

c. Pada sudut kanan objek glas di beri kode/ labeling.

d. Tetesan darah pertama di buang.

e. Tetes selanjutnya diteteskan pada gelas objek, buat sediaan apusan darah tipis.

f. Biarkan mengering, hindari gangguan serangga.

1.3. Cara Pewarnaan Giemsa Sediaan Darah Tipis

a. Sediaan yang sudah kering dihemolisis dengan Metanol ± 15 menit.

b. Kemudian sediaan dipulas dengan Larutan Giemsa, biarkan 30 menit.

c. Bersihkan sediaan dengan air, lalu dikeringkan.

d. Preparat siap untuk diperiksa dibawah mikroskop.

1.4. Cara Pewarnaan Giemsa Sediaan Darah Tebal

a. Sediaan yang sudah kering dihemolisis dengan air bersih ± 10 .

b. Dibilas lagi dengan air bersih secara hati-hati, lalu dikeringkan.

c. Dipulas dengan larutan Giemsa, biarkan selama 30 menit.

d. Sediaan dibilas dan kemudian dikeringkan.

e. Preparat telah siap untuk diperiksa dibawah mikroskop.

1.5. Cara Pemeriksaan Sediaan Apusan Giemsa

Pemeriksaan sediaan apusan Giemsa secara mikroskopis dilakukan oleh dua tenaga laboratorium (*reader 1 dan reader 2*).

a. Mula-mula apusan darah Giemsa diperiksa dengan pembesaran 10x10, untuk mendapatkan lapangan pandang. Kemudian dipakai pembesaran10x100 dengan minyak immersi.

b. Spesies *Plasmodium* dapat dibedakan berdasarkan bentuk-bentuk stadium antara lain bentuk trofozoit, skizon, bentuk gametosit. Stadium tersebut dapat dibedakan berdasarkan perbedaan inti, sitoplasma, pigmen parasit, ukuran parasit dan eritrosit yang terinfeksi.

c. Hasil pemeriksaan dinyatakan negatif apabila tidak ditemukan parasit pada pengamatan 100 lapangan pandang, yang dinyatakan oleh kedua pemeriksa.

d. Hasil negatif apabila tidak ditemukan parasit pada pengamatan 100 lapangan pandang yang dinyatakan oleh kedua pemeriksa.

2. Pemeriksaan Metode PCR

a. Ektraksi DNA *chelex*-100

Prinsip ekstraksi DNA adalah pemisahan DNA dari suatu sel. Prosesnya meliputi perusakan membran sel, pemutusan kompleks protein-DNA, dan pemisahan DNA dari komponen lain seperti protein, RNA, lemak, dan karbohidrat (Seidman and Moore., 1999).

Bahan :
- Phospate Buffer Saline (PBS) pH 7,4.
- Saponin 0,5% dalam PBS
- Chelex 20% dalam ddH_2O Ph 10,5.

b. Cara Kerja ektraksi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan teknik *chelex-100*

1. Masukkan 200 µl darah ke dalam tabung *eppendorf.*
2. Kemudian ditambahkan 1 ml 0,5% saponin dalam PBS Ph 7,4, vorteks selama 5-10 detik. Sampel diinkubasi semalam pada suhu 4ºC, setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 detik dan supernatan dibuang.
3. Kemudian ditambahkan 1ml PBS pH 7,4, dibolak-balik beberapa kali dengan tangan atau vorteks 5-10 detik dan disentrifugasi pada 12.000 rpm 5 detik, supernatan dibuang lagi.
4. Tahap pencucian ini diulang lagi, ditambahkan 1ml PBS Ph 7,4, vorteks 5-10 detik dan disentrifugasi 12.000 rpm 5 detik supernatan dibung.
5. Setelah itu ditambahkan 100 µl H_2O + 50 µL cheleks 20% dalam ddH_2O Ph 10,5.

6. Diinkubasi pada 100ºC selama 10 menit, vorteks setiap 2 menit.Disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 detik
7. Larutan supernatan (DNA) dipindahkan ke tabung mikro yang steril. DNA disimpan pada -20ºC atau langsung diamplifikasi PCR.
8. Larutan supernatan ini mengandung DNA manusia dan DNA *P. falciparum*. Dengan menggunakan primer yang spesifik untuk DNA *P. falciparum* maka yang diamplifikasi pada proses PCR hanya potongan DNA *P. falciparum*.

c. Nested PCR

Komposisi campuran yang digunakan sebanyak volume total 25 µl PCR *Mix Go Taq* (Promega USA) terdiri dari: 12,5 µl ddH_2O dan 3µl DNA cetakan (template) serta primer oligonukleotida reverse (R) dan forward (F) masing-masing 1µl.

Melalui teknik ini, fragmen DNA target yang spesifik diperbanyak secara *in vitro* dengan menggunakan pasangan primer oligonukleotida sintetik yang membatasi daerah yang akan diperbanyak. Amplifikasi DNA dilakukan 2 tahap (nested), yaitu:

- PCR pertama, untuk amplifikasi gen pfmdr1 dan pfcrt parasit *P. falciparum* dengan menggunakan sepasang primer spesifik. Tiap campuran mengandung 2,5 µl DNA hasil ekstraksi sebagai cetakan *(template).* Ditambahkan kedalam 22,5 µl reaksi PCR yang terdiri dari: 0,2 mM dNTP 1x buffer PCR dengan 1,5 mM $MgCL_2$, 1,25 unit Taq DNA polymerase (promega), dan 2ng/µL primer.

  Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Thermal cycler*. Campuran tersebut diamplifikasi sebanyak 30 siklus dengan kondisi sebagai berikut: predenaturasi pada 94ºC selama 30 detik (1 siklus), denaturasi 94ºC selama 15 detk, annealing 60ºC selama 30 detik dan ekstansi 72ºC selama 15 detik dan diakhiri dengan 72ºC selama 5 menit.

- PCR kedua *(nested* PCR), untuk memperbanyak DNA yang sudah diamplifikasi pada PCR yang pertama agar dapat divisualisasi. Produk DNA hasil amplifikasi pada PCR pertama, diamplifikasikan kembali menggunakan internal primer untuk gen pfcrt *P. falciparum.*

  Primer yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 2.

d. Deteksi hasil PCR

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilihat dengan menggunakana teknis elektroforesis gel agarose (konsentrasi 2%). Elektroforesis dilakukan didalam apparatus elektroforesis (*Horizontal MiniSub DNA Biorad*) yang berisi TBE 1x (Tris-Boric acid-EDTA, 10,8 g/l. Tris pH 8,0 yang mengandung 5.5 g/l Boric Acid dan 0,5 M EDTA pH 8,0) dan ditambahkan zat interkalator Ethidium Bromide 0,1%.

DNA hasil PCR sebanyak 5 µl *loading dye* (0,25% bromphenol blue, 40% b/v sukrosa), kemudian dimasukkan dalam sumuran yang terdapat pada gel. Sebagai penanda ukuran pita-pita DNA hasil elektroforesisi pada gel Marker .(100bp DNA ladder Cat no: 15628-019 LOT NO. 1289697 sebanyak 3µg/µl; *promega*) yang di campur 2µl *loading dye* dan 4,5 µl 1x TBE buffer. Gel elektroforesisi pada tegangan listrik 110 volt. Selanjutnya dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*Biorad* USA) untuk divisualisasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam.

3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

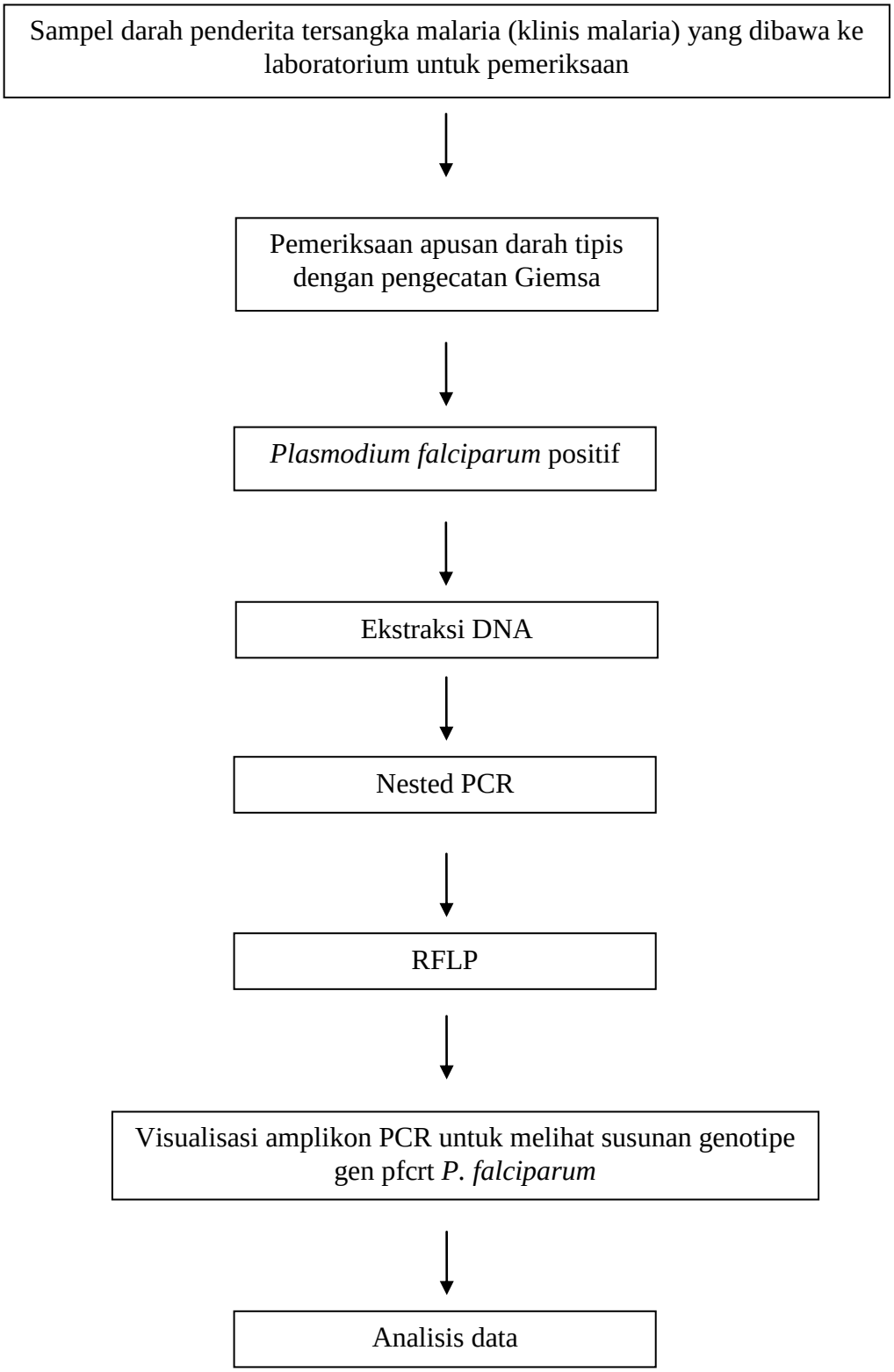
Deteksi mutasi gen Pfcrt dan Pfmdr1 dilakukan dengan memotong DNA produk PCR dengan enzim restriksi diikuti pemisahan fragmen-fragmennya. Adanya mutasi akan menyebabkan terbentuknya situs restriksi baru yang dapat dikenali oleh enzim restriksi.

Sejumlah enzim restriksi digunakan pada proses RFLP. Untuk produk PCR gen *pfcrt*, adanya mutasi pada kodon 76 digunakan enzim *Apo*I. Produk PCR yang sudah ditambahkan dengan enzim restriksi dielektroforesis pada gel agarose 4% dengan tegangan listrik 110 volt. Hasil restriksi dianalisa dan dihubungkan dengan genotipe masing-masing. Jenis enzim restriksi dan gambaran pita hasil elektroforesis dapat dilihat pada lampiran 3.

G. Cara Pengolahan dan Analisis data

Data disajikan secara naratif deskriptif dan dalam bentuk tabulasi.

H. Kerangka Penelitian

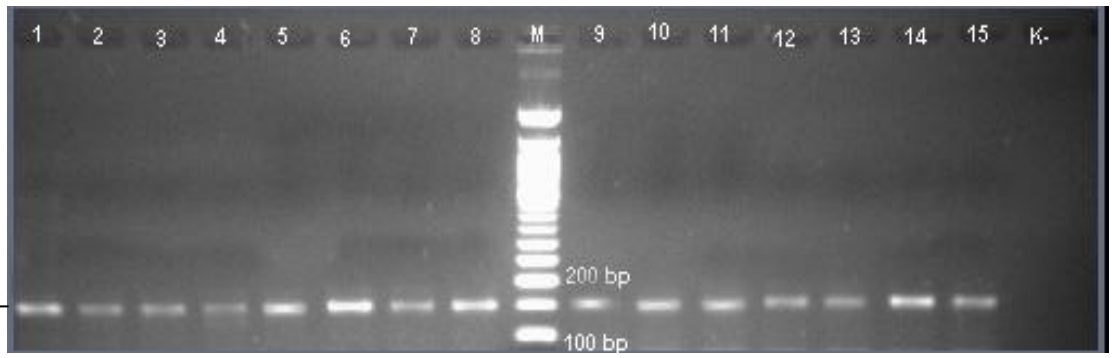


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Amplifikasi dan Digesti Gen Pfcrt

Amplifikasi gen pfcrt pada kodon 76 menggunakan primer nested 165/166 menghasilkan produk sebesar 145 pb. (gambar 12).



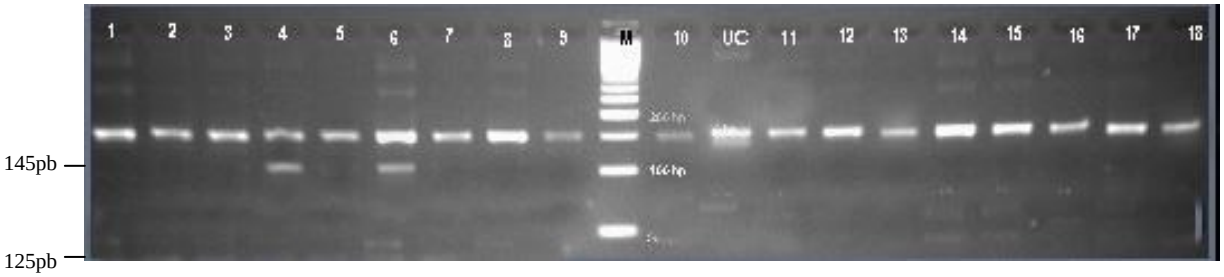
(Gel agarosa 2% (b/v); 90 V, 45 menit)

Gambar 12. Visualisasi gen pfcrt dengan nested PCR

Keterangan:
M : Marker/penanda ukuran DNA
K- : Kontrol negatif
1-15 : Sampel isolat *P. falciparum*

Hasil amplifikasi tadi kemudian dilanjutkan dengan RFLP untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi serta jenis mutasi yang terjadi pada gen tersebut. Deteksi alel mutan pada gen pfcrt dilakukan dengan menggunakan enzim *Apo*I. *Apo*I akan mengenali dan memotong sekuen alel yang wild type dan menghasilkan potongan fragmen DNA sebesar 125 pb dan 20 pb. Apabila terjadi penggantian basa AA menjadi AC pada kodon 76, maka *Apo*I tidak mengenali dan tidak memotong sekuen alel mutan tersebut. Adanya pita DNA

yang tidak terpotong lengkap menunjukkan alel campuran atau mutasi heterozigot, yang berarti sampel tersebut mengandung alel wild tpe dan alel mutan (Gambar 13).



(Gel agarosa 4% (b/v); 80 V, 2 jam)

Gambar 16. Visualisasi hasil digesti gen Pfcrt dengan enzim *ApoI*

Keterangan:
M : Marker/penanda ukuran DNA
UC : Uncut kontrol/sampel yang tidak terpotong
1-18 : Sampel isolat *P. falciparum*

B. Profil Genotip dan Variasi Alel Gen Pfcrt *P. falciparum*

Data pada Tabel 4 menunjukkan hasil positif amplifikasi dan frekuensi distribusi munculnya alel mutan pada gen pfcrt yang terkait dengan resistensi terhadap klorokuin di Sumatera Selatan.

Tabel 4. Hasil Positif Amplifikasi dan Frekuensi Distribusi Alel Mutan

Gen	Kodon	Jumlah Isolat	Positif Amplifikasi	Jumlah alel mutan	Persentase (%)
Pfcrt	76T	30	25	25	100

1. Polimorfisme pada gen Pfcrt

Analisis dari 25 isolat gen Pfcrt kodon 76 menunjukkan sebanyak 92% (23 dari 25) merupakan alel mutan homozigot 76T dan 2 isolat (8%) merupakan mutasi heterozigot (K76T). (Tabel 5)

Tabel 5. Profil genotipe alel-alel mutan pada isolat *P. falciparum*

No Isolat	K76T- Pfcrt
1	T
2	T
3	T
4	K/T
5	T
6	K/T
7	T
8	T
9	T
10	T
11	T
12	T
13	T
14	T
15	T
16	T
17	T
18	T
19	T
20	T
21	T
22	T
23	T
24	T
25	T
26	-
27	-
28	-
29	-
30	-

Prevalensi alel mutan yang terkait dengan resistensi terhadap klorokuin di daerah Sumatera Selatan belum pernah diteliti sebelumnya. Namun berdasarkan penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya di beberapa daerah endemis malaria di Indonesia, hampir semuanya ditemukan alel mutan gen Pfcrt *P. falciparum* seiring dengan meningkatnya laporan kegagalan pengobatan oleh klorokuin (Syafruddin *et al*., 2005). Alel mutan 76T pada gen Pfcrt ditemukan pada semua isolat yang dianalisis. Hal ini mencerminkan adanya kasus kegagalan pengobatan menggunakan klorokuin di Sumatera Selatan. Sebagaimana penelitian yang dilakukan oleh Djimde *et al*., 2001 yang menunjukkan bahwa alel 76T pada gen pfcrt berkaitan dengan terjadinya resistensi secara *in vivo* akibat malaria falciparum dan bertanggungjawab terhadap kegagalan pengobatan dengan menggunakan klorokuin. Menurut Syafruddin *et al*., 2005, mutasi pada gen pfcrt berkaitan erat dengan timbulnya fenotip yang resisten terhadap klorokuin baik di lapangan maupun studi klinis. Berbagai studi menunjukkan bahwa terdapat delapan titik polimorfisme pada gen pfcrt yang terkait dengan resistensi terhadap klorokuin, yaitu M74I, N75E, K76T, A20S, Q271E, N326S, I356T, dan R371I (Willems *et* al., 2001). Namun diantara kedelapan titik mutasi tersebut, mutasi K76T paling sering ditemukan pada galur resisten klorokuin (Willems *et* al., 2001). Selain itu, K76T dapat digunakan sebagai prediktor bagi kegagalan pengobatan oleh klorokuin (Syafrudin *et al*., 2005).

Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin dilaporkan telah terjadi di Indonesia selama 30 tahun. Pada penelitian ini ditemukan adanya polimorfisme baik pada gen pfcrt maupun pfmdr1 dari isolat. Temuan ini memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa resistensi terhadap klorokuin telah menyebar di seluruh daerah endemik malaria di Indonesia (Syafruddin *et al*., 2003; Sutanto *et al*.,2004).

Pada penelitian oleh Syafrudin *et al*., 2005 di bagian barat Indonesia, semua pasien dengan klinis malaria maupun yang asimptomatis ditemukan adanya polimorfisme pada

gen pfcrt 76T. Di Kabupaten Nias, Sumatera Utara, 100% (20 dari 20) isolat membawa polimorfisme pada gen pfcrt 76T. Demikian juga di Kabupaten Hanura Lampung, Kabupaten Kokap Jawa Tengah dan Kabupaten Kutai Kalimantan Timur, semua isolat positif mengandung polimorfisme gen ini.

Tabel 6. Penelitian Mutasi Genetik Gen *P. falciparum* Terkait Resistensi Klorokuin

Lokasi	Persentase Mutasi
	Pfcrt
Sumut	100
Lampung	100
Jawa Tengah	100
Kaltim	100
Sumsel	100

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Isolat-isolat *P. falciparum* dari Sumatera Selatan membawa alel mutan pada gen pfcrt yang terkait dengan resistensi terhadap klorokuin.
2. Penggunaan klorokuin sudah tidak adekuat untuk mengobati malaria di Sumatera Selatan.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap titik-titik mutasi lain dari gen yang terkait dengan resistensi terhadap klorokuin di Sumatera Selatan sehingga hasilnya dapat digunakan untuk memonitor penyebaran resistensi *P. falciparum* terhadap obat antimalaria di Sumatera Selatan.
2. Bagi para klinisi untuk dapat lebih berhati-hati dalam melakukan pemilihan terapi antimalaria mengingat sudah terjadinya kasus resistensi yang menyebar ke berbagai daerah.
3. Perlu dilakukan regulasi oleh para regulator kebijakan (Dinas Kesehatan Kabupaten dan Propinsi bekerjasama dengan BPPOM) untuk mengawasi penyebaran dan pemakaian obat antimalaria yang telah terbukti resisten di masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

Achmad, M.F. dan I. Sutanto. 2003. Peran Gen *Pfmdr1* pada Mekanisme Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Klorokuin. Majalah Kedokteran Indonesia 53(2):69-75.

Ashley, E., R. McGready, S. Proux, and F. Nosten. 2005. Malaria (review). Travel Medicine and Infectious Disease 98:1-15.

Asih, P.B.S., R.M. Dewi, S. Tuti, M. Sadikin, W. Sumarto, B. Sinaga, A.J.A.M. Van der Ven, R.W. Sauerwein, and D. Syafrudin. 2009. Efficacy of Artemisinin-Based Combination Therapy for Treatment of Persons with Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in West Sumba District, East Nusa Tenggara Province, Indonesia, and Genotypic Profiles of the Parasite. Am. J. Trop. Med. Hyg. 80(6):914-918.

Bayoumi R.A.L., H.A. Babiker, and D.E. Arnot. 1994. Uptake and Efflux of Chloroquine by Chloroquine Resistant *Plasmodium falciparum* Clones Recently Isolated in Africa. Acta Tropica 58(2):141-149.

Bray, P.G., R.E. Martin, L. Tilley, S.A. Ward, K. Kirk, and D.A. Fidock. 2005. Defining The Role of Pfcrt In *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance (Abstract). Mol. Microbiology 56(2):323-333.

Chaijaroenkul, W., S.A. Ward, M. Mungthin, D. Johnson, A. Owen, P.G. Bray, K. Na-Bangchang. 2011. Sequence and Gene Expression of Chloroquine resistance Transporter (Pfcrt) in The Association of in vitro Drugs Resistance of *Plasmodium falciparum*. Malaria Journal 10:42.

Chwatt, B.L.J. 1991. Chemoterapy of Malaria. Mc Graw Hill: 1-8.

Cowman, A.F. 1991. The P-glycoprotein Homologues of *Plasmodium falciparum*: Are They Involved in Chloroquine Resistance?. Parasitology Today 7(4):70-76.

Departemen Kesehatan RI. 2002. Profil Kesehatan Indonesia 2001, Menuju Indonesia Sehat 2010.

Departemen Kesehatan RI. 2006. Pedoman Pemberantasan Vektor. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, Jakarta, Indonesia.

Departemen Kesehatan RI. 2007. Pedoman Penemuan Penderita. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, Jakarta, Indonesia.

Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan. 2010. Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Profil Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan.

Djimde, A., O.K. Doumbo, J.F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, A. Dicko, X. Su, T. Nomura, D.A. Fidock, T.E. Wellems, and C.V. Plowe. 2001. A Molecular Marker for Chloroquine Resistant Falciparum Malaria. The N. Eng. J. Med. 344(4): 257-63.

Foote, S.J., J.K. Thomson, A.F. Cowman, and D.J Kemp. 1989. Amplification of Multidrug Resistance Gene in Some Chloroquine Resistant Isolates of *Plasmodium falciparum*. Cell 57:921-30.

Foote, S.J., J.K. Thomson, A.F. Cowman, and D.J Kemp. 1990. Several Allels of Multidrug Resistant Gene Closely Linked to Chloroquine Resistance in *P. falciparum*. Nature 345:255-258.

Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, and M. Berriman. 2002. Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. Nature 419:498-511.

Harijanto, P.N. 2006. Malaria. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Volume 3 (hal.1754-1760). Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia.

Huaman, M.C., K. Yoshinaga, A. Suryanatha, N. Suarsana, and H. Kanbara. 2004. Polymorphism in The Chloroquine Resistance Transporter Gene in *Plasmodium falciparum* Isolates from Lombok, Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 71(1):40–42.

Johnson, D.J., D.A. Fidock, M. Mungthin, V. Lakshmanan, A.B.S. Sidhu, P.G. Bray, and S.A. Ward. 2004. Evidence for a Central role for Pfcrt in Conferring *Plasmodium falciparum* Resistance to Diverse Antimalarial Agents. Molecular cell 15:867-877.

Krogstad, D.J., I.Y. Gluzman, D.E. Kyle, A.M. Oduola, S.K. Martin, W.K. Milhous, and P.H. Schlesinger. 1987. Efflux of Chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of Chloroquine Resistance. Science 238(4831):1283-1285.

Kusumaningtyas, M.A. 2008. Frekuensi Distribusi Alel-alel Resistan *Plasmodium falciparum* Terhadap Obat Antimalaria Klorokuin dan Sulfadoksin-Pirimetamin di Kabupaten Sumba Barat, Nusa Tenggara Timur. Skripsi. 37-8.

Nugroho, A., dan W.M. Tumewu. 2000. Siklus Hidup Plasmodium Malaria. *Dalam* P.N. Harijanto (editor). Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan (hal.38-5). EGC, Jakarta, Indonesia.

Pusarawati, S., dan I.S. Tantular. 2008. Diagnostik Mikroskopis Malaria Pewarnaan Giemsa dan *Acridine Orange* (AO).

Reed, M.B., K.S. Saliba, S.R. Caruana, K. Kirk, and A.F. Cowman. 2000. Pgh1 Modulates Sensitivity and Resstance to Multiple Antimalarial in *Plasmodium falciparum.* Nature 403:906-909.

Rieckmann, K.H., D.R. Davis, and D.C. Hutton. 1989. Plasmodium Vivax Resistance to Chloroquine. Lancet 18:1183-1184.

Saladin, E.G., D.J. Fryauff, W.R.J. Taylor, B.S. Laksana, A.I. Susanti, Purnomo, B. Subianto, and T.L. Richie. 1999. *Plasmodium falciparum mdr1* Mutations and Invivo Chloroquine Resistance in Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(2) 240–244.

Sedigheh, Z., S.T. Najafabadi, A. Zare, and N.D. Djadid. 2002. Detection of Malaria Parasites by Nested PCR in South-Eastern, Iran: Evidence of Highly Mixed Infections in Chahbahar District. *Malaria Journal* 1(2):1-6.

Seidman, L.A., C.J. Moore. 1999. Basic Laboratory Methods for Biotechnology: Textbook and Laboratory Reference. Prentice Hall, New Jersey: 751.

Singh, J.C., B. Singh, A. Alias, and M.S. Abdullah. 1995. Assessment of The Association between Three Pfmdr1 Point Mutations and Chloroquine Resistance in Indonesia. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 89:435-437.

Sony, P.D. 2007. Perbandingan Efikasi Terapi Kombinasi Sulfadoksin-Pirimetamin + Artesunat dengan Sulfadoksin-Pirimetamin + Amodiakuin pada Penderita Malaria Falciparum Tanpa Komplikasi. Tesis Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara (tidak dipublikasikan).

Sutanto, I. dan R. Muljono. 2008. Buku Ajar Parasitologi Kedokteran: *Plasmodium falciparum* (edisi ke-4). Balai Penerbit FK UI, Jakarta, Indonesia.

Sutanto, I. dan W. Pribadi. 2008. Buku Ajar Parasitologi Kedokteran: Parasit Malaria (edisi ke-4). Balai Penerbit FK UI, Jakarta, Indonesia.

Syafruddin, D., P.B.S. Asih, S.L. Aggarwal, and A. Shankar. 2003. Frequency distribution of Antimalarial Drug-resistant Alleles Among Isolates of *Plasmodium falciparum in Purworejo District Central* Java Province, Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69(6):614-620.

Syafrudin, D., P.B.S. Asih, G.J. Casey, J. Maguire, J.K. Baird, H.S. Nagesha, A.F. Cowman, and J.C. Reeder. 2005. Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Resistance to Antimalarial Drugs in Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72(2):174–181.

Syafrudin, D., P.B.S. Asih, R.M. Dewi, S. Tuti, C. Farah, E.R. Ismail, R.E. Iqbal, S. Awalludin, R. Agus, K. Michael, and W. Rogers. 2009. Seasonal prevalence of Malaria in West Sumba District, Indonesia. J. Malaria 8(8).

Thomas, S.M., O. Ndir, T. Dieng, S. Mboup, D. Wypij, J.H. Maguire, and D.F. Wirth. 2002. In Vitro Chloroquine Susceptibility and PCR Analysis of Pfcrt and Pfmdr1 Polymorphism in *Plasmodium falciparum* isolates From Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(5):474–480.

Triglia, T., J.G.T. Menting, C. Wilson, and A.f. Cowman. 1997. Mutations in Dihydropteroate Synthase are Responsible for Sulfone and Sulfonamide Resistance in *Plasmodium falciparum.* Proc. Natl. Acad. Sci. 94:13944–13949.

Triglia, T., P. Wang, P.F. Sims, J.E. Hyde, and A.F. Cowman. 1998. Allelic Exchange at the Endogenous Genomic Locus in *Plasmodium falciparum* Proves the Role of

Dihydropteroate Synthase in Sulfadoxine- Resistant Malaria. *EMBO J. 17:* 3807–3815.

Viana, G.M.R., R.L.D. Machado, V.S.P. Calvosa, and M.M. Povoa. 2006. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfcrt* Genes in *Plasmodium falciparum* Samples from Endemic Malaria Areas in Rondonia and Pará State, Brazilian Amazon Region. Cad. Saúde Pública 22(12):2703-2711.

Wellems, T.E. 1991. Molecular Genetics of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. Parasitology Today 7:110-2.

Willems, T.E., and C.V. Plowe. 2001. Chloroquine-Resistant Malaria. J. Infect. Dis. 184:770-776.

WHO. 2003. Assessment and Monitoring of Antimalarial Drug Efficacy for The Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria. Geneva.

WHO. 2005. Malaria Situation in SEAR Country, Malaria Control/ Roll Back Malaria, (http://www.whosea.org/mal/issues.htm, diakses 15 Februari 2012).

WHO. 2006. Guidelines for The Treatment of Malaria. Geneva.

Lampiran 1

Sekuen Primer yang Digunakan

Gen	Primer		Arah	Sekuen	Panjang (pb)	T_m (^{0}C)
Pfcrt	Outer primer	160	Forward	5'-CCGTTAATAATAAAATACACGCAG-3'	23	50
		161	Reverse	5'-CGGATGTTACAAAACTATAGTTACC-3'	25	53
	Inner Primer	165	Forward	5'-TGTGCTCATGTGTTTAAACTT-3'	21	46
		166	Reverse	5'-CAAAACTATAGTTACCAATTTTG-3'	23	46

(Sumber: Triglia&Cowman 1994: 7149; Fidock *et al*., 2000: 861; Hall *et al*.,2002:527)

Lampiran 2

Enzim Restriksi yang Digunakan beserta Situs Pengenalannya

Enzim (Sumber)	Situs Restriksi	Residu Polimorfisme	Produk PCR (pb)	Ukuran fragmen *wild-type (pb)*	Ukuran Fragmen mutan (pb)
*Apo*I (*Arthrobacter protophormiae)*	5'…R▼A A T T Y…3' 3'…Y T A A A▲R…5'	Lys-76-Thr	145	125, 20	145

Lampiran 3

Komposisi Campuran Reaksi PCR Nested

Bahan	Volume PCR pertama (µl)	Volume PCR kedua (µl)
ddH_2O	9	9
Go *Taq* Polimerase	10	10
Primer *forward*	0,5	0,5
Primer *reverse*	0,5	0,5
DNA cetakan	5	5
Total	25	25

Lampiran 4

Komposisi Campuran Reaksi RFLP

Bahan	Volume (µl)
ddH_2O	2,5
Buffer	1,2
Enzim Restriksi	0,2
BSA	0,1
Amplikon	8
Total	12

Lampiran 5

Kondisi PCR

No	Gen	Primer	Suhu	Waktu	Siklus
1	Pfcrt	160 & 161	94/94/56/72/72	5’/30”/30”/1’/7’	29
		165 & 166	95/95/60/72/72	5’/30”/30”/50”/7’	39

Lampiran 6

INFORMED CONSENT

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama :

Jenis Kelamin :

Umur :

Pekerjaan :

Alamat :

menyatakan dengan sebenarnya bahwa saya bersedia mengikuti penelitian mengenai Identifikasi Mutasi Gen Pfert Plasmodium falciparum Yang Berhubungan dengan Terjadinya Resistensi Klorokuin di Sumatera Selatan yang dilakukan oleh Dwi Handayani setelah saya mendapatkan penjelasan mengenai penelitian ini.

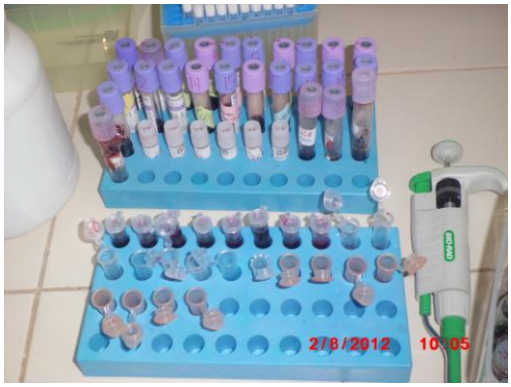
Selanjutnya saya tidak akan menuntut dikemudian hari apabila selama mengikuti penelitian terjadi hal-hal yang tidak terduga diluar kemampuan peneliti sebagai manusia.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya tanpa paksaan dan dalam keadaan sadar sepenuhnya.

Palembang, Maret 2012

Yang memberikan penjelasan	Saksi	Yang membuat pernyataan
( )	( )	( )

Lampiran 7



Isolasi DNA

Mesin PCR

Visualisasi