LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA SATEKS

Deteksi Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Obat Antimalaria Golongan Sulfa Dengan Marka Situs Polimorfik *Ala437Gly* Gen *DHPS* Dengan Metode PCR-RFLP

Oleh,

dr. Tri Suciati. M.Kes

Dibiayai Anggaran DIPA No. 0700/023-04.2.16/06/2011 tanggal 20 Desember 2010
Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Universitas Sriwijaya
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian Dosen Muda SATEKs
Universitas Sriwijaya Nomor : 0320.a/UN9.4.2.1 /LK/2011 tanggal : 13 Juni 2011

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA

OKTOBER 2011

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DOSEN MUDA SATEKs UNSRI

1.	Judul Penelitian	: Deteksi Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Golongan Sulfa dengan Marka Situs Polimorfik *Ala437Gly* Gen DHPS Dengan Metode PCR-RFLP
2.	Bidang Ilmu Penelitian	: Kedokteran
3.	Ketua Peneliti	:
	a. Nama lengkap	: Tri Suciati, M.Kes
	b. Jenis kelamin	: Perempuan
	c. NIP	: 19830714 200912 2 004
	d. Jabatan fungsional	: Staf Bagian Anatomi FK UNSRI
	e. Jabatan struktural	: Tidak ada
	f. Bidang keahlian	: Biologi Molekuler
	g. Fakultas	: Kedokteran
	h. Perguruan tinggi	: Universitas Sriwijaya
	i. Alamat	: Jl. Raya Palembang – Prabumulih Km 32 Ogan Ilir 30662 Telp (0711)581077 ; Fax: 0711580053 Email: trisuciati@yahoo.com
4.	Jumlah tim peneliti	: 1 (satu) orang.
5.	Lokasi penelitian	: 1. Bagian Parasitologi FK UNSRI 2. Laboratorium Biologi Molekuler FK UNSRI
6.	Mata kuliah yang diampu	: Biologi
7.	Waktu penelitian	: 7 (tujuh) bulan
8.	Pembiayaan	: Rp 7.500.000

Inderalaya, 23 November 2011

Dekan Fakultas Kedokteran	Ketua Peneliti
Dr. dr. Zulkarnain, M.MedSc NIP 19610903 198903 1 002	Tri Suciati, M.Kes NIP 19830714 200912 2 004

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Univ. Sriwijaya

Prof. Dr. Ir. H. Muhammad Said, M.Sc
NIP 19610812 198703 1 00

ABSTRACT

Over the past decade, anti-malarial drug resistance has rapidly become a major public health problem in the South East Asia region including South Sumatra. Treatment failures to the first and second lines antimalarial drugs such as chloroquine and combination of sulfadoxine-pyrimethamine have increased in the South Sumatera Province, Indonesia. A molecular epidemiologic study was conducted to determine the frequency distribution of mutant alleles of the genes associated with the resistance among the isolates of *Plasmodium falciparum* from this area. Analyses using a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism showed that nearly all of the 6 samples carried wid type alleles in genes associated with sulfa drugs resistance *P. falciparum* dihydropteroate synthase (dhps) gene *Ala437* (100%).

PRAKATA

Penelitian di bidang Biomedis merupakan suatu tantangan tersendiri untuk menguak permasalah kesehatan dengan pendekatan ilmu kedokteran dasar sehingga didapatkan dasar teori baru dan menjelaskan patomekanisme yang terjadi akibat suatu penyakit. Penelitian ini yang berjudul "Deteksi Resistensi Plasmodium falciparum terhadap Klorokuin dengan Marka Situs Polimorfik *Ala437Gly* Gen *DHPS* Menggunakan Metode PCR-RFLP*"* merupakan penelitian untuk menentukan adanya mutasi pada gen *DHPS* yang berperanan dalam terjadinya resistensi terhadap Klorokuin dengan metode yang mudah, murah dan tidak memerlukan keahlian tertentu serta dapat dilakukan dalam waktu yang singkat dan cepat.

Malaria sampai saat ini masih menjadi permasahan kesehatan terlebih dengan muculnya strain *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap obat antimalaria yang ada. Malihat besarnya permasalahan yang disebabkan penyakit ini sehingga FK Unsri menjadikan malaria sebagai salah satu riset yang diunggulkan. Dengan penggunaan teknologi biologi molekuler diharapkan dapat mendapatkan suatu metode deteksi yang lebih mudah dan diketahuinya pola resistensi *Plasmodium falciparum* di Sumatera Selatan.

Penelitian ini merupakan penelitian pendahulan untuk mendapatkan data karakteristik penderita dan melihat mutasi-mutasi pada gen yang bertanggungjawab terhadap terbentuknya protein transport.

SISTEMATIKA LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA SATEKS

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN ……....	2
ABSTRAK	3
PRAKATA ……	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL ……	6
DAFTAR GAMBAR ……...	7
I. PENDAHULUAN …….	8
II. TINJAUAN PUSTAKA ……	10
III. METODE PENELITIAN ……..	14
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN …….	21
V. KESIMPULAN DAN SARAN …….	25
DAFTAR PUSTAKA ……..	26

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Tempat Mutasi Pada Gen DHPS *Ala437Gly* dari *P.falciparum* Yang Berhubungan Dengan Resistensi Klorokuin	
Tabel 2. Distribusi Responden Menurut Jenis Kelamin	
Tabel 2: Distribusi Responden Menurut Usia	
Tabel 3: Distribusi Responden Menurut Tingkat Pendidikan	
Tabel 4: Distribusi Responden Menurut Pekerjaan	
Tabel 5: Distribusi Responden Berdasarkan Hasil Apusan Darah Giemsa	
Tabel 6: Deteksi Mutasi Gen DHPS *Ala437Gly* dengan PCR RFLP	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambaran mikroskopik *Plasmodium falciparum* pada apusan darah.	

BAB I. PENDAHULUAN

1. 1 Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu 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*. Di antara keempat spesies tersebut, *P. falciparum* merupakan spesies yan mematikan, oleh karena potensinya yang dapat menyebabkan komplikasi serebral. Malaria sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat terutama di negara tropis sekaligus menjadi ancaman global bagi penduduk bumi. Menurut WHO, sekitar 1 milyar penduduk di dunia tinggal di daerah endemi dan 1 juta diantaranya meninggal akibat malaria setiap tahunnya (WHO, 1983).

Pengobatan malaria dalam dua dasawarsa terakhir menjadi semakin sulit dengan munculnya galur-galur *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap berbagai obat anti malaria yang ada (*multi-drug resistant strains*), serta vektor nyamuk nyamuk yang telah pula resisten terhadap berbagai macam insektisida. Sejak munculnya fenomena resistensi terhadap klorokuin dan obat anti malaria tradisional yang murah seperti kina dan klorokuin telah secara dramatis menjadi tidak efektif digunakan di banyak kawasan menyusul penyebaran resistensi yang sangat cepat terhadap obat ini (Shallom et al 1999).

Fenomena resistensi terhadap klorokuin di atas secara nyata telah meningkatkan penggunaan obat-obat anti malaria alternatif, misalnya golongan antifolat dan sulfa. Antifolat yang paling umum digunakan adalah pirimetamin dan proguanil atau bentuk kombinasi sulfadoksin dengan pirimetamin (Wang et al, 1997). Obat ini merupakan obat yang relatif murah dan efektif terhadap malaria falciparum yang telah resisten terhadap klorokuin.

Kombinasi sulfadoksin dan pirimetamin ini secara luas telah digunakan di Afrika sebagai *first and second line drugs* (Jelinek et al 1999; Urdaneta et al 1999), akan tetapi resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap kombinasi kedua obat tersebut terjadi juga secara cepat segera setelah obat ini secara luas digunakan di beberapa daerah endemik malaria dimana klorokuin telah resisten. Di Thailand, obat ini pertama kali dipergunakan pada tahun 1970, ternyata dalam lima tahun *radical cure rate* pada 28 hari setelah pemberian obat telah menurun dari 83% pada tahun 1975 menjadi 22% pada tahun 1979 (Urdanetta et al 1999). Resistensi terhadap obat antifolat tersebut telah tersebar luas di Asia Tenggara dan kini mengancam Afrika dimana obat ini masih sangat luas digunakan (Wang et al 1997; Cowman 1998). Di Indonesia, resistensi terhadap pirimetamin dan sulfadoksin pertama kali dilaporkan

di Irian Jaya (Hutapea 1979) dan dalam waktu 15 tahun telah menyebar luas hampir ke seluruh propinsi endemik malaria di Indonesia (Tjitra et al 1997).

Perkembangan biologi molekuler dalam 20 tahun terakhir ini telah memberikan kemajuan yang cukup berarti dalam memahami mekanisme timbulnya resistensi parasit malaria terhadap obat-obat golongan antifolat (pirimetamin) dan sulfa serta sikloguanil (Cowman 1998). Studi molekuler tentang mekanisme dimana parasit dapat bertahan hidup terhadap pemberian obat ini, telah memacu usaha-usaha untuk mengidentifikasi gen penyandi enzim dihidrofolat reduktase (DHFR) (Bzik et al 1987) dan dihidropteroat sintetase (DHPS) (Brooks et al 1994; Triglia and Cowman 1994) serta mutasi-mutasi yang terjadi pada gen-gen tersebut yang berperan pada fenomena resistensi (Brooks et al 1998; Cowman et al 1988)

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui dasar molekuler yang mendasari resistensi Plasmodium terhadap Sulfa telah menemukan berbagai alel mutan pada gen DHPS yang berhubungan dengan timbulnya resistensi ini (Cowman 1998). Adanya alel mutan 436F/A, 437G, 540E, 581G dan 613S/T telah menyebabkan berbagai derajat resistensi terhadap obat-obat Sulfa termasuk Sulfadoksin. Penelitian epidemiologi menggunakan teknik PCR-RFLP memperlihatkan alel 437G merupakan alel tersering dijumpai sedangkan adanya alel mutan lainnya akan memperberat derajat resistensi yang terjadi.

1. 2 Rumusan Masalah

Apakah pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat sudah terjadi mutasi pada gen *DHPS Plasmodium falciparum* yang berhubungan dengan terjadinya resistensi terhadap Pirimetamin?

1. 3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Melakukan analisis mutasi pada gen *DHPS Plasmodium falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat

Tujuan Khusus

1. Mendapatkan gambaran genotip *Ala437Ala, Ala437Gly* dan *Gly437Gly* gen *DHPS Plasmodium falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat

2. Mendapatkan gambaran alel varian *437Ala* dan *437Gly* gen *DHPS Plasmodium falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat

1. 4 Manfaat Penelitian

Manfaat Teoritis

Memberi landasan dasar teoritis tentang genotip dan alotip mutasi *Ala437Gly* gen *DHPS Plasmodium falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat**.**

Manfaat Terapan

1. Sebagai bahan/informasi bagi klinisi dalam upaya memberikan obat anti malaria selain Pirimetamin bila diketahui *P. falciparum* di daerah tersebut telah resisten terhadap klorokuin
2. Sebagai masukan bagi Dinas Kesehatan Kabupaten Lahat dan Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan tentang kasus resistensi terhadap Pirimetamin di Kabupaten Lahat serta perumusan langkah antisipatif.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1. Obat-obat Sulfa, Pirimetamin, Sikloguanil dan Perannya Pada Biosintesis Folat

Obat Sulfa telah digunakan secara luas untuk mengobati penyakit yang disebabkan infeksi bakteri. Efek antibakterial senyawa-senyawa ini berhubungan dengan aktivitas antagonisme terhadap *p-aminobenzoic acid* (PABA) yang dibutuhkan untuk biosintesis folat. Senyawa Sulfa secara umum mempunyai kesamaan struktur dengan PABA dan berperan sebagai inhibitor kompetitif terhadap enzim *dihydropteroate synthase* (DHPS).

Pada Plasmodium, enzim DHPS berperan pada sintesis *7,8 hydroxypteroate* dari *2-amino, 4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine diphosphate* dan PABA. Kompetisi perikatan antara PABA dengan obat sulfa akan menyebabkan terganggunya proses tersebut (Cowman, 1998)

Pirimetamin dan sikloguanil juga bekerja pada proses biosintesis folat. Efek anti folat senyawa di atas pertama kali diperlihatkan pada bakteri. Penelitian selanjutnya membuktikan bahwa sikloguanil dan pirimetamin merupakan inhibitor kuat enzim dihydrofolate reductase

dari *P. berghei, P. chaubadi* dan *P. falciparum* (Zolg et al 1989; Sirawaraporn et al 1997; Sano et al 1994).

2.2. Biosistesis Folat dan Jalur Penyelamatannya (Salvage Pathway)

Plasmodium falciparum dapat mensintesis kofaktor tetrahidrofolat dari GTP, PABA dan L-glutamat secara *de novo*. Selain itu, folat juga dapat diperoleh dari luar melalui jalan penyelamatan (*salvage pathway*). Krungkai dkk (1989) telah membuktikan melalui inkorporasi folat yang dilabel dengan radioaktif akan menjadi 5-metil tetrahidrofolat$_5$. Penyelamatan folat terjadi melalui pemecahan folat menjadi *pterin-6-aldehyde* dan *p-aminobenzoyl glutamate* yang selanjutnya disalurkan ke dalam proses biosintesis folat *de novo*.

Enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis folat pada spesies Plasmodium adalah *GTP cyclohydrolase, 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterinpyrophosphokinase (PPPK), dihydropteroate synthase (DHPS) dan dihydrofolate reductase (DHFR).*

Kofaktor folat berfungsi sebagai akseptor atau donor 1 unit karbon pada bermacam-macam reaksi yang terlibat daam metabolisme asam amino, purin dan pirimidin, oleh karena itu sangat penting pada pertumbuhan Plasmodium. Senyawa-senyawa folat intraseluler Plasmodium terdapat dalam bentuk *5 methyl tetrahydofolate$_5$* yang disintesis dari *tetrahydofolate* oeh enzim pterylpolyglutamate synthase. Kofaktor ini dan derivat-derivatnya digunakan untuk sintesis glisin, metionin dan timidilat.

Enzim utama yang menjadi sasaran kemoterapi pada proses biosintesis folat ini adalah DHPS dan DHFR. Enzim DHPS bertanggung jawab terhadap sintesis *7,8-dihydropteroate dari 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridin diphosphate* dan PABA. Obat Sulfa mempunyai struktur yang mirip dengan PABA dan melakukan kompetisi perikatan dengan enzim DHPS *Plasmodium berghei, P. chabaudi* dan *P. falciparum*, sedangkan enzim DHFR bertanggungjawab terhadap reduksi *7,8 dihydrofolate* menjadi *tetrahydrofolate*. Pirimetamin dan sikloguanil merupakan inhibitor kuat enzim ini. Pirimetamin biasanya digunakan dalam bentuk kombinasi dengan senyawa sulfa yaitu sulfadoksin sehingga dihasilkan efek sinergis.

Adanya inhibisi terhadap enzim-enzim DHFR dan DHPS pada biosintesis folat parasit malaria akan menyebabkan gangguan proses tersebut yang selanjutnya akan menyebabkan terjadinya penurunan jumlah kofaktor tetrahidrofolat. Kadaan di atas akan mengakibatkan penekanan biosintesis purin dan pirimidin yang pada akhirnya menyebabkan gangguan snteis DNA.

Sejalan dengan penghambatan proses biosintesis folat, efek sitologis yang pada Plasmodium terlihat dengan jelas pada stadium trofozoit tua dimana sintesis DNA mencapai puncaknya.

2.3. Mekanisme Resistensi Terhadap Obat Golongan Sulfa

Obat-obat Sulfa merupakan anti malaria yang sering digunakan dalam bentuk kombinasi dengan inhibitor DHFR. Sulfadoksin telah dipergunakan secara luas dalam bentuk kombinasi dengan pirimetamin. Obat-obat Sulfa diketahui dapat menghambat enzim DHPS. Obat-obat ini diketahui mempunyai struktur yang mirip dengan PABA dan bekerja sebagai inhibitor kompetitif terhadap enzim DHPS (Triglia et al, 1997). Selai itu DHPS akan mengubah *dihydropteroate* ke bentuk yang analog dengan Sulfa yang selanjutnya menghambat enzim *dihydrofolate synthase* pada biosintesis folat.

2.4. Gen PPPK-DHPS: Struktur dan Fungsi

Gen yang menyandi DHPS telah berhasil dikloning dan disekuensing, dan diketahui merupakan gen bifungsional yang juga menyandi enzim 6-*hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate* (PPPK) (Triglia and Cowman 1994). Gen ini terletak pada kromosom 8 dan terdiri dari tiga *open reading frame* (ORF) yaitu sekuens 585-720, 915-2783 dab 2904-3016. Selain itu juga menpunyai intron yaitu pada nukleotida 721-914 dan 2784-2903 yang kaya dengan A+T.

2.5. Pengaruh Mutasi Gen DHFR-TS

Analisis galur *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap Sulfadoksin menunjukkan adanya beberapa kemungkinan mekanisme resistensi (Dieckman and Jung, 1986), tetapi penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa mutasi-mutasi pada gen penyandi enzim DHPS merupakan faktor penyebab utama.Pada P. falciparum yang sudah resisten terhadap Sulfadoksin telah dibuktikan bahwa asupan obat menurun, tetapi sampai sejauh ini belum jelas apakah penurunan ini disebabkan oleh enzim DHPS. Namun jelas bahwa sintesis analog Sulfa dari dihydropteroate berkurang, menunjukkkan bahwa terdapat perubahan pada enzim DHPS yang kemudian mempengaruhi fungsinya.

Analisis terhadap sekuens gen DHPS galur *Plasmodium falciparum* yang resisten dan sensitif menunjukkan bahwa adanya perbedaan residu asam amino yang bertanggungjawab atas terjadinya resistensi terhadap obat ini.

Analisis genetik silang antara *galur P. falciparum* yang sensitif dan resisten terhadap sulfadoksin menunjukkkan adanya mutasi-mutasi gen DHPS pada fenotip yang resisten terhadap obat ini (Wang et al 1997). Selain itu, ditemukan pula bahwa konsentrasi folat dalam medium mempunyai efek terhadap tingkat resistensi *P. falciparum* terhadap Sulfadoksin. Dengan demikian, folat eksogen mempunyai pengaruh yang menentukan pada tingkat resistensi terhadap Sulfadoksin dan merupakan faktor penting dalam mekanisme resistensi (Wang et al, 1997)

Ekspresi enzim PPPK-DHPS yang telah dipurifikasi pada Eschericia coli tidak hanya menunjukkan efek mutasi tetapi juga membuktikan juga bahwa perubahan-perubahan tersebut memeainkan peran utama dalam mekanisme resistensinya (Triglia et al, 1997). Delapan alel berbeda enzim PPPK-DHPS yang telah diekspresikan pada E. coli dan ditentukan kinetikanya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1.

Efek Mutasi gen DHPS *Plasmodium falciparum* pada konstanta inhibisi Sulfadoksin

Residu Asam Amino					**Konstanta inhibisi (nM)**
436	**437**	**540**	**581**	**613**	
Ser	Ala	Lys	Ala	Ala	0,14
Ser	**Gly**	Lys	Ala	Ala	1,39
Ala	**Gly**	Lys	Ala	Ala	19,9
Ser	**Gly**	Lys	**Gly**	Ala	16,2
Phe	**Gly**	Lys	Ala	**Ser**	112
Ala	**Gly**	**Glu**	Ala	Ala	98,3
Ser	Ala	Lys	**Gly**	Ala	0,55
Ser	**Gly**	**Glu**	Ala	Ala	27,7

Sumber: Cowman et al 1998

Dari tabel 2 diperlihatkan bahwa Ki dari isolat yang sensitif berbeda hampir 3 orde dengan isolat yang resisiten terhadap Sulfadoksin yaitu dari 0,14 nM untuk alel sensitif menjadi 112 untuk alel yang resisten terhadap Sulfadoksin.

Dari semua hasil ini, menunjukkan bahwa perubahan asam amino pada enzim DHPS pada isolat yang resisten terhadap Sulfadoksin merupakan mekanisme sentral timbulnya resistensi terhadap obat ini. Resistensi silang terhadap obat golongan Sulfa

Yang lain seperti: Sulfonamid, Sulfametoksazol, Sulfatiazol, Silfon dan Dapson juga dapat diperlihatkan pada akumulasi mutasi gen DHPS. Selanjutnya dengan teknik transfeksi gen dapat dibuktikan bahwa mutasi-mutasi gen DHPS bertanggungjawab terhadap mekenisme resistensi obat ini (Triglia et al, 1997).

BAB III. METODE PENELITIAN

1.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan studi deskriptif untuk mengetahui resistensi Plasmodium falciparum terhadap anti malaria Klorokuin dengan marka alel *Asp86Tyr* gen *Pfmdr1*dengan menggunakan teknik Biologi Molekuler (*Nested-PCR*). Penelitian ini merupakan penelitian payung **Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Obat Anti Malaria Di Sumatera Selatan**.

1.2. Tempat dan Waktu

Dalam penelitian ini sampel darah diambil dari darah pasien yang diterima laboratorium melalui poli dan pasien rawat inap dari tanggal Mei 2011 sampai dengan November 2011. Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua tersangka malaria yang datang ke laboratorium dan telah diperiksa oleh dokter di poli. Sampel adalah semua tersangka malaria yang memenuhi kriteria inklusi penelitian sebagaimana penelitian **Penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Sebagai Metode Diagnosis Pasti Infeksi *Plasmodium falciparum.***

3.4 Besar Sampel

Sampel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$N \doteq \frac{Z_{1/2}\ \alpha^2 x\ [P(1-P)]}{d^2}$$

Keterangan:

N = Sampel yang akan di cari

Z = 1,96 (interval kepercayaan 95%)

P = Proporsi malaria di Lahat 10%

d = 10%

Maka jumlah sampel:

$$N_1 = (1.96)^2\ X\ (0,1\ X\ 0,9) / (0,1)^2$$
$$= 34,6$$

Dari perhitungan di atas didapatkan jumlah sampel minimal adalah sebanyak 35 orang. Karena penelitian ini dilakukan bersamaan dengan penelitian lain yaitu **Penggunaan Polymerase Chain Reaction (PCR) Sebagai Metode Diagnosis Pasti Infeksi *Plasmodium falciparum*** yang mempunyai sampel lebih besar maka semua sampel tersebut akan digunakan pada penelitian ini.

a. Kriteria inklusi

- Tersangka malaria yang datang ke Laboratorium RSUD Lahat melalui poliklinik dengan keluhan demam atau riwayat demam dalam waktu 48 jam terakhir.
- Tersangka malaria yang pasiennya sudah rawat inap di RSUD Lahat dengan klinis malaria yang di lihat dari data status pasien.

b. Kriteria eksklusi

- Tersangka penderita malaria yang datang ke Laboratorium RSUD Lahat yang menolak untuk diambil darah jari atau menolak sebagai sampel penelitian.

3.5. Cara Pengambilan Sampel

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

3.6. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah gambaran genotip *Ala437Ala, Ala437Gly* dan *Gly437Gly* dan alel *437Ala* dan *437Gly* gen *DHPS Plasmodium falciparum*.

3.7. 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, 2006).
- Pemeriksaan sediaan apusan darah Giemsa positif adalah ditemukan *P. falciparum* pada preparat tebal / sediaan tipis.
- *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 basa pair

(bp) tertentu yang dapat dibandingkan dengan kontrol dan marker (Erlich,1989; Brown, 1995; Newton and Graham, 1997).

3.8. Prosedur Pemeriksaan

1. Sediaan Apusan Darah Giemsa

Alat dan bahan

- Objek glass + Mikroskop
- Kapas alkohol
- Torniquet
- Kertas filter Whatman no. 1
- Lanset
- Tabung kapiler

1.1. Cara Membuat Larutan stock Giemsa

Larutan pokok Giemsa menurut Garcia dan Bruckner (1994)

- Serbuk Giemsa 0,6 gram
- Methanol absolute 50 ml
- Gliserin netral 50 ml

Geruslah sebagian serbuk giemsa dan gliserin di dalam mortar dan masukkan ke dalam labu ukur 500 ml atau 1000 ml hingga semua bahan yang di timbang bercampur rata. Tutup dengan kapas dan bungkus dengan kertas tebal, letakkan dalam penangas suhu 55-60ºC selama 2 jam. Kocok perlahan setiap ½ jam. Biarkan dingin, tambahkan alkohol dan simpan dalam botol berwarna coklat, Saring sebelum di pakai.

1.2. Cara Kerja 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.

1.3. Cara kerja membuat sediaan pada kertas Whatman

a. Ambil 10 10µl darah kapiler.
b.Teteskan pada kertas filter Whatman
c. Biarkan kering. Lalu masukkan dalam plastik yang perekat.

d.Berii kode pasien.

1.4. Cara Pembuatan Apusan Darah Giemsa menurut 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 objek glas, buat sediaan apusan darah tebal dan apusan darah tipis dengan 2 preparat, yang satu untuk pemeriksaan rutin Labor RSUD Lahat sedangkan yang satu untuk penelitian ini.
f. Biarkan mengering, hindari gangguan serangga.

1.5. 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 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.

1.6. Cara Pemeriksaan Sediaan Apusan Giemsa

Pemeriksaan sediaan apusan Giemsa secara mikroskopis dilakukan oleh dua tenaga Laboratorium (*reader 1 dan reader 2*) dari 2 instansi yang berbeda.

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 tropozoit, skizon, bentuk gametosit. Stadium tersebut dapat dibedakan berdasarkan perbedaan inti, sitoplasma, pigmen parasit, ukuran oarasit dan erytrosit yang terinfeksi.

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

2. Pemeriksaan Metode PCR

2.1. Ektraksi DNA *chelex*-100

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

Cara Kerja ekstraksi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan teknik *chelex-100*

1. Kertas filter yang ada spot darahnya (10µl) dipotong-potong dan dimasukkan kedalam 1,5 ml 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 disentripugasi 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.Disenrtipugasi 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.

1.2. Nested PCR

Bahan : Saat melaukan 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.

DNA target adalah gen "small subunit ribosomal RNA (ssuRNA). Melalui teknik ini, fragmen DNA target yang spesifik diperbanyak secara *in vitro* dengan menggunakan pasangan primer oligonukleotida sintetik yang membatasi daerah yang akan di perbanyak. Amplifikasi DNA dilakukan 2 tahap (nested), yaitu :

1) PCR pertama, untuk amplifikasi gen *Pfmdr1*parasit *Plasmodium* spp 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 genus spesifik oligonukleotida dari ssurRNA (primer universal) yaitu:

   P forawrd (5′-TAC CGT TTT ACG GAC AGA CTT-3′)

   P reverse (5′- TAC CGT TTT ACG GAA CCC AAA ATC AGA T-3′)

   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.

2) 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 *Pfmdr1 Plasmodium falciparum* yaitu :

   Primer forward (5′- CGT AAT TAC CTT ACG ATC AGA CGT -3′)

   Primer reverse (5′- AAA GAA AGA TCT AGT CAC CTC CAA TG-3′)

2.3. 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%.

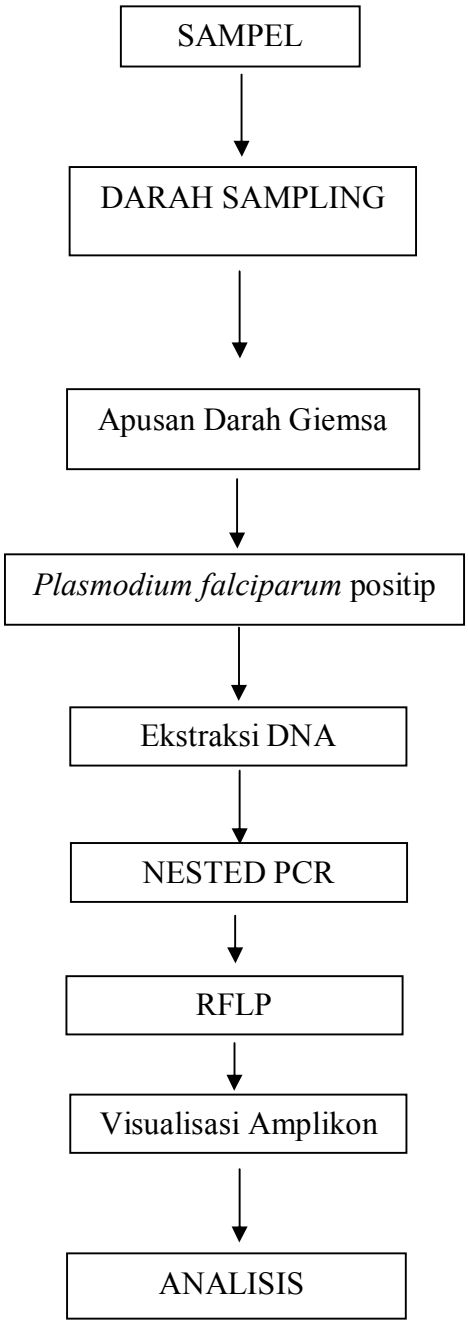
DNA hasil PCR sebanyak 5 µl *loading dye* (0,25% bromphenol blue, 40% b/v sukrosa), kemudian dimasukkan dalam sumuran yang terdapat pada gel. Sebagai penanda ukuran pita-pita DNA hasil elektroforesisi pada gel Marker .(100bp DNA ladder Cat no: 15628-019 LOT NO. 1289697 sebanyak 3µg/µl; *promega*) yang 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 300nm dan direkam. Hasil restriksi dianalisa dan

dihubungkan dengan genotype masing-masing dengan menggunakan sekunsing otomatis DNA selama 2 jam.

3.9. Analisis Data

Data disajikan secara naratif deskriptif dan dalam bentuk tabulasi dan diagram batang

3.10. Alur Penelitian



BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Responden

1.1. Jenis Kelamin

Dari 58 responden terdapat responden laki-laki lebih banyak yaitu 35 (60,3%) dibandingkan dengan responden perempuan sebanyak 23 (39,7%). Adapun data lengkap mengenai distribusi responden menurut jenis kelamin dapat dilihat pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2: Distribusi Responden Menurut Jenis Kelamin

Jenis Kelamin	Jumlah (orang)	Persentase (%)
Laki-laki	35	60,3
Perempuan	23	39,7
Jumlah	58	100,0

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang pernah di lakukan oleh Ervi (2006) dimana responden anak laki-laki lebih banyak dari pada anak perempuan.

1.2. Usia

Dari 58 responden terdapat yang paling banyak pada usia dewasa yaitu sebanyak 36 (62,1%), kemudian responden usia tua sebesar 14 (24,1%) sisanya berasal dari responden anak yaitu sebesar 8 (13,8%). Adapun data lengkap mengenai distribusi responden menurut usia dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3: Distribusi Responden Menurut Usia

Usia	Jumlah(orang)	Persentase (%)
0-14 (anak)	8	13,8
15-50 (dewasa)	36	62,1
51 keatas (tua)	14	24,1
Jumlah	58	100,0

Pada Tabel di atas menunjukkan bahwa sebagian besar responden berusia 15-50 tahun,penelitian dengan hasil yang sama dilakukan oleh Nuzulia.I (2004).

1.3. Pendidikan

Pada tabel di bawah ini terlihat hasil responden yang tingkat pendidikannya tamat SD jumlahnya paling banyak yaitu sebesar 23 (39,6%), selanjutnya responden yang tingkat pendidikannya tamat SMA dan yang tidak tamat sekolah/tidak sekolah yaitu masing-masing sebesar 11 (19%) sedangkan responden yang yang tingkat pendidikannya SMP sebesar 9 (15.6%) responden yang paling rendah adalah dengan tingkat pedidikannya Diploma dan PT sebanyak masing-masing 2 (3,4%). Adapun data lengkap mengenai distribusi responden menurut tingkat pendidikan dapat di lihat pada Tabel 4.

Tabel 4: Distribusi Responden Menurut Tingkat Pendidikan

Tingkat Pendidikan	Tidak sekolah /tidak tamat	SD	SMP	SMA	D3	PT	Jumlah (Orang)
Jumlah (orang)	11	23	9	11	2	2	58
Persen	19,0	39,6	15,6	19,0	3,4	3,4	100,0

Dari tabel ini terlihat bahwa responden yang paling tinggi adalah responden dengan tingkat pendidikan tamat SD ini bisa dikarenakan pengetahuan responden tentang penyakit malaria masih rendah yaitu sebesar 23 (39,6%) hasil penelitian sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan peneliti Aidah dan Laily (2001) dengan hasil 32,6% perbedaan ini dapat di sebabkan oleh perbedaan jumlah responden pada penelitian.

1.4. Pekerjaan

Pada tabel 5 dapat dilihat dari 58 responden terdapat responden yang paling banyak dengan tingkat pekerjaan buruh/tani yaitu sebesar 21 (36,3%), kemudian responden yang tidak bekerja sebanyak 19 (32,7%), sedangkan responden dengan tingkat pekerjaan PNS/TNI/POLRI berjumlah 11 (18,9%), jumlah responden yang paling sedikit adalah dengan tngkat pekerjaan swasta/wirausaha dengan jumlah 7 (12,1%). Data lengkap mengenai distribusi responden berdasarkan pekerjaan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5: Distribusi Responden Menurut Pekerjaan

Pekerjaan	Jumlah(orang)	Persentase (%)
PNS/TNI/POLRI	11	18,9
Swasta/Wirausaha	7	12,1
Buruh/Tani	21	36,3
Tidak bekerja	19	32,7
Jumlah	58	100,0

Pada penelitian yang dilakukan oleh Supratman (2002), menunjukkan hasil yang sedikit berbeda dimana reponden tertinggi pada kelompok yang tidak bekerja sebesar 63,3% sementara hasil dari peneliti yang terbanyak pada kelompok buruh/tani sebanyak 21 (36,3%) hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan pada karakteristik responden penelitian.

1.5. Hasil Pemeriksaan Metode Apusan Darah Giemsa

Hasil pemeriksaan *Plasmodium falciparum* terhadap 58 responden tampak pada Tabel 6 dimana hasil pemeriksaan metode apusan darah Giemsa dijumpai 6 (10,3%) responden dengan hasil positif *Plasmodium falciparum* dan sebanyak 52 (89,7%) responden dengan hasil negatif *Plasmodium falciparum.*

Data lengkap mengenai distribusi responden berdasarkan hasil pemeriksaan metode apusan darah Gimsa dapat dilihat pada Tabel 6

Tabel 6: Distribusi Responden Berdasarkan Hasil Apusan Darah Giemsa

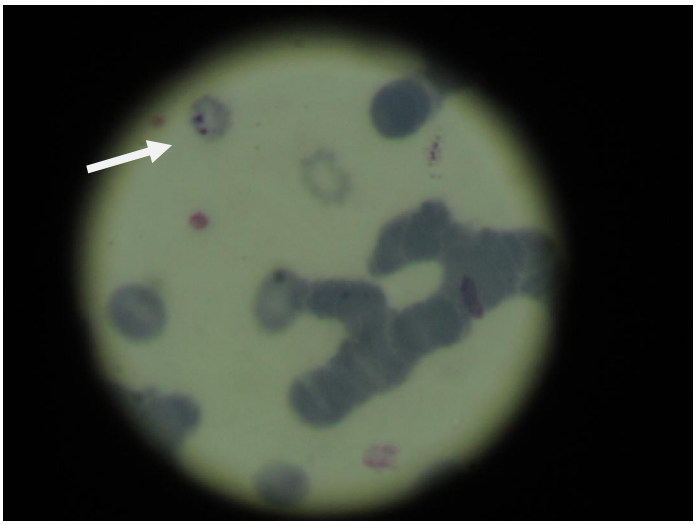
Apusan Darah Giemsa	Jumlah (orang)	Persentase (%)
Positif(*)	6	10,3
Negatif(**)	52	89,7
Jumlah	58	100,0

(*) ditemukan *Plasmodium falciparum*

(**) tidak ditemukan *Plasmodium falciparum*

Hasil positif Giemsa yaitu menemukan 6 (10,3%) responden yang positif, namun hasil penelitian Zakeri *et al* (2002) memberikan hasil 10% perbedaan ini dapat di sebabkan oleh rendahnya jumlah parasit pada sediaan apusan darah sehingga sering tidak terdiagnosis.

Pada gambar tampak inti parasit berwarna merah, sitoplasma yang berwarna biru keunguan dan tampak pigmen coklat kehitaman, ditemukan juga bentuk *double* kromatin.



Gambar 4: Hasil positip *P.falciparum* pada sediaan apusan darah tipis

Keterangan gambar. Tampak kromatin ganda dan eritrosit tidak membesar.

1.6. Hasil Pemeriksaan Genotipe *Plasmodium falciparum* dengan Metode PCR-RFLP

Dari 58 sampel yang didiagnosis sebagai malaria klinis ternyata hanya 6 sampel yang berhasil ditemukan parasit Plasmodium falciparum. Selanjutnya 6 sampel tersebut dilakukan pemeriksaan genotyping pada gen DHPS untuk melihat adanya polimorfisme/mutasi *Ala437Gly*. Hasil pemeriksaan genotipe gen DHPS *Plasmodium falciparum* situs polimorfik *Ala437Gly* dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7: Gabaran genotipe gen DHPS *Ala437Gly P. falciparum*

Nomor Sampel	Genotipe *Ala437Gly*
1.	A
2.	A
3.	A
4.	A
5.	A
6.	A

Dari 6 sampel tersebut menunjukkan semuanya belum mengalami mutasi pada gen DHPS *Ala437Gly* yang berhubungan dengan terjadinya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap antimalaria Sulfa. Dengan demikian dapat disimpulkan keenam sampel tersebut masih sensitif terhadap obat antimalaria golongan Sulfa.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua sampel telah mengalami mutasi pada gen DHPS *Ala437Gly*. Dengan demikian dapat disimpulkan belum terjadi resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap antimalaria golongan Sulfa. Hasil penelitian ini masih belum mencerminkan keadaan yang sebenarnya karena iru diusulkan untuk melakukan penelitian lagi dengan sampel yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

Cowman,A. F., Morry,M.J., Biggs, B. A., Cross, G. A. M. & Foote, S. J. (1988). Amino acid changes linked to pyrimethamine in the dihydrofolate reductase-thymydylate synthase gene of *Plasmodium falciparum. Proceedings of the national Academy of Scienes USA*, 85, 9109-9113.

Cowman AF. (1998). The molecular basis of Resistance to the Sulfones, Sulfonamides, and Dihydrofolate Reductase Inhibitors, p. 317-330. *In* I.W. Shermsn *(ed.)*. Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis and Protection, ASM Press Washington DC.

Curtis, J., Duraisingh, M. T., Trigg, J. K., Mbwana, H., Warburts, D. C. & Curtis, C. F. (1996). Direct evidence that asparagines at position 108 of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**, 678-680.

Curtis, J., Duraisingh, M. T. & Warhurst, D. C. (1998). *In vivo* selection for a specific genotype of dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorproguanil-dapsone treatment. *Infectious Diseases*, **177**, 1429-1423.

Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Diourte Y, Doumbo S, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TF, Plowe CV, Coulibaly D. (2011). A molecular marker fore chloroquine- resistant falciparum malaria. N Engl J Med, 344:257-263.

Duraisingh, M. T., Curtis, J. & warhust, D. C. (1998). *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroete stnthetase genes by PCR and restriction digestion. *Experimental Parasitology*, 89, 1-8.

Duraisingh, M. T., Drakeley, C. J., Muller, O., bailey, R., Snounou, G., Targett, G. A., Greenwood, B. M. & warhurst, D.C. (1997). Evidence for selection for the tyrosine-

86 allele of the *pfmdr* 1 gene of *Palsmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, **114**,205-11.

Ebisawa I and Fukuyama T. (1975). Chloroquine resistance of Plasmodium falciparum in West Irian and East Kalimantan. *Annals Trop Med Parasitol*; 69:131-132

Ebisawa, I. & Fukuyama, T. (1975). Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in West Irian and East Kalimantan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **69**, 275-82.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov, Ferdig MT, Ursas LMB, SIdhu AS, Naude B, Deltsch KW, SU XZ, Wootton JC, Roepe PD & Wellems TE. (2000). Mutations in the P. *falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *pf*CRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Moll Cell*, 5:861-871.

Foote, S.J., Kyle, D. E., Martin, R. K., Oduola, A. M., Forsyth, K., Kemp, D. J. & Cowman, A. F. (1990). Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **345**,255-258.

Foote, S. J., Thomson, J. K., Cowman, A. F. & Kemp, D. J. (1989). Amplication of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. *falciparum. Cell*,**57**, 921-930

Ministry of Health, Directorate General of Communicable Disease Control and Environmental Health. Subdirectorate Malaria. 1998. Recapitulation of Malariometric survey. Tech. Rep.

Nagesha, H. S., Din-Syafruddin, Casey, G. J., Susanti, A. I., Fryhauff, D. J., Reeder, J,C. and Cowman, A.F. (2001). Mutations in the *pfmdr*1, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falcirparum* are associated with *in vivo* drug resistance in Irian Jaya, Indonesia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg in press.*

Peterson, D, S., Walliker, D. & Wellems, T. E. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Scienes USA*, **85**, 9114-9118.

Plowe, C. V., Cortese, J. F., Djimde, A., Nwanyanyu, O. C., Watkins, W. M., Winstanley, P. A., Estrada-Franco, J. G., Mollinedo, R. E., Avila, J. C., Cespedes, J. L., Carter, D. & Doumbo, O. K. (1997). Mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *Journal of Infectious Diseases,* **176,** 1590-1596.

Reed, M. B, Saliba, J. S., Caruana, S. R., Kirk, K. and Cowman, A F. (2000). Pgh 1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparumm. Nature*, **403**, 906-9.

Sirawaraporn W, Sathikul R, Sirawaraporn R, Yuthavong Y & Santi DV. 1997. Antifolate-resistant mutant of plasmodium falciparum dyhidrofolate reductase. Proc Natl acad Sci USA, 94:1124-1129.

Tjitra, E., Gunawan, S., Laihad, F., Marwoto, H., Sulaksono, S., Arjoso, S., Richie, T.L. & Manurung, N. (1997). Evaluation of antimalarial drugs in Indonesia 1981-1995. *Bulletine Penelitian Kesehatan,* **25,** 27-58.

Triglia, T., Menting, J. G. T., Wilson, C & Cowman, A. F. (1997). Mutations of dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum. Proceedinngs of the National Academy of Sciences USA,* **94,** 13944-13949.

Triglia, T., Wang, P., Sims, P.F.G., Hyde, J. E. & Cowman, A. F. (1998). Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. EMBO Journal, **17,** 3807-3815.

Wang P, Brooks R, Sims PFG and Hyde JE. (1995). A Mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate gene of plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol, 71:115-125.

Wang, P., Lee, C.-S., Bayoumi, R., Djimde, A., Doumbo, O., Swedberg, G., Dao, L., Mashinda, H., Tanner, M., Watkins, W. M., Sims, P. F. G. & Hyde, J. E. (1997a). Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequene analiysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleses in large number of field samples of diverse origins. *Molecular and Biochemical Parasitology,* **89,** 161-177.

Wang, P., read, M., Sims, P. F. & Hyde, J. E. (1997b). Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Molecular Microbiology,* **23**, 979-86.

Wellems TE and Plowe CV. (2001). Chloroquine-Resistant malaria J. Infect. Dis., 184:770-776

Wilson CM, Volkman SK, Thaitong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK and Wirth DF (1993). Amplication of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in plasmodium falciparum from Thailand. Mol. Biochem Parasitol, 57:151-160.

WHO fact sheet. 94.1998.http/www.who.int.

Sibley CH, Hyde JE, Sims PFG, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM and Nzila AM. (2011). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum:* what next? Trends Parasitol, **12**:582-588.