

Deteksi Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Klorokuin Dengan Marka Situs Polimorfik *Lys76Tyr* Gen *PfCRT* Menggunakan PCR-RFLP

dr. Triwani, M.Kes
Bagian Biologi Medik
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
Palembang

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 sulfadoxin epyrimethamine 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 mutant alleles in genes associated with chloroquine resistance: *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfCRT*) *Lys76Tyr* (100%). These results are consistent with the antimalarial drug resistance situation in the area and emphasize the need for a proper treatment strategy.

PENDAHULUAN

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 yang mematikan, oleh karena potensinya menyebabkan komplikasi serebral. Malaria sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat terutama di negara tropic 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).

Namun sejak tahun 1950-an terdapat kecendrungan 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 *falsiparum* yang resisten terhadap pengobatan klorokuin. Diduga 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). Di Indonesia telah dilaporkan pula adanya beberapa

fokus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin dari 26 propinsi (Pribadi, 1997). Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mencari obat baru sebagai alternatif ternyata belum menyelesaikan masalah secara mendasar dalam pengendalian malaria karena timbul pula resistensi terhadap obat baru tersebut (Wellems, 2007).

Pada awalnya, dugaan meluasnya kasus resistensi terhadap klorokuin disebabkan karena pemakaian obat yang tidak terkontrol oleh masyarakat yang mengakibatkan perubahan jalur metabolik klorokuin (*alternative metabolic pathway*) pada *P.falciparum*. Dengan berkembangnya teknologi biologi molekuler, para peneliti kini mencari mekanisme resistensi tersebut pada tingkat genetik.

Klorokuin merupakan obat anti malaria golongan 4-aminokuinolin yang bersifat *skizontisida* darah terhadap semua jenis Plasmodia pada manusia dan *gametositosida* untuk *P.vivax*, *P.ovale*, dan *P.malariae* (Chwatt, 1991). Klorokuin bersifat basa lemah dan aktifitasnya di dalam Plasmodium terjadi dalam vakuola makanan parasit stadium aseksual. Klorokuin yang dimakan per oral diabsorpsi 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). Namun kecepatan *uptake* yang terjadi lebih besar daripada kecepatan *efflux* sehingga tercapai konsentrasi obat yang tinggi dalam vakuola makanan (Krogstad, 1987). 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.

Sejak Foote berhasil mengidentifikasi gen *pfmdr1*, banyak penelitian yang dilakukan dengan metoda dan tempat yang berbeda baik secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk membuktikan hubungan mutasi gen tersebut dengan resistensi *P.falciparum*.

Namun demikian, mutasi pada *pfmdr1* saja ternyata tidak cukup untuk memediasi munculnya strain dengan fenotip yang resisten terhadap klorokuin dan penurunan terjadi secara multigen bukan hanya *pfmdr1* saja (Wellems *et al*, 1990; Wilson *et al*, 1993).

Gen *Pfprt* merupakan gen yang terletak pada kromosom 7 parasit Plasmodium *falciparum* ternyata berhubungan erat dengan penurunan sifat resistensi melalui uji genetic crossing (Wellems and Plowe 2001). 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 berperanan pengaturan pH intra-vakuola. Saat ini telah dipetakan delapan mutasi titik pada gen *pfprt* 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.

Analisis terhadap isolat *P. falciparum* yang resisten dari berbagai belahan penjurur dunia memperlihatkan semua isolat resisten tersebut membawa alel yang resisten sebagaimana tersebut di atas.

Di Sumatera Selatan, belum tersedia data mengenai penyebaran kasus resistensi terhadap obat antimalaria golongan Klorokuin ini secara komprehensif. Dengan pendekatan

teknologi biologi molekuler PCR-RFLP diharapkan dapat memberikan gambaran yang akurat dan cepat mengenai pola resistensi terhadap obat ini.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini merupakan studi deskriptif untuk mengetahui resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap anti malaria Klorokuin dengan marka alel *Lys76Tyr* gen *Pfprt* dengan menggunakan teknik Biologi Molekuler (*Nested-PCR*). Penelitian ini merupakan penelitian payung **Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Obat Anti Malaria Di Sumatera Selatan**. Dalam penelitian ini sampel darah diambil dari darah pasien yang didiagnosis sebagai penderita Malaria dari RSUD Lahat, 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.

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***. 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).

Variabel pada penelitian ini adalah gambaran genotip *Lys76Lys*, *Lys76Tyr* dan *Tyr76Tyr* dan alel *Lys76* dan *Tyr76* gen *pfprt Plasmodium falciparum*. Pemeriksaan sediaan apusan Giemsa secara mikroskopis dilakukan oleh dua tenaga Laboratorium (*reader 1 dan reader 2*) dari 2 instansi yang berbeda

Isolasi DNA dilakukan dengan teknik *helex-100*. Bahan: Saat melakukan PCR, Komposisi campuran yang digunakan sebanyak volume total 25 µl PCR *Mix Go Taq* (Promega USA) terdiri dari: 12,5 µl ddH₂O dan 3µl. DNA cetakan (*template*) serta primer oligonukleotida reverse (R) dan forward (F) masing-masing 1µl. DNA target adalah gen *Plasmodium falciparum chloroquin transporter*. 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: 1) PCR pertama, untuk amplifikasi gen *Pfprt* 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 bufferPCR dengan 1,5 mM MgCl₂, 1,25 unit Taq DNA polymerase (promega), dan 2ng/µL primer genus spesifik oligonukleotida dari ssurRNA (primer universal) yaitu: P forawrd (5'- ' - GAA CCC AAA GAC ACG ATC AGA CTT-3') P reverse (5'- ACG ATC AGA TAC CGT TTT GAT TTC TCA T-3') Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Thermal cyler* Campuran tersebut diamplifikasi sebanyak 30 siklus dengan kondisi sebagai berikut: predenaturasi pada 94°C selama 30 detik (1 siklus); denaturasi 94°C selama 15 detik, annealing 60°C selama 30 detik dan ekstansi 72°C selama 15 detik dan diakhiri dengan 72°C 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 *Pfprt Plasmodium falciparum* yaitu: Primer forward (5'- CGT CGT AAT ACG

ATC AGA TAC CTT-3') Primer reverse (5'- AGT CAC CTC CAA TCT AAA GAA AGA TG-3')

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilihat dengan menggunakan 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. Data disajikan secara naratif deskriptif dan dalam bentuk tabulasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

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 1 di bawah ini

Tabel 1: 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.

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 2, yang menunjukkan bahwa sebagian besar responden berusia 15-50 tahun, sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Nuzulia.I (2004).

Tabel 2: 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 bawah ini terlihat hasil responden dengan tingkat pendidikan tamat SD jumlahnya paling banyak yaitu sebesar 23 (39,6%), selanjutnya tingkat pendidikan tamat SMA dan yang tidak tamat sekolah/tidak sekolah yaitu masing-masing sebesar 11 (19%) sedangkan responden dengan tingkat pendidikan SMP sebesar 9 (15,6%), responden yang paling rendah adalah dengan tingkat pendidikannya Diploma dan PT sebanyak masing-masing 2 (3,4%). Adapun data lengkap mengenai distribusi responden menurut tingkat pendidikan dapat di lihat pada Tabel 3

Tabel 3: 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.

Pada tabel 4 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 tingkat pekerjaan swasta/wirausaha dengan jumlah 7 (12,1%).

Tabel 4: 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

Hasil pemeriksaan *Plasmodium falciparum* terhadap 58 responden tampak pada Tabel 5 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 5

Tabel 5: 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: Hasil positif *P.falciparum* pada sediaan apusan darah tipis

Keterangan gambar. Tampak kromatin ganda dan eritrosit tidak membesar.

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 *Pfcr* untuk melihat adanya polimorfisme/mutasi Lys76Tyr. Hasil pemeriksaan genotipe gen *Pfcr* *Plasmodium falciparum* situs polimorfik Lys76Tyr dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6: Gambaran genotipe Pfcrt Lys76Tyr *P. falciparum*

Nomor Sampel	Genotipe Lys76Tyr
1.	Tyr
2.	Tyr
3.	Tyr
4.	Tyr
5.	Tyr
6.	Tyr

Dari 6 sampel tersebut menunjukkan semuanya mengalami mutasi pada gen Pfcrt 76Tyr yang berhubungan dengan terjadinya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap antimalaria klorokuin.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua sampel telah mengalami mutasi pada gen *pfcr* 76Tyr. Dengan demikian dapat disimpulkan telah terjadi resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap antimalaria golongan klorokuin. Penelitian ini dilakukan dengan jumlah sampel terbatas dan area penelitian hanya mencakup Kabupaten Lahat, untuk itu disarankan dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besar dan daerah yang lebih luas.

Terimakasih atas diperolehnya Dana Penelitian ini melalui 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

DAFTAR PUSTAKA

Awad El Karim FM, Miles MA, Walhurst DC. Chloroquine resistant *P. falciparum* isolates from the Sudan lack two mutations in the *pfmdr1* gene thought to be associated with chloroquine resistance. *Trans Roy Soc Trop Med & Hyg* 1992; 86:587-9

Bayoumi RAL, Babiker HA, Arnot DE. Uptake and efflux of chloroquine by chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* clones recently isolated in Africa. *Acta Tropica* 1994; 58:141-9.

Chwatt Bruce LJ. *Chemotherapy of malaria*. Mc.Graw Hill 1991: 1-8

Cowman AF. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in Chloroquine resistance? *Parasitology Today* 1991;7:70-5.

Foote SJ, Thomson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of multidrug resistance gene in some chloroquine resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 1989; 57:921-30

Foote SJ, Thomson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Several alleles of multidrug resistant gene

- closely linked to chloroquine resistance in *P. falciparum*. *Nature* 1990; 345:255-8
- Gomes-Saladin E et al. *P. falciparum* *mdr1* mutations in vivo chloroquine resistance in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:240-9
- Haroki K, Bray PG, Ward SA, Hommel M, Ritchie GY. Chloroquine resistance of *P. falciparum*: further evidence for a lack of association with mutations of the *pfmdr1* gene. *Trans Roy Soc Trop Med & Hyg* 1994; 88:694.
- Krogstad DJ et al. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* 1987; 235:331-6
- Krogstad DJ, De D. Chloroquine: mode of action and resistance. In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*, ASM Press, Washington DC 1998; 331-6
- Pribadi W. Malaria di Jawa dan Bali. Kongres Nasional Perhimpunan Peneliti Penyakit Tropik dan Infeksi III, Balikpapan, 13-25 November 1997.
- Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine. *Lancet* 1989; 18:1183-4
- Singh JC, Singh B, alias A, Abdullah MS. Assessment of the association between three *pfmdr1* point mutations and chloroquine resistance in Indonesia. *Am J Trop Med & Hyg* 1995; 89:435-7
- Warhurst DC. Mechanism of chloroquine resistance in malaria. *Parasitology Today* 1988; 4:211-3.
- Wellems TE. Molecular genetics of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology Today* 1991; 7:110-2
- Willems TS and Plowe CV. Chloroquin resistant Malaria. *J Infect Dis* 2001; 184:770-6
- Wilson CM, Volkman SK, Thaitong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK and Wirth DF. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 57:152-60
- WHO. Advance in malaria chemotherapy. WHO Technical Report Series 711, 1984:10-55
- WHO. Global malaria control. *Bull. WHO* 1993; 71:281-4