

**LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I**

**(KLASTER GIZI DAN KESEHATAN)
TAHUN ANGGARAN 2009**

KKC
KK
LP.117/10
Mas
6



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**GENOTIPING GEN *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* UNTUK
DETEKSI RESISTENSI OBAT ANTIMALARIA PADA *Plasmodium
falciparum* ISOLAT KLINIK LOKAL**

Peneliti

**Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
Prof. dr. Eddy Soewandojo, Sp PD
Mufasirin, MSi., drh.
Yuni Priyandani, Apt, Sp.FRS**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen
Pendidikan Nasional, Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Nomor: 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009. Tanggal 30 Juli 2009**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
DESEMBER 2009**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN

1. Judul : Genotiping Gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* Untuk Deteksi Resistensi Obat Antimalaria Pada *Plasmodium falciparum* Isolat Klinis Lokal

2. Ketua Peneliti :

- a. Nama : Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. NIP : 131 837 006
d. Pangkat/Golongan : Penata Tk I / III d
e. Jabatan Fungsional : Lektor
f. Bidang Keahlian : Farmasi Veteriner, Terapeutika Veteriner
g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan
h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/ Instansi
1.	Prof.dr.Eddy Soewandojo., SpPD	Penyakit Tropik-Infeksi	RSUDr. Soetomo
2.	Mufasirin, M.Si., drh.	Bioteknologi	FKH Unair
3.	Yuni Priyandani, Apt, Sp.FRS	Farmasi Klinik	FKH Unair

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

- a. Jangka waktu Penelitian : 1 Tahun
b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,00
c. Biaya yang disetujui : Rp. 97.000.000,00

Surabaya, 10 Desember 2009

Ketua Peneliti

Mengetahui
Dekan/Wakil Dekan I
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Dr. Anwar Makruf, M.Kes., drh.

NIP. 132 049 017

Lilik Maslachah, M.Kes., drh.

NIP. 132 061 818

Mengetahui ;

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh

NIP.131 837 00

RINGKASAN PENELITIAN

- Judul penelitian :** Genotiping Gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* Untuk Deteksi Resistensi Obat Antimalaria Pada *Plasmodium falciparum* Isolat Klinis Lokal
- Peneliti :** Lilik Maslachah, M.Kes., Drh.
Prof.dr.Eddy Soewandojo., SpPD
Mufasirin, MSi., drh.
Yuni Priyandani, Apt, Sp.FRS
- Tahun Penulisan:** 2009
- Fakultas :** Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Sumber Biaya :** Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
- Nomor :** 171/SP2H/PP/DP2MN/2009. Tanggal 30 Juli 2009

Penelitian Genotiping Gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* Untuk Deteksi Resistensi Obat Antimalaria Pada *Plasmodium falciparum* isolat Klinis Lokal bertujuan untuk membuktikan dan mengungkapkan penyebab dan mekanisme resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* melalui penentuan gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* pada tingkat genotipe.

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris yang terdiri dari langkah-langkah sebagai berikut : (i) Pembuatan sediaan darah tebal dan tipis dari darah penderita malaria untuk pemeriksaan mikroskopis guna menentukan kepadatan parasit dan identifikasi parasit yang tepat. (ii) Kultur invitro untuk mendapatkan isolat parasit *Plasmodium falciparum*, (iii) In vitro Anti malaria drug susceptibility testing untuk menentukan *minimum inhibiting concentration* (MIC) terhadap obat antimalaria. (iv) Ekstraksi DNA genom parasit *Plasmodium falciparum*. (v) Amplifikasi gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* dengan teknik PCR. (vi) Analisis retriksi gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* hasil PCR.

Keluaran produk yang dihasilkan dari penelitian ini adalah dapat mengungkapkan ekspresi gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* penyebab resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* yang sangat diperlukan untuk pengembangan dan penatalaksanaan terapi malaria *falciparum* yang lebih tepat dan akurat. Dapat mengetahui keterkaitan atau hubungan antara besarnya tingkat resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* dan dapat mengetahui mekanisme resistensi obat golongan klorokuin, MDR (*multidrug resisten*) dan obat kombinasi antifolat yang berperan pada resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum*

Hasil penelitian didapatkan sebanyak 4 sampel darah penderita malaria. Setelah dilakukan identifikasi dengan hapusan darah tebal dan tipis dari pemeriksaan penderita malaria hanya disebabkan oleh *Plasmodium falcifarum*. Pada gambar parasit *Plasmodium falsifarum* masih dalam bentuk trofozoit. Hasil

kultur plasmodium falcifarum dalam medium kultur RPMI 1640 dilakukan evaluasi pertumbuhan didapatkan pertumbuhan dan perkembangan parasit yang cukup bagus dengan parasitemia sekitar 10 %.

Hasil dari kultur *Plasmodium falcifarum* ini ada ditemukan berbagai stadium parasit yaitu stadium trofozoid muda, trofozoid matang, skizon dengan merozoit dan gametosit.

Uji kepekaan obat secara invitro pada obat (Chloroquine 500 ng/ml, Sulfadoksin 1500 ng/ml, Pyrimetamin 250 ng/ml, kombinasi Sulfadoksin dan Pyrimetamin 750 ng/ml, 125 ng/ml dan Artemisinine 100 ng/ml) untuk isolat *Plasmodium falcifarum* dari penderita malaria menggunakan metode micro test modifikasi dari WHO dengan menggunakan *well flat bottom 96* (WHO 1990) dengan hasil sebagai berikut sebagai berikut ; Hasil dari uji IC₅₀ didapatkan pada obat Chloroquine parasit *Plasmodium falcifarum* hanya dapat dihambat dengan konsentrasi dosis yang besar yaitu 500ng/ml sedangkan Artemisinine pada dosis 100 ng/ml. Sedangkan pada kombinasi Sulfadoxine dan Pyrimethamine konsentrasi dosis untuk menghambat pertumbuhan parasit menurun yaitu 1,03-017 ng/ml jika dibandingkan dengan pemberian obat secara sendiri-sendiri hal ini menunjukkan kombinasi kedua obat tersebut bekerja lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan parasit.

Pada elektroforesis hasil ekstraksi DNA menggunakan marker ladder dengan band yang paling tinggi sekitar 10.000 bp sedangkan yang paling rendah sekitar 250 bp. Band yang ditunjukkan pada sampel B011, A021, Y dan 3D7 semua menunjukkan hasil yang lebih tinggi dari marker yang digunakan.

Hasil PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi pada *coding region gen* (kodon) yang diinginkan. Gen *pfcr* muncul pada 479- 630 bp, gen *pfmdr1* pada 504 bp, gen *pf dhps* 130 bp dan *pf dhfr* pada 190 bp. Gen-gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* pada *plasmodium falcifarum* dapat diekspresikan sehingga hasil ini dapat digunakan sebagai marker untuk menentukan deteksi resistensi terhadap obat anti malaria.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan: Kosentrasi minimal untuk menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50 % pada masing-masing obat berbeda. Chloroquine membutuhkan konsentrasi yang besar untuk menghambat pertumbuhan parasit 50% yaitu sebesar 500ng/ml. Kombinasi Sulfadoxine dan Pyrimethamine mempunyai efektifitas yang lebih baik untuk menghambat pertumbuhan parasit 50% dibandingkan dengan pemakaian obat secara sendiri-sendiri. Artemisinine dengan dosis 100 ng/ml dapat menghambat semua pertumbuhan parasit. Gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* pada *plasmodium falcifarum* dapat digunakan sebagai marker untuk deteksi resistensi obat antimalaria. Saran yang perlu diberikan dari hasil penelitian ini adalah :Hasil gen yang muncul dari hasil PCR harus dilanjutkan dengan skuensing untuk mengetahui mutasi pada masing-masing gen untuk setiap sampel. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan memakai marker gen resistensi obat untuk membuat kit diaqnostik sebagai rapid test sehingga dapat memberikan manfaat dan masukan kepada pemerintah untuk mengambil kebijakan dalam melakukan program terapi malaria, dan memberikan masukan kepada dokter dalam menentukan terapi dengan obat antimalaria yang tepat kepada penderita malaria

SUMMARY

Research of genotyping genes *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* to detect antimalarial drugs resistance at clinic isolates *Plasmodium falciparum*, aims to prove and lay open mechanism and cause antimalarial drugs resistance at local clinic isolate of *Plasmodium falciparum* through determination of *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* gene. Steps of the research : Making thin and thick blood films from malarial patient for microscopic inspection to determine density and identify parasite. In vitro culture to get *Plasmodium falciparum* parasite Isolate. Drug susceptibility testing to determine minimum inhibiting concentration (MIC) to antimalarial drugs. DNA extraction. Amplification *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* gene with PCR technique.

Output from this research can expression *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* gene cause antimalarial drugs resistance at local clinic isolates *Plasmodium falciparum*, needed to more accurate and precise malarial therapy and development. Corelation of level antimalarial drugs resistance at local clinical isolates *Plasmodium falciparum* and know resistance mechanism of chloroquine, MDR (multidrug resistance) and antifolate combination which share at antimalarial drugs resistance at local clinic isolates *Plasmodium falciparum*.

Result of research got 4 samples. After identify with thin and thick blood films from inspection of malarial patient only because of *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* parasite picture still in stages trophozoites. Result of *Plasmodium falciparum* culture in RPMI 1640 medium to evaluate growth got by parasite growth which enough nicely with parasitaemia about 10 %. *Plasmodium falciparum* culture there was found various parasites stadium young trophozoites, matured trophozoites, scizon with merozoites and gametocytes.

Sensitivity test by in vitro (Chloroquine 500 ng / ml, Sulfadoxine 1500 ng/ml, Pyrimetamine 250 ng / ml, Sulfadoxine combination and Pyrimetamine 750 ng /ml, 125 ng/ml and Artemisinin 100 ng /ml) for the *Plasmodium falciparum* isolates from malarial patient used micro test method modify from WHO by using flat bottom well 96 (WHO 1990) Result of IC50 test got Chloroquine drug can only be pursued with big dose 500 ng / ml, Artemisinin dose 100 ng / ml. Sulfadoxine combination and Pyrimethamine dose 1,03-017 ng/ ml, both of the drugs work more effective to pursue growth parasite.

DNA extraction with electroforesis used ladder marker with highest band 10.000 bp while lowest 250 bp. All of samples (B011, A021, Y and 3D7) showing result of superordinate from used marker.

Result of PCR by using specific primary for the amplification gene region coding (wanted codons). *Pfcr* gen at 479- 630 bp, *pfmdr1* gene at 504 bp, *pfdhps* gene 130 bp and *pfdhfr* at 190 bp. *Pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhfr* and *pfdhps* genes *Plasmodium falciparum* can be expressed so that result of this can be used as marker for the detection anti malarial drugs resistance.

The concluded: Minimum concentration to pursue growth of parasite equal to 50 % each drug different . Chloroquine require big concentration to pursue growth parasite 500ng / ml. Combination Sulfadoxine Pyrimethamine effective to

pursue growth parasite 50%. Artemisinin with dose 100 ng / ml can pursue all growth parasite. Pfcrt, pfmdr1, pfdhfr and pfdhps gene Plasmodium falcifarum can be used as marker to detect antimalarial drugs resistance. Suggestion :Result of gene from PCR have to be continued with sequencing to know mutation at each gene. Furthermore gene marker to make diagnostic kit as rapid test so that can give input and benefit to government evaluating and updating antimalarial drugs treatment policies, and give input to doctor in therapy with correct antimalarial drugs to malarial patients

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmad, hidayah dan karuniaNYa yang dilimpahkan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan judul Genotiping Gen *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* Untuk Deteksi Resistensi Obat Antimalaria Pada *Plasmodium falciparum* Isolat Klinis Lokal.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan berbagai pihak maka penelitian ini tidak akan berhasil dan dengan setulus hati penulis sampaikan rasa terimakasih penulis yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kepala Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sebagai pemberi dana melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
2. Bapak Rektor Universitas Airlangga yang telah memberi kepercayaan dan kesempatan kepada peneliti untuk melakukan penelitian.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat yang telah memberi kesempatan kepada peneliti untuk melakukan penelitian ini.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah menyetujui usulan penelitian ini.
5. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, MKes, SpParK yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan dan banyak membantu dalam terselenggaranya penelitian ini
6. Rumah Sakit Saiful Anwar Malang Bagian Penyakit Dalam dan para Staff dr.Didik,Sp.PD. yang telah membantu peneliti untuk mendapatkan sampel darah penderita malaria.
7. Kepala laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan para staff yang telah membantu dan mengijinkan peneliti untuk menggunakan fasilitas demi kelancaran dan terselesainya penelitian ini.
8. Kepala Lembaga Penyakit Tropik dan para staff yang telah menyediakan fasilitas dan membantu dalam penelitian ini.
9. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberi andil terhadap penelitian ini hingga akhir pembuatan laporan.

Akhir kata penulis mengharapkan semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat dan berguna bagi semua pihak dan khususnya bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Penulis menyadari bahwa tulisan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna untuk itu saran dan masukan demi sempurnanya tulisan ini sangat penulis harapkan

Surabaya 10 Desember 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Khusus	2
1.3. Keutamaan penelitian	3
BAB II. STUDI PUSTAKA.....	5
2.1. Kejadian Malaria di Dunia dan di Indonesia	5
2.2. Mekanisme Terjadinya Resistensi Obat	5
2.3. Mutasi Gen Pada <i>Plasmodium falcifarum</i> Resisten Obat Antimalaria	6
BAB III. METODE PENELITIAN	8
3.1. Prosedur Penelitian	8
3.2. Pemeriksaan Mikroskopis Dengan Sediaan Darah Tebal dan Tipis	8
3.3. Teknik Biakan in –Vitro <i>Plasmodium falcifarum</i>	9
3.3.1. Persiapan Medium	9
3.3.2. Persiapan Serum	9
3.3.3. Persiapan Eritrosit (RBC)	10
3.3.4. Inokulum	10
3.3.5. Prosedur Biakan	10
3.3.6. Evaluasi Pertumbuhan	11
3.3.7. Prosedur Freezing Dengan Larutan Rowe.....	11
3.3.8. Thawing Metode Rowe	11
3.3.9. Sinkronisasi.....	11
3.3.10. Pemeriksaan Kepekaan Secara in-vitro	12
3.3.10.1. Persiapan Obat (Stock solution).....	12
3.3.10.2. Persiapan Obat (Working Solution).....	12
3.3.10.3. Pembuatan Template Test	13

3.3.10.4. Persiapan Test Plate	14
3.3.10.5. Uji Kepekaan obat Secara In-vitro.....	14
3.4. Estraksi DNA Genom Parasit <i>Plasmodium falcifarum</i>	17
3.5. Amplifikasi gen pfcr, pfmdrl, pfdhps dan pfdhfr dengan PCR	17
3.6. Rancangan Penelitian	19
3.7. Variabel Penelitian	19
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1. Pengumpulan Sampel	21
4.2. Hasil Penmeriksaan Mikroskopis Sediaan Darah Tipis	22
4.3. Hasil Kukur <i>Plasmodium falcifarum</i> Secara in-Vitro	23
4.4. Hasil IC50 Sensitivitas <i>Plasmodium falcifarum</i> secara in-vitro.....	24
4.5. Hasil Ekstraksi DNA <i>Plasmodium falcifarum</i>	26
4.6, Hasil Amplifikasi gen pfcr, pfmdrl, pfdhps dan pfdhfr dengan PCR.....	27
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31

DAFTAR TABEL

Tabel No.	Halaman
1, Hasil uji IC50 beberapaobat antimalaria	25

DAFTAR GAMBAR

Gambar No	Halaman
1. Stadium awal trofozoit	22
2. Stadiumawal trofozoit dan seldarah merah krenasi	22
3. Stadium awal trofozoit	23
4. Stadium awal trofozoit	23
5. Bentuk skizon berisi merozoit	23
6. Bentuk trofozoit muda	23
7. Bentuk skizon dan gametosit	24
8. Bentuk trofozoit matang ring 2 dot	24
9. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA	26
10. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA	26
11. Hasil PCR pfmdr86	27
12. Hasil PCR pfcry76	27
13. Hasil PCR pfdhps 437	28
14. Hasil PCR pfdhpr 108	28



BAB I.

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Malaria masih merupakan masalah kesehatan dibanyak negara di seluruh dunia terutama dinegara-negara tropik. Tiga ratus juta penduduk diserang setiap tahunnya dan 2-4 juta meninggal dunia. Berbagai upaya pemberantasan malaria telah dilakukan tetapi prevalensi malaria masih tetap tinggi. Indonesia merupakan daerah endemis malaria, walaupun telah dilakukan program pelaksanaan dan pemberantasan penyakit malaria sejak tahun 1959, namun hingga saat ini angka kesakitan dan kematian masih tinggi, hal ini disebabkan adanya berbagai hambatan dalam pemberantasan malaria diantaranya resistensi vektor terhadap insektisida dan resistensi parasit terhadap obat antimalaria (Simanjutak dan Arbani, 1999).

Resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria khususnya terhadap klorokuin muncul pertama kali di Thailand pada tahun 1961 dan di Amerika Serikat pada tahun 1962. Kemudian resistensi menyebar keseluruh dunia. Di Indonesia resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin pertama kali dilaporkan di Samarinda pada tahun 1974, kemudian resistensi ini terus menyebar dan pada tahun 1996 kasus-kasus malaria yang resisten klorokuin sudah ditemukan diseluruh propinsi di Indonesia. Di propinsi Sumatera selama periode Januari 2001-hingga April 2001 terdapat 6 kasus malaria yang resisten klorokuin. Dilaporkan juga ditemukan 6 kasus resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap sulfadoxin-pirimetamin di Irian Jaya (Tarigan J, 2003).

Munculnya resistensi parasit *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin dan sulfadoxin-pirimetamin ini mengakibatkan pemberantasan malaria menjadi semakin rumit sementara mekanisme resistensi belum diketahui pasti, hasil penelitian yang dilakukan oleh Lembaga Biomolekuler Eijman Jakarta menyatakan bahwa hampir 100 % parasit malaria di Indonesia telah mengalami mutasi gen dan kebal terhadap klorokuin dan sekitar 30-100 % kebal terhadap sulfadoxin-pirimetamin. Mekanisme resistensi obat antimalaria pada *Plasmodium falciparum* merupakan proses yang

sangat kompleks dan belum diketahui secara pasti dan detail. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ochong *et al* (2003). menyatakan bahwa resistensi yang tinggi pada obat sulfadoxin dan primetamin terjadi di Afrika dan penelitian Schonfeld M *et al* (2007) tentang resistensi obat klorokuin di Tanzania disebabkan oleh adanya mutasi gen *pf dhps* dan *pf dhfr* penyandi enzim dihidropteroate sintase dan dihydrofolat reduktase. Sedangkan Pimentel S, *et al* (2006) menyatakan bahwa resistensi obat malaria otovaquone-proguanil di Anngola karena mutasi pada gen *pf cytb* yang berperan pada rantai respirasi di mitokondria. Hasil penelitian Mugittu K, *et al* (2006) meyakini bahwa resistensi artemisin kombinasi di Tanzania karena adanya mutasi pada gen *PfATPase6*. Sedangkan hasil penelitian Lopes *et al*, (2002) menyatakan bahwa resistensi klorokuin dan MDR disebabkan adanya mutasi pada gen *pf crt* dan *pf mdr1*. Meskipun mutasi gen *pf dhps* dan *pf dhfr* dan mutasi gen *pf crt* dan *pf mdr1* dikaitkan dengan timbulnya kejadian resistensi terhadap obat antimalaria, akan tetapi belum banyak hasil riset khususnya di Indonesia yang menerangkan keterkaitan tersebut dengan jelas, terutama pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum*. Hal ini masih memerlukan penelitian lebih mendalam untuk dapat mengungkap penyebab dan mekanisme resistensinya sehingga dapat digunakan untuk melakukan terapi yang akurat.

1.2. Tujuan Khusus

Penelitian Genotiping Gen *pf crt*, *pf mdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* Untuk Deteksi Resistensi Obat Antimalaria Pada *Plasmodium falciparum* Isolat Klinis Lokal mempunyai tujuan khusus yaitu untuk membuktikan dan mengungkapkan penyebab dan mekanisme resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* melalui penentuan gen *pf crt*, *pf mdr1*, *pf dhps* dan *pf dhfr* pada tingkat genotipe. Untuk mencapai tujuan penelitian ini dilakukan beberapa tahapan dalam penelitian sebagai berikut :

1. Pembuatan sedíaan darah tebal dan tipis dari darah penderita malaria untuk pemeriksaan mikroskopis guna menentukan kepadatan parasit dan identifikasi parasit yang tepat.
2. Kultur invitro untuk mendapatkan Isolat parasit *Plasmodium falciparum*

3. In vitro Anti malaria drug susceptibility testing untuk menentukan *minimum inhibiting concentration* (MIC) terhadap obat antimalaria
4. Ekstraksi DNA genom parasit *Plasmodium falciparum*
5. Amplifikasi gen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* dengan teknik PCR

1.3. Keutamaan Penelitian

Indonesia, terutama di wilayah Indonesia Timur dinilai masih sebagai kawasan dengan tingkat endemik malaria tinggi. Secara nasional ditunjukkan adanya 340.000 kasus positif selama tahun 2006. Kehadiran Plasmodium kedalam tubuh manusia memicu munculnya respon ketahanan tubuh hospes yang melibatkan sistem imun padahal imunopatogenesis malaria belum sepenuhnya diketahui. Belum tuntas masalah tersebut, masih disusul lagi masalah yang tidak kalah rumit yaitu munculnya galur parasit resisten terhadap obat antimalaria, juga ada kecenderungan nyamuk yang resisten terhadap insektida tertentu. Sehingga masalah penyakit malaria masih banyak yang perlu dicari solusinya (Nasronudin, 2008).

Resistensi obat antimalaria klorokuin pada *Plasmodium falciparum* di Indonesia pada tahun 1981-1988 terjadi pada semua propinsi. Resistensi pada obat Fansidar (Sulfodoksin-pirimetamin) secara invivo dan invitro pada tahun 1983-1985 terjadi di Jawa Tengah, Lampung dan Sumatera Utara (P.Nias) tetapi secara invitro (modifikasi Nguyen Dinh) dari beberapa lokasi ditemukan resistensi 60 % dari jumlah kasus yang diperiksa. Sedangkan resistensi pada kina pada tahun 1983-1988 terjadi di 4 propinsi seperti Irian jaya, Nusa Tenggara Timur, Jawa Tengah dan Jawa Barat. Dalam rangka persiapan kemungkinan pemakaian meflokuin di Indonesia telah dilakukan penelitian secara invivo dan invitro pada tahun 1983-1988 pada 17 propinsi dan 3 propinsi yaitu Irian jaya, Jawa Tengah dan Nusa Tenggara Timur secara invitro resisten (Tuti, S 1992). Dari uraian diatas maka keutamaan dari penelitian yang akan dilakukan ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian yang mengungkap penyebab resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* sangat diperlukan untuk pengembangan terapi malaria falciparum yang lebih tepat dan akurat.

2. Genotiping gen dengan analisis keragaman gen *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* sangat diperlukan untuk mengetahui kaitan antara besarnya derajat atau tingkat resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum* yang dipelajari terhadap tingkat mutasi gen *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr*
3. Analisis keterkaitan antara tingkat resistensi pada obat antimalaria dengan tingkat mutasi gen *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* sangat diperlukan untuk mendapatkan konsep ilmu yang dapat menjelaskan mekanisme resistensi obat antimalaria pada isolat klinis lokal *Plasmodium falciparum*.

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1. Kejadian Malaria di dunia dan di Indonesia

Malaria masih merupakan masalah bagi kesehatan global. Sekitar 300-500 juta penduduk dunia terinfeksi malaria dan 1,5-2,7 juta jiwa diantaranya meninggal setiap tahun. Sebagian besar kematian akibat *Plasmodium falciparum*. malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan parasit yang ditransmisikan melalui nyamuk Anopheles. Di Indonesia berdasarkan survei Kesehatan Rumah Tangga tahun 2001 terdapat 15 juta kasus malaria dengan 38.000 kematian setiap tahunnya. Sekitar 35 % penduduk Indonesia tinggal didaerah berisiko tinggi malaria, dari 293 kabupaten/kota yang ada di Indonesia 167 kabupaten/kota merupakan wilayah endemis malaria dan diwilayah Indonesia timur dinilai masih sebagai kawasan dengan tingkat endemisitas malaria tinggi secara nasional, yang ditunjukkan dengan adanya 340.000 kasus positif selama tahun 2006 (Nasronudin, 2008).

2.2. Mekanisme terjadinya resistensi obat

Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen, mutasi ini terjadi karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif. Menurut Clyde, Cowman dalam Tarigan (2003) klorokuin bekerja dengan mengikat cincin feriprotoporfirin IX suatu hematin yang merupakan hasil metabolisme hemoglobin didalam parasit. Ikatan feriprotoporfirin IX-klorokuin ini bersifat melisiskan membran parasit sehingga parasit mati, Resistensi parasit terhadap klorokuin terjadi karena (1) Tempat ikatan klorokuin pada eritrosit berkurang sehingga parasit dalam eritrosit tidak dapat dibunuh. (2) Mutasi terjadi multigen sehingga resisten cepat terjadi. Pirimetamin bekerja dengan menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga parasit tidak mampu membuat asam tetrahidrofolat akibatnya parasit tidak mampu melanjutkan siklus hidupnya yang akhirnya akan difagosit. Sulfadoksin bekerja dengan mengadakan kompetisi dengan PABA (*para amino benzoic acid*) dalam

memperebutkan enzim dihidrofolat sintase sehingga pembentukan asam dihidrofolate terganggu dan asam folat yang diperlukan parasit tidak terbentuk. Resistensi pada obat pirimetamin dan sulfadoksin disebabkan karena mutasi gen sehingga parasit mampu menggunakan jalur metabolisme lain yang dapat terhindar dari pengaruh obat. Pada umumnya bila terjadi resistensi terhadap suatu obat malaria akan diikuti dengan resistensi obat malaria lainnya (Tuti S, 1992 ; Alker, PA *et al.*,2005)

2.3. Mutasi gen pada *Plasmodium falciparum* resisten obat antimalaria

Klorokuin adalah obat antimalaria pada pertengahan kedua abad 20an, tetapi peningkatan kecepatan resistensinya menimbulkan perubahan pengobatan lini pertama di Tanzania dengan obat kombinasi sulfadoxin-pirimetamin pada 2001, tetapi resistensi pada sulfadoxin-pirimetamin juga cepat terjadi dan kegagalan terapi terjadi di Muheza, Tanzania, sehingga pada tahun 2006 di Tanzania artemisinin kombinasi digunakan sebagai obat lini pertama.

Kejadian resistensi antimalaria klorokuin dihubungkan dengan adanya perubahan pada asam amino lysin menjadi Threonine pada kodon 76 dari *chloroquin resistance transporter gen (pfcrf) Plasmodium falciparum*, juga adanya mutasi dari asparagin menjadi tyrosin pada kodon 86 pada *multidrug resistant gen (pfmdr)*. Disamping mutasi pada gen *pfmdr1* N86 dihubungkan juga dengan terjadinya resistensi pada lumefatrine, yang secara luas obat ini digunakan sebagai kombinasi bersama dengan artemether, Mutasi pada gen ini juga menyebabkan penurunan sensitivitas *Plasmodium falciparum* pada artemisinin (Djimde *et al*, 2001 ; Duraisingh *et al*, 2005)

Resistensi Sulfadoksin –Pirimetamin dihubungkan dengan mutasi pada gen dihidrofolate reduktase (*pfdhfr*) dan dihidropterone sintase (*pfdhps*). Pirimetamin selektif inhibitor kompetitif pada enzim dihidrofolate reduktase, Sedangkan obat Sulfadoksin menghambat pembentukan dihidropterone sintase pada awal pembentukan folate. Beberapa mutasi titik yang berhubungan dengan kejadian resistensi obat antifolate terjadi mutasi yang berlipat (*triple pfdhfr* 151,R59,N108,

dan *double pfdhps* G437,E540) Hal ini diyakini sebagai penyebab kegagalan terapi obat Sulfadoksin –Pirimetamin (Kublin *et al*, 2002).

Atovaquone-proguanil adalah obat antimalaria yang relatif baru yang bekerja dengan menghambat transport elektron mitokondria. Mutasi titik pada gen *pfcytb* dikodon 268 sebagai penyebab resistensi pada kombinasi obat ini. Kegagalan pengobatan dengan obat kombinasi Atovaquone-proguanil pada *traveller* dihubungkan dengan mutasi pada gen *pfcytb* dikodon 268 yang disebut sebagai T802A dan A803C. Adanya mutasi gen *pfcytb* ini di Luanda, Angola maka obat ini direkomendasikan sebagai profilaksis pada *traveller*.(Wichman *et al*, 2004).

Obat antimalaria artemisinin berinteraksi dan selektif menghambat *PfATPase6* . Hasil studi secara *invivo* menunjukkan bahwa *Plasmodium falciparum* hambatannya meningkat (IC_{50}) pada artemisinin dan menunjukkan mutasi titik yang spesifik pada kodon S769N pada lokus ATPase, dan dijelaskan juga bahwa mutasi ATPase6 A623E dan E431K dihubungkan juga dengan penurunan kepekaan *Plasmodium falciparum* pada artemisinin. Hasil ini merupakan keadaan yang membahayakan akan terjadinya resistensi artemisinin yang meluas (Mugittu,2006).

BAB III.

METODE PENELITIAN

3.1. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri atas : Pengumpulan sampel darah dari penderita yang diduga malaria falciparum, pembuatan sediaan darah tebal dan tipis dari darah penderita yang didiagnose malaria untuk pemeriksaan mikroskopis guna menentukan kepadatan parasit dan identifikasi parasit yang tepat. Pemeriksaan sensitivitas *Plasmodium falciparum* terhadap obat malaria secara invitro dengan micro test. Ekstraksi DNA genom parasit *Plasmodium falciparum*. Amplifikasi gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* dengan teknik PCR, Analisis retriksi gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* hasil PCR, Penentuan urutan nukleotida, dan Analisis mutasi.

3.2. Pemeriksaan mikroskopis dengan sediaan darah tebal dan tipis

Pemeriksaan mikroskopis dengan sediaan darah tebal dan tipis merupakan pemeriksaan yang terpenting. Interpretasi pemeriksaan mikroskopis ini berdasarkan hitung kepadatan parasit dan identifikasi parasit yang tepat. Pemeriksaan ini merupakan standard baku dan mempunyai nilai sensitivitas dan spesifitas hampir 100 %. Cara pemeriksaan darah tebal untuk melihat adanya parasit aseksual dari plasmodium malaria dengan mengambil darah penderita kemudian diletakkan pada gelas obyek dan dibiarkan kering, setelah itu darah dilisiskan dengan air, kemudian selama 20-30 menit diwarnai dengan pewarnaan giemsa 10 % dalam larutan buffer pH 7. Setelah itu sediaan darah dicuci dengan hati-hati selama 1-2 detik dan dibiarkan kering dan siap diperiksa. Pemeriksaan dengan hapusan darah tebal diperlukan untuk menghitung kepadatan parasit.

Cara pemeriksaan darah tipis berguna untuk mengidentifikasi jenis parasit malaria. Cara pengecatan sama dengan pemeriksaan darah tebal namun sebelum dicat sediaan darah difiksasi dengan metanol murni.

3.3. Teknik Biakan In-Vitro *Plasmodium falciparum*

3.3.1. Persiapan Medium (Pusarawati S et al., 1997)

Low PABA, low Folate Medium RPMI-1640 sebanyak 10,4 g dan HEPES 5,94g dimasukkan ke dalam gelas beaker dan ditambahkan aquabidest 600 ml, diaduk dengan stirrer magnetik sampai larut. Ditambahkan aquabidest sampai volumenya 960ml, kemudian diukur pH nya dan ditambahkan 1 N NaOH tetes demi tetes sampai mencapai pH 6,9-7.0. Ditambahkan gentamisin 2,5 cc dan diaduk sampai merata. Kemudian medium distirilisasi dengan filter diameter 0,22um dan dimasukkan ke dalam botol disimpan pada suhu 4° C. Medium ini disebut medium minus (M-) dan apabila akan digunakan dimasukkan dalam inkubator dulu. Medium untuk mencuci eritrosit (RBC) dibuat dengan cara sebagai berikut sebanyak 100 ml medium minus (M-) ditambahkan larutan sodium bikarbonat 5 % (w/v) sebanyak 4,2 ml Hasil dari campuran ini dinamakan medium plus(M+) yang baru dibuat jika hendak dipakai. Sedangkan medium biak merupakan campuran medium plus (M+) dengan penambahan serum manusia 10% atau sebanyak 11,5 ml kemudian diukur pHnya hingga 7,2- 7,4 . Hasil medium ini disebut medium komplit + serum manusia (RP-HS).

3.3.2. Persiapan Serum (Pusarawati S et al., 1997)

Untuk membuat serum dapat digunakan darah dari golongan darah A,B, AB dan O. Darah segar tanpa antikoagulan yang sudah diambil dimasukkan dalam tabung sentrifuge (15 ml atau 50 ml), diletakkan dalam temperatur ruang selama 30 menit dan dibiarkan semalam pada suhu 4°C. Selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit pada 4° C. Serum diambil dengan pipet Pasteur dan dimasukkan dalam tabung 15 ml dan diinaktifasi pada suhu 56 ° C selama 30 menit. Penyimpanan pada suhu -20 °C dan bila akan digunakan dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37 °C.

3.3.3. Persiapan Eritrosit (RBC) (Pusarawati S et al., 1997)

Darah manusia yang telah diberi antikoagulan disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Plasma, buffy coat dan supernatan dibuang (dipisahkan) hingga tinggal endapan eritrosit (*packed cell*). Eritrosit dicuci dengan medium plus (M+) tiga sampai lima kali volume sebanyak dua kali, kemudian terakhir diberi medium komplit + serum manusia (RP-HS) dengan volume yang sama sehingga mejadi RBC 50 % dan disimpan pada suhu 4° C. Sel darah merah yang telah dicuci dapat digunakan tidak lebih dari satu minggu.

3.3.4. Inokulum

Inokulum untuk biakan adalah eritrosit yang terinfeksi. Sumber eritrosit yang terinfeksi adalah dari isolat baru penderita malaria falciparum yang dirawat di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

3.3.5. Prosedur Biakan (Pusarawati S et al., 1997)

Darah dari penderita malaria diambil melalui vena kira-kira 10 ml, kemudian darah dipindahkan dari syringe ke tabung steril yang mengandung 200 IU heparin ditambah dengan medium transport (Medium plus tanpa serum) dengan volume yang sama dan dicampur dengan baik. Bila tidak segera dikerjakan disimpan pada suhu 4° C. Penyimpanan ini dapat dilakukan selama 24-36 jam. Kemudian darah disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Plasma, buffy coat dan supernatan dibuang dengan cara isolasi menggunakan ficoll hypaque hingga tinggal endapan eritrosit (*packed cell*), lalu dicuci dengan medium plus sampai tiga kali. Diambil setiap 1ml larutan suspensi eritrosit tersebut dan dicampurkan dengan 9 ml medium komplit plus 15% serum manusia dan dimasukkan kedalam botol biakan (*cultur flask*) dan diinkubasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 °C 5% CO₂, 5 % O₂ dan 90 % N₂. Penggantian medium dilakukan setiap 24 jam sekalidengan hati-hati menggunakan pipet Pasteur yang steril. Diambil sedikit sedimen untuk dibuat hapusan untuk melihat parasitemia, kemudian ditambahkan 9 ml medium untuk setiap botol biakan dan diinkubasi kembali.

3.3.6. Evaluasi Pertumbuhan

Untuk mengetahui pertumbuhan parasit, dibuat hapusan darah tipis dan dihitung tingkat parasitemianya. Hapusan darah tipis difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan Giemsa. Pertumbuhan parasit secara teratur diamati tiap 24 jam atau 48 jam. Bila hendak diperbanyak dilakukan sub-biakan dan bila disimpan dapat dilakukan freezing sampai akan digunakan lagi.

3.3.7. Prosedur Freezing dengan Larutan Rowe (Pusarawati S et al., 1997)

Biakan ditambahkan dengan larutan Freezing yang terdiri dari gliserol 28 % Sorbitol 3%, NaCl 0,65 % dan aquabidest sampai 100 ml dengan volume sama dalam packed cell dan diaduk sampai rata. Didiamkan selama 5 menit pada suhu kamar dipindahkan dalam cryotube steril kurang lebih 1,5 ml dan disimpan dalam deep freeze (-80 ° C.).

3.3.8. Thawing Metode Rowe (Pusarawati S et al., 1997)

Biakan parasit dimasukkan kedalam tabung sentrifuge, disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 ° C . Supernatan dibuang dan *packed cell* ditambah dengan NACl 3,5 % steril dengan volume yang sama dan aduk pelan-pelan. Disentrifuge lagi 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 ° C dan supernatannya dibuang. *packed cell* dicuci dengan RP-HS sebanyak 2-3 kali sampai hemolisis tidak terjadi.

3.3.9. Sinkronisasi (Pusarawati S et al., 1997)

Plasmodium falciparum yang ditumbuhkan di dalam biakan setelah beberapa siklus akan kehilangan sifat sinkronnya. Sinkronisasi dilakukan dengan D Sorbitol 5 % (w/v). Suspensi eritrosit 1cc dimasukkan dalam tabung sentrifuge 15 ml dan dipusingkan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 ° C. Supernatannya dibuang dan *packed cell* ditambah dengan larutan sorbitol sebanyak 5 kali volume dan dibiarkan selama 5-10 menit pada temperatur kamar, disentrifus lagi dengan kecepatan sama dan supernatannya dibuang dan dicuci dengan medium lengkap ditambah 10% serum manusia sebanyak 3-4 kali volume dan diulangi 2-3 kali. Packed cell yang

terbentuk masukkan dalam flask baru ditambahkan dengan medium komplit 10% 8-9cc, sehingga konsentrasi hematokrit 10 % dan ditambahkan dengan RBC 50 % sebanyak 1cc.. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ dan diganti mediumnya setiap 24 jam.

3.3.10. Pemeriksaan kepekaan secara invitro dengan mikro test (MIM/TDR)

3.3.10.1. Persiapan Obat (Stock solution)

Timbang obat (Chhloroquine, Pyrimethamine, Sulfadokxine, Artemisinine) masing - masing seberat 5 mg. Chloroquine dilarutkan dalam 1,5 ml deionize water/distilled water terlebih dahulu, kemudian divortek atau sonifikasi. Setelah obat larut ditambahkan 3,5 ml etanol absolut dan divortex kembali hingga larut sempurna. Pyrimethamine, Sulfadokxine, Artemisinine masing-masing obat dilarutkan dalam 5 ml etanol 70% .Larutan obat yang terbentuk adalah larutan stock dengan konsentrasi 1mg/ml.

3.3.10.2. Persiapan Obat (Working Solution).

Untuk menentukan dosis working solution tiap obat dilakukan perhitungan dilution factor dengan menggunakan persamaan : $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$

Dengan V_1 = Volume larutan stock yang diambil

M_1 = Kosentrasi larutan stock (1mg/ml)

V_2 = Volume working solution yang diperlukan

M_2 = Kosentrasi working solution yang diperlukan

Dengan persamaan diatas dibuat sederetan larutan dari masing- masing obat dari larutan stock (1mg/ml) dengan starting kosentrasi untuk Chloroquine 500 ng/ml, Sulfadoksin 1500 ng/ml, Pyrimetamin 250 ng/ml, kombinasi Sulfadoksin dan Pyrimetamin 750 ng/ml, 125 ng/ml dan Artemisinine 100 ng/ml diruang laminier, kemudian difilter dengan filter 0,2 μ m.

3.3.10.3. Pembuatan template test

- a. Well 1 dan 2 dari row A diisi dengan chloroquine 300 ul dengan dosis working solution (500 ng/ml).
- b. Well 3 dan 4 dari row A diisi dengan Sulfadoksin 300 ul dengan dosis working solution (1250 ng/ml).
- c. Well 5 dan 6 dari row A diisi dengan Pyrimetamin 300 ul dengan dosis working solution (250 ng/ml).
- d. Well 7 dan 8 dari row A diisi dengan Sulfadoksin 150 ul dan Pyrimetamin 150 ul dengan dosis working solution (1250 ng/ml dan 250 ng/ml).
- e. Well 9 dan 10 dari row A diisi dengan Artemisinin 300 ul dengan dosis working solution (100 ng/ml).
- f. Well 11 dan 12 dari row A diisi dengan CM 300 ul. well ini dipakai untuk kombinasi chloroquine dan verapamil.
- g. Well yang tersisa row B sampai H diisi dengan 200 ul CM
- h. Buat dilusi (1/3 dilusi) dengan cara mentransfer 100 ul isi dari row A ke B, 100 ul dari row B yang sudah ditambah dengan row A ke C, demikian pula hingga seterusnya.

Dosis yang didapat untuk template adalah:

Pada kolom 1 A sampai 1G; 2A sampai 2G; berisi larutan Chloroquine dengan konsentrasi awal mulai 500 ng/ml; 166,6 ng/ml; 55,5 ng/ml; 18,5 ng/ml, 6,2 ng/ml, 2 ng/ml, 0,6 ng/ml.

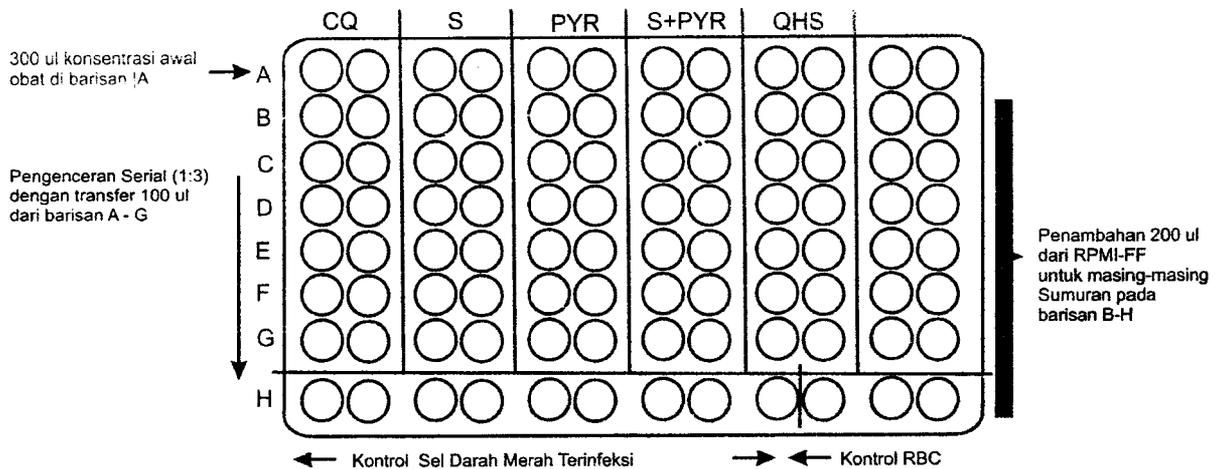
Pada kolom 3A sampai 3G; 4A sampai 4G; berisi larutan Sulfadoxine dengan konsentrasi awal mulai 1500 ng/ml ; 500 ng/ml ; 166,6 ng/ml ; 55,5 ng/ml ; 18,5 ng/ml ; 6,2 ng/ml ; 2,1 ng/ml

Pada kolom 5A sampai 5G; 6A sampai 6G; berisi larutan Pyrimethamine dengan konsentrasi awal mulai dari 250 ng/ml, 83,3 ng/ml ; 27,8 ng/ml ; 9,3 ng/ml ; 3,1 ng/ml ; 1,02 ng/ml ; 0,34 ng/ml

Pada kolom 7A sampai 7G; 8A sampai 8G; berisi larutan kombinasi dari larutan Sulfadoxine dengan Pyrimethamine dengan konsentrasi awal mulai dari 750 ng/ml untuk sulfadoxin dan 125 ng/ml untuk pyrimetamin, 250 ; 41,7 ng/ml ; 83,3 ; 13,9 ng/ml, 27,7 ; 4,6 ng/ml; 9,3 ; 1,5 ng/ml ; 3,1 ; 0,51 ng/ml ; 1,03 ; 0,17 ng/ml ; 0,34 ; 0,06 ng/ml.

Pada kolom 9A sampai 9G; 10A sampai 10G; berisi larutan Artemisinin dengan konsentrasi awal mulai dari 100 ng/ml, 33,3 ng/ml; 11,1 ng/ml ; 3,7 ng/ml; 1,2 ng/ml; 0,4 ng/ml; 0,14 ng/ml.

Pada baris H merupakan kontrol yang berisi sel darah merah terinfeksi dan RBC tanpa diberi obat apapun.



Keterangan : CQ : Chloroquine
 S : Sulfadoxine
 PYR : Pyrimethamine
 QHS : Artemisinin

3.3.10. 4. Persiapan test plate

1. Masukkan 25µl dari seluruh well dari template plate ke dalam 96 micro plate baru (dapat untuk 7 buah microplate baru) dengan multichannel pipette .
2. Masukkan 25µl CM pada semua well kecuali well yang mengandung verapamil. Jika ada verapamil, masukkan 25µl dari working solution verapamil (500 ng/ml) ke dalam well 11 dan 12.
3. Total volume obat pada test plate adalah 50 µl.

3.3.10.5. Uji kepekaan obat secara in-vitro

Uji kepekaan obat secara invitro pada obat (Chloroquine 500 ng/ml, Sulfadoksin 1500 ng/ml, Pyrimetamin 250 ng/ml, kombinasi Sulfadoksin dan Pyrimetamin 750 ng/ml, 125 ng/ml dan Artemisinin 100 ng/ml) untuk isolat *Plasmodium falciparum* dari penderita malaria menggunakan metode micro test modifikasi dari WHO dengan menggunakan *well flat bottom 96* (WHO 1990).

Koleksi sampel darah dari penderita malaria falciparum (dan darah kontrol yang mengandung *P.falciparum* sensitif terhadap Chloroquine, Sulfadoksin pyremetamin

dan artemisin) sebanyak 2,5 ml. Sampel darah dibagi menjadi 2 aliquot. Satu aliquot (2ml) untuk digunakan dalam pengujian kepekaan terhadap obat antimalaria secara invitro dan satu aliquot (0,5 ml) disimpan beku(-70°C). Sampel darah 2 ml diencerkan sampai 20 x dengan medium RPMI dengan PABA dan Folate rendah untuk membuat 40 ml yang digunakan untuk dua plate mikrotiter. Sebanyak 200 µl sampel darah yang sudah diencerkan tersebut dipindahkan ke dalam plate yang berisi 50 µl larutan obat (dan media). Inkubasi pada suhu 37°C selama 20 – 36 jam. Sumuran pada control diamati untuk pematangan skizon mulai dari jam 18 sampai jam 20 setelah koleksi sampel dan secara periodik setelahnya. Setelah matang miringkan plate 45° dan biarkan sel, mengendap di dasar sumuran. Ambil supernatant 200 µl dan dibuang. Siapkan lapisan film tipis dengan menggunakan 5µl endapan sel.

Analisis resistensi untuk chloroquine

1. Tentukan konsentrasi chloroquine yang memberikan IC50
2. Tentukan konsentrasi chloroquine dan Verapamil yang memberikan IC50
3. Penurunan IC50 dari chloroquine dengan adanya verapamil mengindikasikan adanya resistensi.

Analisis resistensi untuk Sulfadoksin/pyremetamin dan Artemisin

- Tentukan konsentrasi obat yang memberikan IC50 pada darah sampel
- Tentukan konsentrasi obat yang memberikan IC50 pada darah kontrol
- Penurunan IC50 dari obat pada sampel dibandingkan kontrol mengindikasikan adanya resistensi.

Koleksi sampel darah dari penderita malaria falciparum sebanyak 2,5 ml.

Sampel darah dibagi menjadi 2 aliquot. Satu aliquot (2ml) untuk digunakan dalam pengujian kepekaan terhadap obat antimalaria secara invitro dan satu aliquot (0,5 ml) disimpan beku(-70°C)

Sampel darah 2 ml diencerkan sampai 20 x dengan medium RPMI dengan PABA dan Folate rendah untuk membuat 40 ml yang digunakan untuk dua plate mikrotiter.

Sampel darah sebanyak 200 μ l yang sudah diencerkan tersebut dipindahkan ke dalam plate yang berisi 50 μ l larutan obat (dan media).

Diinkubasi pada 37°C selama 20 – 36 jam. Sumuran control diamati untuk pematangan skizon mulai dari jam 18 sampai jam 20 setelah koleksi sampel dan secara periodik setelahnya.

Setelah matang miringkan plate 45° dan biarkan sel mengendap di dasar well. Ambil supernatant 200 μ l dan buang. Siapkan lapisan film tipis dengan menggunakan 5 μ l sel pada endapan sumuran .

3.4. Ekstraksi DNA genom parasit *Plasmodium falciparum* (Sulandari dan Arifin Zain,2003)

Isolat parasit dalam kultur dimasukkan dalam tabung 10 ml dan ditambahkan buffer lisis sebanyak empat kali volume sampel. Kocok dan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan dibuang. Tahapan ini dilakukan 2 kali. Kemudian ditambahkan rinse buffer sebanyak empat kali volume larutan dan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet yang tersisa didasar tabung dilarutkan dengan 2,5 ml Salted Tris EDTA dan 20 µl enzim proteinase K (10 mg/ml). Campuran kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 2 jam. Ditambahkan 5 M NaCl sebanyak 10 % dari volume, CIAA (Chloroform Isomyl Alkohol) 50 % dari volume dan phenol 50 % dari volume larutan kemudian dicampur menggunakan *rotary mixer*. Selama 2 jam dalam temperatur kamar. Sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit supernatan diambil dimasukkan dalam tabung dialisis (membran selulose) sekitar 12 jam. Hasil dialisis dipindahkan dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan 20 µl enzim RNase dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 30 menit. Ditambahkan 50 µl enzim proteinase K dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 1 jam. Ditambahkan 5 M NaCl 10 % dari volume CIAA 50 % dari volume dan phenol 50 % dari volume dicampur menggunakan *rotary mixer* selama 2 jam. Sentrifugasi 7000 rpm selama 10 menit, Supernatan diambil dan dimasukkan dalam tabung dialisis (membran selulose). Dialisis kedua terhadap Tris EDTA sekitar 12 jam atau bisa diulang lagi untuk mendapatkan DNA yang lebih murni. DNA total hasil ekstraksi dan purifikasi disimpan dalam botol ditambah beberapa tetes chloroform untuk menghindari tumbuhnya jamur dan disimpan pada temperatur 4 °C sampai siap digunakan lebih lanjut.

3.5. Amplifikasi gen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* dengan teknik PCR

Amplifikasi gen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* dilakukan melalui tahapan perancangan primer, penyiapan larutan DNA template dan proses PCR. Primer untuk amplifikasi gen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* adalah *pfprt* 76, *pfmdr*86, *dhps*437 dan *dhfr*108 (Schonfeld, 2007), Primer - primer ini digunakan untuk mengamplifikasi pada

coding region gen (kodon) dari gen-gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* sebagai berikut :

*pfcr*76(senseCAAGAAGGAAGTAAGTATCCAAAATGG:antisense:GTAGTTCTTGT AAGACCTATGAAGGC).

*pfmdr*86(sense:ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG,antisense:CGTACCAATTCCTGAA CTCAC)

*dhps*437(sense:TGAAATGATAAATGAAGGTGCTAGTGT,antisenseAATACAGGTAC TACTAAATCTCTTTCACATAATTTT)

*dhfr*108(sense:TGGATAATGTAAATGATATGCCTAATTCTAA,antisense.AATCTTCT CTTTTTTTAAGGTTCTAGACAATATAACA)

Larutan DNA template dari hasil ekstraksi DNA genom parasit *Plasmodium falciparum* dalam buffer lisis yang mengandung enzim proteinase K (Sulandari dan Arifin Zain,2003).

Campuran reaksi untuk proses PCR akan dikerjakan dalam volume 25 µl yang mengandung 25 pmol primer, 5 µl larutan template, 1,25 unit Taq DNA polymerase, buffer PCR 1x (10 m M Tris HCl pH 9, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) dan dNTP (dGTP,dATP, dCTP dan dTTP) dengan konsentrasi masing-masing 100 µl. Proses PCR akan dilakukan dengan mesin DNA thermal Cyler sebanyak 25 siklus, dengan masing-masing siklus terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik , tahap *annealing* pada suhu optimum 56-59 °C selama 30 detik dan tahap polimerisasi pada 60-68 °C selama 60 detik. Kondisi proses predenaturasi PCR dilakukan pada suhu 94 °C selama 4 menit dan proses *extention* pada suhu 60 °C selama 5 menit. Hasil amplifikasi selanjutnya akan dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1% (b/v) yang mengandung 0,6 etidium bromida. Visualisasi hasil elektroforesis akan dilakukan dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 205 nm dan didokumentasi dengan kamera digital.

3.7. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan diberikan sama dari mulai pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium.

3.8. Variabel Penelitian

Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Beberapa obat antimalaria dan konsentrasi dosis obat antimalaria antara lain:

- Klorokuin
- Pirimetamin-sulfadoksin
- Artemisinin

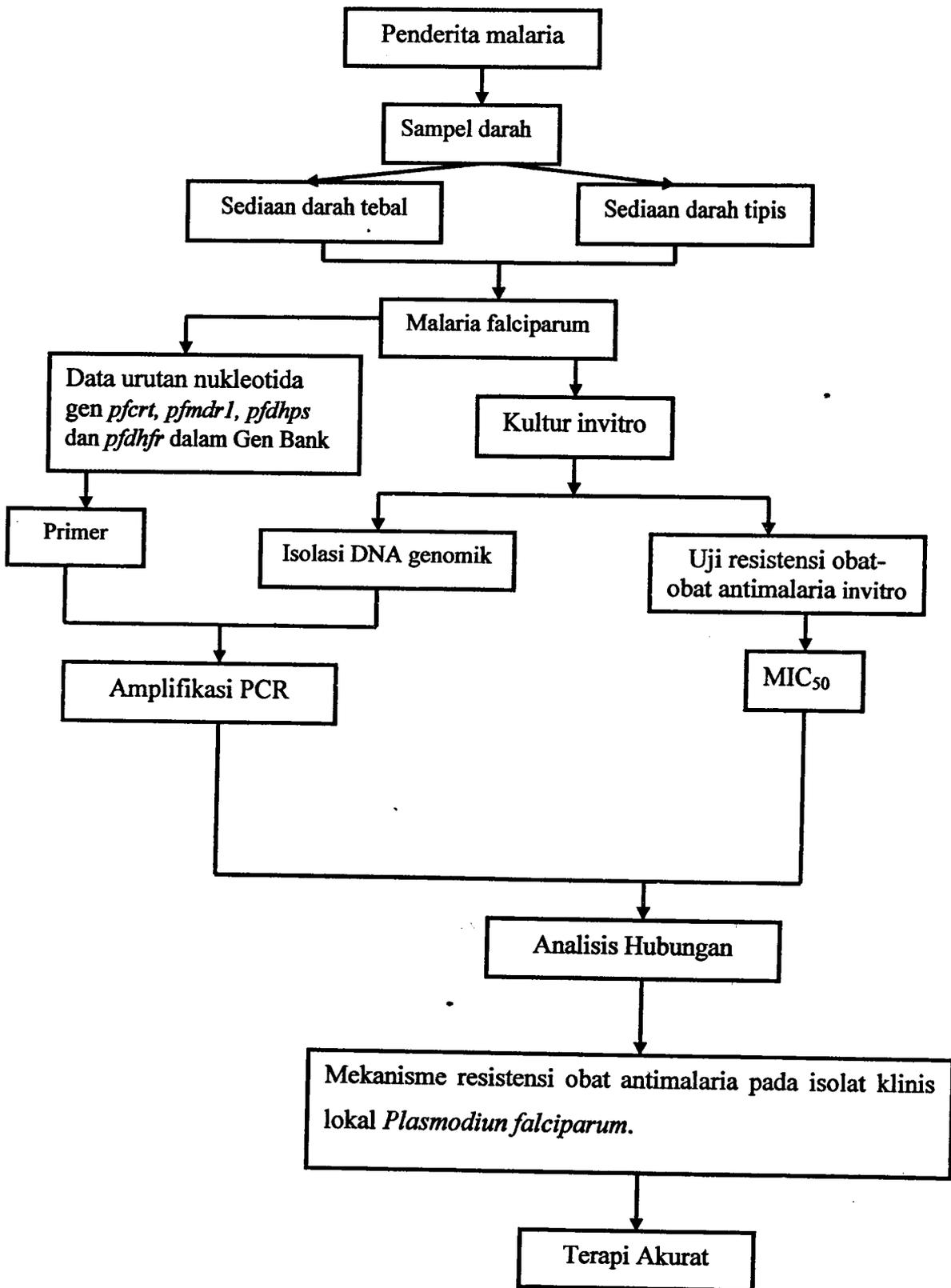
Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)

- Data *Plasmodium falciparum* isolat klinik lokal yang resisten terhadap beberapa obat antimalaria
- IC_{50} yaitu konsentrasi obat yang dapat menghambat 50 % pertumbuhan *Plasmodium falciparum*
- Urutan nukleotida *Plasmodium falciparum* isolat klinis lokal yang resisten terhadap beberapa obat antimalaria
- Analisis mutasi

Variabel Kendali

- Media kultur
- Suhu dan kelembaban inkubator CO_2
- Umur Penderita malaria
- Hanya mengandung *Plasmodium falciparum* dalam darahnya (bukan infeksi campuran)
- Kepadatan/jumlah parasit aseksual 500-100.000/ml darah

Alur Penelitian



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

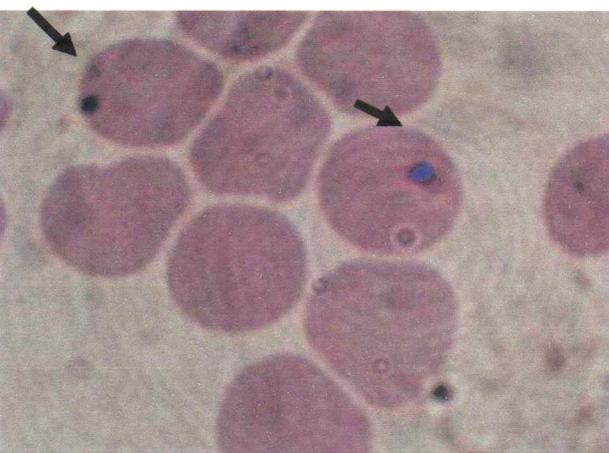
4.1. Pengumpulan Sampel

Hasil pengumpulan sampel darah dari penderita malaria falcifarum yang dilakukan di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang diambil dari Bagian penyakit Dalam selama penelitian didapatkan sebanyak 4 sampel. Empat sampel ini kemudian dilakukan identifikasi dengan hapusan darah tebal dan tipis untuk menentukan malaria yang hanya disebabkan oleh *Plasmodium falcifarum* bukan oleh infeksi campuran dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang .



4.2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Sediaan Darah Tipis

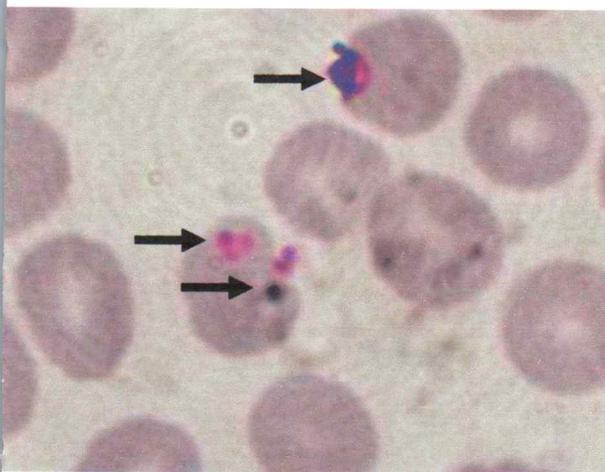
Pemeriksaan mikroskopis dengan hapusan darah tipis merupakan pemeriksaan yang terpenting untuk identifikasi parasit yang tepat. Pada gambar dibawah adalah merupakan hasil dari pemeriksaan hapusan darah tipis dari penderita malaria yang hanya disebabkan oleh *Plasmodium falcifarum*. Pada gambar parasit *Plasmodium falsifarum* di bawah *Plasmodium falcifarum* masih dalam bentuk trofozoit. Untuk menentukan bahwa penderita memang terinfeksi oleh *Plasmodium falcifarum* akan terlihat dengan jelas perbedaan dengan infeksi oleh plasmodium yang lain seperti yang dapat dilihat cirinya yaitu sel darah merah yang terinfeksi tidak membesar tetapi sering mengalami pengerutan (distorsi) dengan krenasi. Kemerahan dengan sisi gelap. Ada bintik-bintik kasar (Mauer's dot).



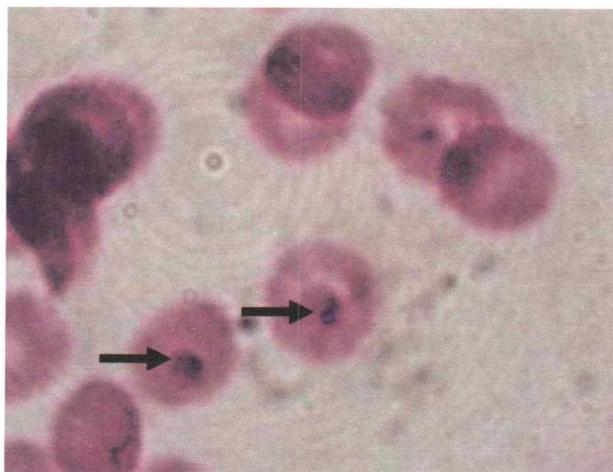
Gambar 1. Stadium awal trofozoit



Gambar 2. Stadium awal trofozoit
Sel darah merah krenasi



Gambar 3. Stadium trofozoit



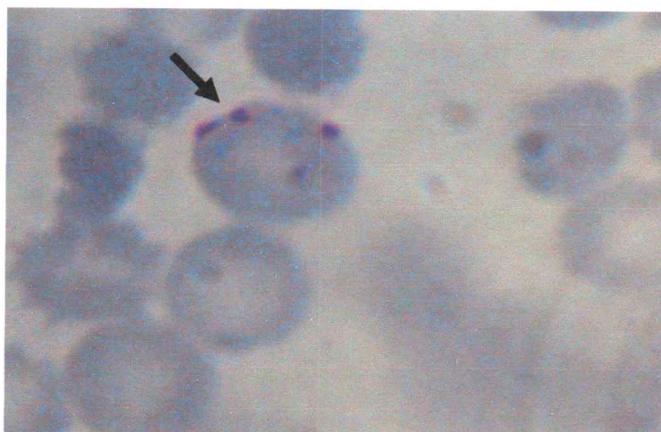
Gambar 4. Stadium trofozoit

4.3. Hasil kultur *Plasmodium falcifarum* secara invitro

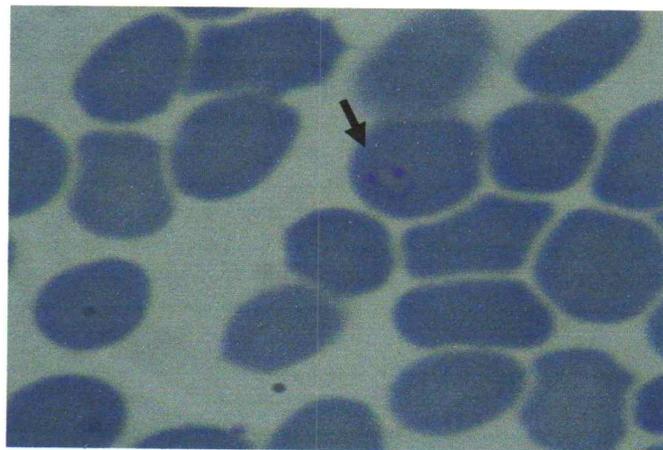
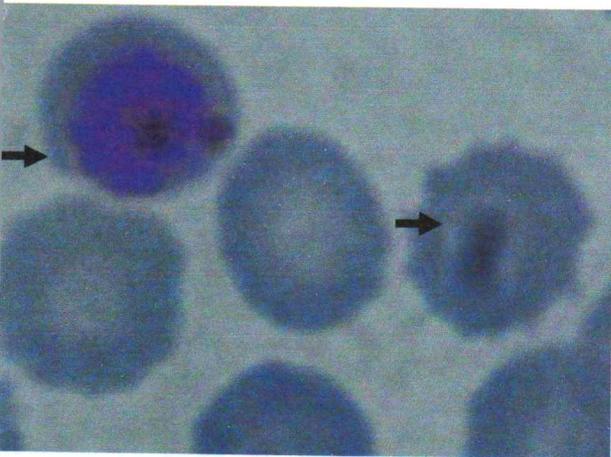
Hasil kultur plasmodium falcifarum dalam medium kultur RPMI 1640 dilakukan evaluasi pertumbuhan untuk mengetahui pertumbuhan parasit dengan membuat hapusan darah tipis yang difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan Giemsa 20 % selama 20 menit dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dan dihitung tingkat parasitemianya. Dari hasil kultur didapatkan pertumbuhan dan perkembangan parasit yang cukup bagus dengan parasitemia sekitar 10 %.



Gambar 5. Bentuk Skizon berisi merozoit



Gambar 6. Bentuk Trofozoit muda



Gambar 7. Bentuk Skizon dan gametosit Gambar 8. Bentuk tropozoit matang ring 2 dot

Hasil dari kultur *Plasmodium falciparum* ini ada berbagai stadium yaitu stadium trofozoid muda yang sering ditemukan dengan sitoplasma ring tipis biru pucat dan kromatinnya dots kecil merah 1 atau 2. Trofozoid matang juga sering ditemukan dengan sitoplasma ring tipis biru atau berbentuk koma atau tanda seru. Kromatin merah berukuran medium berjumlah 1 atau 2. Skizon dengan pigmen hitam kecoklatan gelap dengan merozoit sekitar 18-23, sedangkan gametosit seperti pisang.

4.4. Hasil IC₅₀ sensitivitas *Plasmodium falciparum* secara invitro

Uji kepekaan obat secara invitro pada obat (Chloroquine 500 ng/ml, Sulfadoksin 1500 ng/ml, Pyrimetamin 250 ng/ml, kombinasi Sulfadoksin dan Pyrimetamin 750 ng/ml, 125 ng/ml dan Artemisinine 100 ng/ml) untuk isolat *Plasmodium falciparum* dari penderita malaria menggunakan metode micro test modifikasi dari WHO dengan menggunakan *well flat bottom* 96 (WHO 1990) dengan hasil sebagai berikut sebagai berikut ; Hasil dari uji IC₅₀ didapatkan dari hasil pertumbuhan parasit pada kontrol darah terinfeksi dibandingkan dengan darah terinfeksi yang diberikan perlakuan beberapa macam obat setelah inkubasi selama

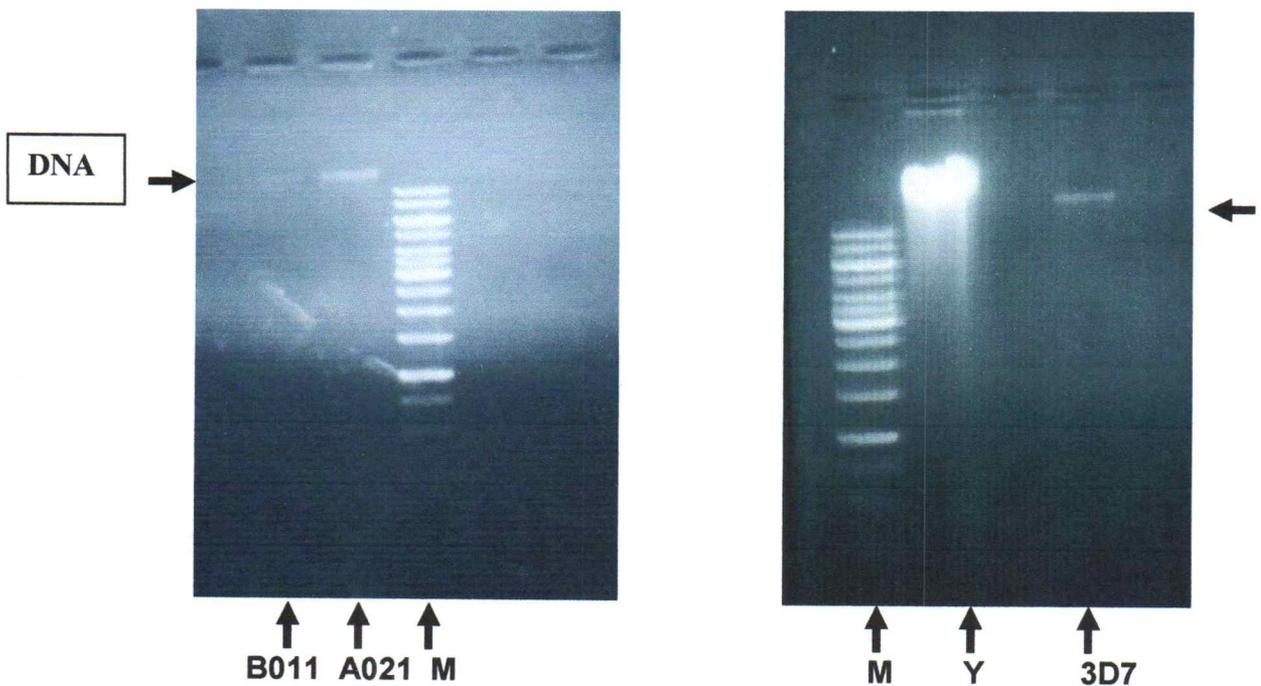
24 jam dengan beberapa pengenceran dosis obat didapatkan seperti pada tabel 1. pada obat Chloroquine parasit hanya dapat dihambat dengan konsentrasi dosis yang besar yaitu Chloroquine 500 ng/ml sedangkan Artemisinin pada dosis 100 ng/ml semua parasit tidak dapat tumbuh sehingga mampu menghambat pertumbuhan parasit. Hasil ini mungkin sudah menunjukkan bahwa parasit ini sudah resisten terhadap obat Chloroquine tersebut sehingga membutuhkan dosis yang lebih besar untuk menghambat pertumbuhannya. Seperti hasil penelitian yang dilakukan oleh Tuti (1992) bahwa dengan tes *invivo* dan *invitro* resistensi terhadap chloroquine sudah ditemukan hampir disemua propinsi di Indonesia. Sedangkan pada kombinasi Sulfadoxine dan Pyrimethamine konsentrasi dosis untuk menghambat pertumbuhan parasit menurun yaitu 1,03-017 ng/ml jika dibandingkan dengan pemberian obat secara sendiri-sendiri hal ini menunjukkan kombinasi kedua obat tersebut bekerja lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan parasit. Efek kombinasi sulfadoxine–Pyrimethamine adalah saling memperkuat (*sinergisme*). Sulfadoxine mempunyai sifat *competitive inhibition* dengan PABA sehingga pembentukan asam folat yang dibutuhkan dalam proses pembentukan inti sel dan sitoplasma terhalang sedangkan pyrimethamine menghalangi enzim dihidrofolate reduktase sehingga tidak terbentuk asam folinat.

Tabel 1. Hasil Uji IC₅₀ Beberapa Obat antimalaria

Obat	IC ₅₀ (ng/ml)
Cloroquine	500
Pyrimethamine	9,3
Sulfadoxine	55,5
SulfadoxineK	1,03
PyrimethamineK	0,17
Artemisinin	100

4.5. Hasil ekstraksi DNA dari kultur *Plasmodium falcifarum*

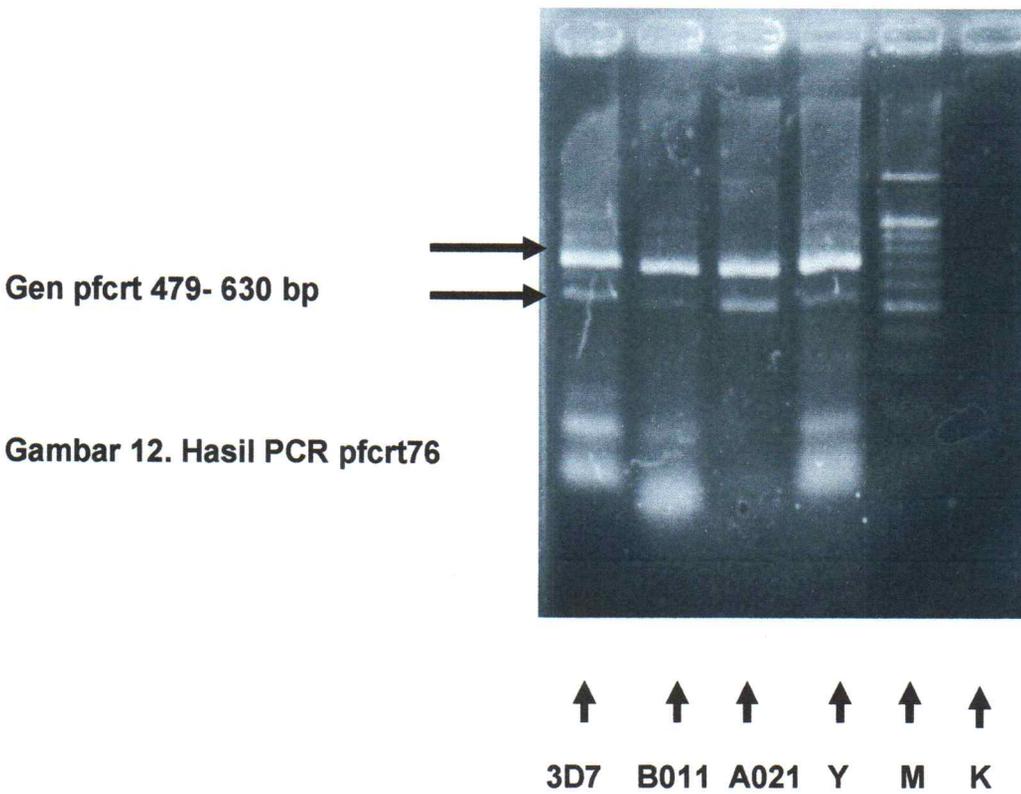
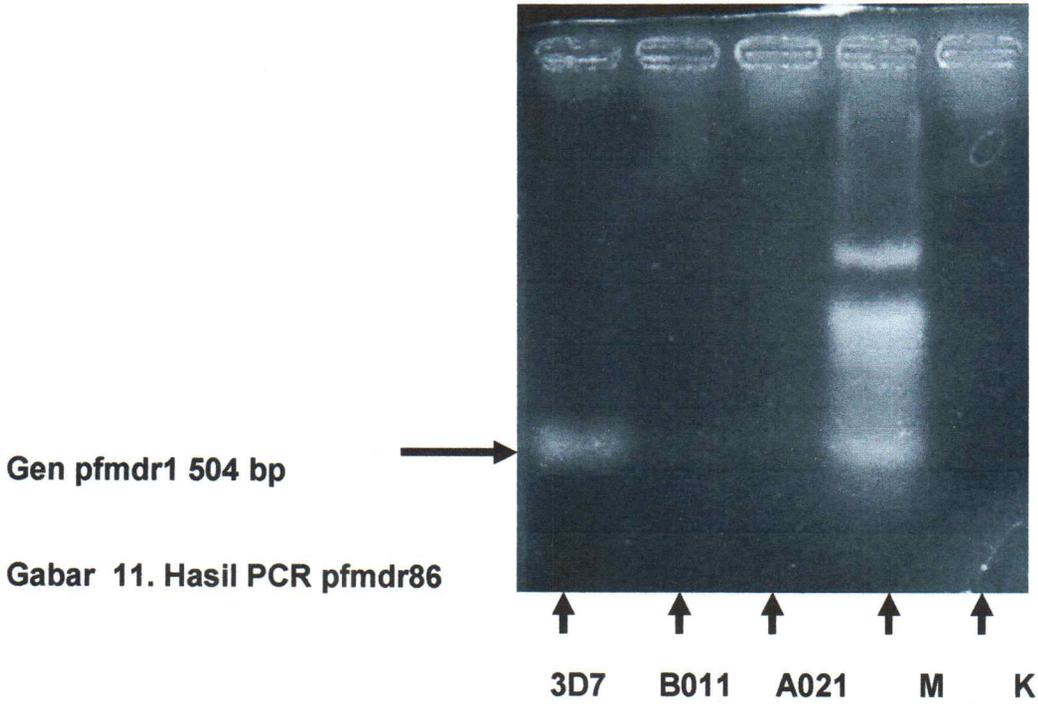
Sampel kultur *Plasmodium falcifarum* dari penderita malaria dilakukan ekstraksi DNA dengan reagen Qiagen. Hasil ekstraksi kultur parasit dari sampel 3D7, B011, A021, Y, dilakukan elektroforesis dengan hasil sebagai berikut.



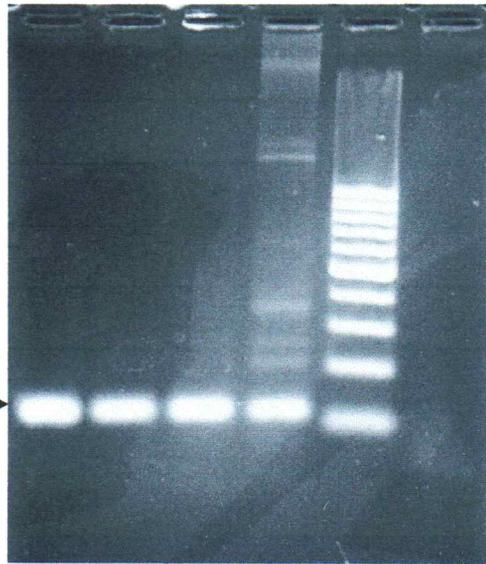
Gambar 9. dan 10 . Hasil elektroforesis ekstraksi DNA

Pada elektroforesis menggunakan marker ladder dengan band yang paling tinggi sekitar 10.000 bp sedangkan yang paling rendah sekitar 250 bp. Hasil band yang ditunjukkan pada sampel B011, A021, Y dan 3D7 semua menunjukkan hasil yang lebih tinggi dari marker yang digunakan.

5.6. Hasil Amplifikasi gen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* dengan teknik PCR



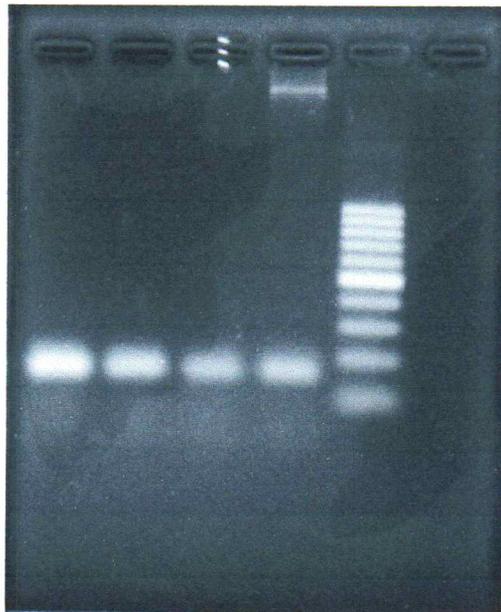
Gen pfdhps 130 bp



Gambar 13. Hasil PCR pfdhps 437

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
3D7 B011 A021 Y M K

Gen pfdhfr 190bp



Gambar 14. Hasil PCR pfdhfr108

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
3D7 B011 A021 Y M K

Hasil PCR yang ditunjukkan pada gambar diatas band-band yang muncul dengan ukuran tertentu pada setiap gen yang berbeda dengan menggunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi pada *coding region gen* (kodon) yang diinginkan. Gen *pfcr* muncul pada 479- 630 bp, gen *pfmdr1* pada 504 bp, gen *pfdhps* 130 bp dan *pfdhfr* pada 190 bp. Gen-gen *pfcr*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* pada *plasmodium falcifarum* dapat diekspresikan sehingga hasil ini dapat digunakan sebagai marker untuk menentukan deteksi resistensi terhadap obat anti malaria.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kosentrasi minimal untuk menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50 % pada masing-masing obat berbeda
2. Chloroquine membutuhkan kosentrasi yang besar untuk menghambat pertumbuhan parasit 50% yaitu sebesar 500ng/ml
3. Kombinasi Sulfadoxine dan Pyrimethamine mempunyai efektifitas yang lebih baik untuk menghambat pertumbuhan parasit 50% dibandingkan dengan pemakaian obat secara sendiri-sendiri.
4. Artemisiniine dengan dosis 100 ng/ml dapat menghambat semua pertumbuhan parasit
5. Gen *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfdhps* dan *pfdhfr* pada *plasmodium falcifarum* dapat digunakan sebagai marker untuk deteksi resistensi obat antimalaria.

Saran :

Saran yang perlu diberikan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Hasil gen yang muncul dari hasil PCR harus dilanjutkan dengan skuensing untuk mengetahui mutasi pada masing-masing gen untuk setiap sampel.
2. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan memakai marker gen resistensi obat untuk membuat kit diaqnostik sebagai rapit test sehingga dapat memberikan manfaat dan masukan kepada pemerintah untuk mengambil kebijakan dalam melakukan program terapi malaria, dan memberikan masukan kepada dokter dalam menentukan terapi dengan obat antimalaria yang tepat kepada penderita malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Alker PA, Mwapasa V, Purfield A, Rogerson SJ, Molyneux M.E, Kamwendo DD, Tadesse E, Chaluluka E, Meshnick SR. (2005) Mutation Associated with Sulfadoxine-Pyrimethamine and Chlorproguanil Resistance in *Plasmodium falciparum* Isolates from Blantyre, Malawi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sept (Vol 49) 3919 -3921.
- Chaijaroenkul, W., Bangchang K.N., Mungthin, M and Ward, S.A (2005). *In vitro* Antimalaria Drug Susceptibility in Tha Border Area From 1998-2003. *Malaria Journal* .4:37
- Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diorte, Y., Dicko, A., Su, Xz., Nombra, T., Fidock, D.A., Wellem TE., Plwe CV., Coulibly, D. (2001). A molecular Marker For Chloroquine Resistant *Falciparum* Malaria. *N.Engl J*. 344:257-263
- Duraisingh, M.T., Cowman, A.F. (2005) Contribution of *pfmdr1* Gene to Antimalarial Drug Resistance. *Acta Trop*. 94(3) :181-190
- Kublin, J.G., Dzinjalama, F., Kkwendo, D.D., Malkin, E.M., Cortese, J.F., Martino, L.M., Mukdam, R.A (2002). Molecular Markers for Failure of Sulfadoxin-Pyrimethmine and Chlorproguanil Dapsone Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis* 185:380-388
- Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil, J.P., Rosario, V.E and Cravo Pedro. (2002) Molecular Characterisation of Drug Resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal*. 1 :12
- Mugittu, K., Genton, B., Mshinda, H and Beck H.P. (2006) Molecular Monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to Artemisinin in Tanzania. *Malaria Journal* 5:126
- Nasronudin (2008). Patogenesis dan Penatalaksanaan Malaria. *Biologi Molekuler Penyakit Infeksi*. Institute of Tropical Disease Airlangga University. Airlangga University Press. 68-81
- Ochong, E., Nzila, A., Kimani, S., Kokwaro, G., Mutabingwa, T., Watkins, W. and Marsh K. (2003) Molecular Monitoring of the Leu-164 Mutation of Dihydrofolate Reductase in a Highly Sulfadoxine/Pyrimethamine Resistant Area In Africa. *Malaria Journal* 2:46.

- Pimentel,S.,Nogueira,F.,Benchimol,C.,Quinientos,V.,Bom,J., Varandas,L., Rosario V and Bernardino ,L (2006) Detection of Atovaquone-Proguanil Resistance Converting Mutation in *Plasmodium falciparum* Cytochrome b Gene in Luanda, Angola. *Malaria Journal* 5;30
- Pusarawati S, Tantular I.S, Hidayati S, Prijatna Dachlan Y, (1997) Biakan Berkesinambungan *Plasmodium falciparum* Stadium Eritrosit. *Biologi Molekuler Kedokteran*. 95-108
- Schonfeld,M.Miranda,I.B.,Schunk,M., Manduhu,I.,Mboko,L.,Hoelsher,M.,Riha,NB Kitua,A and Loscher, T.(2007). Molecular Surveillance of Drug Resistance associated Mutation of *Plasmodium falciparum* in Southwest Tanzania. *Malaria Journal* 6:2
- Simanjutk,C.H., Arbani,P.R. (1999) Status Malaria Di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran*. 55:3-11
- Sulandari,S dan Arifin Zein MS. (2003) Pandun Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi.Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu pengetahuan Indonesia.47-108.
- Tarigan,J (2003). Kombinasi Kina Tetrasiklin Pada Pengobatan Malaria Falciparum Tanpa Komplikasi di Daerah Resisten Multidrug Malaria. Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Usu digital Library.1-20
- Tuti,S (1992). Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Beberapa Obat Anti Malaria Di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran* 76. 49-52.
- Wichman,O.,Muelhlberger,N.,Jelinek,T.,Alifrangis,M.,PeyerlH.G.,Muhlen,M.,Grobusch,M.,Gascon,J., et al. (2004) Screening for Mutation Related To Atovaquone-Proguanil Resistance in Treatment Failures and other Imported Isolates of *Plasmodium Falciparum* in Europe. *J. Infect Dis.*90: 1541-1546