

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL BATCH II
TAHUN ANGGARAN 2009 / 2010



KKA
KK
LP.154/10
Efi



Judul Penelitian

Efikasi Sulfadoxine-Pyrimethamine *in vivo* dan polimorfisme gen *Plasmodium falciparum*-Dihydrofolate Reductase dan Dihydropteroate Synthase di Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Kalimantan Selatan

Sukmawati Basuki, dr., MSc, Budiono, dr., MKes, Fitriah, SKM, Damayanti, dr
Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc., Sp.ParK, Asc. Prof. Haruki Uemura

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch II nomor: 651/SP2H/PP/DP2M/VII, 2009

**Universitas Airlangga
Desember 2009**

Lembar Pengesahan

1. Judul : Efikasi Sulfadoxine-Pyrimethamine *in vivo* dan polimorfisme gen *Plasmodium falciparum-Dihydrofolate Reductase* dan *Dihydropteroate Synthase* di Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Kalimantan Selatan
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Sukmawati Basuki, dr., MSc
 - b. Jenis Kelamin : P
 - c. NIP : 132 147 150
 - d. Jabatan Struktural : -
 - e. Jabatan fungsional : Gol. IIIb
 - f. Bidang Keahlian : Parasitologi, Imunologi dan Molekuler
 - g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran./ Departemen Parasitologi
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Asal Fakultas/Kelembagaan Penelitian	Perguruan Tinggi
1.	Budiono, dr., MKes	Biostatistik	Kedokteran	Universitas Airlangga
2.	Fitriah, SKM	Analisis	LPT,	Universitas Airlangga
3.	Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan,dr., MSc,SpPark	Imunologi, Parasitologi Klinik	Kedokteran	Universitas Airlangga
4	Damayanti, dr	Parasitologi	Kedokteran	Universitas Airlangga
5	Asc. Prof. Haruki Uemura	Molekuler, Protozoologi	Inst.of Trop.Med.,	Nagasaki Univ., Jepang

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka Waktu Penelitian: 1 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp 200.000.000
- c. Biaya yang disetujui, tertanggal 16 September 2009 : Rp 125.000.000

Surabaya, 14 DEC 2009

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran



(Signature of Prof. Dr. Muhammad Amin)

Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P (K)
NIP. 130 517 186

Ketua Peneliti,

(Signature of dr. Sukmawati Basuki)

dr. Sukmawati Basuki, MSc
NIP. 132 147 150

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat



(Signature of Prof. Dr. Bambang Sektiari L.)

Prof. Dr. Bambang Sektiari L., drh., DEA
NIP. 131 837 004

Kata Pengantar

Puji syukur kami ucapkan sebesar-besarnya kepada Allah SWT, karena berkat rahmatNya penelitian "Efikasi Sulfadoxine-Pyremethamine In Vivo dan Polimorfisme Gen Plasmodium Falciparum-Dihydrofolate Reductase Dan Dihydropteroate Synthase Di Sei Pinang Kab. Banjar Baru - Kalimantan Selatan" dapat terlaksana. Terima kasih juga kami ucapkan Kepada Dinas Pendidikan Tinggi karena telah membantu kami agar penelitian kami dapat terealisasi.

Sebagai pertanggungjawaban, kami sampaikan laporan pelaksanaan Penelitian "Efikasi Sulfadoxine-Pyremethamine In Vivo dan Polimorfisme Gen Plasmodium Falciparum-Dihydrofolate Reductase Dan Dihydropteroate Synthase Di Sei Pinang Kab. Banjar Baru - Kalimantan Selatan" .

Kami mengetahui masih banyak kekurangan dalam pelaksanaan penelitian kami. Kami harap dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik dan tepat waktu dan dapat memberikan manfaat untuk kemajuan ilmu kedokteran.

Kami terbuka untuk saran dan kritik yang membangun.

Peneliti

DAFTAR ISI



Lembar Pengesahan	
Kata Pengantar	
Daftar Isi	
Daftar Gambar	
Daftar Tabel	
Daftar Lampiran	
Abstrak	i
Bab I	1
Pendahuluan	
Bab II	4
Studi Pustaka	
Bab III	9
Tujuan dan Manfaat	
Bab IV	10
Metode Penelitian	
Bab V	16
Hasil dan Diskusi	
Daftar Pustaka	ii

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Konsep Penelitian dalam Pengendalian Malaria	5
Gambar 2.	Jalur Biosntesis Asam Folat Pada <i>Plasmodium</i> spp.	7
Gambar 3.	Alur Penelitian	14
Gambar 4.	Lokasi Penelitian	15
Gambar 5.	Pelatihan Pada Petugas Kesehatan dan Petugas Laboratorium	19
Gambar 6.	Pelatihan Pada Petugas Laboratorium	20
Gambar 7	Hasil Pemeriksaan Malaria dengan RDT	20

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Jadwal Kegiatan	16
Tabel 2.	Kasus malaria dan <i>annual malaria incidence</i> (AMI) di tiap Puskesmas di Kecamatan dari Kabupaten Banjar, Propinsi Kalimantan Selatan, tahun 2004 – 2006	iv
Tabel 3.	Slide positive rate (SPR) yang terkoleksi secara <i>passive detection</i> di Puskesmas, Kabupaten Banjar, tahun 2004 – 2006	v

DAFTAR LAMPIRAN

Lembar Persetujuan (<i>Informed Consent</i>)	vi
Lembaran sampel (<i>sample form</i>)	viii
Lembaran pemeriksaan laboratorium	ix

ABSTRAK

Malaria adalah penyakit infeksi parasit yang masih sebagai masalah kesehatan masyarakat di Indonesia terutama di luar Jawa-Bali, berefek menurunkan kualitas sumber daya manusia yang menyebabkan menurunnya produktifitas sosial dan ekonomi yang pada akhirnya berdampak pada ketahanan dan keamanan nasional. Resistensi obat malaria merupakan kendala dalam pengendalian malaria dewasa ini. Penelitian malaria sangat dibutuhkan guna memberikan informasi berbasis kejadian terhadap program. Sulfadoxine-Pyrimethamine adalah obat malaria lini kedua, sebagai obat pencegahan malaria, dan sebagai obat pencegahan malaria pada ibu hamil, yang dewasa ini diketahui adanya peningkatan resistensi dalam pengobatan falciparum malaria di beberapa Negara Asia dan Afrika. Kurangnya informasi adanya resistensi obat SP dalam penatalaksana pengobatan falciparum malaria di Indonesia, maka penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan memberikan masukan terhadap program pengendalian malaria khususnya di Indonesia berbasis kejadian yang ada di daerah endemis malaria, dengan menggunakan metode: uji efikasi SP *in vivo* dan dalam kaitannya dengan polimorfisme gen *Plasmodium falciparum-dihydropteroate synthase* dan *Plasmodium falciparum-dihydrofolate reductase* di daerah endemis malaria, Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Kalimantan Selatan. Ditemukan 2 penderita malaria falciparum dan vivax (*mixed infection*) pada bulan Oktober 2009. Setelah 7 hari pengobatan, masih terdapat parasit malaria pada sediaan tetes tebal darah kedua penderita dan satu penderita terdapat parasit malaria pada sediaan tetes tebal darah pada hari ke- 28 setelah pengobatan. Dari hasil sementara yang didapat menunjukkan kemungkinan adanya resistensi SP di daerah ini. Pemeriksaan molekuler akan dilaksanakan segera setelah reagen pemeriksaan yang dipesan tersedia. Pelaksanaan pengumpulan sampel masih berlangsung.

Kata kunci: Efikasi SP *in vivo*, polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr*, polimorfisme gen *P. falciparum-dhps*, daerah endemis malaria

BAB I PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit tropik infeksi yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium* yang menginfeksi sel darah merah dan menimbulkan gejala klinis panas badan, anemia dan pembesaran limpa. Malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat di dunia. Di Indonesia, terutama di luar Jawa-Bali, berefek menurunkan kualitas sumber daya manusia yang menyebabkan menurunnya produktifitas sosial dan ekonomi yang pada akhirnya berdampak pada ketahanan dan keamanan nasional. Berdasarkan laporan 'Profil Kesehatan Republik Indonesia' tahun 2006, malaria adalah penyebab kematian bayi sebesar 0,8% dan termasuk urutan ke -10 penyebab kematian bayi. Angka kesakitan malaria pada tahun 2001 hingga 2006 adalah fluktuasi, dari 2,69% pada tahun 2001, 4,9% pada tahun 2003 dan terjadi penurunan hingga 0,42% pada tahun 2006. Sedangkan angka insidens malaria (*Annual Malaria Incidence*) yang berlaku di luar Jawa dan Bali adalah 26,1% pada tahun 2001, 24,8% pada tahun 2005 dan 24,0% pada tahun 2006. Angka kesakitan dan kematian malaria masih cukup tinggi terutama di Indonesia Bagian Timur (IBT). Berdasar angka insidens parasit (*Annual Parasite Incidence*) yang berlaku di Jawa dan Bali; 0,62% pada tahun 2001, 0,15% pada tahun 2005, dan di tahun 2006 sebesar 0,19%. Hampir dua pertiga wilayah di Indonesia merupakan wilayah endemis malaria, terutama di Indonesia bagian timur, yang termasuk dalam wilayah endemis tinggi

Resistensi obat pada malaria merupakan kendala terberat dalam mengatasi penyakit tersebut terutama karena terancamnya tujuan pokok pengendalian malaria yakni menurunkan angka kesakitan dan meniadakan angka kematian. Dari beberapa mekanisme resistensi obat yang telah dianalisa, ternyata penyebab penting terjadinya resistensi obat antimalaria adalah terwujudnya suatu point mutation pada gen-gen penyandi protein dari parasit malaria. Resistensi, yang nyata secara klinis, terhadap obat antimalaria sebenarnya merupakan akumulasi mutasi berkali-kali (*multiple mutation*). Berbagai upaya untuk mengatasi resistensi obat antimalaria telah dilakukan mulai dari penerapan terapi kombinasi dari obat-obat yang tersedia hingga kajian yang ditujukan untuk menemukan sasaran-sasaran baru dari parasit dan terapi baru. Namun, seberapa jauh kontribusi dari factor-factor genetik host (tuan rumah), khususnya keterkaitannya dengan metabolisme obat antimalaria belum dikaji sepenuhnya. Sebagai tambahan, hubungan antara kadar obat secara *in vivo* dan keberhasilan obat seringkali menunjukkan hasil yang tidak konsisten. Merupakan hal penting untuk mempelajari yang lebih mendalam tentang peran bervariasinya faktor metabolisme obat antimalaria yang pada akhirnya berdampak terhadap keefektifan obat dan pengendalian malaria. Situasi peta distribusi nasional dan global, obat-obatan antimalaria yang digunakan saat ini, nasional, regional, global, dan informasi terjadinya resistensi obat malaria dalam hubungannya dengan berbagai mutasi pada gen-gen spesifik dari parasit akan sangat menunjang upaya pemahaman mekanisme genetik atas terjadinya resistensi parasit terhadap malaria dan keefektifan obat terkait dengan metabolismenya (

Mehlotra & Zimmerman, 2006).

Resistensi terhadap sulfone, sulfonamide, pyremethamine maupun kombinasi (sulfadoxine/pyremethamine, SP) yang merupakan obat malaria semakin meluas sejak 1987 (Peters et al, 1987). Walaupun demikian, sulfadoxine-pyrimethamine masih digunakan sebagai obat malaria di dunia, sebagai obat malaria *second line* di Indonesia, dan sebagai pencegahan terhadap malaria, khususnya pada ibu hamil di Afrika. Obat kombinasi tersebut menghambat kerja ensim dihydrofolate reductase (*dhfr*) dan dihydropteroate synthase (*dhps*) pada sintesa folat dalam parasit malaria. Adanya mutasi gen penyandi ensim tersebut pada malaria parasit berkaitan dengan parasit resisten terhadap pengobatan dengan sulfadoxine/pyremethamine (Cowman et al, 1988, Peterson et al, 1988, Inselburg et al, 1988, Zolg et al, 1988, Snewin et al, 1989, Tanaka et al, 1990, Thaithong et al, 1992, Wu et al, 1996). Hingga saat ini, *Plasmodium falciparum* menyebabkan keganasan malaria hingga kematian pada manusia. Kurang adanya data resistensi SP sebagai obat malaria dan kaitannya dengan mutasi gen penyandi ensim *dhfr* dan *dhfs* pada malaria parasit, maka pada penelitian ini akan melaksanakan uji efikasi SP dan menganalisa polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr* dan *dhfs* di daerah endemis malaria Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Kalimantan Selatan. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan memberikan masukan pada program pengendalian malaria di Indonesia berbasis dengan kejadian yang ada di daerah endemis malaria.

Penelitian resistensi obat malaria telah dilakukan sejak tahun 2004 dan yang merupakan penelitian kerjasama dengan Departemen Kesehatan RI dan *Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Jepang*. Penelitian ini diawali dengan menganalisa resistensi klorokuin pada penderita *falciparum* malaria dengan tanpa komplikasi dan terkait dengan polimorfisme gen penyandi klorokuin resisten dalam malaria parasit, di beberapa daerah endemis malaria; Pacitan (Jawa Timur), Tembilahan (Indragiri Hilir, Riau), Pasir (Kalimantan Timur), Tanjung (Lombok Barat, Nusa Tenggara Barat), Utan Rhee dan Lunyuk (Sumbawa Besar, Nusa Tenggara Barat). Pada tahun 2005, dilaksanakan penelitian efikasi Artemisin Combined Therapy (ACT) yaitu artesunate-amodiaquine di Tanjung dan Utan Rhee.

Kerjasama penelitian di bidang malaria telah terlaksana oleh Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga sejak tahun 1991, dengan Universitas Kobe, Jepang pada tahun 1991-1999 (LSCR, ICMR) dan Departemen Kesehatan Republik Indonesia (RI) meliputi penelitian epidemiologi malaria, surveilans, dan entomologi. Dilanjutkan dengan pengembangan sistem surveilans di Pacitan tahun 2001-2002 oleh WHO/SEARO, mempelajari kasus malaria di daerah perpindahan penduduk, di Pacitan bersama NAMRU-2, Jakarta pada tahun 2004-2005, mempelajari epidemiologi malaria di daerah terpencil, daerah transmigrasi, Kecamatan Lunyuk, Kabupaten Sumbawa Besar, Nusa Tenggara Barat pada tahun 2005-2006 bersama dengan Universitas Nagasaki, Jepang, dan kemudian mempelajari perilaku vektor malaria dan penduduk setempat di daerah endemis malaria, Indragiri Hilir, Riau oleh WHO/SEARO pada tahun 2006-2007.

Penelitian pengendalian malaria di Pulau Lombok dan Pulau Sumbawa, Nusa Tenggara Barat terlaksana atas kerjasama dengan *Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*, Jepang, Departemen Kesehatan RI, oleh JICA partnership program, pada tahun 2001-2004.

Kerjasama penelitian ini kemudian berlanjut dengan Departemen Kesehatan RI disertai jajarannya, Departemen Parasitologi FK Universitas Indonesia, Departemen Parasitologi FK Universitas Gajah Mada, Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Hasanudin, *Institute of Eijkmann*, dan Unicef dalam *Malaria Transmission Consortium* yaitu pengendalian malaria di Indonesia, sejak 2008.

Pada tahun 2009/2010, kerjasama penelitian di bidang malaria yaitu mempelajari kasus malaria pada ibu hamil di Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Kalimantan Selatan dengan Departemen Kesehatan RI oleh WHO/SEARO.

Hasil kerjasama penelitian tersebut adalah; 1) Adanya masukan kepada program pengendalian malaria di Indonesia, 2) Peningkatan keahlian dan kemampuan sumber daya masyarakat setempat termasuk staf kesehatan dalam penanganan kasus malaria, 3) Sejumlah staf edukasi menyelesaikan pendidikan S2 dan S3, 4) Peningkatan keahlian dan kemampuan staf edukasi dalam penelitian malaria, penulisan karya ilmiah, partisipasi dalam pertemuan ilmiah baik nasional maupun internasional, 5) Adanya publikasi ilmiah nasional dan internasional

Tujuan Khusus penelitian ini:

1. Mengetahui adanya resistensi SP *in vivo* pada *P. falciparum*
2. Mengetahui adanya gambaran spesifik polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr* dan *P. falciparum-dhps* yang terkait dengan resistensi SP

Urgensi atau keutamaan penelitian ini adalah; penelitian ini memberikan masukan yang besar terhadap program pengendalian malaria di Indonesia, karena masih digunakan SP sebagai pengobatan malaria walaupun pada lini kedua, dan SP mudah didapat/dibeli di apotik, serta adanya rekomendasi penggunaan SP sebagai pengobatan pencegahan malaria pada ibu hamil yang telah terlaksana di beberapa negara di Afrika.

BAB II

STUDI PUSTAKA

MALARIA

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit malaria (*Plasmodium*) dalam bentuk aseksual yang masuk ke dalam tubuh manusia yang ditularkan oleh nyamuk malaria (*Anopheles*) betina.

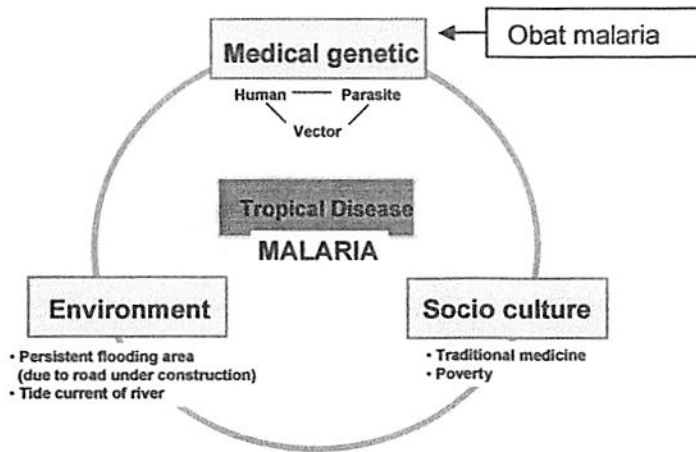
Malaria berasal dari *Phylum Apicomplexa*, *Class Aconoidasida*, *Order Haemosporida*, *Family Plasmodiidae*, dan dari *genus Plasmodiu* (Welch, 1897). Dari empat spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia, *P. falciparum* yang paling berbahaya karena dapat menyebabkan terjadinya komplikasi (*severe malaria*). Faktor virulensi parasit yang mempengaruhi terjadinya komplikasi pada penderita malaria adalah kecepatan melakukan multiplikasi di dalam eritrosit, selektifitas dalam memilih eritrosit, kemampuan eritrosit yang terinfeksi parasit untuk melakukan perlekatan dengan endotel pembuluh darah kecil di organ-organ (*cytoadherence*), mudah melekat dengan eritrosit lain (*rosetting*), potensi dalam menginduksi pelepasan sitokin, *antigenicity*, dan resistensi parasit terhadap obat anti malaria (Shermann IW, 1998). Selain itu terjadinya komplikasi pada penderita malaria juga dipengaruhi oleh wilayah geografis dan intensitas penularan malaria (Snow RW et al, 1997)

Dewasa ini diperkirakan 400 juta orang didunia terinfeksi malaria dan ada 130 juta kasus malaria baru setiap tahun, serta 1,5 – 2,7 kematian per tahun disebabkan oleh terjadinya komplikasi pada malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum*. Pada anak-anak di daerah endemis, malaria pada kehamilan dan pada individu non imun dapat terjadi gejala klinis yang berat (Perlmann and Troye B, 2002). Sindroma utama dari komplikasi pada penderita malaria pada anak-anak adalah *cerebral malaria*, anemia berat, *respiratory distress* atau metabolik asidosis (Marsh K et al, 1995), hiperparasitemia, *jaundice* dan shok (Day NP et al, 1999).

PENGENDALIAN MALARIA

Malaria dapat ditanggulangi dan disembuhkan melalui pengobatan yang tepat dan efektif. Obat-obat antimalaria yang telah direkomendasikan penggunaannya, terbatas jumlahnya, meliputi 4-aminoquinolines (chloroquine, amodiaquine), arylaminoalcohol (mefloquine, halofantrine, lumefantrin), antifolat (sulfadoxine-pyrimethamine (SP)), atovaquone, artemisinin dan derivatnya (artesunate, artemether), begitu juga dengan antibiotik-antibiotik (WHO, 2008b). Quinine dipakai terutama untuk pengobatan malaria yang berat dengan tujuan untuk mencegah kematian. Untuk kasus malaria tanpa komplikasi tujuan dari pengobatan adalah untuk menyembuhkan dan mencegah berkembangnya malaria yang berat. Lagi pula, dari sudut pandang kesehatan masyarakat, pengobatan malaria bertujuan untuk mengurangi terjadinya transmisi penyakit (WHO, 2006).

Konsep penelitian dalam pengendalian malaria



Gambar 1. Konsep penelitian dalam pengendalian malaria. Diambil atas ijin: Yoes P. Dachlan

Obat-obat anti malaria juga dipakai sebagai ukuran pencegahan yaitu sebagai profilaksis untuk orang yang bepergian ke daerah endemis malaria atau untuk intermitten preventive treatment pada wanita hamil (IPTp). IPTp adalah suatu strategi yang telah direkomendasikan oleh WHO pada daerah edemisitas tinggi malaria sejak tahun 1998, meliputi pemberian pengobatan antimalaria dengan dosis penuh (biasanya SP, yang mempunyai half life panjang) pada batas waktu tertentu selama kehamilan tergantung dari adanya parasit malaria (WHO,2007)

IPTp berarti bahwa pengobatan SP diberikan 3 kali selama trimester kedua dan ketiga, terlepas dari parasitemia. Monitoring SP-resistance penting untuk memperkirakan efektifitas dari kebijakan ini, dan marker molekuler terus dikembangkan untuk mengaplikasikan hal ini. SP-resistance berhubungan dengan mutasi spesifik yang terjadi pada gen Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (dhfr) dan dihydropteroat synthase (dhps).

RESISTENSI OBAT ANTIMALARIA

Definisi

Resistensi obat Antimalaria didefinisikan sebagai kemampuan strain parasit untuk bertahan hidup dan / atau melakukan multiplikasi walaupun pemberian dan penyerapan obat tetap diberikan dalam dosis sama atau lebih tinggi daripada yang biasanya dianjurkan tetapi dalam batas toleransi dari subjek. Definisi ini kemudian dimodifikasi untuk menentukan bahwa obat tersebut harus mendapatkan akses ke parasit yang terinfeksi atau sel darah merah dalam durasi waktu yang diperlukan untuk tindakan normal (WHO, 1986)

Resistensi obat antimalaria dapat menyebabkan kegagalan pengobatan, walaupun kegagalan pengobatan bukan semata-mata disebabkan oleh resistensi obat. Faktor-faktor lain yang mungkin menimbulkan kegagalan pengobatan : dosis yang tidak adekuat, pengaturan dosis dan durasi pemberian yang tidak tepat, rendahnya kualitas obat, pemakaian obat yang tidak teratur dan misdiagnosis/kesalahan diagnosa.

Mekanisme Terjadinya Resistensi

Terjadinya resistensi dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yang berbeda-beda (Sherman, IW 1998) :

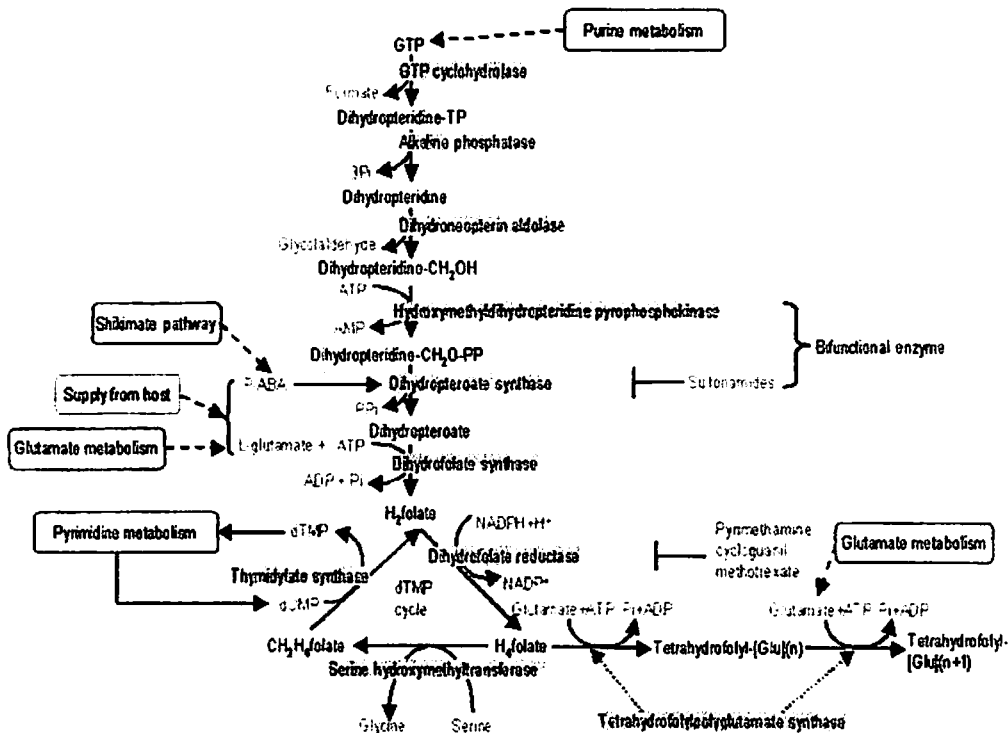
1. Perubahan transport atau permeabilitas obat
2. Konversi obat dengan cara merubah formasi yang dapat mengaktifkan kembali aktivitas obat tsb
3. Meningkatnya ekspresi target obat
4. Perubahan target enzim yang dapat menurunkan daya ikat dari daya hambat obat

Perubahan target enzim dapat dikarenakan adanya mutasi dari gen penyandi enzim tersebut. Mutasi sering terjadi pada salah satu dari *gene amplification* atau *single nucleotide polymorphism* (SNP). Dua gene dapat bertindak *epistatically*, dikombinasikan untuk menghasilkan *phenotype* spesifik (Duraisingh & Refour, 2005). Satu gen mungkin juga memiliki kemampuan untuk menghasilkan *phenotype multidrug* resisten.

Mekanisme Resistensi Malaria Parasites terhadap Antifolat

Jalur Biosintesis Asam Folat pada Plasmodium

Dua gen yang mengcode enzim pada jalur metabolisme asam folat menjadi target obat antifolat yang telah ada, yaitu dihydrofolate reductase (DHFR) (Bzik dkk., 1987) dan dihydropteroate synthase (DHPS) (Brooks dkk., 1994; Triglia dan Cowman, 1994), pada kedua enzim ini telah dilakukan kloning dan pengurutan, dan mutasi yang terjadi pada kedua gen ini memainkan peranan penting pada terjadinya resistensi terhadap obat antifolat (Peterson dkk., 1988). Gangguan dari penghambatan sintesis folat oleh DHFR dan DHPS mengarah pada terjadinya penurunan tetrahydrofolate, cofactor penting pada reaksi perpindahan satu karbon pada jalur metabolisme di purine, pyrimidine, dan asam amino (Ferone, 1977). Semakin rendah tingkat tetrahydrofolate mengakibatkan penurunan perubahan glycine ke serine, penurunan sintesis methionine, dan menurunkan tingkat thymidylate dengan menghentikan sementara replikasi DNA (Schellenberg dan Coatney, 1961; Gutteridge dan Trigg, 1971; Newbold dkk., 1982; Gritzmacher dan Reese, 1984; Triglia dan Cowman, 1999)



Gambar 2. Jalur Biosintesis asam folat pada *Plasmodium spp.*
(http://malaria.atcc.org/metabolic_pathways/maps/folatebiopath.html).

Dihydrofolate Reductase (Dhfr)

Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase disandi oleh *single-copy gene* pada kromosom ke 4 yang juga menyandi thymidylate synthase, dan dua enzyme ini membentuk protein dengan dua fungsi (Chen GX & Zolg JW, 1987; Snewin VA dkk, 1989). Meskipun struktur kristal *P. falciparum* dihydrofolate reductase belum diselesaikan, kesimpulan berharga telah diambil dari struktur yang berasal dari enzim dalam *Toxoplasma gondii* (Reynolds MG, Roos DS, 1998) dan *Leishmania* (Plowe C dkk, 1997), serta secara langsung melalui skema pemodelan molekular (Warhurst DC, 1998). Kesimpulan ini, dikombinasikan dengan *enzyme kinetic assays wild-type* dan *mutant type* dari dihydrofolate reductase dari *Plasmodium*, mendukung gambaran bahwa *nucleotide substitutions* pada genotype mengubah bagian aktif dari enzim dan mengakibatkan perbedaan ikatan afinitas pada obat yang berbeda. Resistensi ini memberikan mutasi pada suatu tahapan, pola susunan asam amino, dengan tingkat yang lebih tinggi resistensi *in vitro* terjadi mutasi multiple. Mutasi primer diperlukan untuk mutasi selanjutnya harus dipertahankan dan tetap melestarikan fungsi enzim. Bukti definitif terjadinya point mutasi pada dihydrofolate reductase memberikan resistensi terhadap pyrimethamin berdasarkan dari penelitian transfeksi pada *P. falciparum*, di mana klon pyrimethamine yang sensitif telah dirubah menjadi dihydrofolate reductase yang mengalami mutasi, dan mutasi hasil transformasi diprediksi resistensinya terhadap pyrimethamin (Wu Y & Sifri CD, 1995; Wu Y & Kirkman LA, dkk 1996).

Dihydropteroate Synthase (Dhps)

Dilakukan kloning dari gene, identifikasi point mutasi berkaitan dengan resistensi obat secara *in vitro*, dan detail dari karakterisasi heterologous diekspresikan pada enzim wild-type dan dan mutant type. Seperti dihydrofolate reductase, dihydropteroate synthase adalah bagian dari polypeptide bifunctional, dicode oleh gen yang juga mengkode dihydrohydroxymethylpterin pyrophosphokinase, *constituent* lain dari siklus metabolisme asam folate (Triglia T & Cowman AF, 1994; Brooks DR dkk, 1994). Analisis sequen dari daerah coding dihydropteroate synthase diestabilis dari sel line yang telah diidentifikasi sebelumnya, keterbatasan jumlah point mutasi, semua yang terkait dengan resistensi *in vitro* pada obat golongan sulfa. Interpretasi studi *in vitro* dari *P. falciparum* terhadap obat sulfa terlalu rumit melalui kebutuhan untuk melakukan assays di bawah standar yang ketat, kondisi asam folat mendekati titik nol untuk memperoleh hasil dapat digandakan. Dengan kondisi tersebut, mutasi pada dihydropteroate synthase yang terkait dengan resistensi terhadap sulfadoxine adalah : serine ke alanine pada codon 436, alanine ke glycine pada codon 437, lysine ke glutamate pada codon 540, alanine ke glycine pada codon 581, dan serine ke phenylalanine di codon 436 digabungkan dengan alanine baik untuk threonine atau serine pada codon 613 (Wang P dkk, 1997; Triglia T & Cowman AF, 1994). Mutasi selanjutnya pada dihydropteroate synthase membuktikan telah memberikan resistensi terhadap sulfonamides dan sulfones melalui studi *P. falciparum* secara *transfection* (Triglia T, 1998). The GLU-436, SER-437, Ser-613 *triple mutant* adalah genotipe yang sangat tahan yang dianalisis, mendekati hampir 1000 kali lipat dalam meningkatkan konsentrasi pada median inhibitory concentration (IC50) untuk sulfadoxine relatif terhadap *wild-type*. Genotipe ini, bagaimanapun, secara alamiah jarang terjadi, dan SER-437, ALA-540, genotip Ala-581 yang prevalensinya menyebar luas adalah kegagalan sulfadoxine-pyrimethamine (Plowe CV, 1997; Kublin JG, 1998) belum dilakukan penilaian dalam studi *in vitro*, studi *transfection*, atau studi enzim kinetic.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Khusus penelitian ini:

1. Mengetahui adanya resistensi SP *in vivo* pada *P. falciparum*
2. Mengetahui adanya gambaran spesifik polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr* dan *P. falciparum-dhps* yang terkait dengan resistensi SP

Manfaat penelitian ini

- 1) Adanya masukan kepada program pengendalian malaria di Indonesia
- 2) Peningkatan keahlian dan kemampuan sumber daya masyarakat setempat termasuk staf kesehatan dalam penanganan kasus malaria,
- 3) Peningkatan keahlian dan kemampuan staf edukasi dalam penelitian malaria, penulisan karya ilmiah, partisipasi dalam pertemuan ilmiah baik nasional maupun internasional,
- 4) Sejumlah staf edukasi menyelesaikan pendidikan S2,
- 5) Adanya publikasi ilmiah nasional dan internasional.

Urgensi atau keutamaan penelitian ini adalah; penelitian ini memberikan masukan yang besar terhadap program pengendalian malaria di Indonesia, karena masih digunakan SP sebagai pengobatan malaria maupun sebagai obat pencegahan malaria, dan SP mudah didapat/dibeli di apotik, serta adanya rekomendasi penggunaan SP sebagai pengobatan pencegahan malaria pada ibu hamil yang telah terlaksana di beberapa negara di Afrika.

BAB IV

METODE PENELITIAN

1. Daerah studi :

Di wilayah Kecamatan Sei Pinang, Kabupaten Banjar Baru, Propinsi Kalimantan Selatan, dengan angka kesakitan malaria tinggi (gambar 4, tabel 2 dan 3)

2. Subjek studi :

Penderita falciparum malaria dengan tanpa komplikasi

3. Perkiraan besar sampel :

Besar sampel dihitung dengan menggunakan Epi Info 2002, StatCalc module (population survey) dengan pengambilan sampel secara random (bukan cluster) dan $\alpha = 0.05$, dengan formula

$$\text{Besarnya sampel} = n / (1 - (n / \text{populasi}))$$

$$N = Z^2 \cdot P(1-P) / (D^2 \cdot D)$$

100 orang, sampel diambil secara random. Penduduk yang telah memberikan *informed consent* (halaman vi dan vii) akan terpilih sebagai sampel untuk pemeriksaan malaria, tanya jawab riwayat penyakit, pengobatan dan perpindahan penduduk dan pengobatan SP.

4. Metode studi :

Pertemuan dengan Dinas Kesehatan Dati II Kabupaten Banjar Baru dan Dinas Kesehatan Dati I Propinsi Kalimantan Selatan.

Pelatihan petugas kesehatan setempat dalam pengambilan peserta dan sampel, pengisian form, pemberian obat, monitoring dan evaluasi pengobatan (halaman viii). Pelatihan petugas laboratorium dalam penanganan sampel mikroskopis serta pengisian form (halaman ix)

Pemeriksaan malaria (parasitologi), meliputi :

1. Pengisian form, yang berisi :

Gejala-gejala penyakit malaria dan pemeriksaan fisik (suhu tubuh dan pembesaran limpa)

2. Pengambilan darah melalui ujung jari untuk RDT, sediaan darah dan kertas saring (Whatman 3, Whatman International Ltd., UK)

3. Pengecatan sediaan darah

4. Identifikasi parasit malaria: secara mikroskopis (tetes tebal, tetes tipis), RDT (*Rapid Diagnostic Test*), dan molekuler.

5. Pengobatan SP

Pengobatan SP

Uji efikasi SP *in vivo* berdasar WHO, dengan diikuti selama 28 hari, hari ke 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, dan 28 dan dilakukan pemeriksaan suhu dan keluhan penderita dicatat dalam lembaran penderita dan diberi kode. Sediaan hapusan darah tebal dan tipis serta kertas saring dikoleksi pada hari ke 0, 3, 7, 14, 21, dan 28. Dosis obat berdasarkan berat badan (25 mg/kg BB untuk sulfadoxine, 1 mg/KgBB untuk pyrimethamine) (halaman viii).

Hasil uji efikasi berdasar WHO; ETF (*early treatment failure*), LTF (*late treatment failure*), LPF (*late parasitological failure*) dan ACPR (*adequate clinical and parasitological response*)

5. Metode laboratorium

- Pengambilan darah:

Bersihkan ujung jari pasien dengan kapas alkohol, biarkan kering sendiri

Tusuk dengan lanset steril sedalam ± 3 mm, darah keluar dengan sendirinya

Tetes darah pertama dihapus dengan kapas kering. Tunggu sampai darah keluar lagi.

Sentuhkan tetesan darah pada kaca objek ± 20 μ l., sentuhkan tetesan darah pada RDT, dan pada kertas saring

- Pembuatan hapusan darah dan pewarnaan Giemsa

Tetes darah diletakkan di gelas objek dan dipegang oleh tangan kiri. Gelas objek pada tangan kanan digeserkan ke kiri pada gelas objek pertama yang menyentuh tetesan darah dengan membentuk sudut 30-40°. Hapusan tipis ini sebaiknya membentuk lidah kucing dengan bagian kanan tebal dan bagian kiri tipis. Biarkan kering dan kemudian dilakukan fiksasi menggunakan larutan metanol, dan biarkan kering kembali.

Tetes darah diletakkan di gelas objek dan dipegang oleh tangan kiri. Gelas objek pada tangan kanan disentuhkan pada bagian tengah tetesan darah dengan menggunakan ujung gelas objek, kemudian digerakkan melingkar keluar. Hapusan tebal ini dibiarkan kering, kemudian dilakukan lisis eritrosit dengan menggunakan aquades, dan kemudian biarkan kering kembali.

Larutan Giemsa dalam bufer fosfat (pH 7.8) dengan konsentrasi 5% diteteskan pada hapusan tipis yang telah terfiksasi dengan metanol dan pada hapusan tebal yang telah terlisis hingga mengenai hapusan darah tersebut. Biarkan 30 menit, kemudian dibilas dengan air, dan kemudian biarkan kering.

Pemeriksaan hapusan darah yang telah terwarnai dengan Giemsa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 1000 X, dan dengan menggunakan *oil emersi*.

Quality control dari pemeriksaan ini adalah dengan cara melakukan pemeriksaan ulang pada Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Unair, sebanyak 25% dari

jumlah *slide* yang negatif.

- Pemeriksaan *rapid diagnosis test* (RDT) adalah suatu pemeriksaan berdasar *immuno chromatography* dan merupakan pemeriksaan yang cepat untuk diagnosis (Moody A, 2002). Pemeriksaan RDT dilakukan dengan menggunakan ICT® Now test, tetesan darah yang diletakkan pada tempatnya, dibiarkan berdifusi dan kemudian ditetesi dengan bufer, ditunggu hingga bufer bereaksi dengan darah, apabila terinfeksi dengan *P. falciparum* memberikan gambaran 2 garis (garis I dan II), bila infeksi campuran *P. falciparum* dengan yang lainnya memberikan gambaran 3 garis (garis I, II, dan III) (lihat pada gambar 7), bila terinfeksi salah satu *Plasmodium* yang bukan *P. falciparum* akan memberikan gambaran 2 garis (garis I dan III), dan apabila tidak terinfeksi oleh *Plasmodium*, maka ada gambaran 1 garis yaitu garis I.
- Pemeriksaan molekuler adalah pemeriksaan yang mempunyai spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi terhadap diagnosis suatu spesies (Moody A, 2002). DNA parasit diekstraksi dari filter paper yang mengandung tetesan darah dengan *Qiagen DNA blood kit*, kemudian diamplifikasikan dengan sepasang primer yang mensandi gen 18s rRNA dari masing-masing spesies *Plasmodium* dalam *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil dibaca dengan menggunakan sinar ultra violet setelah hasil PCR dilakukan elektroferase dan pengecatan dengan ethidium bromide.

Analisa Polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr* dan *P. falciparum-dhps* dengan teknik nested PCR-RFLP dan sekuensing DNA. Hasil positif spesies identifikasi adalah *P. falciparum*, maka DNA sampel akan dilanjutkan di analisa polimorfisme gen *P. falciparum-dhfr* (di kodon 108) dan *P. falciparum-dhps* (di kodon 437, 540 dan 581) dengan metode dari Tinto H, dkk (2007) dan dari Mbugi EV, dkk. (2006). Untuk mengetahui rekrudensi dan infeksi baru secara genotyping digunakan metode nested PCR dari marker gen MSP1 dan MSP2 oleh Ranford-Catwright LC dkk (1997). Dikatakan rekrudensi apabila tampak gambaran yang sama salah satu dari gen tersebut pada hari ke 0 dan hari kemudian saat timbulnya parasitemia kembali.

Sekuensing DNA dilakukan di Departmen of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Jepang.

Definisi

Malaria didefinisikan adanya *Plasmodium* (malaria parasit) di sediaan hapusan darah

Falciparum malaria dengan tanpa komplikasi didefinisikan adanya *P. falciparum* dalam hapusan darah dan tidak disertai komplikasi malaria

Komplikasi malaria adalah malaria dengan gangguan kesadaran, anemia berat, ikterus, black water fever, metobolik asidosis, gangguan pemapasan.

Malaria klinis didefinisikan adanya gejala klinis malaria berupa panas badan, anemia, dan

pembesaran limpa.

Panas badan didefinisikan suhu tubuh $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ (pemeriksaan suhu melalui telinga).

Kriteria inklusi

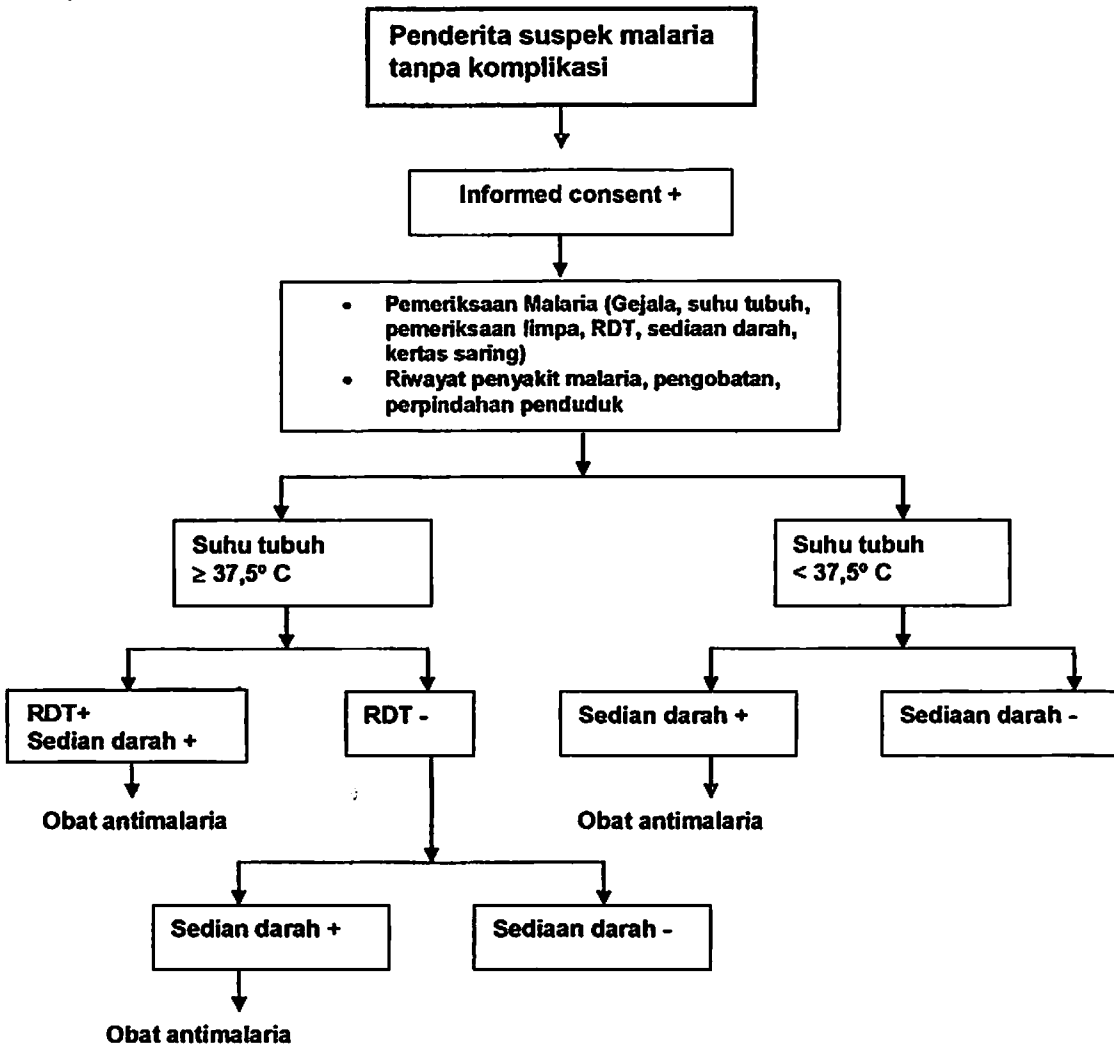
Penduduk yang bersedia berpartisipasi dengan memberikan *informed consent*

Kriteria eksklusi

Penduduk yang tidak bersedia berpartisipasi dengan tidak memberikan *informed consent* dan penduduk yang mempunyai riwayat alergi terhadap obat yang mengandung sulfa



Alur penelitian



Gambar 3. Alur penelitian



Gambar 1. Lokasi Penelitian

Jadwal Kegiatan

Tabel 1 Jadwal Kegiatan

No	Subyek	2009			2010		
		Oktober	November	Desember	Januari	Pebruari	Maret
1	Pelatihan tenaga kesehatan	■					
2	Koleksi data	■	■	■	■	■	■
3	Analisa data di LPT-Unair				■	■	■
4	Analisa data di Nagasaki Univ., Jepang						■
5	Survei parasitologi			■			
6	Pertemuan regular dan supervisi						■
7	Pertemua preoperasional di lokasi	■					

No	Subject	2010		2010			
		April	Mei	Juni	Juli	Agustus	September
1	Pelatihan tenaga kesehatan						
2	Koleksi data	■	■	■	■	■	
3	Analisa data di LPT-Unair	■	■	■	■	■	■
4	Analisa data di Nagasaki Univ., Jepang					■	■
5	Survei parasitologi		■			■	
6	Pertemuan regular dan supervisi		■				■

■ Telah terlaksana

BAB V

HASIL DAN DISKUSI

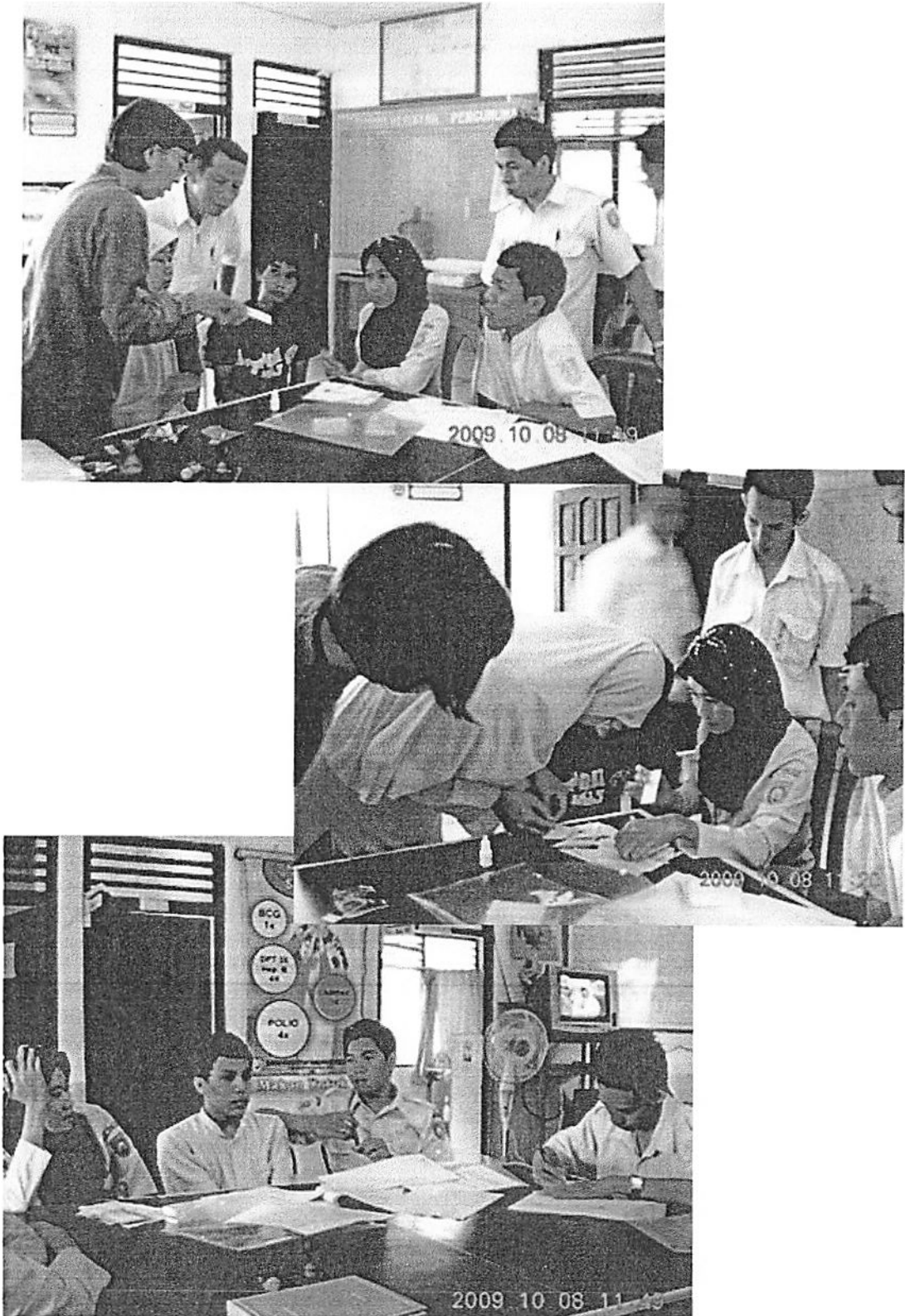
PELATIHAN PETUGAS KESEHATAN DAN PETUGAS LABORATORIUM

- Dilaksanakan pada tanggal 8-9 Oktober 2009.
- Tempat: Puskesmas Sei Pinang
- Dihadiri 4 petugas kesehatan (perawat), 1 petugas laboratorium dan Kepala Puskesmas Sei Pinang
- Isi pelatihan :
 - Pengenalan Penelitian yang akan dilaksanakan disertai tujuan penelitian
 - Penatalaksanaan pengambilan peserta dan sampel
 - Pengisian *inform consent* dan *sample form* (halaman vi-ix)
 - Penatalaksanaan pemberian obat antimalaria dengan SP dan efek-efek samping yang mungkin terjadi
 - Penggunaan RDT dan pembuatan sediaan darah tebal
 - Penggunaan RDT, pemeriksaan sediaan darah tebal dan pengisian form (halaman ix) pada petugas laboratorium
- Hasil (lihat gambar 5-7)
 - Diskusi berlangsung dengan baik
 - Pada penggunaan RDT dilakukan secara langsung pada penderita yang dicurigai malaria (8 Oktober 2009) dan ditemukan bahwa penderita tersebut terdapat *mixed infection* (*P. falciparum* dan *P. vivax/P.ovale/P.malariae*). Penderita menyetujui untuk turut serta dalam penelitian ini. Secara langsung dilakukan *inform consent* dan pengisian *sample form*. Obat antimalaria yang digunakan adalah SP yang ada di Puskesmas dan yang merupakan produksi PT Indofarma (obat generik). Pada 9 Oktober 2009, penderita hadir kembali ke Puskesmas dengan tanpa keluhan, pengambilan sampel darah dilakukan dalam pelaksanaan efikasi obat antimalaria 'SP' secara *in vivo*
 - Pertemuan dengan Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Banjar Baru pada tanggal 9 Oktober 2009. Kepala Dinas Kesehatan mendukung penelitian ini dan memberikan masukan-masukan yang bermanfaat untuk penelitian ini.
 - Selama bulan Oktober 2009, terdapat 2 penderita malaria *falciparum* dan *vivax* (*mixed infection*) yang bersedia diberikan pengobatan SP dan diikuti perkembangan penyakitnya selama 28 hari. Hasil pemeriksaan RDT pada awal diagnosa terlihat pada gambar 3. Setelah 7 hari pengobatan, masih terdapat parasit malaria pada sediaan tetes tebal darah kedua penderita dan satu penderita terdapat parasit malaria pada sediaan tetes tebal darah pada hari ke- 28 setelah pengobatan. Dari hasil sementara yang didapat menunjukkan kemungkinan adanya *P. falciparum* yang resistensi terhadap

SP di daerah ini.

- Rencana kelanjutan kegiatan:
 - Pemesanan primer dan enzim restriksi untuk pemeriksaan molekuler untuk identifikasi spesies dan polimorfisme gen Pfdhfr dan Pfdhps
 - Pengambilan sampel dan monitoring kegiatan di lokasi penelitian pada bulan awal Desember tahun 2009.
 - Pemeriksaan molekuler (identifikasi spesies, polimorfisme gen Pfdhfr dan Pfdhps) akan dimulai sejak pertengahan bulan Desember 2009 (apabila primer dan enzim telah tersedia).





Gambar 5. Pelatihan pada petugas kesehatan dan petugas laboratorium tanggal 8 Oktober 2009



Gambar 6. Pelatihan pada petugas laboratorium tanggal 9 Oktober 2009.



Gambar 7. Hasil pemeriksaan diagnose malaria dengan RDT. Kedua penderita terinfeksi oleh *P. falciparum* dan *P. vivax* (mixed infection).

DAFTAR PUSTAKA

- Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, and Hyde JE .1994. Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* 224: 397-405
- Bruce-Chwatt LJ dkk. 1986. Chemotherapy of malaria Geneva, World Health Organization
- Bzik DJ, Li WB, Horii T, and Inselburg J. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8360-8364
- Chen GX, Zolg JW. 1987. Purification of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase complex from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*;32:723-730.
- Cowman AF and AM Lew.1989. Antifolate drug selection results in duplication and rearrangement of chromosome 7 in *P. chabaudi*. *Mol. Cell Biol.* 9:5182-5188
- Ferone R .1977. Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ* 55: 291-298
- Gutteridge WE and Trigg PI .1971. Action of pyrimethamine and related drugs against *Plasmodium knowlesi* in vitro. *Parasitology* 62: 431-444
- Inselburg J, Bzik DJ, Li WB.1988. *Plasmodium falciparum*: three amino acid changes in the dihydrofolate reductase of a pyrimethamine-resistant mutant. *Exp.Parasitol.* 67:361-363
- Kublin JG, Witzig RS, Shankar AH, Zurita JQ, Gilman RH, Guarda JA, 1998. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet*;351:1629-1630.
- Lobel HO, Campbell CC. 1986. Malaria Prophylaxis and distribution of drug resistance. *Clinics in Tropical Medicine and Communicable Diseases*;1:225-242.
- Mbugi EV, Mutayoba B., Malisa AL, Balthazary ST, Nyambo TB, Mshinda H. 2006. Drug resistance to *P.falciparum* malaria in Mimba, Tanzania. *Malaria J.* 5:94
- Mehlotra & Zimmerman, 2006. Resistance to antimalarial drugs: Parasite and Host Genetic Factors. In : *Malaria : Genetic and Evolutionary Aspects*
- Newbold CI, Boyle DB, Smith CC, and Brown KN .1982. Stage specific protein and nucleic acid synthesis during the asexual cycle of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol* 5: 33-44
- Peterson DS, Walliker D, and Wellems TE .1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9114-9118
- Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. 1997. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*;176:1590-1596.
- Ranford-Catwright LC, Taylor J., Umasunthar T, Taylor LH, Babiker HA, Lell B, Smith-Ott JR, Leihman LG, Walliker G, Kremsner PG. 1997. Molecular analysis of recrudescence in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*91:719-724.
- Reynolds MG, Roos DS. 1998. A biochemical and genetic model for parasite resistance to antifolates. *Toxoplasma gondii* provides insights into pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*;273:3461-3469.
- Sherman IW, 1998. The Molecular basis of resistance to the Sulfones, Sulfonamides, and Dihydrofolate reductase Inhibitors. *Malaria, Parasite biology, pathogenesis, and protection.* ASM Press. Washington DC.
- Tanaka M, Gu HM, Bzik DJ, Li WB, Inselburg JW. 1990. Mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase genes in pyrimethamine-resistant *P. falciparum* with polymorphic chromosome duplications. *Mol.Biochem Parasitol.* 42:83-92

- Thaitong S, Chan SW, Songsombom S, Walairat P, Seesod N, Sueblinwong T, Goman M, Ridley R., Beale G. 1992. Pyrimethamine resistant mutations in *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:149-158
- Tinto H, Ouedraogo JB, Zongo I, Van Overmeir C, Van Marck E., Guiguemde TR, D'Alessandro U. 2007. Sulfadoxine-Pyrimethamine Efficacy and selection of *P. falciparum* dhfr mutations in Burkina Faso before its introduction as intermittent preventive treatment for pregnant women. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 76(4):608-613.
- Triglia T and Cowman AF .1994. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7149-7153
- Triglia T, Wang P, Sims PG, Hyde JE, Cowman AF. 1998. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J*;17:3807-3815.
- Triglia T and Cowman AF. 1999. The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* 2: 15-19
- Schellenberg KA and Coatney GR, 1961. The influence of antimalarial drugs on nucleic acid synthesis in *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium berghei*. *Biochem Pharmacol* 6: 143-152
- Snewin VA, England SM, Sims PF, Hyde JE. 1989. Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene*;76:41-52.
- WHO, 2006. Guidelines for the treatment of malaria. <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>
- WHO, 2007. Technical Expert Group meeting on intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp). <http://www.who.int/malaria/docs/IPTp/TechnicalExpertMtgIPTpReport.pdf>
- WHO, 2008b. Treatment policies. <http://www.who.int/malaria/treatmentpolicies.html/>
- Warhurst DC. 1998. Antimalarial drug discovery: development of inhibitors of dihydro folate reductase active in drug resistance. *Drug Discovery Today*;3:538-546.
- Wu Y, Sifri CD, Lei HH, Su XZ, Wellems TE. 1995 Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;92:973-977.
- Wu Y, Kirkman LA, Wellems TE. 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci USA*;93:1130-1134.
- Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. 1997. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol*; 23:979-986.
- Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmer S. 1989. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem Parasitol.* 36:253-262

Tabel2. Kasus malaria dan *annual malaria incidence* (AMI) di tiap Puskesmas di Kecamatan dari Kabupaten Banjar, Propinsi Kalimantan Selatan, tahun 2004 - 2006

No	Puskesmas (Kecamatan)	Malaria					
		2004		2005		2006	
		Kasus	AMI(%)	Kasus	AMI(%)	Kasus	AMI(%)
1	Aluh-aluh (Aluh-aluh)	0	0	0	0	0	0
2	Aranio (Aranio)	7	0.91	0	0	15	1.89
3	Astambul (Astambul)	0	0	0	0	0	0
4	Bawahan Selan (Mataraman)	10	0.45	37	1.69	27	1.22
5	Dalam pagar (Martapura Timur)	0	0	0	0	0	0
6	Gambut (Gambut)	5	0.15	3	0.09	8	0.25
7	Jambu Burung (Beruntung Baru)	1	0.07	0	0	0	0
8	Karang Intan (Karang Intan)	0	0	0	0	2	0.16
	Sei Alang (Karang Intan)	29	1.78	4	0.23	0	0
9	Lok Baintan (Sei Tabuk)	0	0	0	0	0	0
	Sei Tabuk (Sei Tabuk)	14	0.57	0	0	13	0.51
	Sei Lulut (Sei Tabuk)	*	*	0	0	0	0
19	Martapura (Martapura)	3	0.05	0	0	0	0
	Pasayangan (Martapura)	0	0	1	0.03	4	0.23
11	Pengaron (Pengaron)	165	6.73	61	4.05	0	0
12	Sei Pinang (Sei Pinang)	358	20.4	371	21.3	361	19.8
13	Sungkai (Simpang Empat)	40	2.29	3	0.48	19	1.04
	Simpang Empat (Simpang Empat)	0	0	31	1.74	1	0.06
14	Sambung Makmur (Sambung Makmur)	*	*	18	1.87	12	1.24
15	Sei Rangas (Martapura Barat)	1	0.06	0	0	4	0.23
16	Kertak Hanyar (Kertak Hanyar)	8	0.27	0	0	0	0
	TP Laut Kertak Hanyar)	0	0	0	0	0	0
	Total	641	1.41	529	1.14	466	0.99

*Puskesmas belum terbentuk di tahun 2004
Kasus malaria diidentifikasi sebagai malaria klinis

Tabel 3. Slide positive rate (SPR) yang terkoleksi secara passive detection di Puskesmas, Kabupaten Banjar, tahun 2004 - 2006

No	Puskesmas (Kecamatan)	SPR (%)		
		2004	2005	2006
1	Aluh-aluh (Aluh-aluh)	0	0	0
2	Aranio (Aranio)	0	0	100.0 (15/15)
3	Astambul (Astambul)	0	0	0
4	Bawahhan Selan (Mataraman)	40.0 (4/10)	73.5 (25/34)	11.7 (2/17)
5	Dalam pagar (Martapura Timur)	0	0	0
6	Gambut (Gambut)	20.0 (1/5)	100.0 (3/3)	62.5 (5/8)
7	Jambu Burung (Beruntung Baru)	0	0	0
8	Karang Intan (Karang Intan)	0	0	50.0 (1/2)
	Sei Alang (Karang Intan)	9.52 (2/21)	0	0
9	Lok Baintan (Sei Tabuk)	0	0	0
	Sei Tabuk (Sei Tabuk)	0	0	0
	Sei Lulut (Sei Tabuk)	*	0	0
19	Martapura (Martapura)	33.3 (1/3)	0	0
	Pasayangan (Martapura)	0	0	0
11	Pengaron (Pengaron)	42.8 (33/77)	29.2 (12/41)	0
12	Sei Pinang (Sei Pinang)	6.3 (15/258)	19.2 (39/203)	86.3 (133/154)
13	Sungkai (Simpang Empat)	27.2 (9/33)	19.2 (5/26)	10.5 (2/19)
	Simpang Empat (Simpang Empat)	0	33.3 (1/3)	0
14	Sambung Makmur (Sambung Makmur)	*	22.2 (4/18)	16.5 (1/6)
15	Sei Rangas (Martapura Barat)	0	0	25.0 (1/4)
16	Kertak Hanyar (Kertak Hanyar)	0	0	0
	TP Laut (Kertak Hanyar)	0	0	0
	Total	15.6 (65/415)	26.9 (89/330)	71.1 (160/225)

*Puskesmas belum terbentuk di tahun 2004

Lembaran persetujuan (*Informed consent*)

Pendahuluan

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, sedang melakukan penelitian di area ini untuk memperoleh angka kesakitan malaria di wilayah kecamatan ini. Jika anda menderita malaria, mungkin akan menyebabkan anda kekurangan darah (anemia), sulit berpikir, ataupun dapat menyebabkan komplikasi misalnya, gangguan kesadaran, keguguran/prematur/berat bayi lahir rendah pada ibu hamil ataupun dapat menyebabkan kematian pada janin, anak-anak dan orang dewasa apabila tidak diketahui secara dini dan diobati secara cepat dan tepat. Kadang anda tidak merasa sakit, namun ada parasit malaria dalam darah anda, hal ini dikarenakan anda telah mempunyai antibodi akibat berulang terkena malaria. Kami dapat mengetahui bila anda menderita malaria dari sedikit darah anda dengan melakukan simpel tes. Kami akan melakukan penelitian ini pada 120 orang di Sei Pinang, di Kabupaten Banjar.

Tujuan penelitian

Kami berencana untuk memeriksa darah anda untuk diagnosis malaria dan untuk mengetahui berapa orang yang menderita malaria. Dan kami akan memberikan pengobatan dengan sulfadoxine- pyrimethamine apabila menderita falciparum malaria yang tidak disertai komplikasi dan akan diikuti selama 28 hari. Ini akan membantu kami dalam perencanaan program pengendalian malaria di wilayah anda.

Teknik penelitian

Bila anda setuju mengikuti penelitian ini, kami akan memberikan beberapa pertanyaan yang berkaitan dengan malaria termasuk pengobatan malaria, riwayat menderita malaria, pencegahan, pengobatan dan bepercian yang anda lakukan. Kami juga akan melaksanakan pemeriksaan badan terhadap diri anda, misalnya suhu badan, pembesaran limpa dan pengambilan darah dari ujung jari secara aseptik untuk pemeriksaan malaria. Kami tidak melakukan tes lain untuk penyakit lain dari darah anda. Waktu yang dibutuhkan untuk wawancara, pemeriksaan badan dan pengambilan darah ini sekitar 20 menit.

Semua jawaban dan hasil tes akan tersimpan secara rahasia dan aman. Jika anda setuju berpartisipasi tetapi tidak mau diambil darahnya, anda dapat menolaknya. Anda juga dapat menolak menjawab pertanyaan-pertanyaan yang tidak anda inginkan. Anda bebas untuk berpartisipasi atau tidak.

Keuntungan

Kami akan memberikan tes malaria dan dari sedikit darah anda. Jika kami menemukan parasit malaria di darah anda, kami akan memberikan pengobatan secara gratis. Bila, kami berpikir anda membutuhkan pengobatan lebih lanjut, maka kami akan merujuk anda ke staf klinik, dan mereka akan mampu untuk memberikan pengobatan yang dibutuhkan.

Resiko ketidaknyaman

Pada pengambilan darah akan terjadi goresan kecil dan umumnya akan menghilang dengan segera tanpa pengobatan. Darah yang diambil adalah sedikit dan tidak mengakibatkan sakit pada anda maupun pada janin anda (pada ibu hamil). Bila darah anda menunjukkan malaria, kami akan memberikan pengobatan dan tidak mempengaruhi janin anda (pada ibu hamil).. Bagaimanapun, bila anda merasa tidak nyaman selama pengobatan, sebaiknya anda kontak rumah sakit. Mereka akan memberikan nasehat apa yang perlu anda lakukan.

Jika anda mempunyai pertanyaan perihal penelitian ini, utarakan secara bebas, anda dapat menanyakan saat sekarang atau kemudian.

Jika anda mempunyai pertanyaan atau keluhan kemudian perihal aspek penelitian ini, anda dapat kontak kedi.....dengan nomor tilpun
Atau anda dapat kontak ke Unit Bioetik, FK Unair, jika anda merasakan ketidaknyamanan dalam penelitian ini, atau anda mempunyai pertanyaan tentang hak anda sebagai partisipan

Terimakasih. Apakah anda bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini?

Partisipan:

Informasi penelitian diatas telah diterangkan kepada saya dan:

Saya setuju mengikuti penelitian ini

Tanda tangan/ stamp: _____ Tanggal: / /

Untuk partisipan yang tidak dapat melakukan tandatangan:

Saksi:

Saya menjelaskan bahwa partisipan dibacakan informasi persetujuan dan semua pertanyaan terjawab. Partisipan setuju mengikuti penelitian ini.

Saksi

Tanda tangan saksi: _____ Tanggal: / /

dr. Sukmawati Basuki, MSc.

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

LOKASI STUDI		RUMAH SAKIT/PUSKESMAS :		KOTA :		KABUPATEN/PROVINSI :		
PENDERITA		NO :		UMUR :		BB (kg)		
PENDERITA		NAMA :		UMUR :		Tinggi Badan (cm)		
PENDERITA		Nama Orang Tua (Penanggung Jawab) :		Alamat :		Total Dosis (mg base)		
OBAT MALARIA		Sulfadoxine-Pyrimethamine		Produsen : Indofarma		No. Produksi : MFD :		
OBAT MALARIA		Kadaluarsa :		Kadaluarsa :		Total Dosis (mg base)		
HARI	0	1	2	3	7 atau 8	14 (13-16)	21 (20-22)	28 (27-29)
DATA KELUHAN								
TANDA BAHAYA ¹								
PANAS BADAN < 24 JAM								
TEMPERATUR AXILLA/ TELUNGA (C)								
TES ICT/RDT								
HITUNG PARASIT (per ul) ²								
PENGOBATAN (mg/kgBB) . ³								
PENGOBATAN								
TAMBAHAN . ⁴								
EFEK SAMPING								
OBAT MALARIA . ⁵								
OBSERVASITANGGAL								

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

