

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Malaria

Malaria adalah suatu infeksi yang disebabkan oleh protozoa obligat intraeritrositik dari genus *Plasmodium*. Infeksi terutama ditularkan melalui gigitan nyamuk betina yang infeksi dari genus *Anopheles*, tetapi dapat juga terjadi melalui transfusi darah yang terinfeksi *Plasmodium* dan melalui kongenital (Trampuz dkk, 2003)

##### 2.1.1 Parasit penyebab Malaria

Ada 4 spesies *plasmodium* yang menginfeksi manusia :

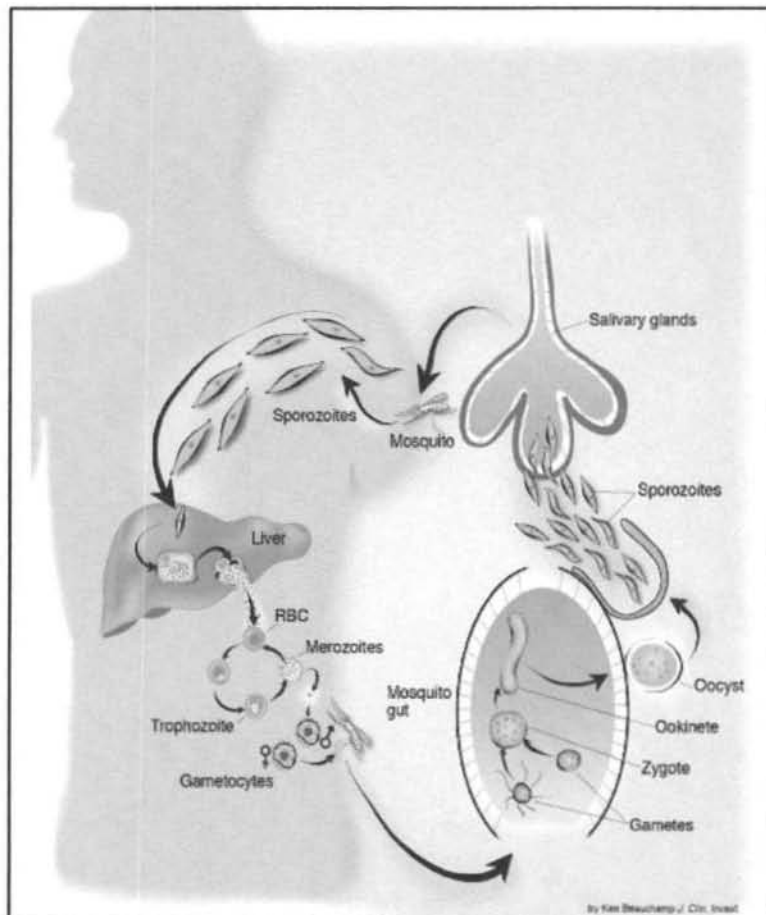
1. *Plasmodium falciparum*, penyebab penyakit malaria tropika, yang sering menyebabkan malaria berat atau malaria serebral yang fatal, gejala serangannya timbul berselang setiap dua hari atau 48 jam sekali.
2. *Plasmodium vivax*, penyebab penyakit malaria tertiana, yang gejala serangannya timbul berselang setiap tiga hari.
3. *Plasmodium malariae*, penyebab penyakit malaria quartana, yang gejala serangannya timbul berselang setiap empat hari.
4. *Plasmodium ovale*, penyebab penyakit malaria ovale

Seorang penderita dapat ditulari oleh lebih dari satu jenis *Plasmodium*, biasanya infeksi semacam ini disebut infeksi campuran (*mixed infection*), tetapi umumnya paling banyak hanya dua jenis parasit, yaitu campuran antara

*Plasmodium falciparum* dengan *Plasmodium vivax* atau *Plasmodium malariae*  
( Biggs dan Brown, 2001; Trampuz dkk, 2003)

### 2.1.2 Siklus Hidup *Plasmodium*

Daur hidup parasit malaria dapat dibagi menjadi dua, yaitu daur hidup aseksual yang berlangsung di dalam tubuh manusia dan daur hidup seksual yang berlangsung di dalam tubuh nyamuk (vektor)(Fujioka dan Aikawa ,2002)



Gambar 2.1 Siklus hidup *Plasmodium* dalam tubuh manusia dan nyamuk *Anopheles* (White, 2004)

Siklus di dalam tubuh manusia dimulai dengan masuknya sporozoit ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk, rata-rata dapat membawa 12-20 sporozoit dalam sekali gigitan. Sporozoit kemudian mengikuti aliran darah atau limfe, dalam waktu lebih kurang 30-60 menit sudah sampai di dalam hati. Di dalam organ ini sporozoit akan memasuki sel parenkhim, berubah menjadi trofozoit, berkembang menjadi sizon yang berinti banyak. Sizon membelah diri dan menghasilkan 10.000 hingga 30.000 merozoit. Tahap perkembangan di dalam sel hati ini disebut sebagai siklus exo atau pre-eritrositik dan berlangsung rata-rata 7 sampai 8 hari pada *P.vivax*, 5-6 hari untuk *P.falciparum*, 13-16 hari untuk *P.malariae* dan 9 hari untuk *P.ovale*. pada akhir tahap ini, merozoit tercurah ke dalam sirkulasi darah untuk memulai siklus eritrositik.

Pada *P. vivax* dan *P.ovale* terkadang bentuk-bentuk di dalam hati ini menjadi "hipnozoit" yaitu bentuk "tidur" yang dapat tinggal di dalam hati dalam waktu yang lama yang sewaktu-waktu dapat "bangun" dan memulai siklus eritrositik yang baru, sehingga jumlah parasit dalam darah meningkat lagi.

Siklus berikutnya, yaitu siklus aseksual eritrositik dimulai dengan tercurahnya merozoit yang berasal dari hati ke dalam darah. Merozoit-merozoit akan mencari sel darah merah untuk dimasuki. Setelah invasi ini, parasit hidup di dalam sitoplasma sebagai trofozoit muda yang berbentuk cincin, kemudian tumbuh menjadi trofozoit dewasa dan intinya kemudian membelah menjadi semakin banyak hingga menjadi sizon dewasa. Jumlah inti pada sizon dewasa berbeda-beda sesuai dengan spesies. Sizon dewasa akan pecah bersama sel darah merah menghasilkan merozoit-merozoit darah. merozoit di dalam sirkulasi darah akan mencari sel darah merah yang baru.

Satu siklus di dalam sel darah merah ini berlangsung 48 jam pada *P. vivax*, 36-48 jam pada *P. falciparum* sekitar 72 jam pada *P. malariae* dan 48-50 jam pada *P. ovale*

Setelah menjalani beberapa siklus aseksual dalam eritrosit, sesudah sizon pecah, sebagian merozoit yang masuk ke dalam sel eritrosit yang baru, tidak berkembang menjadi sizon, tetapi berkembang menjadi gametosit jantan dan betina. Bentuk-bentuk seksual ini tetap dalam sirkulasi darah dalam beberapa hari sampai dua minggu. Bila ada nyamuk *Anopheles* betina menggigit, gametosit ikut terisap, dan di dalam tubuh nyamuk, mereka akan berkembang, mengalami fertilisasi dan reproduksi. Pada akhirnya akan dihasilkan beribu-ribu sporozoit, yang bermigrasi ke arah kelenjar ludah, dan kemudian menunggu di sana sampai nyamuk menggigit manusia lagi. Lamanya sporogoni di dalam tubuh nyamuk 8-20 hari, tergantung kepada spesies *Plasmodium* dan suhu udara. Sporozoit di dalam kelenjar ludah nyamuk dapat tetap hidup sampai 30-40 hari, namun sangat tergantung pada sisa umur nyamuk.

### **2.1.3 *Plasmodium falciparum***

#### **2.1.3.1 Distribusi Geografik**

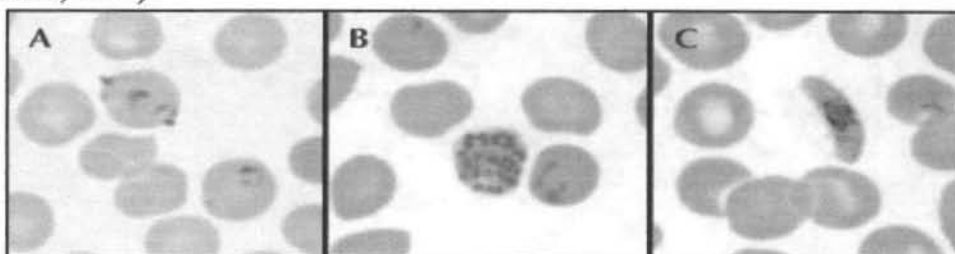
*P. falciparum* ditemukan di daerah tropik dan sub tropik Afrika dan sebagian wilayah Amerika Tengah dan Selatan, Bangladesh, Pakistan, Afghanistan, Nepal, Sri Lanka, Asia Tenggara, Indonesia, Philipina, Haiti, Kepulauan Solomon, Papua New Guinea dan beberapa kepulauan di Melanesia. Ditemukan juga di sebagian India, Timur Tengah, and Mediterania bagian Timur. Spesies *P. falciparum* mempunyai banyak variasi yang menunjukkan perbedaan distribusi geografis, *vector*

*susceptibility*, pola infeksi pada manusia, *drug susceptibility*, morfologi dan komposisi *antigenic* (Cheesbrough, 2009)

### 2.1.3.2 Morfologi

Merozoit keluar dari sizon ekso-eritrositik dari sel hati, mengadakan invasi ke sel darah merah. Bentuk cincin kecil, sitoplasma tipis mengelilingi vakuol yang besar, dengan 1 atau 2 inti. Parasit sering berada pada tepi sel darah merah disebut *acrole*, infeksi ganda sering terjadi di dalam satu sel darah merah. Bentuk cincin tumbuh cepat, tidak menunjukkan gerakan amoeboid yang aktif. Bentuk sizon matang tidak teratur, inti dan plasma terbelah menjadi merozoit, jumlahnya 16.

Eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum*, besarnya tidak berubah, tampak titik Maurer's. Bentuk gametosit jantan berwarna merah, sitoplasma tercat biru, inti ditutup butir pigmen coklat tua terkumpul di tengah seperti sosis disebut *banana shape*, kedua ujungnya tumpul, inti besar, pada sediaan Giemsa inti gametosit betina atau makrogametosit bentuk menyerupai bulan sabit, inti kompak, sitoplasma biru. Di dalam darah tepi penderita berisi bentuk cincin (*ring*) dan gametosit, bentuk sizon tidak dijumpai kecuali pada infeksi berat (Woodruff, 1984; Manson Bar, 1987; Strickland, 1991)



Gambar 2.2 Stadium dalam siklus hidup *P. falciparum*. A: bentuk *ring* (trofosoit muda), B: Sizon matang, C: gametosit (*banana shape*) (Suh dkk, 2004)

#### 2.1.4 Biologi Molekuler *Plasmodium*

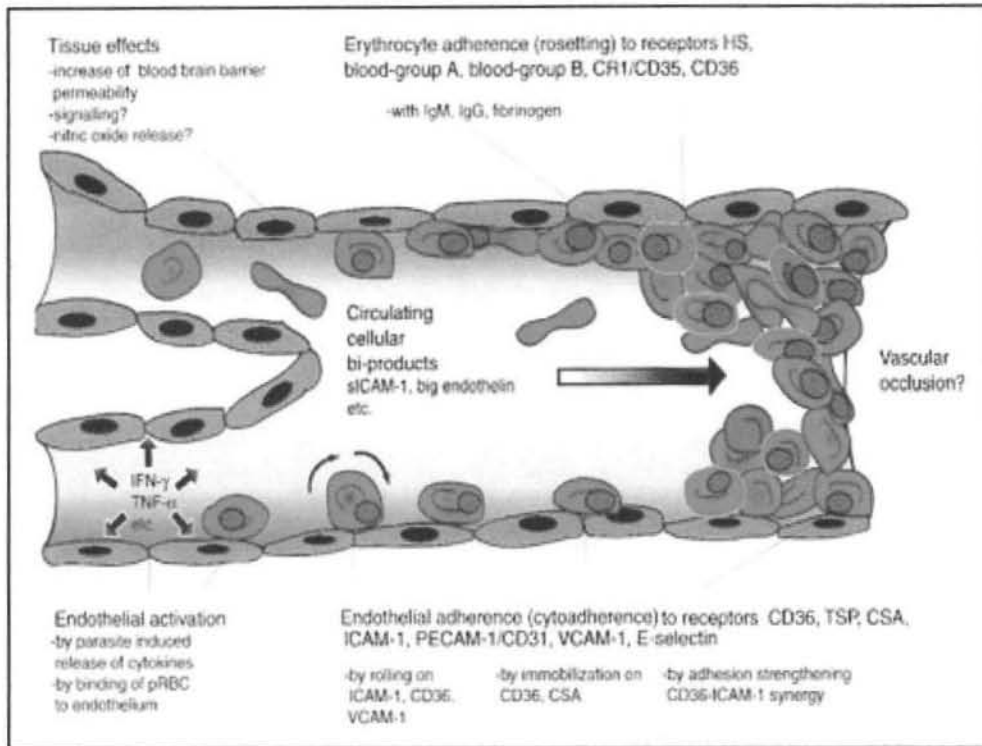
*Plasmodium* adalah organisme *eukariota*, dan ukuran genomnya sekitar 26 Mb, yang berarti dalam keadaan haploid kandungan DNANYA sekitar 0,03 pg/ nukleus. Hampir dalam keseluruhan siklus hidupnya yang kompleks parasit malaria adalah haploid, dan bentuk diploid hanya terjadi pada zygot yang terjadi dalam tubuh vektor yaitu nyamuk. Genome nukleus dari *Plasmodium* terdiri dari 14 kromosom, masing-masing kromosom ukurannya bervariasi antara 650 kb – 3400 kb. *Plasmodium* mempunyai 2 elemen DNA ektranukleus, yaitu DNA linier yang homolog dengan DNA mitokondria dan DNA sirkuler yang merupakan *plastid-type gene* (Walliker dkk, 1998)

Gen penyandi 18S rRNA *Plasmodium* (*small sub unit ribosomal RNA Plasmodium*), terdapat dalam sejumlah kopi yang terletak di genom nukleus, yang tersebar dalam beberapa kromosom yang berbeda (Rogers dkk, 1998).

#### 2.1.5 Patogenesis

*P. falciparum* paling berbahaya diantara spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia, karena dapat menyebabkan terjadinya malaria berat. Faktor virulensi parasit yang mempengaruhi terjadinya malaria berat 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*), kemudahan eritrosit yang terinfeksi parasit untuk melakukan perlekatan dengan eritrosit lain yang tidak terinfeksi (*rosetting*), potensi dalam menginduksi pelepasan sitokin, *antigenicity*, dan resistensi

parasit terhadap obat anti malaria (White, 1998; Fried, 2001; English dan Newton, 2002; Wahlgren dkk, 2005).



Gambar 2.3 Gambar skematis mekanisme sequestrasi sel darah merah terinfeksi *P.falciparum*. *Cytoadherence* dan *rosetting* berkontribusi dalam terjadinya sequestrasi parasit dan penyumbatan pembuluh darah (Wahlgren dkk, 2005)

Manifestasi klinis dari infeksi merupakan hasil akumulasi parasit dalam berbagai organ tertentu, sebagai contoh : karakteristik yang menonjol dari malaria maternal adalah terjadinya akumulasi parasit dalam plasenta walaupun dalam peredaran darah tidak terlihat parasit atau konsentrasi parasit rendah. Banyak pendapat menyatakan bahwa perlekatan parasit (*parasite adhesion*) adalah faktor penting dalam terjadinya sequestrasi dan manifestasi penyakit (Fried, 2001)

## **2.1.6 Gejala Klinis**

### **2.1.6.1 Malaria dengan gejala klinis ringan (malaria tanpa komplikasi)**

Gejala klinis malaria terutama disebabkan pecahnya schizont dan destruksi eritrosit. Karakteristik klinis dari infeksi malaria adalah paroksisma akut dan episode demam yang biasanya berulang pada interval tertentu, anemia dan pembesaran limpa. Gejala yang berhubungan dengan paroksisma periodik ini, termasuk beratnya manifestasi klinis sangat spesifik untuk masing-masing jenis parasit malaria. Dalam infeksi yang disebabkan *P. falciparum*, paroksisma biasanya kurang tergambar dan mungkin tidak menentu dalam kurun waktu lebih dari 24 jam. Paroksisma pada infeksi *P. vivax* umumnya pendek dan tergambar dengan jelas biasanya dalam kurun waktu kurang dari 8 jam. (Karunaweera dkk, 1992)

Paroksisma malaria terdiri dari 3 stadia yang berurutan, yaitu menggigil (15-60 menit), demam (2-6 jam), berkeringat (2-4 jam). Selain gejala klasik di atas, dapat juga disertai gejala umum lain, seperti lemas, sakit kepala, mialgia, nyeri perut, mual/muntah, dan diare ringan. Tanda-tanda fisik termasuk demam, tachycardia, pucat, hipotensi ortostatik, hepatomegali, dan splenomegali. (Biggs dan Brown, 2001, Trampuz dkk, 2003)

### **2.1.6.2 Malaria berat**

WHO mendefinisikan malaria berat sebagai ditemukannya *P. falciparum* bentuk aseksual dengan satu atau beberapa komplikasi/manifestasi klinis yang berat (WHO, 2000). Pada tahun 1990 WHO telah menetapkan kriteria untuk malaria berat dan pada tahun 2000, WHO merevisi kriteria tersebut dengan memasukkan manifestasi



klinis lainnya dan gambaran laboratorium yang menandakan prognosis yang buruk berdasarkan pengalaman klinis pada pasien semi-imun (Trampuz dkk, 2003), yaitu :

1. Malaria serebral

Koma tidak disebabkan penyebab lainnya, dengan skor skala koma Glasgow  $\leq 9$ .

Koma harus bertahan paling sedikit 30 menit setelah kekejangan umum.

2. Anemi berat (Hematokrit  $< 15\%$  atau Hb  $< 5 \text{ g\%}$  dalam perhitungan parasit 10.000/ $\mu\text{l}$  )

3. Hipoglikemi (kadar gula darah  $< 40 \text{ mg\%}$ )

4. Udem paru / ARDS

Skor cedera paru akut dihitung berdasarkan kepadatan radiografi, tingkat keparahan sindroma stress hypoxemia dan tekanan akhir expiratori positif

5. Kolaps sirkulasi (algid malaria)

Sistolik  $< 70 \text{ mmHg}$  pada pasien  $> 5$  tahun dan  $< 50 \text{ mmHg}$  pada anak-anak usia 1-5 tahun, dengan kulit berkeringat dingin atau perbedaan suhu bagian tengah kulit  $> 10^\circ\text{C}$

6. Gagal ginjal akut (ARF) urine output  $< 400 \text{ ml/24 jam}$  pada orang dewasa ( $< 12 \text{ ml/kg/24 jam}$  pada anak-anak) dan kadar serum kreatinin  $> 265 \mu\text{mol / l}$  ( $> 3.0 \text{ mg / dl}$ )

7. Perdarahan abnormal dan / atau menyebarkan koagulasi intravascular

Pendarahan spontan dari gusi, hidung, saluran pencernaan, atau hasil pemeriksaan laboratorium terjadi penyebaran koagulasi intravascular

8. Kejang umum berulang ( $> 3$  kali/24 jam)

9. Acidemia/ asidosis pH arteri  $< 7,25$  atau asidosis (plasma bikarbonat  $< 15$  mmol/l) Perdarahan abnormal dan gangguan pembekuan darah.
10. Hemoglobinuria
11. Kelemahan yang sangat (*severe prostration*)
12. Hiperparasitemi ( $> 5\%$  eritrosit yang terinfeksi parasit atau  $> 250.000$  parasit/ $\mu$ l (dalam individu non-imun))
13. Hiperpireksi (suhu  $> 40^{\circ}\text{C}$ )
14. Hiperbilirubinemia (bilirubin total  $>43 \mu\text{mol/l}$  ( $>2.5 \text{ mg/dl}$ ))

## **2.1.7 Diagnosis Malaria**

### **2.1.7.1 Diagnosis Klinis**

Pada anamnesis harus dicurigai malaria :

- seseorang yang berasal dari daerah endemis malaria dengan demam akut dalam segala bentuk, dengan/tanpa gejala-gejala lain,
- Adanya riwayat perjalanan ke daerah endemis malaria dalam 2 minggu terakhir
- Riwayat tinggal di daerah malaria
- Riwayat pernah mendapat pengobatan malaria
- Pada pemeriksaan fisik : Suhu  $> 37,5^{\circ}\text{C}$ , ditemukan pembesaran limpa, ditemukan anemi

### 2.1.7.2 Diagnosis Laboratorium

#### 1. Pemeriksaan mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis hapusan darah dan tetes tebal dengan metode Giemsa dianggap sebagai metode yang paling tepat karena biayanya murah, dapat mengidentifikasi jenis spesies *Plasmodium* dan dapat menentukan kepadatan parasit (Wongsrichanalai dkk, 2007), Kekurangan yang paling penting dari pemeriksaan mikroskopis adalah kepekaan yang relatif rendah, khususnya pada tingkat parasitemia rendah. Meskipun seseorang yang sangat ahli dalam pemeriksaan mikroskopis dapat mendeteksi sampai 5 parasit/ $\mu$ l, faktanya rata-rata hanya dapat mendeteksi konsentrasi parasit 50-100/ $\mu$ l darah. (Moody, 2000; Tangpukdee dkk, 2009).

Penggunaan pemeriksaan mikroskopis dalam penelitian tetap merupakan *gold standard* dan satu-satunya yang disetujui US Food and Drug Administration (FDA) sebagai endpoint untuk menilai hasil efikasi obat dan vaksin, dan sebagai referensi standar dalam evaluasi alat-alat baru untuk diagnosis malaria. (Wongsrichanalai dkk, 2007)

#### 2. Rapid Diagnostic Test (RDT)

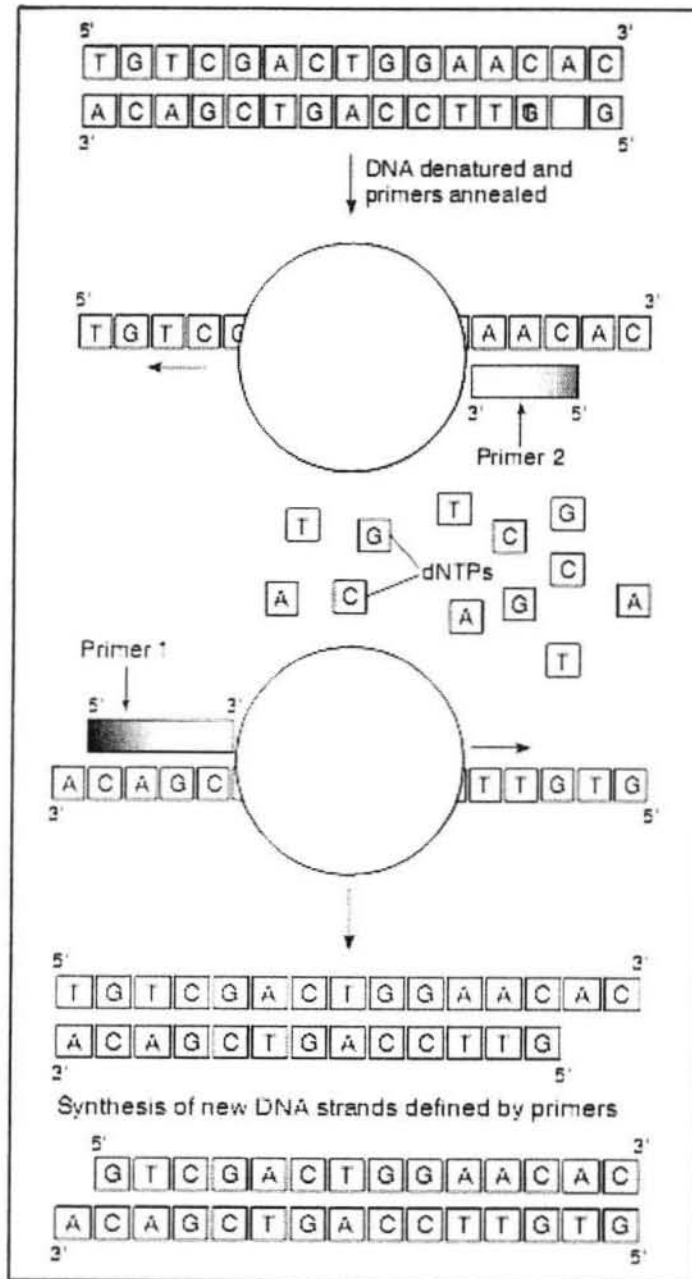
Suatu metode cepat untuk mendeteksi antigen spesifik yang diproduksi oleh parasit malaria dengan menggunakan antibodi monoklonal. Uji ini didasarkan pada migrasi cairan pada permukaan membran nitroselulose. Ada beberapa antigen malaria yang digunakan sebagai target (sasaran) dalam pemeriksaan ini yaitu *Histidine rich protein 2 (HRP-2)*, *parasit specific plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH)* dan *Plasmodium aldolase* (Sherman, 1998; Moody, 2002; UNICEF, 2007).

RDT merupakan lini pertama diagnosis malaria di semua wilayah, tidak memerlukan adanya instalasi listrik, sederhana untuk dilakukan, dan mudah untuk interpretasi hasil. (Moody, 2000; WHO, 2006; UNICEF, 2007; Wongsrichanalai dkk, 2007; Tangpukdee dkk, 2009). Tes komersial RDT dibuat dengan sasaran antigen kombinasi yang berbeda disesuaikan dengan epidemiologi malaria pada daerah setempat. (UNICEF, 2007; Wongsrichanalai dkk, 2007)

Kelemahan dari RDT diantaranya biaya relatif mahal dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopis, masa penyimpanan pendek, diperlukan adanya sistem transportasi, penyimpanan dan distribusi yang baik, pemeriksaan bersifat kualitatif sehingga perlu ditunjang dengan pemeriksaan berbasis laboratorium, intensitas dari band yang tampak bervariasi dengan jumlah antigen yang ada, pada derajat parasitemia rendah pembacaan hasil pemeriksaan cenderung bervariasi (Murray dan Bennett, 2009; UNICEF, 2007)

### **3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Empat komponen utama pada proses PCR adalah DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, oligonukleotida primer yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, dioksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP dan enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, serta komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer.



Gambar 2.4 Siklus pertama dari PCR (McPherson dan Moller, 2006)

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan

dengan menggunakan panas (95°C) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan cetakan primer. Proses *annealing* biasanya dilakukan selama 1-2 menit. Kemudian suhu dinaikkan menjadi 72°C selama 1,5 menit, pada suhu ini DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasar informasi yang ada pada DNA cetakan. Reaksi-reaksi denaturasi, *annealing* dan polimerasi DNA diulangi lagi sampai 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. (McPherson dan Moller, 2006)

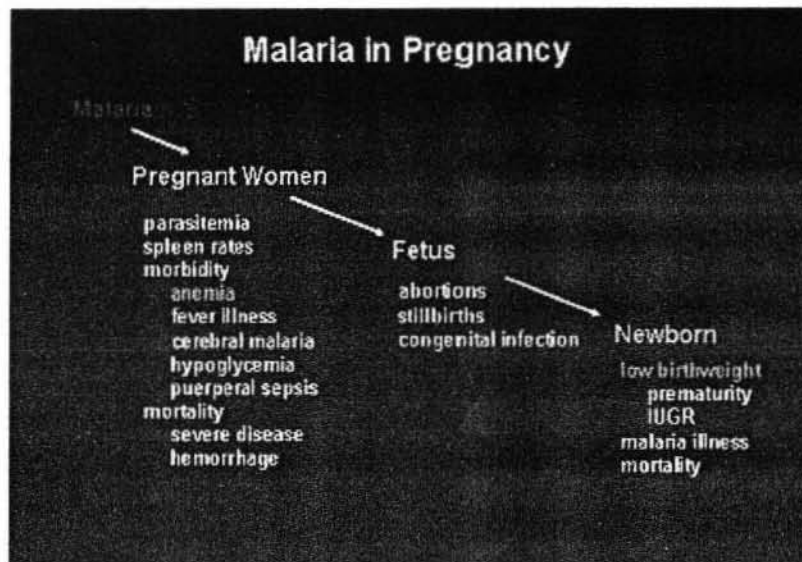
PCR merupakan diagnosis malaria lini kedua pada laboratorium yang peralatannya sudah memadai, teknik ini tetap digunakan secara ekstensif untuk mengkonfirmasi infeksi malaria, tindak lanjut respon terapi, dan mengidentifikasi resistensi obat. PCR dapat mendeteksi sedikitnya 1-5 parasit/ $\mu$ l darah ( $\leq 0,0001\%$  sel-sel darah merah yang terinfeksi) dibandingkan dengan sekitar 50-100 parasit/ $\mu$ l darah dengan mikroskop atau RDT. (Ciceron dkk, 1999; Bloland, 2001; Ohrt dkk, 2002; Tangpukdee dkk, 2009)

Kegunaan PCR dibatasi oleh metode yang kompleks, biaya yang tinggi, dan kebutuhan khusus teknisi terlatih, oleh karena itu, tidak secara rutin PCR dilaksanakan. Kontrol kualitas dan pemeliharaan peralatan juga penting untuk teknik

PCR, sehingga mungkin tidak cocok untuk diagnosis malaria di daerah terpencil atau bahkan di laboratorium diagnosis klinis rutin (Tangpukdee dkk, 2009)

## 2.2 Malaria Pada Kehamilan

Infeksi malaria selama kehamilan memberikan dampak yang serius terhadap ibu, janin dan atau bayi yang dilahirkan (Gambar 2.5)



Gambar 2. 5 Konsekuensi malaria yang berat selama kehamilan ( Yartey, 2006)

Efek klinis malaria selama kehamilan berbeda menurut intensitas transmisi malaria, tingkat kekebalan terhadap malaria yang diperoleh ibu sebelum kehamilan, dan efektivitas respon imun selama kehamilan, walaupun diakui ada 2 epidemiologi yang berbeda (transmisi malaria rendah, sedang sampai tinggi), pada kenyataannya

intensitas transmisi dan kekebalan pada ibu hamil merupakan suatu rangkaian kesatuan, dan mungkin bervariasi dalam negara tertentu.

Di daerah transmisi malaria tinggi atau sedang (*stable transmission*) seperti di Sub-Sahara Afrika. Orang-orang di daerah ini terus-menerus terpapar malaria karena sering menerima gigitan nyamuk infeksi setiap bulannya, kekebalan terhadap malaria terbentuk secara signifikan sehingga infeksi *P. falciparum* selama kehamilan sering asimtomatik. Di wilayah ini, primigravida dan secundigravida berisiko tinggi terinfeksi, dan efek utama infeksi adalah anemia pada ibu hamil dan parasitemia plasenta, walaupun anemia selama kehamilan dapat memiliki beberapa penyebab lain (malnutrisi, hemoglobinopati, infeksi cacing tambang, HIV dan infeksi lain). Dampak pada janin adalah kelambatan pertumbuhan intrauterine karena janin mengalami gangguan gizi, yang berkontribusi pada berat badan lahir rendah (BBLR), yang merupakan risiko terbesar angka kematian bayi.

Di daerah dengan transmisi malaria rendah atau transmisi malaria tidak stabil (*unstable transmission*) seperti di Asia Tenggara dan Amerika Selatan, penduduk di daerah ini jarang terpapar malaria dan hanya menerima gigitan nyamuk infeksi rata-rata < 1 gigitan nyamuk/tahun. Di daerah ini sebagian besar populasinya merupakan orang-orang non-imun terhadap malaria, kehamilan akan meningkatkan risiko penyakit maternal yang berat, kematian janin, kelahiran prematur dan kematian perinatal. Ibu hamil yang menderita malaria berat di daerah ini memiliki risiko fatal lebih dari 10 kali dibandingkan ibu tidak hamil yang menderita malaria berat di daerah yang sama ( Suparman, 2005; Yartey, 2006)



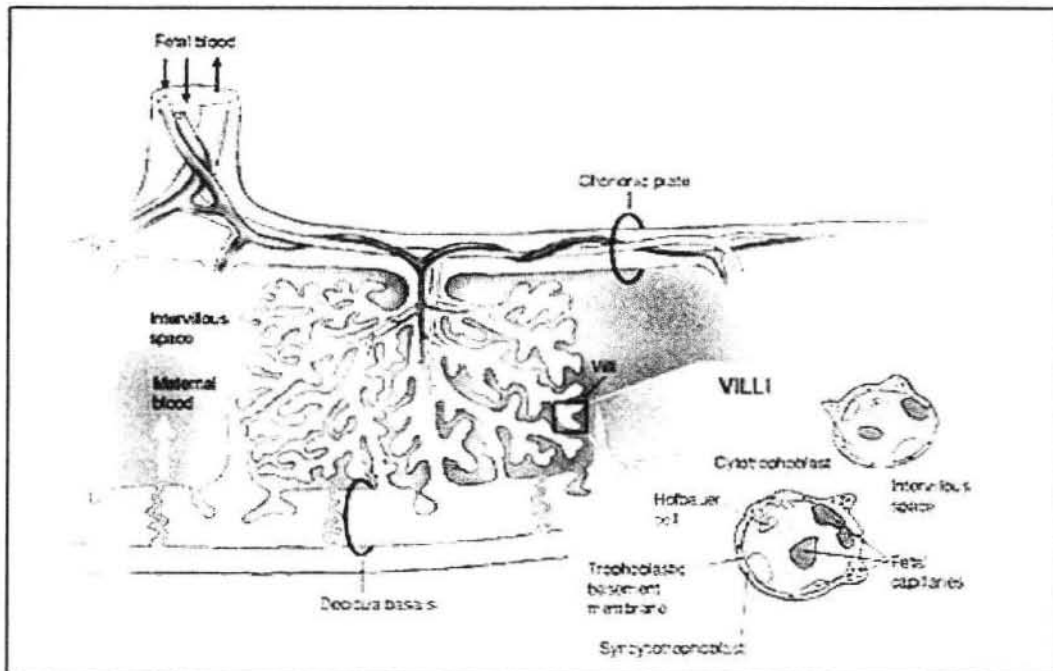
### 2.2.1 Respon Imun terhadap Infeksi Malaria selama Kehamilan

Selama kehamilan ada sequestrasi berat dari eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium* pada bagian *intervillous* dari plasenta, mengakibatkan kemudahan untuk terjadinya *cytoadherence* pada *syncytiotrophoblast* dari plasenta sehingga diduga respon imun terhadap parasit di bagian tersebut mengalami supresi. Hal tersebut berhubungan dengan supresi sistem imun baik humoral maupun seluler selama kehamilan sehubungan dengan keberadaan fetus sebagai "benda asing" di dalam tubuh ibu. (Perlmann dan Troye-Blomberg, 2002; Suparman, 2005)

Infeksi *Plasmodium* yang kronis pada plasenta dihubungkan dengan terjadinya inflamasi *intervillous* khususnya infeksi malaria yang berat pada kehamilan pertama, sebaliknya pada kehamilan kedua atau lebih, kerentanan untuk terjadinya malaria plasenta berkurang, setidaknya hal ini disebabkan produksi antibodi yang menghambat terjadinya *cytoadherence* di plasenta. Salah satu reseptor plasenta host yang utama untuk eritrosit terinfeksi adalah chondroitin sulfat A (CSA) (Fried, 2001; Perlmann dan Troye-Blomberg, 2002)



Gambar 2.6 Ikatan antara eritrosit yang terinfeksi *P.falciparum* dengan *syncytiotrophoblast* dalam plasenta (tanda panah)(Wahlgren dkk, 2005)



Gambar 2.7 Skema plasenta dari manusia, dengan potongan melintang dari ujung villi (Duffy and Fried , 2001)

Supresi sistem imun selama kehamilan juga berhubungan dengan keadaan hormonal. Konsentrasi hormon progesteron yang meningkat selama kehamilan berefek menghambat aktivasi limfosit T terhadap stimulasi antigen. Selain itu efek immunosupresi kortisol juga berperan dalam menghambat respon imun. Kadar kortisol meningkat selama kehamilan, dimulai pada awal kehamilan 7-10 minggu dan terus meningkat sampai trimester ketiga, pada primigravida memiliki tingkat yang lebih tinggi daripada multigravida (Duffi, 2001; Desowitz, 2001)

Respon imun seluler juga mengalami supresi menurut studi *in vitro*. Respon sel-sel mononuklear yang spesifik untuk malaria dan antigen-antigen yang terkait menurun selama malaria akut, termasuk respon proliferaatif, IL-2 dan IFN- $\gamma$ . Di

antara kemungkinan yang menyebabkan berkurangnya respon seluler yaitu, sel T yang responsif terhadap antigen parasit ditarik dari sirkulasi perifer selama malaria akut, dan dialokasikan kembali ke organ limfoid atau tempat lain. Hal ini didukung dengan kadar reseptor IL-2 soluble yang tinggi selama malaria akut, menunjukkan aktivasi sel T, sementara pada saat yang sama, sel T yang beredar, reseptor IL-2 nya berkurang (Duffy, 2001)

Sitokin yang mempunyai peran sentral dalam proteksi dan patogenesis malaria adalah TNF. TNF tidak membunuh parasit secara langsung tetapi menggunakan proteksi dengan cara mengaktifasi efek anti-parasitic dari berbagai sel efektor leukosit. Berkenaan dengan patogenesis, level TNF berkorelasi positif dengan beratnya sakit dan malaria fever. Sumber utama dari TNF ini adalah monosit/macrofak yang diaktivasi oleh berbagai produk dari parasit. Akan tetapi, IgE yang mengandung imun kompleks juga berkontribusi pada overproduksi lokal TNF pada malaria berat. (Perlmann dan Troye-Blomberg, 2002). Selama malaria plasenta, transkripsi IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan IL-8 diregulasi kembali dan kadar IL - 2 dan TNF- $\alpha$  dalam plasenta juga meningkat. Kadar sitokin plasenta, reseptor sitokin soluble, dan molekul adhesi soluble umumnya melebihi kadar di perifer, hal ini menunjukkan proses inflamasi lokal. Selama kehamilan pertama, IFN- $\gamma$  dapat tetap meningkat walaupun tidak disertai parasitemia, dan hal ini dapat berkontribusi pada outcome malaria yang buruk dalam primigravida (Duffy, 2001).

## **2.2.2 Pengaruh malaria pada Ibu dan Janin**

### **2.2.2.1 Pengaruh malaria pada Ibu**

#### **1. Anemi**

Infeksi malaria akan menyebabkan lisis sel darah merah yang mengandung parasit sehingga akan menyebabkan anemi. Jenis anemi yang ditemukan adalah hemolitik normokrom. Pada infeksi *P. falciparum* dapat terjadi anemi berat karena semua umur eritrosit dapat diserang. Eritrosit berparasit maupun tidak berparasit mengalami hemolisis karena fragilitas osmotik meningkat. Selain itu juga dapat disebabkan peningkatan autohemolisis baik pada eritrosit berparasit maupun tidak berparasit sehingga masa hidup eritrosit menjadi lebih singkat dan anemi lebih cepat terjadi (Hidajati, 2005; Suparman, 2005).

#### **2. Edema pulmonum**

Pada infeksi *P. falciparum*, pneumonia merupakan komplikasi yang sering dan umumnya akibat aspirasi atau bakteremia yang menyebar dari tempat infeksi lain. Gangguan perfusi organ akan meningkatkan permeabilitas kapiler sehingga terjadi edema interstitial. Hal ini akan menyebabkan disfungsi mikrosirkulasi paru.

#### **3. Hipoglikemi**

Pada wanita hamil umumnya terjadi perubahan metabolisme karbohidrat yang menyebabkan kecenderungan hipoglikemi terutama saat trimester terakhir. Selain itu, sel darah merah yang terinfeksi memerlukan glukosa 75 kali lebih banyak daripada sel darah normal. Hipoglikemi karena kebutuhan metabolik parasit yang meningkat menyebabkan habisnya cadangan glikogen hati. Hipoglikemi sering terjadi pada wanita hamil khususnya pada primigravida. Hipoglikemi juga terjadi pada 7 dari 12

ibu hamil dengan malaria berat yang mendapat pengobatan kina intravena. (Duffy dan Desowitz, 2001; Suparman, 2005)

#### **4. Infeksi plasenta**

Pada penelitian terhadap plasenta wanita hamil yang terinfeksi berat oleh *falciparum* ditemukan banyak timbunan eritrosit yang terinfeksi parasit dan monosit yang berisi pigmen di daerah *intervillous*. Juga ditemukan nekrosis sinsisial dan proliferasi sel-sel *syncytiotrophoblast*. Adanya kelainan plasenta dengan penimbunan pigmen tetapi tidak ditemukan parasit menunjukkan adanya infeksi yang sudah sembuh atau inaktif.

#### **5. Gangguan elektrolit**

Rasio natrium/kalium di eritrosit dan otot meningkat dan pada beberapa kasus terjadi peningkatan kalium plasma pada saat lisis berat. Rasio natrium/kalium urin sering terbalik. Hiponatremi sering ditemukan pada penderita sakit berat dan karena ginjal terlibat dapat terjadi peningkatan serum kreatinin dan BUN (Suparman, 2005)

#### **6. Malaria serebral**

Sejumlah mekanisme patofisiologi ditemukan antara lain obstruksi mekanis pembuluh darah serebral akibat berkurangnya kemampuan deformabilitas eritrosit berparasit atau akibat *cytoadherence* dan akhirnya menyebabkan permeabilitas vaskuler meningkat, sawar darah otak rusak, edema serebral dan menginduksi respon radang pada dan di sekitar pembuluh darah serebral. (English dan Newton, 2002; Suparman, 2005)

### **2.2.2.2 Pengaruh malaria pada janin**

#### **1. Kematian janin dalam kandungan**

Kematian janin intrauterin dapat terjadi akibat hiperpireksi, anemi berat, penimbunan parasit di dalam plasenta yang menyebabkan gangguan sirkulasi ataupun akibat infeksi transplasental (Brabin, 1988).

#### **2. Abortus**

Abortus pada usia kehamilan trimester pertama lebih sering terjadi karena demam tinggi sedangkan abortus pada usia trimester kedua disebabkan oleh anemia berat.

#### **3. Persalinan prematur**

Umumnya terjadi sewaktu atau tidak lama setelah serangan malaria. Beberapa hal yang menyebabkan persalinan prematur adalah febris, dehidrasi, asidosis atau infeksi plasenta.

#### **4. Berat badan lahir rendah**

Penderita malaria biasanya menderita anemi sehingga akan menyebabkan gangguan sirkulasi nutrisi pada janin dan berakibat terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan janin dalam kandungan.

#### **5. Malaria plasenta**

Plasenta mempunyai fungsi sebagai barier protektif dari berbagai kelainan yang terdapat dalam darah ibu sehingga parasit malaria akan ditemukan di plasenta bagian maternal dan hanya dapat masuk ke sirkulasi janin bila terdapat kerusakan plasenta misalnya pada persalinan sehingga terjadi malaria kongenital.

## 6. Malaria kongenital

Gejala klinik malaria kongenital antara lain iritabilitas, tidak mau menyusu, demam, pembesaran hati dan limpa (hepatosplenomegali) dan anemia tanpa retikulositosis dan tanpa ikterus (Suparman, 2005)

### 2.2.3 Pengendalian Malaria pada Kehamilan

WHO telah merekomendasikan bahwa wanita hamil di daerah endemik malaria menerima pengobatan antimalaria penuh pada kontak pertama kehamilan mereka dengan klinik antenatal, kemudian diikuti dengan kemoprofilaksis mingguan. Meningkatnya resistensi *P.falciparum* terhadap klorokuin di sebagian besar wilayah Afrika menyebabkan kemoprofilaksis mingguan dengan klorokuin tidak lagi direkomendasikan untuk pencegahan dan pengendalian malaria selama kehamilan. Pada tahun 1998, WHO merekomendasikan tiga macam pendekatan untuk pencegahan dan pengendalian malaria selama kehamilan (Yartey, 2006) yaitu :

#### 1. *Intermittent preventive treatment for pregnant (IPTp)*

IPTp adalah pemberian dosis pengobatan penuh yang efektif untuk pencegahan malaria pada interval yang telah ditentukan. Semua ibu hamil di wilayah transmisi malaria stabil harus menerima setidaknya dua dosis IPTp setelah kunjungan pertama di klinik antenatal kemudian secara rutin dijadwalkan, direkomendasikan sebanyak empat kali selama kehamilan. Obat yang paling efektif untuk IPTp adalah sulfadoksin-pirimetamin (SP) karena sudah terbukti aman selama kehamilan, harga obat terjangkau, ketersediannya luas, dan mudah diberikan sebagai dosis tunggal (Newman dkk, 2003)

IPTp dengan SP telah terbukti efektif dalam mengurangi risiko malaria selama kehamilan. Penelitian Verhoeff dkk, 1998, di Rumah Sakit Distrik Chikwawa, Malawi, mengenai efek pengobatan antimalaria setelah dilakukan kemoprofilaksis selama kehamilan menunjukkan bahwa rata-rata berat lahir bayi yang lahir pada primigravida dan multigravida yang menerima 2 dosis SP atau lebih secara bermakna lebih tinggi daripada bayi yang ibunya hanya menerima 1 dosis SP.

Rogerson dkk pada tahun 1997-1999 melakukan penelitian di Blantyre, Malawi setelah dilaksanakannya program IPTp/SP sebagai profilaksis malaria pada kehamilan menunjukkan bahwa pemberian dosis SP  $\geq 2$  berhubungan dengan penurunan prevalensi malaria plasenta dan parasitemia (dari 31,9% tanpa pemberian SP menjadi 22,8% dengan pemberian SP), penurunan prevalensi BBLR (dari 23% tanpa pemberian SP menjadi 10,3% dengan pemberian SP), dan kadar Hb ibu yang lebih tinggi.

Penelitian Sirima dkk, 2006 menunjukkan bahwa setelah satu tahun dilaksanakannya program IPTp di Koupela, Burkina Faso, pemberian SP dengan dosis  $\geq 1$  berhubungan secara signifikan dengan penurunan prevalensi parasitemia perifer, dosis  $\geq 2$  berhubungan dengan penurunan prevalensi parasitemia plasenta, dan 3 dosis SP berhubungan dengan penurunan resiko BBLR.

## 2. *Insecticide-treated nets (ITNs)*

Penggunaan kelambu yang dicelup insektisida (ITNs) mengurangi kontak antara vektor dengan manusia. Penelitian di Afrika telah menunjukkan bahwa penggunaan



ITNs skala luas dapat mengurangi semua penyebab kematian pada anak-anak sekitar 20% dan sebanyak 50% jumlah malaria klinis dalam kelompok usia yang sama.

### 3. Manajemen kasus yang tepat dan efektif.

Pengobatan malaria selama kehamilan bertujuan sepenuhnya menghilangkan infeksi. Quinine adalah obat pilihan untuk pengobatan malaria pada trimester pertama kehamilan dan malaria berat selama kehamilan. Obat antimalaria yang dianjurkan untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi adalah klorokuin untuk daerah yang masih sensitif klorokuin dan SP di daerah-daerah dengan resistensi klorokuin. Quinine juga dapat digunakan sebagai alternatif di daerah dimana klorokuin dan SP tidak efektif lagi. WHO telah menyatakan bahwa obat-obat ini aman untuk digunakan pada kehamilan trimester kedua dan ketiga dan selama menyusui (Yartey, 2006)

Kebijakan pengobatan malaria (*P.falciparum* dan *P.vivax*) di Indonesia hanya menganjurkan pemakaian klorokuin dosis terapi untuk pengobatan selama kehamilan, sedangkan quinine untuk pengobatan malaria berat. Di daerah dimana *P.falciparum* resisten klorokuin, dapat diberikan pengobatan alternatif yaitu SP 3 tablet dosis tunggal, *Garam Kina* 10 mg/kg.bb per oral 3 kali selama 7 hari (minimum 3 hari + SP 3 tablet dosis tunggal hari pertama) dan *meflokuin* dapat dipakai jika sudah resisten dengan quinine atau SP, namun penggunaannya pada kehamilan muda harus benar-benar dipertimbangkan, karena data penggunaannya pada trimester pertama masih terbatas (Suparman, 2005)

## **2.3 Mutasi**

### **2.3.1 Definisi**

Mutasi didefinisikan sebagai perubahan susunan nukleotida dalam DNA. Mutasi dapat disebabkan oleh kesalahan spontan pada saat replikasi DNA dan faktor-faktor eksternal seperti radiasi dan mutagen kimia yang dapat merusak molekul DNA (Kirby, 1992; Brown, 2002; Brown, 2009)

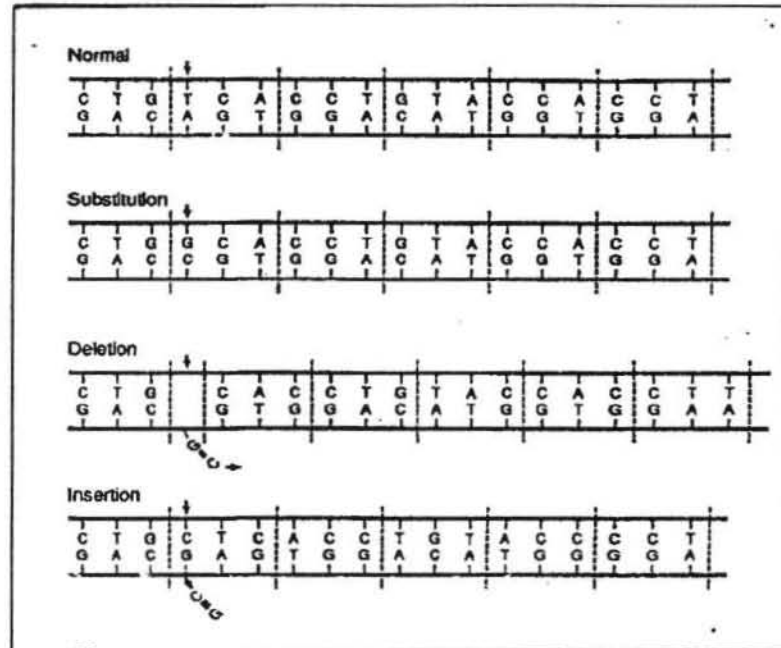
### **2.3.2 Macam-macam mutasi**

Mutasi dapat terjadi pada level nukleotida dan kromosom (Kirby, 1992) :

#### **1. Nukleotida, meliputi :**

- a. Mutasi titik yaitu penggantian satu nukleotida dengan nukleotida yang lain, ada 2 kategori :
  - Transisi yaitu penggantian suatu basa purin dengan basa purin lainnya, atau pirimidin dengan pirimidin lainnya terhadap pasangan basa molekul DNA
  - Transversi yaitu penggantian suatu basa purin dengan pirimidin atau sebaliknya terhadap pasangan molekul DNA
- b. Delesi yaitu penghilangan atau penghapusan sepasang nukleotida dari rantai DNA

- c. Insersi yaitu penyisipan sepasang atau lebih nukleotida ke dalam untai ganda DNA



Gambar 2.8 Gambaran skematis delesi dan insersi (Kirby, 1992)

2. Kromosom (aberasi kromosom) yaitu penyimpangan pada jumlah normal atau struktur dari kromosom, meliputi :
  - a. Delesi yaitu hilangnya segmen kromosom disebabkan hilangnya materi genetik
  - b. Duplikasi yaitu penggandaan segmen kromosom disebabkan proses *crossing over* yang tidak seimbang
  - c. Inversi terjadi ketika ada urutan dalam kromosom yang berbeda, misalnya yang asli A-B menjadi B-A
  - d. Translokasi adalah mutasi yang terjadi dimana segmen dari kromosom mengalami perubahan posisi. Ada 2 kategori :

- Translokasi intrakromosomal yaitu translokasi dapat terjadi dengan kromosom yang sama.
- Translokasi interkromosomal yaitu translokasi yang melibatkan transfer dari daerah kromosom ke kromosom non homolog. Ada 2 tipe yaitu reciprocal (atau seimbang) dan nonreciprocal

#### **2.4 Sulfadoksin-Pirimetamin (SP)**

SP adalah obat anti malaria kombinasi antara golongan sulfonamide/sulfon dengan diaminopirimidine yang bersifat skizontisida jaringan, skizontisida darah dan sporontosidal. Konsentrasi puncak di dalam darah dicapai dalam 2-4 jam dengan waktu paruh sulfonamid adalah 180 jam dan pirimetamin 90 jam. Di Indonesia, obat ini tersedia hanya dalam bentuk tablet untuk pemberian per oral, satu tablet mengandung 500 mg sulfadoksin dan 25 mg pirimetamin (Tjitra, 2000).

Secara farmakologis pirimetamin bekerja sebagai inhibitor enzim *dhfr* sedangkan sulfadoksin berkompetisi dengan PABA (*para amino benzoic acid*) dalam memperebutkan dihidrofolat sintase sehingga pembentukan asam dihidropteroat terganggu dan asam folat yang diperlukan parasit tidak terbentuk.

#### **2.5 Resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria**

##### **2.5.1 Definisi**

Resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria didefinisikan sebagai kemampuan strain parasit untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak

dan menimbulkan gejala penyakit walaupun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun dosis yang lebih tinggi, yang masih bisa ditolerir oleh pemakai obat (WHO, 1986)

### 2.5.2 Deteksi resistensi

Metode yang dipakai untuk menilai adanya resistensi terhadap obat antimalaria adalah (Bloland, 2001; WHO, 2006) :

#### 1. Penilaian efikasi pengobatan malaria secara *in vivo*

Uji *in vivo* terdiri dari pengobatan sekelompok individu dengan simptom dan parasitemia yang telah diketahui dosis obatnya dan selanjutnya dilakukan penilaian secara klinis dan parasitologis terhadap hasil pengobatan pada hari 7, 14, atau 28 berdasarkan pada standar WHO.

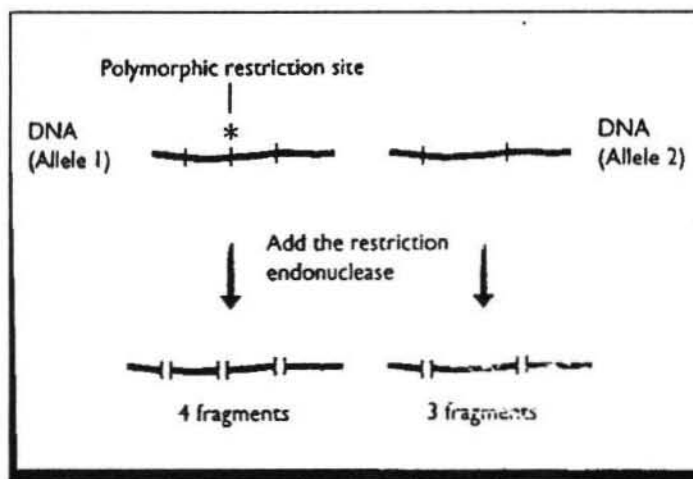
Monitoring pasien setelah pengobatan malaria didasarkan pada respon parasitologis terhadap obat tertentu, dan infeksi diklasifikasikan sebagai sensitif (S), atau resisten (R) pada salah satu dari tiga tingkatan, RI, RII atau RIII. Monitoring menggunakan protokol yang telah dimodifikasi dan disederhakan didasarkan respon parasitologis dan klinis diukur dengan *adequate clinical response* (ACR) dan kegagalan pengobatan awal serta akhir (ETF dan LTF).

#### 2. Studi *in vitro* kerentanan parasit terhadap obat-obat antimalaria dalam kultur *plasmodium*

Uji *in vitro* dilakukan dalam lingkungan percobaan yang terkontrol untuk menghindari pembauran banyak faktor, sampel darah diletakkan dalam mikropate dan diketahui secara tepat jumlah obat serta diamati penghambatan dari maturasi parasit sampai schizont.

### 3. Teknik Molekuler

Kemajuan dalam memahami mekanisme kerja obat memungkinkan identifikasi target molekul yang diduga bertanggung jawab terhadap terjadinya resistensi. Teknik molekuler dengan menggunakan PCR untuk mengindikasikan adanya mutasi gen yang mengkode resistensi terhadap obat antimalaria. Salah satu metode yang dipakai untuk analisis *Single nucleotide polymorphism* (SNP) dalam gen yang resisten terhadap obat antimalaria adalah PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms*). RFLP, mengacu pada perbedaan antara dua atau lebih molekul DNA homolog yang timbul dari *restriction site* yang berbeda. Dalam analisis RFLP, produk PCR dari hasil *nested* PCR dilakukan pemberian enzim restriksi. Sampel DNA dipecah menjadi potongan-potongan fragmen DNA oleh enzim restriksi dan fragmen restriksi yang dihasilkan dipisahkan menurut panjangnya dengan gel elektroforesis (Brown, 2002)

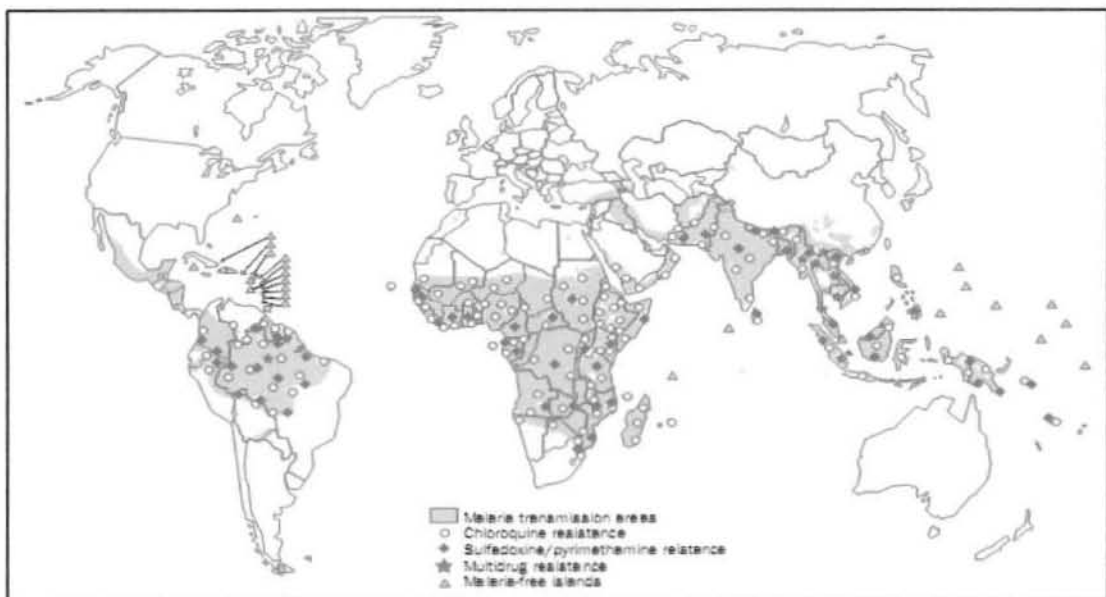


Gambar 2.9 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Brown, 2002)

## 2.5.3 Resistensi Parasit Malaria terhadap SP

### 2.5.3.1 Epidemiologi

Resistensi parasit malaria terhadap SP pertama kali dilaporkan di perbatasan Thailand-Kamboja pada pertengahan tahun 1960. Saat ini, tingkat resistensi yang tinggi (hingga 90%) ditemukan di sebagian besar Asia Tenggara, Cina Selatan, dan Amazon. Resistensi dengan derajat dan frekuensi rendah ditemukan di pantai Pasifik Amerika Selatan, Asia Selatan, Iran bagian timur dan Oceania bagian barat. Di Afrika, sensitivitas terhadap SP mulai menurun pada akhir 1980-an. Resistensi dengan cepat berkembang di benua ini terutama di Afrika bagian Timur, dimana tingkat resistensi di daerah ini bervariasi. (Bloland, 2001, ICMR, 2008)



Gambar 2.10 Wilayah transmisi malaria dan distribusi geografis *P. falciparum* yang resisten terhadap obat antimalaria ( Wongsrichanalai dkk, 2002)

### 2.5.3.2 Jalur biosintesis folat pada *Plasmodium*

Metabolisme folat menjadi target dari beberapa obat antimalaria. Berkurangnya folat sebagai kofaktor dalam beberapa reaksi transfer 1 unit carbon yang terlibat dalam biosintesis asam amino dan nukleotida sangat berpengaruh terhadap parasit karena tingkat replikasi parasit yang tinggi membutuhkan nukleotida yang banyak sebagai prekursor untuk sintesis DNA

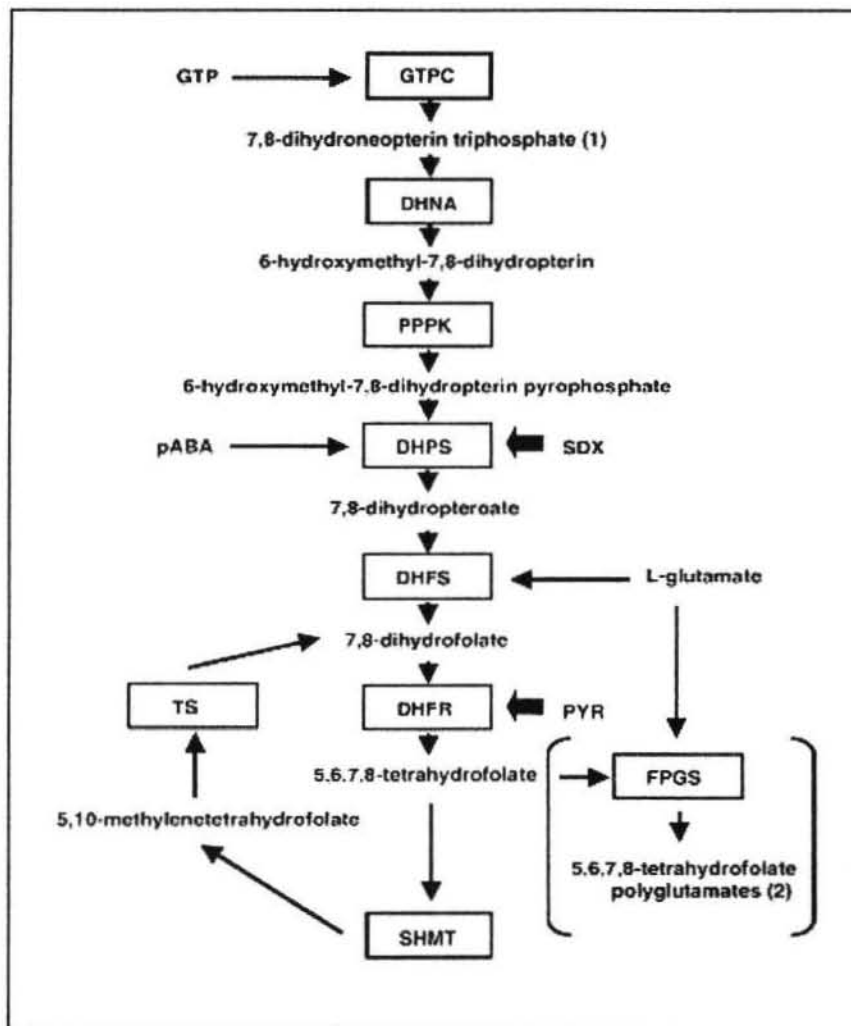
Parasit malaria dapat mensintesis folat *de novo* sedangkan host manusia tidak bisa mensintesis folat. Folat disintesis dari 3 blok bangunan dasar, GTP, p-aminobenzoic acid (PABA), dan glutamat, dalam sebuah jalur biosintesis yang melibatkan 5 enzim. Salah satu enzim yaitu *dihydropteroate sintase (dhps)*, dihambat oleh obat berbasis sulfa. Sulfadoksin dan dapson adalah dua antimalaria umum sebagai inhibitor *dhps*.

Dalam sintesis DNA, folat dalam bentuk 5,10-methylenetetrahydrofolate (methylene THF) diperlukan untuk persediaan grup metil yang mengubah deoxyuridine monophosphate (dUMP) menjadi deoxythymidylate monophosphate (dTMP), yang mana turunan dari triphosphate digunakan oleh DNA polimerase untuk menambahkan nukleotida 'T' (Timin) untuk penambahan rantai DNA.

Gambar 2.12 menggambarkan enzim-enzim utama pada jalur folat, meliputi biosintesis GTP dari dihydrofolate (DHF), juga pengurangan dari tetrahydrofolate (THF). Produksi masing-masing molekul dari dTMP sebagai hasil dari oksidasi molekul THF ke DHF, yang harus di daur ulang kembali oleh *dhfr* ke bentuk THF. Biosintesis dari DHF ke dalam berbagai bentuk dimediasi oleh aktivitas lima enzim, hal ini diperlukan untuk mentransfer reaksi C1 yang pada prinsipnya dilakukan oleh empat kegiatan lebih lanjut, salah satu yang terakhir adalah *folylpolyglutamate sintase*



(FPGS), mengubah pengurangan folat ke bentuk *polyglutamat*, di mana tambahan residu glutamat dikonjugasikan ke satu glutamat selain *dihydropteroate* menghasilkan DHF (Hyde, 2005). Mutasi titik tertentu dalam enzim-enzim ini mengakibatkan afinitas yang lebih rendah terhadap obat SP.



Gambar 2.11 Jalur Biosintesis folat (Hyde, 2005)

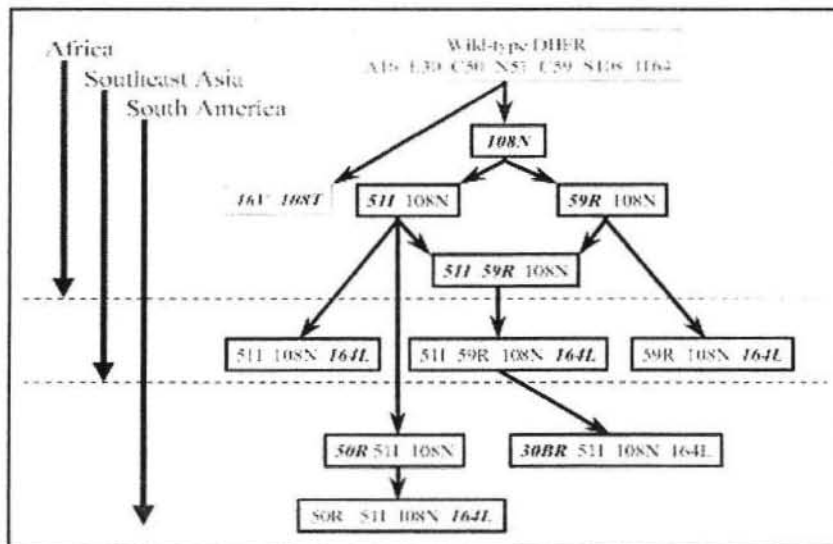
### 2.5.3.3 Mekanisme terjadinya resistensi parasit malaria terhadap SP

Resistensi terhadap obat antimalaria muncul sebagai hasil dari mutasi yang terjadi secara spontan yang mempengaruhi struktur dan aktivitas pada tingkat molekuler target obat parasit malaria atau mempengaruhi akses obat terhadap target. Parasit mengalami mutasi jika konsentrasi obat antimalaria cukup untuk menghambat multiplikasi parasit yang rentan tetapi tidak memadai untuk menghambat parasit yang mutan, sebuah fenomena yang dikenal sebagai "*drug selection*". Seleksi ini didasarkan pada anggapan adanya peningkatan dari kadar plasma obat sub terapi dan kurva respon dosis yang mendarat terhadap obat tersebut (WHO, 2000).

Penelitian secara *in vivo* tentang penggunaan pirimetamin sebagai profilaksis dengan regimen bulanan di Tanzania, didapatkan rata-rata resistensi terhadap *P.falciparum* mencapai 0-37% hanya dalam waktu 5 bulan dan ketika profilaksis dirubah dalam regimen mingguan resisten berjalan perlahan tetapi mencapai 50-60% dalam waktu 2 tahun (Plowe, 2001). Penelitian lain mengungkapkan bahwa isolat parasit yang sensitif dan resisten terhadap pirimetamin mempunyai kesamaan dalam uptake pirimetamin, tetapi aktivitas strain *dhfr* yang resisten 300 kali kurang sensitif terhadap efek penghambatan pirimetamin. Berdasar studi *in vivo* dan *in vitro* di atas menunjukkan perkembangan resistensi yang cepat sebagai respon terhadap tekanan obat, hal ini menegaskan bahwa resistensi merupakan hasil dari mekanisme resistensi yang relatif sederhana sebagaimana terjadinya mutasi titik pada satu gen yang menjadi target obat (Gregson dan Plowe, 2005).

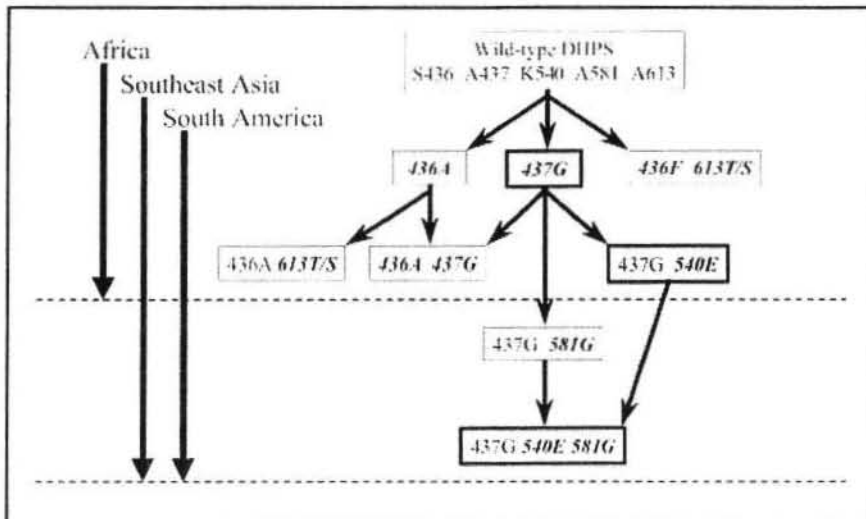
Penelitian gen *dhfr* dengan sequencing pada fenotipe *Pfdhfr* yang sensitif dan resisten memberikan bukti langsung bahwa mutasi titik dalam gen *dhfr* bertanggung

jawab terhadap fenotipe resisten. *Pfdhfr* yang berasal dari klon pirimetamin-sensitif, 3D7, dan isolat-isolat dengan berbagai derajat resisten terhadap pirimetamin disekuensing, menunjukkan bahwa serin pada posisi 108 dalam kloning 3D7 sensitif, berubah menjadi asparagin (S108N) pada isolat resisten. Secara keseluruhan, perubahan serin menjadi asparagin pada kodon 108 diketahui menjadi mutasi kunci untuk resistensi terhadap pirimetamin. Tambahan mutasi titik dalam tiga kodon lain, Ile51, Arg59, dan Leu164, diketahui meningkatkan tingkat resistensi progresif, demikian juga, *quadruplemutan* (mutasi pada kodon 108,51,59 dengan mutasi Leu164) memberikan resistensi paling parah (Gregson dan Plowe, 2005)



Gambar 2.12 Perkembangan alami mutasi dalam *Pfdhfr* dengan distribusi geografis genotipe mutan dominan. *Wild type* dinyatakan dengan asam amino disebelah kiri dari nomor kodon dan *mutant type* dinyatakan dengan asam amino disebelah kanan dari nomor kodon. Genotipe mutasi baru yang timbul dinyatakan dengan huruf tebal miring. Kotak dengan warna abu-abu menunjukkan mutasi yang muncul paling sering dibawah tekanan obat in vivo (Plowe, 2001)

Peran *dhps* dalam resistensi terhadap sulfonamid diuraikan melalui kloning gen, identifikasi mutasi titik yang berhubungan dengan resistensi obat *in vitro* dan karakterisasi heterologous yang diekspresikan pada *wild type* dan *mutant* enzim. Mutasi titik yang terjadi pada lima kodon dari gen *Pfdhps* diketahui terlibat dalam memberikan resistensi dengan mengurangi pengikatan obat terhadap enzim (Plowe, 2001). Mutasi pada *dhps* yang terkait dengan resistensi terhadap sulfadoksin adalah serin menjadi alanin atau fenilalanin pada kodon 436, alanin menjadi glisin pada kodon 437, lisin menjadi asam glutamat pada kodon 540, alanin menjadi glisin pada kodon 581, alanin menjadi threonin atau serin pada kodon 613. Mutasi *Pfdhps* selanjutnya telah membuktikan resistensi terhadap sulfonamid dan sulfon melalui studi transfeksi *P. falciparum*. Mutasi triple Glu-436, Ser-437, Ser-613 adalah genotipe yang sangat tahan yang dianalisis, meningkatkan konsentrasi median *inhibitory concentration* (IC50) mendekati hampir 1000 kali lipat untuk sulfadoksin relatif terhadap *wild-type*, secara alamiah hal ini jarang terjadi (Gregson dan Plowe, 2005).



Gambar 2.13 Perkembangan alami mutasi *Pfdhps* dengan distribusi geografis genotipe mutan dominan. *Wild type* dinyatakan dengan asam amino disebelah kiri dari nomor kodon dan *mutant type* dinyatakan dengan asam amino disebelah kanan dari nomor kodon. Genotipe mutasi baru yang timbul dinyatakan dengan huruf tebal miring. Kotak dengan warna abu-abu menunjukkan mutasi yang muncul paling sering dibawah tekanan obat in vivo (Plowe, 2001)

## 2.6 Gen yang mengkode enzim yang menjadi target obat SP

Dua gen yang mengkode enzim pada jalur metabolisme folat menjadi target obat SP, yaitu *dihydrofolate reductase (dhfr)* dan *dihydropteroate synthase (dhps)* (Plowe, 2001; Gregson dan Plowe, 2005).

### 2.6.1 Gen *Pfdhfr*

Pirimetamin dan proguanil adalah dua *dhfr* paling umum digunakan sebagai inhibitor antimalaria. Resistensi terhadap pirimetamin disebabkan oleh mutasi pada gen *Pfdhfr*, yang mengarah pada melemahnya afinitas obat terhadap *dhfr*, tetapi tetap mempertahankan aktivitas enzim.

*P.falciparum dhfr* dikode oleh copi gen tunggal pada kromosom 4 yang juga mengkode *thymidylate synthase*, dua enzim ini membentuk protein dengan dua fungsi. *Dhfr-ts* dari *P. falciparum* mengandung 608 asam amino, 231 pertama merupakan domain *dhfr*, 89 berikutnya membentuk daerah *junction*, 288 sisanya bergabung dengan domain *thymidylate sintase* (Gregson dan Plowe, 2005)

### 2. 6.2 Gen *Pfdhps*

Sulfadoksin merupakan obat golongan sulfa yang paling umum digunakan dalam kombinasi dengan pirimetamin. Obat golongan sulfa telah diketahui menghambat enzim *dihydropteroate synthase (dhps)*, merupakan bagian dari polipeptida yang mempunyai dua fungsi, dikode oleh gen yang juga mengkode *dihydrohydroxymethylpterin pyrophosphokinase*, enzim lain dalam jalur metabolisme folat (Cowman, 1998; Plowe, 2001)

*Pfdhps* dikode oleh copi gen tunggal pada kromosom 8 dengan panjang fragmen 1269 bp. *Dhps* mengkatalis kondensasi dari pABA dengan 6-hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphate menghasilkan 7,8-dihydropteroate. Penghambatan *dhps* pada metabolisme folat *Plasmodium* menghasilkan penipisan prekursor dTTP dan selanjutnya menurunkan produksi DNA. (Ayala dkk, 1998; Gregson dan Plowe, 2005)