

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Perbedaan Prevalensi malaria pada ibu hamil di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan

Prevalensi ibu hamil paling banyak ditemukan di wilayah puskesmas Peramasan. Dilihat dari keadaan letak geografi wilayah Peramasan merupakan desa-desa yang sangat terpencil dan terisolir, keadaan topografi wilayah ini merupakan daerah pegunungan dan dikelilingi oleh hutan lebat serta semak belukar, dengan sungai-sungai kecil di antara pertemuan gunung, sebagian penduduknya bekerja sebagai penambang emas secara sederhana, adanya penebangan hutan sebagai lahan untuk menambang emas sehingga dari kegiatan ini menimbulkan sisa-sisa kubangan yang merupakan tempat nyaman bagi nyamuk untuk berkembang biak. Disamping sebagai penambang emas, penduduk juga bercocok tanam padi yang lokasinya jauh dari tempat tinggal (di tengah hutan), bahkan karena jauh dari tempat tinggal, penduduk juga membuat gubuk-gubuk kecil untuk dijadikan tempat tinggal beberapa hari. Kondisi-kondisi seperti ini semakin memperbesar peluang untuk mendapatkan gigitan nyamuk.

Riyanto (2008) dalam penelitiannya menemukan bahwa di semua desa di Peramasan terdapat tempat perindukan (*breeding place*) nyamuk *Anopheles*. Spesies *Anopheles* yang ditemukan adalah : *Anopheles balabacensis*, *Anopheles maculantus*, *Anopheles letifer*, *Anopheles umbrosus*, *Anopheles kochi*, *Anopheles nigerrimus*, dan *Anopheles vanu*. Perubahan iklim dan sejumlah percepatan dalam wilayah juga dapat mempengaruhi tersedianya *breeding place* nyamuk (Gubler, 2001).

Variabel lain yang mempengaruhi transmisi malaria adalah perubahan lingkungan (kerusakan hutan, meningkatnya irigasi dan keringnya rawa-rawa), pertumbuhan populasi, terbatasnya akses sistem kesehatan dan kurang atau tidak suksesnya kontrol malaria (Tanser, 2003). Program pemberantasan malaria yang dilakukan oleh Dinas Kesehatan Kabupaten Banjar dengan pihak Puskesmas selama ini lebih bersifat *Passive Case Detection* (PCD), artinya lebih banyak menunggu orang yang datang untuk berobat ke Pusat Pelayanan Kesehatan, baik ke Puskesmas Induk, Puskesmas Pembantu, ataupun yang datang ke petugas kesehatan di desa seperti bidan dan perawat sedangkan kegiatan penyemprotan, pengobatan secara radikal dan Survey Entomologi dilakukan hanya apabila terjadi Kejadian Luar Biasa (KLB), selain itu tenaga kesehatan di wilayah puskesmas Peramasan masih sangat terbatas.

Di wilayah puskesmas Sungai Pinang tempat perindukan nyamuk (*breeding place*) tidak kering pada musim kemarau, karena adanya mata air dari pegunungan sehingga memungkinkan nyamuk terus berkembang biak. Hasil pemeriksaan di dua desa yaitu desa Kupang Rejo dan desa Sei Pinang tidak ditemukan adanya jentik *Anopheles* pada *breeding place* nya (Riyanto, 2008).

Dari semua ibu hamil yang terinfeksi parasit malaria didapatkan bahwa paling banyak terinfeksi pada kehamilan pertama (primigravida). Malaria sebagai penyebab penting terjadinya bayi BBLR pada ibu yang tinggal di wilayah endemis malaria, meningkatnya prevalensi bayi BBLR pada primigravida mempunyai arti penting, dimana 10% terjadi pada wilayah transmisi malaria rendah dan lebih dari 50% terjadi pada wilayah transmisi malaria sedang dan tinggi. Di Papua New Guinea dan Gambia ibu hamil yang terinfeksi malaria pada primigravida berisiko melahirkan bayi BBLR sekitar 30% dan di Afrika berisiko BBLR antara 9-40%. (Brabin, 1991a; Brabin dan Rogerson, 2001; Shulman dkk, 2003). Mekanisme terjadinya bayi BBLR

mungkin merupakan pengaruh dari anemia maternal, gangguan haemodinamic dari sirkulasi uteroplasental, dan kerusakan plasenta sehingga menyebabkan terhalangnya supply nutrisi bagi janin (Dorman dkk, 2002). 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. Pada kenyataannya intensitas transmisi dan kekebalan pada ibu hamil merupakan suatu rangkaian kesatuan, dan mungkin bervariasi dengan basis geografis (Suparman, 2005; Yartey, 2006)

Pada penelitian ini didapatkan bahwa prevalensi malaria pada ibu hamil relatif kecil, hal ini dimungkinkan karena penelitian dilakukan di wilayah pemukiman sedangkan *breeding place* nyamuk banyak dijumpai di daerah-daerah dekat pendulangan emas atau di lahan-lahan bercocok tanam yang jauh dari pemukiman (di tengah hutan). Ibu hamil mungkin terinfeksi malaria pada saat mereka mengirim perbekalan makanan ketika suami mereka bekerja di pendulangan emas atau ketika ibu hamil membantu suaminya bercocok tanam dan tinggal selama beberapa hari di tengah hutan.

6.2 Perbedaan hasil pemeriksaan parasit malaria dengan cara mikroskopis dan *nested* PCR

Pemeriksaan mikroskopis hapusan darah dan tetes tebal tetap merupakan *gold standard*, karena biayanya murah, dapat mengidentifikasi jenis spesies *Plasmodium* dan dapat menentukan kepadatan parasit (Wongsrichanalai dkk, 2007), akan tetapi proses pewarnaan dan interpretasinya memakan waktu lama, dan memerlukan keahlian cukup, untuk itu diperlukan pelatihan petugas kesehatan terutama untuk identifikasi spesies yang akurat. Kekurangan yang paling penting dari pemeriksaan mikroskopis adalah kepekaan yang relatif rendah, misdiagnosis dalam menentukan spesies *Plasmodium* khususnya pada tingkat parasitemia rendah, infeksi

campuran dan ketika hanya stadium ring yang tampak dalam sediaan darah malaria (Rodulfo dkk, 2007; Moody ,2000; Tangpukdee dkk, 2009). Beberapa artefak yang dapat menyebabkan terjadinya misdiagnosis malaria diantaranya bagian-bagian darah seperti trombosit, debris yang berasal dari eritrosit *immature* dan limfosit, bakteri, spora, sel-sel tumbuhan, spora dari jamur, partikel-partikel debu, kristal dari pewarna Giemsa (WHO, 1991)

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

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan antara hasil pemeriksaan parasit malaria dengan cara mikroskopis dengan *nested* PCR, dimana dengan pemeriksaan mikroskopis didapatkan hasil positif malaria sebanyak 23 dan dengan *nested* PCR didapatkan hasil positif sebanyak 12. Hal ini mungkin disebabkan proses pewarnaan sediaan darah yang kurang bagus dan adanya artefak-artefak yang mirip sekali dengan inti parasit sehingga menyebabkan terjadinya kesalahan diagnosis pada pemeriksaan mikroskopis (WHO, 1991)

Ibu hamil di daerah endemis yang terinfeksi malaria kadang asimtomatis, 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 dalam pemeriksaan hapusan darah tepi kadang parasit

malaria tidak terdeteksi (Perlmann dan Troye-Blomberg, 2002; Suparman, 2005). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan *nested* PCR pada sampel dengan hasil pemeriksaan mikroskopis negatif yang diambil secara random. Dari hasil pemeriksaan didapatkan semua sampel negatif.

PCR lebih sensitif daripada mikroskopis, mampu untuk identifikasi parasit malaria sampai pada tingkat spesies dan dipakai sebagai metode konfirmasi untuk diagnosis laboratorium malaria (Johnston dkk, 2006). Penggunaan pemeriksaan mikroskopis dan *nested* PCR bersama-sama dapat diperoleh kepastian hasil pemeriksaan 100% (Rudolfo dkk, 2007)

6.3 Mutasi gen PfdHFR pada ibu hamil di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan

Marker molekuler terjadinya resistensi terhadap obat SP ditunjukkan melalui studi *in vivo*, yaitu terjadinya mutasi pada gen penyandi enzim PfdHFR dan PfdHPS pada parasit malaria (Plowe, 2001). Dari hasil penelitian didapatkan bahwa dari 7 sampel ibu hamil yang positif *P. falciparum* semua mengalami mutasi *double* yaitu mutasi gen PfdHFR di kodon 108 dan 51 yaitu N108 dan I51, sedangkan mutasi gen PfdHFR T108 tidak didapatkan dalam penelitian ini, maka dimungkinkan di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan menunjukkan adanya resistensi *P. falciparum* terhadap SP pada penderita malaria *falciparum* maupun infeksi campuran Pf dengan Pv.

Resistensi parasit terhadap pirimethamin berkembang cepat, sesaat setelah dipakai sebagai profilaksis di beberapa wilayah endemis (Mita, 2009). 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 diubah dalam

regimen mingguan resisten berjalan perlahan tetapi mencapai 50-60% dalam waktu 2 tahun (Plowe, 2001).

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 mendatar terhadap obat tersebut (WHO, 2000).

Sampai saat ini SP masih digunakan sebagai obat malaria alternatif di Kabupaten Banjar. Obat SP banyak dijual bebas di apotek dan toko obat, penggunaan dosis obat yang tidak tepat dan ketidakpatuhan masyarakat dalam minum obat memungkinkan terjadinya resistensi. Penggunaan dosis subterapi dengan cara tidak sesuai prosedur, pemberian obat yang tidak sesuai aturan dan penggunaan obat tanpa konfirmasi pemeriksaan parasit malaria merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya resistensi obat antimalaria (Wongsrichanalai, 2002). Penelitian yang telah dilakukan di Thailand menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara perilaku dalam melakukan pengobatan malaria dengan resistensi obat, kebiasaan penduduk untuk memanfaatkan sumber pengobatan yang bervariasi, perilaku untuk melakukan pengobatan sendiri ketika sakit, beredarnya secara luas paket obat malaria yang dikenal dengan "ya chud malaria" untuk setiap kali sakit, tidak ada kepatuhan terhadap obat yang telah ditentukan dan penggunaan terus menerus klorokuin meskipun sudah resmi ditinggalkan untuk pengobatan radikal malaria falciparum oleh National Malaria Control Program di Thailand (Honrado dan Fungladda, 1994)

Faktor berikutnya adalah karakteristik obat, dimana pada obat dengan *long half-life* resistensi berkembang lebih cepat daripada obat dengan *short half-life*. Respon pengobatan dipengaruhi oleh konsentrasi obat dalam darah. Obat dengan *long half life* menghasilkan periode kemopropilaksis yang lama, menimbulkan adanya seleksi bahan residu pada infeksi baru setelah pengobatan infeksi primer ketika obat tetap pada konsentrasi subterapi dalam plasma terutama pada wilayah transmisi malaria yang tinggi. Konsentrasi obat subterapi melenyapkan sebagian parasit yang peka dan menyisakan parasit yang masih bertahan untuk melakukan reproduksi lagi dalam darah, sehingga hal ini memungkinkan dosis terapi melewati toleransi maksimum dan bermanifestasi munculnya resistensi obat (Talisuna, 2007; Wongsrichanalai, 2002; Hastings, 2002).

Resistensi terhadap SP pertama kali dilaporkan di perbatasan Thailand-Kamboja pada tahun 1967, terjadi pada tahun yang sama ketika SP dipakai sebagai lini pertama pengobatan malaria menggantikan klorokuin yang telah resisten. (Wongsrichanalai, 2002). Pada saat itu telah terjadi mutasi *double* (R59 dan N108) dan mutasi *triple* (I51, R59 dan N108), kemudian distribusi mutasi gen PfDHFR meluas ke beberapa wilayah Asia Tenggara lainnya seperti Thailand ditemukan mutasi *quarted* (I51, R59, N108 dan L164), Kamboja, Vietnam dan Myanmar ditemukan mutasi *triple* dan mutasi *double* di Laos (Mita, 2009)

Di Indonesia, kasus resistensi SP pertama kali dijumpai tahun 1979 (WHO-SEARO, 2009). Resistensi SP juga dijumpai di provinsi Nanggroe Aceh Darussalam, Sumatra Utara, Riau, Lampung, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah dan Papua (Marwoto H, 2002; Azlin, 2003; Syafruddin dkk, 2005). Penelitian-penelitian lain mengenai mutasi gen PfDHFR di beberapa wilayah Indonesia menunjukkan hasil yang hampir sama. Penelitian Syafruddin dkk (2003) di Purworejo, Jawa Tengah ditemukan mutasi gen

PfDHFR tunggal N108/T108 atau berpasangan dengan R59/ L164. Schoepflin dkk (2008) dan Marfurt dkk (2008) hasil penelitiannya di Papua New Guinea didapatkan mutasi gen S108N dan 59R, demikian juga penelitian Asih dkk (2009) di Sumba dan Almeida dkk (2009) di Timor Leste juga didapatkan mutasi gen yang sama yaitu N108 dan I51. Tipe mutasi *double* gen PfDHFR yang ada di Indonesia sama dengan yang ditemukan di Afrika yaitu I51 dan N108 (Mita, 2009).

Berdasar fakta-fakta bahwa mutasi *double* gen PfDHFR yang ditemukan dalam penelitian ini mempunyai pola yang hampir sama dengan pola mutasi gen PfDHFR di Asia Tenggara dan Afrika sehingga dimungkinkan adanya penyebaran resistensi obat SP bukan hanya lintas regional tetapi juga penyebaran secara global.

Pada penelitian ini gen PfDHFR yang dianalisa hanya dua kodon yaitu 51 dan 108, dengan melihat pola mutasi *triple* yaitu I51, R59 dan N108 yang telah ada di Asia Tenggara dan di beberapa daerah di Indonesia sehingga dimungkinkan mutasi gen PfDHFR pada *P. falciparum* yang menginfeksi ibu hamil di Sungai Pinang dan Peramasan ini bukan hanya mutasi *double* tapi dimungkinkan juga merupakan mutasi *triple* karena kodon 59 belum dianalisa sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

6.4 Mutasi gen PfDHPS pada ibu hamil di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan

Dalam identifikasi mutasi gen PfDHPS ini didapatkan hasil bahwa dari 7 sampel ibu hamil yang positif *P. falciparum* 6 sampel mengalami mutasi tunggal gen PfDHPS di A437G dan hanya 1 sampel yaitu KH9 yang mengalami mutasi *double* yaitu G437 dan E540.

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 *dihydrohydroxy-methylpterin pyrophosphokinase*, enzim lain dalam jalur metabolisme folat (Cowman, 1998; Plowe, 2001). Mutasi titik yang terjadi pada lima kodon dari gen *Pfdhps* diketahui terlibat dalam memberikan resistensi dengan mengurangi pengikatan obat terhadap enzim (Plowe, 2001). Meningkatnya resistensi terhadap sulfadoksin diperkirakan terjadi beberapa tahun setelah munculnya resistensi terhadap pirimethamin, mutasi pada gen PfdHPS akan semakin meningkatkan derajat resistensi (Hastings dkk, 2002)

Penelitian-penelitian lain mengenai mutasi gen PfdHPS di beberapa wilayah Indonesia, Syafruddin dkk (2003) di Purworejo, Jawa Tengah, Marfurt dkk (2008) dan Schoepflin dkk (2008) di Papua New Guinea dalam penelitiannya menemukan mutasi PfdHPS tunggal G437 atau berpasangan dengan K540E, sedangkan penelitian Asih dkk (2009) di Sumba dan Almeida dkk (2009) di Timor Leste didapatkan mutasi gen tunggal G437.

Dalam penelitian ini didapatkan hanya satu sampel ibu hamil yang mengalami mutasi *double* yaitu pada G437 dan E 540, yang berasal dari wilayah Peramasan. Perubahan topografi wilayah di kabupaten Banjar akibat pembangunan (sosial ekonomi) di hutan seperti pertambangan, hutan tanaman industri dan pertanian menjadi bentuk baru dari habitat vektor malaria. Para pekerja di sektor pertambangan dan kehutanan tidak hanya berasal dari Kalimantan Selatan tetapi juga berasal dari berbagai wilayah di Indonesia termasuk dari Pulau Jawa dan Papua. Di wilayah puskesmas ini sebagian besar kepala rumah tangga bekerja sebagai pekerja musiman di berbagai sektor di wilayah Kalimantan Selatan sehingga dimungkinkan mereka terinfeksi malaria karena pekerjaan mereka. Para pekerja musiman yang terinfeksi malaria mungkin membawa strain baru ke wilayah asal mereka, hal ini dimungkinkan karena parasit malaria, *Plasmodium* mempunyai stadium seksual obligat yang terjadi pada lambung nyamuk *Anopheles* betina, pada saat nyamuk

menggigit manusia, gametosit ikut terisap, dan di dalam tubuh nyamuk, mereka akan berkembang, mengalami fertilisasi dan reproduksi, mengalami pembelahan sel meiosis. Proses ini berhubungan dengan terjadinya rekombinasi genetik, meiosis dapat memunculkan genotipe parasit baru sehingga mempunyai implikasi penting dalam penyebab resistensi obat (Talisuna dkk, 2007; Sherman IW, 1998).

Penebangan hutan yang berpindah-pindah terjadi di Paramasan untuk pembukaan lahan-lahan pendulangan emas dan lahan bercocok tanam baru sehingga menimbulkan banyaknya kubangan yang menjadi habitat baru vektor malaria dan ditemukannya berbagai spesies *Anopheles* merupakan faktor yang mempengaruhi proliferasi parasit resisten, sebagai contoh strain parasit yang resisten terhadap klorokuin lebih tahan untuk melakukan reproduksi daripada strain parasit yang tidak resisten dalam tubuh nyamuk *Anopheles* (Wongsrichanalai, 2002)

6.5 Mutasi *Multiple gen PfDHFR dan PfDHPS pada ibu hamil di wilayah puskesmas Sungai Pinang dan Peramasan*

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa 6 dari 7 sampel ibu hamil yang positif *P. falciparum* mengalami mutasi *triple* yaitu *double PfDHFR* (N108 dan I51) dan mutasi tunggal gen *PfDHPS* G437. Satu sampel mengalami mutasi *quardruple* yaitu *double PfDHFR* (S108N dan N51I) dan *double PfDHPS* (G437 dan E540) (lihat tabel 5.8).

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). Mutasi gen *PfDHFR* menjadi pusat mekanisme resistensi yang penting terhadap obat SP, sedangkan mutasi pada gen *PfDHPS* merupakan tambahan mutasi yang akan semakin meningkatkan derajat resistensi (Hastings, 2002), tetapi penelitian-penelitian baru tentang evolusi molekuler lebih difokuskan pada *PfDHPS* (Mita, 2009)

Sejak resistensi parasit malaria terhadap SP pertama kali dilaporkan di perbatasan Thailand-Kamboja, tekanan selektif terhadap obat SP meningkat dan kemudian menyebar ke wilayah endemis lain di Asia Tenggara (Bloland, 2001, ICMR, 2008) Mutasi *double* gen PfdHFR dan PfdHPS sudah ditemukan disebagian besar wilayah endemis malaria di Melaneisa (Mita, 2009). Telah terjadi penyebaran resistensi parasit malaria terhadap obat SP di Indonesia, hal ini dimungkinkan karena pada penelitian di wilayah Sungai Pinang dan Peramasan serta penelitian yang telah dilakukan diberbagai wilayah Indonesia juga menunjukkan adanya mutasi *multiple* pada gen PfdHFR dan PfdHPS (Schoepflin, 2008; Syafruddin, 2003; Asih, 2009; Almeida, 2009).

Hitung kepadatan parasit/ul darah pada sampel ibu hamil yang mengalami mutasi *multiple* gen PfdHFR dan PfdHPS didapatkan hasil yang bervariasi, dimana pada sampel KH9 yang mengalami mutasi *quardruple* didapatkan kepadatan parasit/ul darah paling rendah. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim (2007) di Nigeria dimana tidak ada hubungan yang signifikan antara marker molekuler dan hiperparasitemia, tetapi mutasi PfdHFR pada kodon 108 berhubungan positif dengan anemia berat pada malaria. Adanya sequestrasi parasit malaria pada berbagai organ sehingga memungkinkan kepadatan parasit/ul sulit diukur dengan pasti (Talisuna dkk, 2007).

Sebagian besar mutasi gen PfdHFR dan PfdHPS pada *P.falciparum* yang menginfeksi ibu hamil terjadi di Peramasan, hal ini dimungkinkan karena perubahan lingkungan yang terjadi di sana dan adanya para pekerja musiman yang mungkin membawa strain parasit baru ke wilayah asal mereka sehingga mempunyai implikasi penting dalam penyebaran resistensi obat. Perubahan hutan menjadi daerah-daerah pertambangan, hutan tanaman industri dan pertanian menjadi bentuk baru dari habitat vektor malaria. Di Uganda telah dilakukan penelitian pada tahun 1999