

KK
KKA
Tr. 03/11
Ari
i

TESIS

IDENTIFIKASI MUTASI GEN *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (PfDHFR) CODON 108 PADA PENDERITA MALARIA FALCIPARUM DI DAERAH ENDEMIS MALARIA PULAU LOMBOK



**PANCAWATI ARIAMI
NIM 090810432**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**IDENTIFIKASI MUTASI GEN *Plasmodium falciparum* dihydrofolate
reductase (PfdHFR) CODON 108 PADA PENDERITA
MALARIA FALCIPARUM DI DAERAH ENDEMIS
MALARIA PULAU LOMBOK**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh:

**PANCAWATI ARIAMI
NIM 090810432**

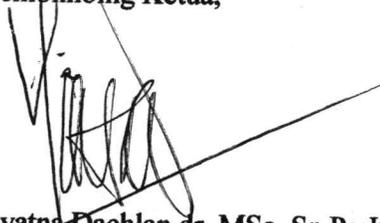
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 26 AGUSTUS 2010**

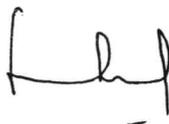
Oleh

Pembimbing Ketua,



**Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc., Sp. ParK.
NIP. 130 359 278**

Pembimbing II,



**Sukmawati Basuki, dr., MSc.
NIP. 132 147 150**

Mengetahui K2PS Ilmu Kedokteran Tropis,



**Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK
NIP 19570307 198403 2 001**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Tesis ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji pada
Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Pada Tanggal 26 Agustus 2010

PANITIA PENGUJI TESIS,

- Ketua** : Prof. Dr. Suharto, dr., Msc., DTMH, Sp.PD., KTI.
- Anggota** : 1. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., Sp.Par.K.
2. Sukmawati Basuki, dr., MSc.
3. Budiono, dr., M.Kes.
4. Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)
5. Prof. Dr. Sri Hidayati B S, dr., MS., DTM., Sp.Par.K.
6. Drs. Herman Budasih, MS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Allah SWT, atas segala Kemuliaan, Kuasa, Rahmat, dan HidayahNya. Salam serta salawat kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan,dr.,MSc.,Sp.ParK. selaku Pembimbing ketua sekaligus dosen Penasehat Akademik selama mengikuti Program Magister Ilmu Kedokteran Tropis yang dengan penuh pengertian dan perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Sukmawati Basuki, dr.MSc. selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan serta saran selama penelitian dan penulisan tesis.

Terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Airlangga Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih,dr.,MS.,Sp.MK atas segala fasilitas, bantuan moral dan spiritual selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Terima kasih kepada Tim Penguji Tesis, yang banyak memberikan masukan, saran serta penilaian dalam penyempurnaan tesis ini.

Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Kesehatan melalui Badan PPSDM dan Pusrengun yang telah memberikan ijin dan bantuan dana Tugas Belajar, sehingga menunjang studi saya di program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Magister di Universitas Airlangga Surabaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta stafnya atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.
3. Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta stafnya atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.
4. Direktur Politeknik Kesehatan dan Ketua Jurusan Analis Kesehatan Depkes Mataram atas ijin dan kesempatan serta dukungan untuk mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

5. Kepala Dinas Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Barat, kabupaten Lombok Barat/Lombok Utara dan Puskesmas beserta staff atas ijin lokasi penelitian dan bantuan data serta proses pengambilan sampel penelitian.
6. Kepala *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya Prof.Dr.Nasronudin,MD. beserta staf atas ijin, bantuan serta segala fasilitas selama penelitian tesis.
7. Sukmawati Basuki,dr.,M.Sc. dan Fitriah,SKM. di labolatorium malaria *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya, atas bantuan dan arahan dalam menyelesaikan pemeriksaan mikroskopis dan molekuler selama penelitian dan masukan dalam penyusunan tesis.
8. Para dosen program pasca sarjana Universitas Airlangga Surabaya atas ilmu, bimbingan, dorongan maupun saran yang diberikan kepada saya.
9. Kepada keluarga tercinta, kedua orang tua : ayahanda H Zulkifli Achmad (Alm.) yang telah meninggalkan kefanaan dunia saat saya baru menyelesaikan proposal dan ibunda Hj Ariam, abang-abang/kakak Drs. H. Eka Doni Zulimar,Apt.; Dwi Zulianti,SE.; Triolid Zuliansyah,dr,Sp.THT; dan H. C Z Akhmad Rasyid,S.Kom. juga adik-adik (ke-6 sampai 10) yang telah banyak memberi bantuan materi dan spirit dalam meringankan beban saya dalam menempuh pendidikan hingga selesai.
10. Suami tercinta Yusuf Akhmad dan anak-anak tersayang Adam Firdas Yuspandhana, Ghossan Fari Yuspanya, dan Digidaya Rayhana Yuspanya atas pengorbanannya yang tak terhingga, memberikan dorongan semangat, pengertian, dan inspirasi yang sangat besar selama saya mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya
11. Rekan-rekan kerja Yunan Jiwintarum,S.Si.M.Kes; Maruni Wiwin Diarti,S.Si.,M.Kes.; Agrijanti,S.Pd.,M.Ked.; Iswari Pauzi,M.Kes. dan rekan kerja lainnya yang banyak memberi bantuan dan saran. Rekan-rekan senasib sepenanggungan Dewi Susilowati,SKM. dan Made Agus Hendrayana,dr.,M.Ked.; Makhfudli,S.Kep.Ns atas perjuangannya di IKT; Siti Zaetun,SKM,M.Kes.; Supriyanto,S.Si.; Tress Paukiran,ST.; Irine Nurmalina Ginanjar,S.Ip.; Rizky Andalusia,S.Ip ; Nursidah,S.Si. ; Roni Yuliwar,S.Kep.Ns.; dan rekan-rekan yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, atas bantuan, semangat serta kebersamaan yang telah diberikan selama perkuliahan, penyusunan dan penelitian.

Akhir kata, semoga Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Bijaksana memberi ketabahan, kesabaran, dan kekuatan dari 'terpaan angin' yang datang dalam kehidupan kita. Amin ya Rabbal 'alamin.

Surabaya, Agustus 2010

Hormat kami,

Penulis

RINGKASAN

Identifikasi mutasi gen *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reduktase (PfdHFR) codon 108 pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok

Malaria di dunia menyebabkan infeksi 350-500 juta dan sekitar 1 juta kematian oleh *Plasmodium falciparum* setiap tahun. NTB sebagai salah satu daerah tujuan wisata di Indonesia angka API masih relatif tinggi sehingga merupakan ancaman bagi wisatawan untuk berkunjung ke daerah ini. Angka *P. falciparum* yang meningkat di wilayah kerja Puskesmas yang menjadi lokasi penelitian mengindikasikan adanya resistensi *P. falciparum* terhadap obat antimalaria. SP merupakan salah satu obat *second line* setelah Klorokuin dinyatakan resisten. Resistensi *P. falciparum* terhadap SP di Indonesia pertama kali terjadi tahun 1979. SP di NTB sudah banyak digunakan pada tahun 1987 dan hasil uji resistensi tahun 1993 secara *in vitro* masih dinyatakan sensitif, sedangkan monitoring molekuler terjadinya resistensi terhadap SP belum pernah dilakukan. Resistensi SP disandi oleh dua gen yaitu *PfDHPS* (Sulfadoksin) dan gen *PfDHFR* (Pirimetamin). Resistensi Pirimetamin menyebabkan mutasi yang disandi oleh gen *DHFR* yang dapat terjadi pada beberapa codon, 108 menjadi kunci mutasi resistensi dengan perubahan asam amino dari serin ke asparagin. Salah satu penyebab terjadinya resistensi adalah penggunaan Sulfadoksin Pirimetamin (SP) sebagai dosis tunggal pengobatan malaria falciparum setelah Klorokuin dinyatakan resisten. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui gambaran mutasi gen *PfDHFR* codon 108 pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok.

Penelitian ini mengambil sampel darah kapiler yang dibuat sediaan tetes tebal dan tetesan darah pada kertas filter. Selain sampel darah karakteristik penderita malaria diketahui dari kuisioner, seperti jenis kelamin, umur, penduduk asli atau pendatang, suhu tubuh (demam). Sediaan tetes tebal di cat dengan zat warna Giemsa ditentukan secara mikroskopis, spesies dan kepadatan parasit per μl darah; dengan menghitung jumlah parasit dalam 200 lekosit dikalikan 8000. Bercak darah pada kertas filter diekstraksi dengan *QIAGEN DNA blood kit*. Hasil ekstraksi DNA diidentifikasi spesies *Plasmodium* dengan tehnik *nested-PCR* menggunakan *Gene Amp PCR System 2700*, *Applied Biosystem*. Hasil *PCR* dapat dilihat dalam foto di transluminator yang dibuat dalam medan elektroforesis gel agarose 2% dan diwarnai dengan ethidium bromida. Mutasi gen *PfDHFR* dengan tehnik *PCR-RFLP*. *The first-round PCR amplification* dilakukan dalam suatu campuran (Promega- Madison, WI, USA) dan ekstrak DNA parasit. Kumpulan *second round PCR* dikerjakan dalam 50- μL campuran yang mengandung 1 μL *primary PCR product*. *The amplified DNA fragments* dipisahkan dengan *electrophoresis* dalam agarose gel 2%. Hasil kumpulan *second round PCR* ditambahkan enzim (New England Biolabs). Dari mutasi *DHFR* 108, *AluI* hanya memotong *wild-type gene* (Ser-108) dalam 323 dan 372 bp, *BsrI* hanya memotong *mutant gene* (Asn-108) dalam 328 dan 372 bp, dan *ScrFI* hanya memotong *mutant gene* (Thr-108) dalam 324 dan 376 bp. Setiap seri sampel yang

digunakan sebagai control negatif adalah air. Untuk deteksi Asn-108, digunakan 3D7 DNA sebagai *wild-type control* dan Dd2-DNA sebagai *mutant control*.

Hasil penelitian dengan jumlah sampel 82 di *cross check* sejumlah 76 positif malaria, 61 sampel dinyatakan positif malaria falciparum baik sebagai infeksi tunggal maupun infeksi campuran (malaria falciparum + malaria vivax). Karakteristik penderita malaria falciparum berdasarkan jenis kelamin 59% laki-laki dan 41% perempuan. Berdasarkan kelompok umur pada anak-anak (< 15 tahun) 39,3% dan dewasa 60,7%. Sebagian besar malaria diderita oleh penduduk asli (91,8%). Penderita yang demam dan positif malaria falciparum 88,5% (54 dari 61 sampel). Kepadatan parasit rata-rata 10.990 per μ l darah. Hasil penentuan mutasi gen *PfDHFR codon 108* sejumlah 54, semua hasil identifikasi berupa mutasi yang disandi oleh asparagin (Asn-108). Tidak ditemukan *wild type* yang disandi oleh Serin maupun *mutant type* lainnya, Threonin.

Kesimpulan penelitian ini adalah penderita malaria falciparum lebih banyak ditemukan pada laki-laki, kelompok umur dewasa (umur > 15 tahun), sebagian besar pada penduduk asli yang menderita demam. Hasil pemeriksaan kepadatan parasit termasuk pada *low to moderate transmission area*. Hasil identifikasi pada gen *PfDHFR* berupa mutasi Asn-108 sebesar 100% (pada 54 sampel) yang merupakan mutasi terhadap pirimetamin. Untuk memastikan hal ini penelitian perlu dilanjutkan pada *PfDHFR codon* lain dan *PfDHPS*, serta efikasi pengobatan dengan Sulfadoksin Pirimetamin (SP).

SUMMARY

Identification of Gene Mutation of *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (PfdHFR) Codon 108 in Falciparum Malarial Patients of Malarial Endemic Area of Lombok Island*

Malaria in the world causing 350-500 million infections and approximately 1 million deaths each year by *Plasmodium falciparum*. NTB as one tourist destination in Indonesia is still relatively high number of *Annual Parasite Incidence (API)* that are a threat to tourists to visit this region. *P. falciparum* rate are increasing in the service area of public health centers under investigation indicated the resistance of *P. falciparum* to antimalarial drugs. SP is one of the second-line drugs after Chloroquine otherwise resistant. *P. falciparum* resistance to SP in Indonesia first occurred in 1979. SP in the NTB has been widely used in 1987 and 1993, the results of resistance testing in vitro was declared sensitive, while the molecular monitoring of resistance to SP has not been done. SP resistance encoded by two genes namely PfDHPS (sulfadoxine) and gene PfDHFR (pyrimethamine). Pyrimethamine resistance caused by mutations that encoded DHFR gene which can occur in some codon, 108 a key resistance mutations with amino acid change from serine to asparagine. One cause of resistance is the use of sulfadoxine pyrimethamine (SP) as a single dose treatment of falciparum malaria after Chloroquine otherwise resistant. The purpose of the present research was to determine characteristics of local patients with malaria by identifying species of *P. falciparum* through using nested-PCR and a gene mutation of *PfdHFR* codon 108 in patients with falciparum malaria.

Samples were capillary blood prepared into thick drops and drops on filter paper. In addition to blood samples, information of characteristics of malarial patients was obtained by the use of questionnaire inquiring sex, age, natives or newcomers, and body temperature (fever). Thick-drop preparations were stained with Giemsa dye in order to microscopically determine species and parasitic density per μl by counting the amount of parasites in 200 leukocytes multiplied by 8000. Blood spots on the filter papers were extracted by means of Qiagen DNA Blood kit. Product of DNA extraction was identified for species of *Plasmodium* by means of nested PCR using Amp PCR System 2700, Applied Biosystem. Product of PCR was visible on the photographs of transilluminator made on the field of 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Gene mutation of *PfdHFR* was performed by using PCR-RFLP. First-round PCR amplification was run in a mixture (Promega-Madison, WI, USA) and extracts of parasitic DNA. A pool of second-round PCR was run in a 50- μl mixture containing 1 μl of primary PCR product. Amplified DNA fragments were separated in 2% gel agarose electrophoresis. An enzyme was added to

product of the second-round PCR. Mutation of *DHFR* 108 indicated that *AluI* only sliced wild-type gene (Ser-108) at 323 and 327 bp; *BsrI* only sliced a mutant gene (Asn-108) at 328 and 372 bp; *ScrfI* only sliced a mutant gene (*Thr*-108) at 324 and 376 bp. In each series of samples, water was used as negative control. The DNA 3D7 was used as wild-type control and DNA Dd2 as mutant control in detection of Asn-108.

Results of research with a sample of 82 with the cross check a number of positive malaria 76, 61 samples tested positive for falciparum malaria infection either as single or mixed infections (malaria falciparum + malaria vivax). Characteristics of patients with falciparum malaria by sex 59% of men and 41% female. Based on the age group of children (<15 years), 39.3% and 60.7% adult. Most of the malaria suffered by indigenous people (91.8%). Patients with fever and positive falciparum malaria 88.5% (54 of 61 samples). The average parasite density of 10,990 per mL of blood. Results *PfDHFR* determination gene codon 108 mutation number 54, all the results of the identification of mutations that encoded by the asparagine (Asn-108). Not found in wild-type encoded by Serin or mutant other type by Threonine.

The conclusion, malarial falciparum patients were more of males, adults (>15 yrs), febrile natives and of *P. falciparum* species. The result rank of parasitic density, low to moderate transmission areas. Results of identification of mutations in the gene *PfDHFR* Asn-108 was 100% (in 54 samples) which are mutations of pyrimethamine . Further investigation was needed on other *PfDHFR* codons and/or *PfDHPS* codons and on the efficacy of treatment with sulphadoxine pyrimethamine (SP).

ABSTRACT

Identification of Gene Mutation of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (PfdHFR) Codon 108 in *Falciparum* Malarial Patients of Malarial Endemic Area of Lombok Island

Gene mutation of *PfdHFR* codon 108 was a preliminary mutation of pyrimethamine. The sequenced DHFR originating from the sensitive pyrimethamine clone 3D7 and other isolates of various degrees of resistance indicated that Ser-108 in the sensitive clone of 3D7 has changed into Asn-108 in the resistant isolates, thereby making Ser-108-Asn a key to resistance mutation of pyrimethamine.

The present research was of explorative by using consecutive sampling in several Public Health Centers of West Lombok Regency. Sampling criteria were patients with clinical malarial symptoms microscopically positive of *P. falciparum*. Method of species determination was of molecular by using nested-PCR of Qiagen originating from blood spots on filter papers (Whatmann 3 mm) followed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Of 82 samples, 76 were malaria-positive and identified as *P falciparum* as was 61 samples. With regard to patients' characteristics, on the basis of sex, 59% was male and 41% was female. In terms of age cohort, 39.3% was children (<15 yr) and 60.7% was adult. Most natives developed malaria (91.8%). Average parasitic density 10.990 per μ l of blood. Determination of gene mutation of *PfdHFR* codon 108 showed 54 mutations, all of which being coded by asparagine (Asn-108). There was no wild type that was coded by both serine and the other mutant type of threonine.

Mutation of Asn-108 was 100% (at 54 sample) found, possibly a mutation occurred in pyrimethamine. Further investigation was needed on the other DHFR codons and/or DHPS codons and on the efficacy of treatment with sulphadoxine pyrimethamine (SP).

Keywords: mutation, *PfdHFR* codon-108 genes, *falciparum* malaria.

DAFTAR ISI



	Halaman
Sampul Depan	
Sampul Dalam	
Prasyarat Gelar	ii
Lembar Persetujuan	iii
Penetapan Panitia Penguji	iv
Ucapan Terima Kasih	v
Ringkasan	vii
Summary	ix
Abstract	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Malaria	
2.1.1 Pengertian	7
2.1.2 Etiologi.....	7
2.1.3 Siklus hidup <i>Plamodium falciparum</i>	8
2.1.4 Morfologi <i>P falciparum</i>	10
2.1.5 Patobiologi malaria	11
2.2 Cara Diagnosis	
2.2.1 Diagnosis klinis	12
2.2.2 Diagnosis laboratorium.....	15
2.3 Obat Antimalaria.....	18
2.3.1 Klasifikasi obat antimalaria	18

2.3.2	Obat antimalaria di Indonesia.....	22
2.4	Resistensi Obat Antimalaria	
2.4.1	Defenisi resistensi obat.....	27
2.4.2	Penyebaran resistensi obat	27
2.4.3	Uji resistensi obat.....	29
2.4.4	Resistensi terhadap Sulfadoksin Pirimetamin.....	30
2.4.5	Mekanisme resistensi SP.....	32
2.5	<i>Folate Pathway</i>	35
2.5.1	Biosintesis <i>folate</i> dalam <i>Plasmodium</i>	36
2.5.2	Target identifikasi obat <i>antifolate</i>	38
2.6	Mutasi gen <i>PfDHFR</i>	
2.6.1	<i>Point mutations</i> dalam respon <i>DHFR</i> dari resistensi <i>in vitro</i>	38
2.6.2	Pemeriksaan mutasi gen	39
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN.....		43
 BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	46
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	46
4.2.1	Populasi dan sampel	46
4.2.2	Besar sampel.....	46
4.2.3	Teknik Pengambilan Sampel.....	47
4.3	Variabel Penelitian	
4.3.1	Klasifikasi variabel	47
4.3.2	Defenisi operasional	48
4.4	Instrumen Penelitian.....	48
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian	
4.5.1	Lokasi penelitian.....	49
4.5.2	Waktu penelitian.....	49
4.6	Alur Penelitian	50
4.7	Prosedur pengambilan atau pengumpulan data	
4.7.1	<i>Informed consent</i>	50
4.7.2	Tehnik mikroskopis	50
4.7.3	Prosedur ekstraksi <i>DNA</i> dengan <i>Qiagen DNA blood kit</i>	52

4.7.4	Prosedur identifikasi spesies <i>Plasmodium</i> dengan teknik <i>nested PCR</i>	54
4.7.5	Prosedur deteksi mutasi genetik den <i>PfDHFR</i> dengan teknik <i>PCR-RFLP</i>	55
4.8	Cara Pengolahan dan Analisa Data	57
 BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN		
5.1	Gambaran umum lokasi penelitian	58
5.2	Gambaran malaria di daerah penelitian	60
5.3	Karakteristik penderita malaria falciparum 64	64
5.4	Hasil Identifikasi mutasi gen <i>PfDHFR codón 108</i>	69
 BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Gambaran malaria di daerah penelitian	73
6.2	Karakteristik penderita malaria falciparum	77
6.3	Hasil identifikasi mutasi gen <i>PfDHFR codón 108</i>	80
6.4	Gambaran mutasi gen <i>PfDHFR codón 108</i>	86
 BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	92
7.2	Saran	92
DAFTAR PUSTAKA		94
LAMPIRAN-LAMPIRAN		100

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Obat antimalaria menurut struktur kimia	20
Tabel 2.2. Perbandingan cepat antara obat sizontosida darah	21
Tabel 2.3. Protein dan Mutasi dihubungkan dengan resistensi obat	34
Tabel 4.1 <i>Primer</i> , kondisi reaksi amplifikasi, enzim restriksi dan <i>DNA</i> kontrol untuk deteksi mutasi genetik gen <i>PfDHFR</i>	56
Tabel 5.1 Luas wilayah, jumlah desa, penduduk, rumah tangga, dan kepadatan penduduk menurut kecamatan di kabupaten Lombok Barat tahun 2008.	59
Tabel 5.2 Data malaria kabupaten Lombok Barat tahun 2006-2009	62
Tabel 5.3 Perbandingan data malaria di Luar Jawa-Bali, NTB, Lombok Barat dan Puskesmas	63
Tabel 5.4 Karakteristik penderita dengan gejala klinis malaria	65
Tabel 5.5 Karakteristik penderita malaria di pulau Lombok.	66
Tabel 5.6 Penduduk dan jenis malaria di pulau Lombok	67
Tabel 5.7 Riwayat pengobatan penderita malaria di Lombok Barat	67
Tabel 5.8 Perbandingan jenis malaria dengan demam, kepadatan parasit dan pengobatan di Lombok	68
Tabel 5.9 Hasil pemeriksaan mikroskopis, <i>nested-PCR</i> , dan identifikasi mutasi gen <i>PfDHFR codon 108</i>	69
Tabel 5.10 Mutasi mutasi gen <i>PfDHFR codon 108</i> dengan metode <i>PCR-RFLP</i> di Lombok	71

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Siklus hidup parasit malaria <i>Plasmodium falciparum</i>	8
Gambar 2.2a. Trophozoites: Stadium darah parasit malaria <i>Plasmodium falciparum</i> : hapusan darah	10
Gambar 2.2b. <i>Plasmodium falciparum</i> : Parasit stadium darah: tetes tebal	11
Gambar 2.3. Area transmisi dan distribusi malaria dilaporkan resistensi atau kegagalan pengobatan dengan obat antimalaria yang terpilih.....	29
Gambar 2.4. Distribusi resistensi Sulfadoksin Pirimetamin (SP) dalam <i>P falciparum</i>	31
Gambar 2.5. Skema metabolisme folate yang disederhanakan.....	33
Gambar 2.6. Struktur <i>dihydrofolate (DHF)</i> menandakan susunan dari separuh <i>pterin</i> , <i>pABA</i> and <i>L-glutamate</i>	36
Gambar 2.7. Mengemukakan <i>de novo and salvage pathways</i> dari <i>tetrahydrofolate</i> pada <i>P. falciparum</i>	37
Gambar 2.8. Siklus pertama dari PCR	40
Gambar 5.1 Peta lokasi pulau Lombok	58
Gambar 5.2 Lokasi penelitian dan peta endemisitas kabupaten Lombok Barat	61
Gambar 5.3 Kondisi penduduk di daerah endemis malaria	62
Gambar 5.4 Identifikasi spesies Plasmodium dengan metode <i>nested PCR</i>	70
Gambar 5.5 Identifikasi mutasi gen PfDHFR dengan metode <i>nested PCR-RFLP</i>	71

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal penelitian	100
Lampiran 2. Penjelasan dan Form Persetujuan Penelitian	101
Lampiran 3. <i>Informed Consent</i>	103
Lampiran 4. Kuisisioner	104
Lampiran 5. Keterangan Kelaikan Etik (<i>Ethical Clearance</i>)	105
Lampiran 6. Ijin penelitian	106
Lampiran 7 Lahan-lahan yang menjadi tempat perindukan nyamuk <i>Anopheles</i> di kabupaten Lombok Barat	108
Lampiran 8 Data karakteristik penduduk dengan gejala klinis malaria di Lombok	109
Lampiran 9 Data karakteristik pengobatan penderita malaria	111
Lampiran 10 Hasil pemeriksaan <i>nested-PCR</i> pada penderita malaria di daerah endemis malaria pulau Lombok	112
Lampiran 11 Hasil pemeriksaan <i>PCR-RFLP codon 108</i> pada penderita malaria <i>falciparum</i> di daerah endemis malaria pulau Lombok	114

DAFTAR SINGKATAN

- ACT = *Artemisinin-based Combination Therapy*
 AMI = *Annual Malaria Incidence*
 API = *Annual Parasite Incidence*
 Asn-108 = Asparagin pada codon 108
 Depkes = Departemen Kesehatan
 DHFR = *dihydrofolate reductase*
 DHPS = *dihydropteroate synthase*
 Dinkes = Dinas Kesehatan
 DNA = *Deoxyribo Nucleic Acid*
 HIA = *Hight Incidence Area*
 HRP-2 = *histidine-rich protein-2*
 KLB = Kejadian Luar Biasa
 LIA = *Low Incidence Area*
 Lobar = Lombok Barat
 Lotim = Lombok Timur
 MIA = *Meso Incidence Area*
 NTB = Nusa Tenggara Barat
 pABA = *p-aminobenzoic acid*
 PCD = *Passive Case Detection*
 PCR = *polymerase chain reaction*
 Pf = *P falciparum = Plasmodium falciparum*
 PfDHFR = *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase*
 pLDH = *parasite-specific lactate dehydrogenase*
 Pm = *P malariae = Plasmodium malariae*
 Po = *P ovale = Plasmodium ovale*
 Pv = *P vivax = Plasmodium vivax*
 Puskesmas = Pusat Kesehatan Masyarakat
 RDT = *Rapid Diagnostic Test*
 RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 SP = Sulfadoksin Pirimetamin
 SPR = *Slide Positivity Rate*
 Thr-108 = threonin pada codon 108

BAB 1 PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN**1.1 Latar Belakang**

Malaria adalah satu dari banyak penyakit parasit pada manusia yang tersebar di daerah tropis dan subtropis; lebih dari dua per tiga populasi dunia hidup di daerah endemi. Sekitar tahun 1950 dimulai insiden tahunan penyakit yang diperkirakan 250 juta kasus dengan 2,5 juta kematian pertahun (Harijanto, 2000). Setiap tahun malaria menyebabkan infeksi 350-500 juta di seluruh dunia dan sekitar 1 juta kematian (CDC, 2004). Setengah dari penduduk dunia terancam malaria, dan diperkirakan pada tahun 2008 terdapat 243 juta kasus yang menyebabkan kematian 863.000 orang (WHO, 2009).

Di Indonesia *Annual Parasite Incidence* (API) di Jawa-Bali tahun 2006 sebesar 0,19 ‰ dan tahun 2007-2008 0,16 ‰; sedangkan *Annual Malaria Incidence* (AMI) di luar Jawa-Bali tahun 2006 dan 2007 masing-masing 23,98 ‰ dan 19,67 ‰ (Laihad dan Arbani, 2010). Berdasarkan data malaria propinsi Nusa Tenggara Barat (NTB) tahun 2007 AMI 21,3 ‰, tahun 2008 23,56 ‰ dengan angka *Plasmodium falciparum* (*P falciparum*) tertinggi ditemukan di kabupaten Lombok Barat (Lobar) 77,44 ‰ dan Lombok Timur (Lotim) 75,70 ‰. *Annual Parasite Incidence* (API) NTB tahun 2008 sebesar 5,03 ‰; tertinggi di kota Bima sebesar 67,56 ‰ sedangkan Lombok Barat dan Lombok Timur masing-masing sebesar 1,88 ‰ dan 1,34 ‰. AMI NTB tahun 2009 sebesar 20,29 ‰, API 3,41 ‰; Lombok Barat AMI 17,45 ‰ dan API 3,15 ‰, dan kabupaten Lombok Utara AMI 22,85 ‰, dan API 4,25 ‰ (Dinkes Provinsi NTB, 2010).

Berdasarkan data dari kantor Statistik kabupaten/kota tahun 2008, Lombok

Barat dengan luas wilayah 1.672,15 km², 121 desa, dan jumlah penduduk 816.523 orang. Kecamatan Batulayar (Puskesmas Meninting) luas wilayah 34,11 km², terdiri dari enam desa, dan jumlah penduduk 36.665 orang. Kecamatan Gunungsari dengan luas wilayah 89,74 km², jumlah penduduk 77.128 orang terdiri atas 12 desa. Kecamatan Tanjung dengan luas wilayah 115,64 km², 6 desa, dan jumlah penduduk 816.532 orang. Berdasarkan data Dinkes provinsi NTB Oktober 2009, Puskesmas di Lombok Barat dengan jumlah penderita malaria tertinggi masing-masing Tanjung 68, Gangga 43, Penimbung 34, Meninting 22, dan Gunungsari 17. Data bulan April dan Mei 2010 dari Puskesmas Meninting menunjukkan penderita dengan gejala klinis malaria masing-masing sebanyak 112 (47 Pf, 18 Pv) dan 132 (30 Pf, 28 Pv). Pencarian penderita yang dilakukan langsung ke lapangan menyebabkan penemuan penderita menjadi lebih cepat (khususnya di Puskesmas Meninting), walaupun dari Puskesmas lain jumlah penderita yang datang ke Puskesmas sangat menurun. Peningkatan angka *P falciparum* menunjukkan adanya resistensi yang beredar di masyarakat, terutama pada masyarakat dengan penghasilan rendah, pendidikan dan pengetahuan rendah serta kemampuan untuk datang berobat juga rendah.

Hampir semua kematian yang diakibatkan oleh penyakit malaria disebabkan oleh *P falciparum*. Penderita malaria falciparum, jika tidak segera di terapi dapat berlanjut pada komplikasi. Pengobatan malaria bertujuan untuk menyembuhkan penderita, mencegah kematian, mengurangi kesakitan, mencegah komplikasi dan relaps, serta mengurangi kerugian sosial ekonomi akibat malaria. Di sisi lain pengobatan dapat mengalami hambatan yang disebabkan oleh faktor-faktor produksi obat yang tidak sesuai kualitas bahkan palsu, pendistribusian tidak sesuai dengan kebutuhan atas indikasi kasus, pemberian obat tidak sesuai dosis

standar operasional prosedur (SOP), penderita tidak minum obat sesuai dengan dosis standar pengobatan yang diberikan (Anonim, 1999). Sulfadoksin Pirimetamin (SP) adalah obat anti malaria yang mempunyai waktu paruh panjang (*long half life*), yaitu pirimetamin 3-4 hari dan sulfadoksin 7-9 hari (Kakkilaya, 2006; Gunawan, 2010) sehingga parasit mempunyai cukup waktu beradaptasi yang memungkinkan obat menjadi resisten. SP merupakan salah satu obat yang aman dikonsumsi, baik sebagai profilaksis maupun sebagai terapi bagi ibu hamil yang akan ke atau tinggal di daerah endemis malaria. SP sampai sekarang masih beredar, baik di apotik maupun di toko-toko obat di daerah endemis malaria di pulau Lombok.

Program pengobatan malaria di NTB dari Klorokuin/SP diganti menggunakan *Artesunate Combination Therapy* (ACT) yang telah diuji coba sejak tahun 2006 dan serentak dilaksanakan di semua kabupaten pada bulan Maret 2008. Walaupun demikian, penggunaan obat-obat antimalaria *non ACT* masih digunakan terutama pada penderita malaria *falciparum* tanpa komplikasi di daerah terpencil, di kabupaten Sumbawa, Lombok Utara, dan di Lombok Timur (Dinkes Provinsi NTB, 2009).

Antimalaria golongan antifolat yang menghasilkan resistensi *P. falciparum* yang disandi oleh gen *dihydrofolate reductase* (DHFR). Permulaan mutasi *P. falciparum* selalu dimulai pada posisi 108 (biasanya dari serine ke asparagine), yang menurunkan kerentanan obat hanya sepuluh kali lipat, tetapi tidak mempengaruhi respon terapi. Mutasi pada posisi 51 dan 59 berhubungan dengan meningkatnya resistensi pirimetamin. Infeksi dengan *triple* mutan berhubungan dengan resistensi tapi beberapa respon terapi biasanya terlihat. Mutasi pada posisi 164 (isoleucine ke leucine) menyebabkan antifolate menjadi

tidak efektif sama sekali (Peterson et al, 1988; Yuthavong, 1996; Khan et al, 1997; Jelinek et al, 1998; Aubouy et al, 2003; WHO, 2006). Pada analisa genetik antara *P falciparum* yang sensitif dan resisten terhadap pirimetamin menunjukkan bahwa fenotip Asn-108 merupakan determinan obat resisten (Peterson et al, 1988). Pada transfektan *P falciparum*, gen *DHFR* yang mengandung Asn-108 dan alel lain yang mengandung Thr-108, Ile-51, dan Arg-59 mampu menunjukkan resistensi pirimetamin dalam beberapa tingkatan, sehingga parasit menjadi resisten terhadap obat (Wu et al, 1996).

Resistensi SP disandi oleh dua gen yaitu *PfDHPS* untuk Sulfadoksin dan gen *PfDHFR* untuk Pirimetamin. Mutasi titik pada enzim *dhfr/dhps* berperan pada terjadinya resistensi obat antifolat (Peterson et. al., 1988), menyebabkan ikatan afinitas menurun antara enzim dengan inhibitorynya. Obat ini bekerja menghambat pembentukan asam folat yang mengikat enzim *dhfr/dhps*. Asam folat digunakan untuk pembentukan asam nukleat pada inti parasit (Tjitra, 2000).

Resistensi *P falciparum* terhadap obat antimalaria yang multi resisten (Klorokuin, SP, dan Amodiakuin) di Indonesia periode 1973-1996 tercatat di 3 daerah, yaitu Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, dan Timor Timur. Sedangkan pada periode 1996-2003 resistensi *P falciparum* terhadap SP tercatat di 7 provinsi dengan 10 lokasi (www. Search.WHO, 21 September 2010). Proporsi *PfDHFR codon* 108 di beberapa daerah yang pernah dilakukan antara lain di Purworejo-Jawa Tengah 84,7% (Syafuruddin et. al., 2003); di Alor-NTT 71,2%, dan Lampung 87,2% (Agustina, 2005); Peruvian Amazon 100% (Kublin et al, 1998); Brazil 90%, akan tetapi di Narin Columbia Asn-108 dan Thr-108 masing-masing sebesar 59% dan 11% (Giraldo, 1998); Nigeria 79% (Happi et al, 2005); Mozambique 93% (Fernandes et al, 2007); dan Burkina Faso-Belgia 76,2% (Tinto et al, 2007).

NTB terdiri atas dua kota dan tujuh kabupaten. Kabupaten Lombok Barat banyak mempunyai daerah tujuan wisata, seperti sepanjang pantai Senggigi di Lombok Barat sampai ke pantai Malimbu dan pantai Sire merupakan daerah endemis malaria. Adanya tempat perindukan nyamuk *Anopheles* seperti lagoon, rawa dan aliran sungai terputus, memungkinkan penyebaran malaria terus berlanjut. Penggunaan SP di NTB sudah banyak digunakan pada tahun 1987. Pada masyarakat daerah pantai dengan informasi, mobilisasi dan transmisi penduduk; daerah pegunungan yang jauh dari jangkauan puskesmas menyebabkan penggunaan SP yang praktis masih banyak digunakan (*unpublished*). API yang masih tinggi merupakan ancaman baik bagi wisatawan domestik maupun mancanegara untuk berkunjung ke daerah ini.

Hasil uji resistensi SP di NTB tahun 1993 secara *in vitro* dinyatakan sensitif. Pola resistensi SP dapat terjadi karena termasuk obat dengan *long half life*, kontak parasit yang terus menerus dan penggunaan SP sebagai profilaksis maupun pengobatan dalam waktu lama memungkinkan adanya resistensi, maka perlu dilakukan penelitian tentang " Identifikasi Mutasi gen *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (PfdHFR) codon 108* pada penderita malaria *falciparum* di daerah endemis malaria pulau Lombok".

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan tersebut, maka rumusan masalah yang dikemukakan adalah bagaimanakah gambaran mutasi gen *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (PfdHFR) codon 108* pada penderita malaria *falciparum* di daerah endemis malaria pulau Lombok.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum penelitian

Untuk mengetahui gambaran mutasi gen *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (PfdHFR) codon 108* pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok.

1.3.2 Tujuan khusus penelitian

1. Menentukan karakteristik penderita malaria falciparum di daerah endemis pulau Lombok.
2. Mengidentifikasi mutasi gen *PfdHFR codon 108* pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok.
3. Mencari gambaran mutasi gen *PfdHFR codon 108* menurut karakteristik penderita malaria falciparum di daerah endemis pulau Lombok.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan: untuk mendapatkan informasi yang lebih jelas tentang mutasi gen *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (PfdHFR) codon 108* pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok.
2. Bagi program pembangunan dan masyarakat: memberikan masukan dalam kebijakan pengobatan dan profilaksis pada ibu hamil dan masyarakat yang berada di atau yang akan ke daerah endemis malaria.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

2.1.1 Pengertian

Malaria adalah penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh parasit dari genus *Plasmodium*, yang ditularkan melalui gigitan nyamuk Anopheles dengan gambaran penyakit berupa demam yang sering periodik, anemia, pembesaran limpa dan berbagai kumpulan gejala oleh karena pengaruhnya pada beberapa organ misalnya otak, hati dan ginjal (Prabowo, 2004).

2.1.2 Etiologi

Nama malaria berasal dari Italia mal – aria atau udara buruk, dengan kata lain untuk menggambarkan malaria yang berasal dari bahasa Latin yang berarti rawa. Penyebab penyakit malaria termasuk ke dalam:

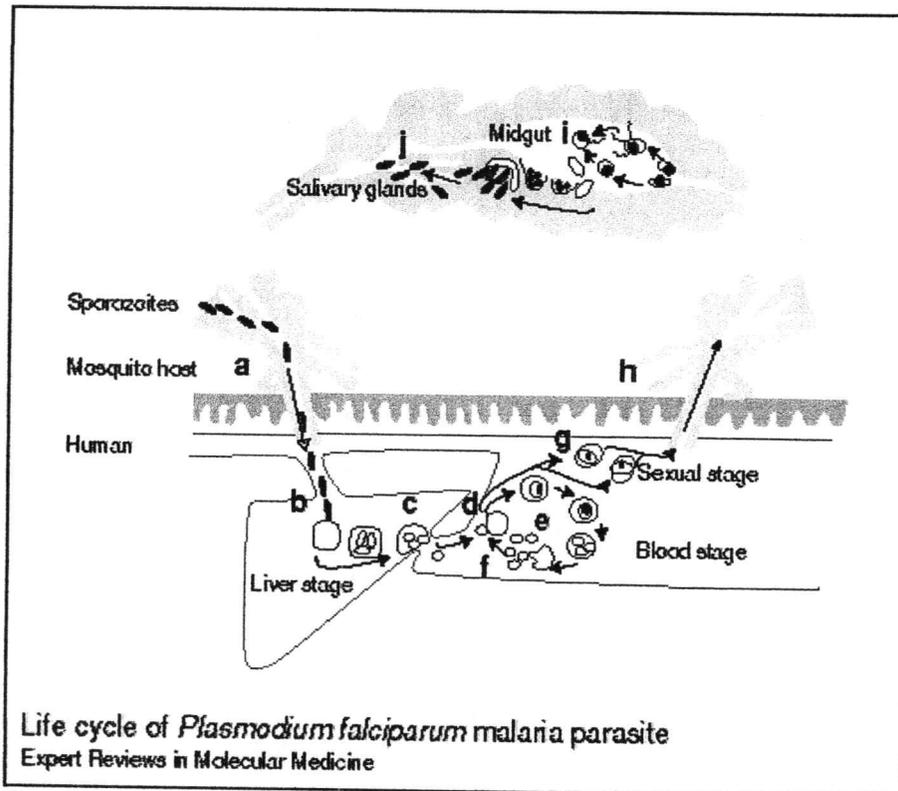
Filum : Apicomplexa
 Kelas : Aconsoidasida (Sporozoasida)
 Ordo : Haemosporida
 Famili : Plasmodiidae
 Genus : Plasmodium (Wikipedia, 2009)

Spesies yang menyerang manusia, yaitu :

- *Plasmodium vivax* menimbulkan malaria vivax (malaria tertiana ringan).
- *Plasmodium falcifarum* menimbulkan malaria falcifarum (malaria tertiana berat), malaria pernisiiosa dan *blackwater fever*.
- *Plasmodium malariae* menimbulkan malaria kuartana,
- *Plasmodium ovale* menimbulkan malaria ovale.

Keempat spesies plasmodium tersebut dapat dibedakan morfologinya dengan membandingkan bentuk skizon, bentuk trofozoit, dan bentuk gametosit yang terdapat di dalam darah tepi maupun bentuk pre-eritrositik dari skizon yang terdapat di dalam sel parenkim hati. *Plasmodium falciparum*, ditemukan oleh Welch, 1897 (Prabowo, 2004).

2.1.3. Siklus Hidup *Plasmodium falciparum*



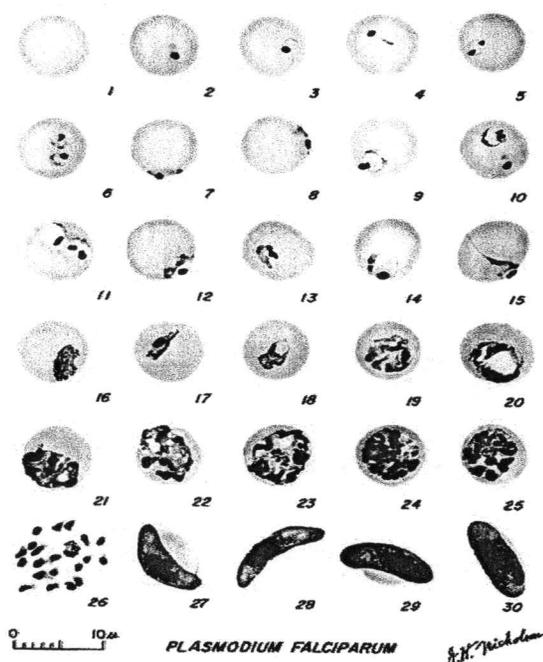
Gambar 2.1. Siklus hidup parasit malaria *Plasmodium falciparum* (www.geocities.com/aaadeel/Malaria.html).

Malaria disebabkan oleh infeksi parasit protozoa intraseluler obligat dari genus *Plasmodium*. Diantara 4 spesies yang menginfeksi manusia (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium malariae*), *P. falciparum* yang sebenarnya bertanggung jawab pada semua kematian. Siklus hidup *Plasmodium* spp. kompleks dan agak spesifik pada spesies parasit ini.

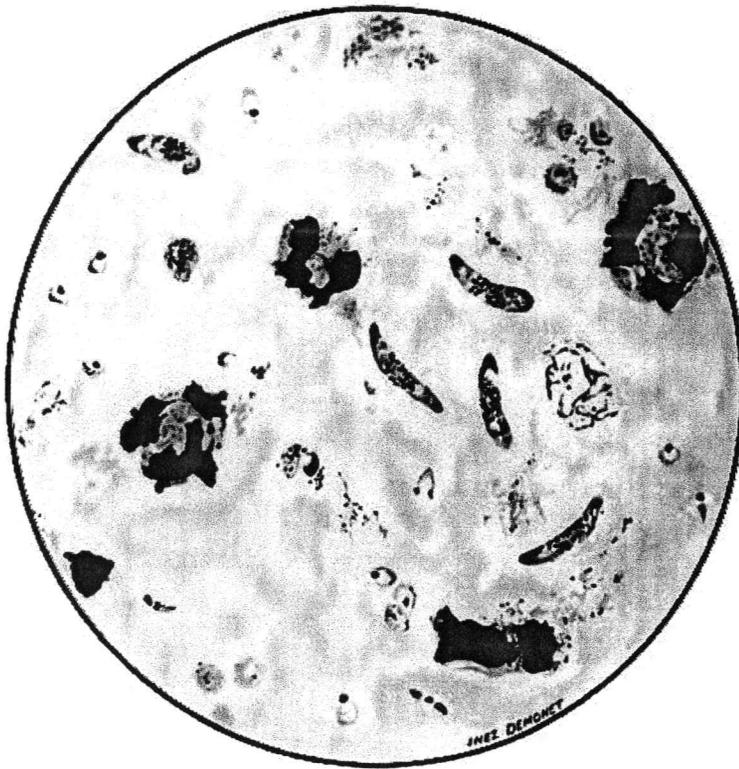
- (a) Infeksi *P. falciparum* pada manusia dimulai dengan nyamuk *Anopheles sp.* yang terinfeksi mengisap darah dan memasukkan sporozoit infeksi ke dalam peredaran darah tepi.
- (b) Dalam beberapa menit, sporozoit ini menyerang sel hati (*hepatocytes*) dan sekitar lebih dari 1 minggu kemudian mengadakan perkembangbiakan secara aseksual, menghasilkan 10 sampai ribuan merozoit.
- (c) Bila menginfeksi *hepatocyte rupture*, merozoit dilepaskan ke dalam peredaran darah tepi.
- (d) Merozoit menyerang eritrosit dan
- (e) perkembangbiakan yang lengkap terjadi dalam 48–72 jam, memproduksi 16–20 merozoit per eritrosit, yang dalam prosesnya menelan haemoglobin.
- (f) Pelepasan merozoit menyerang eritrosit lain dan terbawa dalam siklus. Merozoit dilepaskan secara bersamaan yang sebagian kecil menjadi *responsible*, hal ini dihubungkan dengan periode demam malaria.
- (g) Beberapa merozoit tidak memisahkan diri, tapi dibedakan kedalam bentuk seksual jantan (*microgametocyte*) dan betina (*macrogametocyte*).
- (h) Bentuk seksual ini keluar dari peredaran darah oleh gigitan nyamuk *Anopheles sp.* dan
- (i) Perkawinan dalam lambung nyamuk membentuk *zygotes*. *Zygotes* berubah menjadi bentuk *motile* (disebut *ookinetes*), migrasi ke dinding usus dan memisahkan diri dalam *oocysts* ke luar dinding usus membentuk ribuan *sporozoites*.
- (j) Sporozoit infeksi dilepaskan ke dalam *haemocoel* nyamuk dan bergerak ke kelenjar ludah, dimana mereka menunggu menggigit orang lain, hingga melengkapi siklus hidup.

2.1.4. Morfologi *P. falciparum*

Morfologi parasit malaria secara umum berbentuk *ring*, berukuran 1-2 μm , walaupun bentuk lain ada juga. Bentuk parasit seksual (gametosit) lebih besar dan berukuran 7-14 μm . Gametosit *P. falciparum* paling besar dan berbentuk pisang, sedangkan gametosit spesies lain kecil, yang paling kecil dan bulat *P. vivax* menyebabkan *stippling* sel eritrosit yang terinfeksi (Gambar 2.2a dan Gambar 2.2b).



Gambar 2.2a. *Trophozoites*: Stadium darah parasit malaria *Plasmodium falciparum*: hapusan darah. Gambar 1. Eritrosit normal. Gambar 2-18: *Trophozoites* (diantara ini, Gambar. 2-10 sama dengan stadium *ring-trophozoites*); Gambar 19-26: *Schizonts* (Gambar 26 *ruptured schizont*); Gambar. 27, 28: *macrogametocytes* (betina) matang; Gambar 29, 30: *microgametocytes* (jantan) matang (CDC. *Illustrations from*: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. *The Primate Malariae*. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, 1971)



Gambar 2.2b. *Plasmodium falciparum*: Parasit stadium darah: tetes tebal (CDC. Illustrations from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960).

2.1.5. Patobiologi Malaria (*P falciparum* dan *P vivax*)

Proses patologi pada malaria adalah akibat siklus eritrositik. Merozoit menyerang eritrosit dari bentuk trophozoit sampai sizon. Pada kasus *P. falciparum* proses ini mengikuti perubahan terhadap eritrosit terinfeksi. Pada manusia, malaria falciparum berat dengan komplikasi mengubah banyak fungsi normal jaringan dan organ. Fenomena sekuestrasi eritrosit terinfeksi parasit mungkin menyebabkan disfungsi serebral, jantung, ginjal, paru-paru, dan gastrointestinal (Harijanto,2000).

Sifat malaria yang ditimbulkan oleh plasmodium manusia berbeda-beda menurut spesies yang menginfeksi. Derajat parasitemia yang dihasilkan oleh

berbagai Plasmodium sangat berbeda. *P. vivax* (mungkin juga *P. ovale*) menyerang eritrosit termuda (retikulosit), sehingga pada saat penemuan tidak lebih dari 2% eritrosit terserang. *P. malariae* cenderung menyerang eritrosit yang lebih matang dan infeksi jarang lebih dari 1 %. Sedangkan parasit *P. falciparum* mempunyai afinitas terhadap setiap eritrosit tanpa memandang umur, dengan konsekuensi angka infeksi eritrosit menjadi sangat tinggi, sehingga sering menyebabkan komplikasi berat. Beratnya malaria falciparum adalah proporsional terhadap densitas parasit didalam pembuluh internal dan tidak pada sirkulasi perifer. Serangan sering mendadak, rigor jarang sekuat pada malaria lain, paroksismalnya kurang teratur dan pada infeksi berat demam sering terus menerus. Kerap kali pada semua bentuk malaria tipe paroksismal sangat dimodifikasi, baik sifat maupun regularitasnya. Syok, malaria serebral, gagal ginjal akut, hemolisis, manifestasi hematologik lain dan edema paru telah banyak dialami, berpotensi memberi komplikasi fatal. (Harijanto,2000).

2.2. Cara diagnosis

2.2.1 Diagnosis klinis (tanpa pemeriksaan Laboratorium) dibedakan atas:

1. Malaria klinis ringan/tanpa komplikasi
2. Malaria klinis berat/dengan komplikasi

Anamnesis pada malaria ringan/tanpa komplikasi:

- Harus dicurigai malaria pada 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 $> 37,5^{\circ}\text{C}$
- Dapat ditemukan pembesaran limpa
- Dapat ditemukan anemia
- Gejala klasik malaria khas terdiri dari tiga stadium yang berurutan, yaitu *menggigil (15- 60 menit), demam (2-6 jam), berkeringat (2-4 jam)*

Di daerah endemis malaria, pada penderita yang telah mempunyai imunitas terhadap malaria, gejala klasik di atas tidak timbul berurutan, bahkan tidak semua gejala tersebut dapat ditemukan. Selain gejala klasik di atas, dapat juga disertai gejala lain/gejala khas setempat, seperti lemas, sakit kepala, mialgia, sakit perut, mual/muntah, dan diare (Suparman, 2005).

Malaria falciparum tanpa komplikasi digolongkan sebagai malaria ringan adalah penyakit malaria yang disebabkan *Plasmodium falciparum* dengan tanda klinis ringan terutama sakit kepala, demam, menggigil, dan mual tanpa disertai kelainan fungsi organ (Tarigan, 2003).

2. Malaria klinis berat dengan komplikasi

Malaria berat adalah bentuk malaria falciparum serius dan berbahaya, yang memerlukan penanganan segera dan intensif. Oleh karena itu pengenalan tanda-tanda dan gejala-gejala malaria berat sangat penting bagi unit pelayanan kesehatan untuk menurunkan mortalitas malaria. Beberapa penyakit penting yang mirip dengan malaria berat adalah meningitis, ensefalitis, septikemia,



demam tifoid, infeksi virus, dll. Hal ini menyebabkan pemeriksaan laboratorium sangat dibutuhkan untuk menambah kekuatan diagnosis.

Malaria *falciparum* dengan komplikasi umumnya digolongkan sebagai malaria berat yang menurut WHO didefinisikan sebagai infeksi *Plasmodium falciparum* stadium aseksual dengan satu atau lebih komplikasi sebagai berikut :

- a. Malaria serebral yang ditandai dengan koma dan tidak bisa dibangunkan.
- b. Anemia berat (Hb < 5 gr% atau hematokrit > 15 %)
- c. Gagal ginjal akut (urine <400 ml/24 jam dewasa atau <12 ml/kgBB pada anak-anak setelah dilakukan rehidrasi, disertai kreatinin >3 mg%)
- d. Edema paru / ARDS (*adult respiratory distress syndrome*)
- e. Hipoglikemia : Gula darah < 40 mg%
- f. Gagal sirkulasi atau Syok : Tekanan darah sistolik < 70 mmHg .
- g. Perdarahan spontan dari hidung, gusi, saluran pencernaan, dan atau disertai kelainan laboratorium adanya gangguan koagulasi intravaskular.
- h. Kejang berulang lebih dari 2 kali /24 jam.
- i. Asidemia (pH<7,25) atau asidosis metabolik (Plasma bikarbonat <15 mmol/L)
- j. Makroskopik hemoglobinuria oleh karena infeksi malaria akut (bukan karena obat anti malaria pada kekurangan G6PD) (Tarigan, 2003; Suparman, 2005).
- k. *Jaundice* (bilirubin > 3 mg%)
- l. Gangguan keseimbangan cairan, elektrolit dan asam-basa.
- m. Kelemahan yang sangat (*severe prostration*)
- n. Hiperparasitemia
- o. Hiperpireksia (suhu > 40°C). (Suparman, 2005)
- p. Diagnosa *post mortem* dengan ditemukannya parasit yang padat pada pembuluh darah kapiler otak (Tarigan, 2003).

Malaria falciparum tanpa komplikasi dapat menjadi berat (komplikasi) jika tidak diobati secara dini dan semestinya (Suparman, 2005).

2.2.2 Diagnosis laboratorium

Diagnosis pasti malaria dilakukan di laboratorium dengan identifikasi mikroskopik parasit dalam hapusan darah. Secara teori darah yang terinfeksi *falciparum* sebagian besar terbawa setelah puncak demam dengan memperlihatkan *ring form* dan sebelum eritrosit pada stadium akhir menghilang dalam kapiler organ yang mengalami sizogoni. Gametosit dari ke-4 spesies malaria dilihat dalam darah secara berkelanjutan. Secara praktis, darah diperiksa pada saat penderita pertama ditemukan dan pada interval 6 jam sesudah parasit masuk. Parasit tidak ditemukan antara penyerangan, sesudah pengobatan, selama proses terapi. Darah diperiksa pada 3-4 hari berturut-turut sebelum malaria dapat mengulang siklus baru. Pada hapusan dapat diperiksa kira-kira 15 menit. Pigmen dilihat pada netrofil (*polymorphonuclear =pmn*). Pada tetes tebal untuk petugas yang berpengalaman metode ini lebih dapat dipercaya untuk deteksi parasit malaria, khususnya bila jumlah parasit sedikit. Bila diagnosis laboratorium negatif atau tidak tersedia, kepercayaan harus ditempatkan pada gejala dan tanda-tanda klinik serta respon obat (Brown, 1969).

Diagnosis malaria termasuk identifikasi parasit malaria atau antigen/produknya dalam darah penderita. Hasil identifikasi dan interpretasi parasitemia malaria pada uji diagnosis tergantung dari beberapa faktor seperti:

- *erythrocytic schizogony*
- perbedaan endemisitas dari spesies yang berbeda
- pergerakan/perkembangan populasi yang berhubungan dengan tingkat transmisi, imunitas, parasitemia, dan gejala

- masalah *recurrent malaria*
- resistensi obat, parasitemia tetap hidup ataupun tidak
- sequestrasi parasit pada organ dalam
- penggunaan kemoprofilaksis atau kejadian pencegahan pengobatan pada dasar diagnosis klinik.

Diagnosis malaria dikonfirmasi melalui pemeriksaan darah dan dapat dibagi dalam uji mikroskopik dan non-mikroskopik (Kakkilaya, 2009).

1. Uji mikroskopis

Hampir 100 tahun visualisasi mikroskopis langsung dari parasit pada tetes tebal atau hapusan darah diterima sebagai metode untuk diagnosis malaria dalam beberapa keadaan, dari laboratorium klinik sampai hasil survey. Pemeriksaan yang hati-hati dari preparat yang baik dan pewarnaan sediaan hapusan darah yang baik tetap sebagai "*gold standard*" dari diagnosis malaria (Kakkilaya, 2009).

Pada pemeriksaan hapusan darah tepi, mikroskop cahaya dari pewarnaan tetes tebal dan hapusan darah tetap merupakan metode standar untuk diagnosis malaria. Tetes tebal 20–40 kali lebih sensitif daripada sediaan hapusan pada uji *screening*, dengan batas deteksi 10–50 trofosoit/ μ l. Hapusan darah mendeteksi satu identitas spesies malaria (termasuk diagnosis infeksi campuran), mengukur parasitemia, dan menilai kehadiran pigmen sizon, gametosit, dan pigmen malaria dalam netrofil dan monosit. Akurasi diagnosis tergantung pada kualitas hapusan darah dan pengalaman petugas laboratorium (Kakkilaya, 2009).

Sebelum melaporkan hasil negatif pada paling sedikit 200 hasil pengamatan pada perbesaran 1000x yang diperiksa pada tetes tebal dan hapusan

tipis, yang mempunyai sensitivitas 90%. Parasitemia dapat diperlihatkan sebagai salah satu persentase parasitisasi eritrosit atau sebagai jumlah parasit/ul darah. Pada malaria non falciparum, parasitemia jarang ditemukan melebihi 2%, sebaliknya dapat menjadi amat tinggi (>50%) pada malaria falciparum. Dalam individu yang non imun, hiperparasitemia (parasitemia >5% atau >250.000 parasit/ul) umumnya dihubungkan dengan penyakit berat (Kakkilaya, 2009).

Pada malaria falciparum, parasitisasi eritrosit mungkin dapat terasing dalam jaringan kapiler sehingga menghasilkan penghitungan parasit menjadi *false* rendah dalam darah perifer. Perkembangan stadium dari parasit dilihat pada hapusan darah mungkin membantu menilai beratnya penyakit lebih baik daripada penghitungan parasit sendiri. Banyaknya parasit bentuk matur (>20% sebagai parasit trophozoit tua dan sizon) dan lebih dari 5% netrofil yang mengandung pigmen malaria menunjukkan penyakit lebih lanjut dan prognosis semakin buruk. *False negative* membuat diagnosis malaria sangat tidak disukai (khususnya bentuk berat); walaupun hapusan dapat diulangi setiap 6-12 jam sampai 48 jam jika masih dicurigai malaria (Kakkilaya, 2009).

False negative yang terjadi dalam infeksi berat, mungkin disebabkan oleh pengobatan antimalaria atau oleh sequestrasi sel parasitisasi di dasar *vascular* dalam. Pada kasus ini, parasit, atau pigmen malaria mungkin didapat dalam aspirasi sumsum tulang. Pigmen malaria diperlihatkan dalam sirkulasi netrofil dan monosit kemungkinan memberi kesan malaria (Kakkilaya, 2009).

2. Uji Non-Mikroskopis

- a. *Rapid Diagnostic Tests* (RDTs) mendeteksi sirkulasi spesies spesifik target antigen parasit salah satu dari *histidine-rich protein-2* (HRP-2)

atau *parasite-specific lactate dehydrogenase* (pLDH) dari *P. falciparum* (Kakkilaya, 2009).

- b. Uji dasar pada *polymerase chain reaction* (PCR) untuk spesies spesifik genom Plasmodium lebih sensitif dan spesifik daripada uji lain, mendeteksi kurang dari 10 parasites/ μ l darah (Kakkilaya, 2009).

Oleh karena itu, uji yang paling sederhana dan pasti adalah mempelajari waktu yang tepat hapusan darah tepi dari parasit malaria. Tidak satupun uji terbaru lain melebihi '*gold standard*' hapusan darah tepi (Kakkilaya, 2009).

2.3. Obat Anti Malaria

Obat antimalaria yang ideal adalah obat yang efektif terhadap semua jenis dan stadium parasit, menyembuhkan infeksi akut maupun laten, cara pemakaian mudah, harga terjangkau oleh seluruh lapisan masyarakat dan mudah diperoleh, efek samping ringan dan toksisitas rendah (Harijanto, 2000).

Obat antimalaria yang tersedia di Indonesia terdiri dari obat-obat lama seperti klorokuin, sulfadoksin-pirimetamin, kina dan primakuin. Beberapa obat baru masih terbatas di daerah tertentu dan belum direkomendasikan secara luas oleh Depkes. Contoh obat baru tersebut adalah kombinasi Artesunate dengan Amodiaquin, kombinasi Artesunate dengan Meflokuin, kombinasi Artemisin dengan Naflokuin, dan Artemeter injeksi (Zein, 2005).

2.3.1 Klasifikasi obat anti malaria

Obat anti malaria dapat diklasifikasikan menurut aktivitas dan struktur.

1. Menurut aktivitas zat anti malaria:

- a. Sizontosida jaringan untuk penyebab profilaksis: bekerja pada bentuk jaringan primer setelah pertumbuhan Plasmodium di dalam hati dan

berfungsi sebagai profilaksis, mulai stadium eritrositik. Stadium ini diblokir, untuk mencegah pengembangan infeksi lebih lanjut secara teoritis. Pirimetamin dan primakuin memiliki aktivitas ini. Namun tidak mungkin untuk memprediksi infeksi sebelum timbul gejala klinis, model terapi ini lebih teoritis (Kakkilaya, 2006; Gunawan, 2010).

- b. Sizontosida jaringan untuk mencegah relaps: bekerja pada hipnosoit dari *P. vivax* dan *P. ovale* di hati yang menyebabkan gejala relaps. Contohnya Primakuin.
- c. Sizontosida darah: bekerja pada parasit bentuk darah (skizogoni) dan dengan demikian mengakhiri serangan klinis malaria maupun terapi supresif, sehingga tidak terbentuk sizon baru dan tidak terjadi penghancuran eritrosit. Ini adalah obat yang paling penting dalam kemoterapi anti malaria. Contoh: kloroquin, kina, mefloquin, derivat artemisin (*rapidly acting blood schizontocides*), pirimetamin, sulfadoksin, sulfon, tetrasiklin (antifolat dan antibiotik termasuk *slow acting blood schizontocides*) (Kakkilaya, 2006; Depkes R I, 2007; Gunawan, 2010).
- d. Gametosida: menghancurkan bentuk seksual parasit dalam darah dan dengan demikian mencegah penularan infeksi ke nyamuk. Kloroquin dan kina memiliki aktivitas *gametocytocidal* terhadap *P. vivax* dan *P. malariae*, tapi tidak terhadap *P. falciparum*. Primakuin memiliki aktivitas *gametocytocidal* terhadap semua plasmodium (Kakkilaya, 2006; Depkes R I, 2007; Gunawan, 2010).
- e. Sporontosida: mencegah perkembangan *oocysts* dalam nyamuk dan dengan demikian menghentikan transmisi. Contoh golongan ini adalah Primakuin dan *chloroguanide* (Kakkilaya, 2006; Depkes R I, 2007; Gunawan, 2010).

2. Menurut struktur:

Tabel 2.1. Obat antimalaria menurut Struktur kimia

<i>Aryl amino alcohols:</i>	Kina, quinidine (alkaloid kulit pohon kina), mefloquine, halofantrine.
<i>4-aminoquinolines:</i>	Chloroquine, amodiaquine.
<i>Folate synthesis inhibitors:</i>	Tipe 1 - kompetitif inhibitor dari dihydropteroate sintase - sulphones, sulfonamid Tipe 2 - inhibit dihydrofolate reduktase - biguanides seperti proguanil dan chloroproguanil; diaminopyrimidine seperti pyrimethamine
<i>8-aminoquinolines:</i>	Primakuin, WR238, 605
<i>Antimicrobials:</i>	Tetracycline, doxycycline, klindamisin, azitromisin, fluoroquinolones
<i>Peroxides:</i>	Artemisinin (Qinghaosu) derivatif dan analog - artemether, arteether, artesunate, asam artelinat
<i>Naphthoquinones:</i>	Atovaquone
<i>Iron chelating agents:</i>	Desferrioxamine

Kakkilaya, 2006

Tabel 2.2. Perbandingan cepat antara obat *schizontocide* darah

	<u>Chloroquine</u>	<u>Pyr./Sulpha.</u>	<u>Kina</u>	<u>Mefloquine</u>	<u>Qinghaosu</u>
Efikasi	+++	++	+++	+++	++++
	Cepat	Lambat	Cepat	cepat	Tercepat
	Prototipe obat, pilihan utama untuk semua kasus	Hanya untuk tanpa komplikasi, multi resisten obat <i>P. falciparum</i>	Hanya untuk <i>P. falciparum</i> resisten	Hanya untuk tanpa komplikasi, multi resisten obat <i>P. falciparum</i>	Dicadangkan untuk obat resisten <i>P. falciparum</i> . Namun, hal itu dapat dianggap dalam hidup mengancam komplikasi dari <i>P. falciparum</i> karena tindakan cepat
	Persiapan parenteral dapat digunakan di daerah-daerah dengan strain yang sensitif	Tidak berguna dalam penyakit akut, dapat bersama-diresepkan dengan parenteral antimalarial lain	Obat pilihan untuk malaria berat, tetapi satu-satunya obat parenteral yang tersedia untuk waktu yang lama sampai chloroquine dan artemisinin parenteral tiba	Tidak digunakan dalam penyakit akut, dapat bersama-diresepkan dengan artemisinin setelah fase akut berakhir.	Berguna dalam malaria berat; mungkin akan lebih efektif dan ditoleransi lebih baik daripada kina.
Toxicity	++	+++	+++	+++	+
Kontra indikasi	Hampir tidak ada, hanya penyakit hati lanjut	Alergi sulfa	Sebelum reaksi hipersensitif	Epilepsi, psikosis, blok jantung, pengguna blocker	Tak satupun
Penggunaan pada kehamilan	Ya	Hanya dalam trimester II jika perlu	Hanya jika diperlukan, mengawasi hipoglikemia	Tidak di trimester pertama	Ya, jika situasi menuntut
Biaya	Termurah	Murah	Moderat	Mahal	Mahal
Tabel Salt-Base					
Obat	Garam		Base		
Chloroquine sulfat	136 mg		100 mg		
Chloroquine difosfat	250 mg		150 mg		
Kina sulfat	362 mg		300 mg		
Kina bisulphate	508 mg		300 mg		
Kina hydrochloride	405 mg		300 mg		
Mefloquine hydrochloride	274 mg 274 mg		250 mg 250mg		
Primakuin	26.3 mg 26,3 mg		15 mg 15 mg		

Kakkilaya, 2006.

2.3.2 Obat antimalaria di Indonesia.

1. Klorokuin.

Merupakan obat antimalaria kelompok 4-amino kuinolin, bersifat sizontosida darah. Secara farmakologis bekerja dengan mengikat feriprotoporfirin IX-klorokuin, yaitu suatu cincin hematin yang merupakan hasil metabolisme hemoglobin didalam parasit. Ikatan feriprotoporfirin ini bersifat melisiskan membran parasit sehingga parasit mati (Zein, 2005).

Kerja obat terhadap sizon darah dan gametosit. Efek pada sizon darah:

Sangat efektif terhadap semua jenis parasit malaria dengan menekan gejala klinis dan menyembuhkan secara klinis dan secara radikal. Obat pilihan terhadap serangan akut, demam hilang dalam 24 jam dan parasitemia hilang dalam 48-72 jam. Bila penyembuhan lambat dapat dicurigai terjadi resisten atau gagal obat. Terhadap *P falciparum* yang resisten klorokuin masih dapat mencegah kematian dan mengurangi penderitaan. Terhadap gametosit; tidak efektif terhadap gamet dewasa tapi masih efektif terhadap gamet muda (Anonim, 2003).

2. Primakuin

Merupakan obat antimalaria kelompok 8-amino kuinolin yang bersifat sizontosida jaringan, gametosida, dan sporontosida untuk Plasmodium manusia. Pelengkap atau tambahan pada pengobatan malaria klinis, pengobatan radikal malaria berat dengan komplikasi. Efek menghambat proses respirasi mitokondria didalam parasit malaria melalui hasil metabolit yang bersifat sebagai oksidan. Di Indonesia obat ini tersedia dalam bentuk tablet Primakuin-

difosfat untuk pemberian per oral. Satu tablet primakuin setara dengan 15 mg basa primakuin. Konsentrasi puncak dalam plasma dicapai dalam waktu 1 jam.

Kerja obat terhadap:

- a. Sizon darah: sangat efektif terhadap *P falciparum*, dan *P vivax* sedangkan terhadap *P malariae* tidak diketahui.
- b. Sizon darah: aktif terhadap *P falciparum* dan *P vivax* tapi dosis yang lebih tinggi sehingga perlu hati-hati.
- c. Gametosit: sangat efektif terhadap semua spesies parasit.
- d. Hipnosit: dapat kesembuhan radikal pada *P vivax* dan *P ovale*.

Farmakodinamika: menghambat proses respirasi mitokondria parasit, sehingga lebih berefek terhadap parasit stadium jaringan dan hipnosit (Anonim, 2003).

3. Sulfadoksin Pirimetamin (SP).

SP adalah obat antimalaria kombinasi antara golongan sulfonamida/ sulfon dengan diaminopirimidin yang bersifat sizontosida jaringan, sizontosida darah, dan sporontosida untuk ke-4 jenis Plasmodium manusia. Sangat praktis karena dapat diberi dalam dosis tunggal, namun punya kelemahan karena mudah mengalami resisten; merupakan obat anti malaria alternatif yang digunakan selektif untuk pengobatan radikal penderita malaria falciparum tanpa komplikasi di daerah-daerah dengan proporsi *P falciparum* resisten terhadap klorokuin tinggi (Tjitra, 2000; Zein, 2005; Gunawan, 2010).

Aktivitas Anti malaria: Sulfadoksin adalah sulfonamid yang dieliminasi secara pelan dan larut dalam air. Sulfonamid bersifat antagonis kompetitif terhadap pABA dan kompetitif inhibitor terhadap enzim *dhps*, suatu enzim bakteri yang

berperan dalam penggabungan pABA dalam proses sintesis asam folat sehingga golongan obat ini dikenal sebagai antagonis folat. Pirimetamin bekerja sebagai inhibitor enzim tetra hidrofolat, sehingga parasit tidak mampu melanjutkan siklus hidup sampai difagositosis. Pirimetamin menghambat *dihydrofolate reduktase (dhfr)* yang berperan dalam sintesis asam nukleat. Bersifat skizontosida darah yang bekerja pelan dan mungkin aktif terhadap bentuk pre-eritrositk parasit serta menghambat perkembangan sporozoit dalam tubuh nyamuk. (Gunawan, 2010).

Kombinasi obat ini menghambat pembentukan asam folat dengan mengikat enzim *dhps* dan *dhfr*. Asam folat dibutuhkan parasit untuk pembentukan asam nukleat pada pembentukan inti parasit (Tjitra, 2000; Gunawan, 2010), mengakibatkan kegagalan inti pada saat pembentukan sizon dalam eritrosit dan hati. Kombinasi sulfa dan pirimetamin menawarkan dua langkah sinergis blokade plasmodium (Kakkilaya, 2006).

Proses penyerapan dan ekskresi: Pirimetamin berlangsung perlahan tapi benar-benar terserap setelah pemberian oral dan akan menghilang secara perlahan dengan waktu paruh plasma sekitar 80-95 jam atau 4 hari. Tingkat penekan obat dapat ditemukan dalam plasma sampai 2 minggu. Obat ini diekskresi dalam ASI (Tjitra, 2000; Kakkilaya, 2006).

Sulfonamid dengan cepat diserap dari usus dan terikat dengan protein plasma, kemudian dimetabolisasi di hati dan diekskresikan dalam urine, melewati plasenta dengan bebas. Sulfadoksin bekerja lama bertindak sebagai sulfonamida dengan waktu paruh 180 jam atau 7-9 hari (Tjitra, 2000; Kakkilaya, 2006).

Kerja obat efektif terhadap bentuk sizon darah dan gametosit. Pada sizon darah, SP bekerja sangat efektif pada semua *P falciparum* dan kurang efektif

terhadap parasit lain dan menyembuhkan secara radikal. Efek terhadap gametosit: sulfadoksin tidak efektif terhadap gametosit tapi pirimetamin dapat mensterilkan gametosit (Anonim, 2003).

Toksisitas dan kontraindikasi: Pirimetamin dapat menyebabkan ruam kulit dan kadang-kadang menekan *hematopoiesis*. Dosis yang berlebih dapat menyebabkan anemia megaloblastik. Sulfonamida dapat menyebabkan berbagai efek samping: *agranulocytosis; aplastic anemia*; reaksi hipersensitif seperti ruam, *erythema multiform* dari tipe Steven Johnson, *exfoliative dermatitis*, disfungsi hati; anoreksia, muntah dan dapat juga terjadi anemia hemolitik akut. Obat ini kontraindikasi pada penderita dengan hipersensitivitas terhadap sulfa, bayi usia >2 bulan, penderita dengan penyakit ginjal akut dan lanjut serta kehamilan trimester terakhir (Kakkilaya, 2006; Gunawan, 2010). Akan tetapi menurut WHO (1995) dapat diberikan secara intermitten untuk pengobatan profilaksis ibu hamil (Tjitra, 2000)

Ketersediaan: Kombinasi tablet Sulfadoksin Pirimetamin yang tersedia, mengandung 25 mg pirimetamin dan 500 mg sulfadoksin dalam setiap tablet. (Kakkilaya, 2006)

Dosis Pirimetamin / sulfadoksin:

Umur dalam tahun	0-1	1-5	5-9	9-14	>14
Dosis 25 mg 500 tablet	1/4	1/2	1	2	3

(Kakkilaya, 2006).

Kombinasi Sulfonamida-Pirimetamin

Tablet: 500 mg sulfadoksin + 25 mg pirimetamin

Tablet: 500 mg sulfalena + 25 mg pirimetamin

Pengobatan dengan kombinasi sulfonamida–pirimetamin

Sulfadoksin Pirimetamin dan Sulfalena Pirimetamin digunakan sebagai dosis tunggal yang setara dengan 1.25 mg pirimetamin/kg berat badan (sampai dosis dewasa maximum 3 tablet). Jika temperatur tubuh melebihi 38,5°C, penderita langsung diberi satu dosis *paracetamol* dan dosis lainnya dibawa kemudian kerumah jika demam tetap bertahan. Orang tua/wali dapat menggunakan spong hangat-hangat kuku untuk menurunkan demam selama 24-48 jam pertama. Kegagalan dengan persepsi bahwa pengobatan tidak efektif, penderita (orang tua/wali) dapat meminta alternatif pengobatan, yang bertentangan dengan protokol penelitian (WHO, 2003).

4. Artemisinin-based Combination Therapy (ACT)

Artemisinin dibuat dari ekstrak daun *Artemisia annua* (*qinghaosu/sweet wormwood*) telah dipakai di Cina sebagai obat demam sejak lebih dari 2000 tahun yang lalu. Struktur kimia artemisinin ditemukan oleh ilmuwan Cina tahun 1967 dan mulai tahun 1972 diketahui memiliki khasiat sebagai Obat Anti Malaria (OAM) dengan daya kerja paling cepat (Wikipedia, 2006); hal ini dapat dinilai dari *parasite clearance* dan perbaikan klinis. Obat ini dapat menurunkan jumlah parasit 10.000 kali lipat setiap siklus aseksual dibandingkan dengan OAM lain yang hanya mampu menurunkan jumlah parasit 100 – 1000 kali lipat setiap siklus (Gunawan, 2010).

Artemisinin bersifat gametosida terhadap *P falciparum*, termasuk stadium 4 yang hanya sensitif terhadap primakuin. Derivate artemisinin bekerja dengan menghambat enzim yang berperan dalam masuknya kalsium ke dalam membrane parasit. Kerja obat ini juga menghambat hemoglobinase, menghambat

detoksifikasi oleh feroheme, alkilasi DNA, pembentukan radikal bebas, oksidasi dan alkilasi protein, menghambat peroksidasi lipid. Mekanisme kerja lain di duga melalui intervensi terhadap fungsi pelikel mitokondria, menghambat masuknya nutrisi kedalam vakuola makanan parasit, sehingga terjadi defisiensi asam amino disertai pembentukan vakuola *autophagic* yang berlanjut pada kematian parasit karena kehilangan sitoplasma (Wikipedia, 2006; Gunawan, 2010).

Pengobatan yang mengandung artemisinin (terapi kombinasi artemisinin, ACT) menjadi pengobatan standar untuk pengobatan malaria *falciparum* di seluruh dunia. Kompleks senyawa biasanya dimodifikasi secara kimia dan dikombinasikan dengan obat lain. Penggunaan sebagai monoterapi telah dilarang oleh WHO karena telah ada tanda-tanda bahwa parasit malaria kebal terhadap obat tersebut. Kombinasi terapi yang mencakup artemisinin adalah pengobatan pilihan untuk malaria yang efektif dan mempunyai toleransi yang baik pada penderita (Wikipedia, 2010).

2.4 Resistensi obat antimalaria

2.4.1 Defenisi resistensi obat

Resistensi obat malaria adalah kemampuan strain parasit untuk terus hidup dan atau berkembangbiak setelah diberikan pengobatan dan penyerapan obat antimalaria dengan dosis normal yang direkomendasikan. Resistensi obat antimalaria berhubungan dengan efek konsentrasi (*respon dosis*) (WHO, 2006).

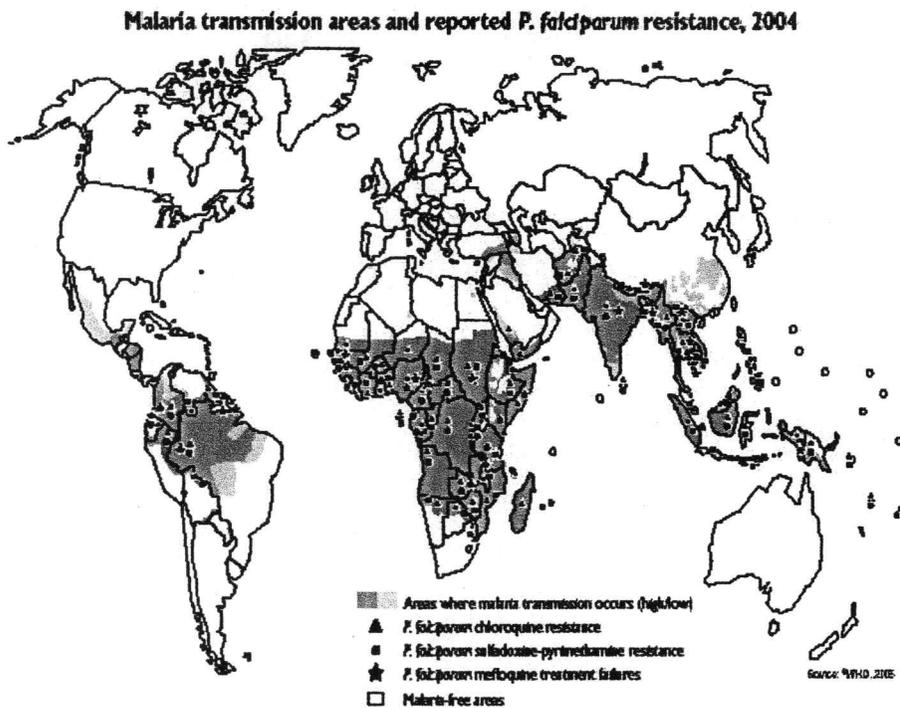
2.4.2 Penyebaran resistensi obat

Penyebaran resistensi ditentukan dengan mempergunakan kesempatan yang diberikan oleh mekanisme resistensi. Ini diperoleh dari peningkatan gametosit pembawa yang dihubungkan dengan kegagalan pengobatan, dan

kemudian tekanan selektif dari residu konsentrasi antimalaria yang dikeluarkan secara perlahan dengan *long half life* setelah pengobatan *chemoprophylaxis*.

Resistensi yang dikoding oleh mutasi ganda pada *single locus* mungkin dipertimbangkan dalam 2 fase yang *overlapping*. Fase pertama, dimana obat lebih tahan terhadap parasit tetapi dosis terapi pada umumnya masih menyembuhkan infeksi, dan fase kedua dimana kegagalan klinik mulai terjadi. Fase kedua ini sangat cepat dan hal-hal yang perlu bahwa program surveilen mampu memonitor perubahan dari fase pertama ke fase kedua. Di dalam area transmisi yang tinggi, fase pertama mungkin terjadi belakangan tapi fase berikutnya perlahan. Kombinasi terapi secara signifikan perlahan menilai perkembangan resistensi, tapi sebelum resistensi signifikan pada bagian lain diperlihatkan (WHO, 2006).

Resistensi antimalaria merupakan sebagian masalah dengan *P. falciparum*, Dalam penyebaran resistensi terhadap klorokuin, sulfadoksin-pirimetamin dan mefloquine dapat diamati (Gambar 2.3). Resistensi antifolate dan klorokuin berkembang didalam *P. vivax* dalam beberapa area dan resistensi klorokuin dalam *P. malariae* juga telah dilaporkan. Resistensi tidak bermakna telah diamati pada artemisinin dan derivatnya meskipun menyebar luas di beberapa bagian Asia (WHO, 2006).



Gambar 2.3. Area transmisi dan distribusi malaria dilaporkan resistensi atau kegagalan pengobatan dengan obat antimalaria yang terpilih, September 2004 (mefloquine resistan di Africa sekarang ini menjadi lebih lanjut ditinjau) (WHO, 2006).

2.4.3 Uji resistensi obat

Uji resistensi obat dilakukan dalam laboratorium secara khusus untuk menilai kerentanan senyawa antimalaria terhadap parasit yang dikumpulkan dari penderita khusus. Dua metode utama laboratorium yang tersedia adalah:

Uji *in vitro*: parasit tumbuh dalam biakan dengan memperlihatkan peningkatan konsentrasi obat, konsentrasi yang menghambat pertumbuhan parasit digunakan sebagai *endpoint*.

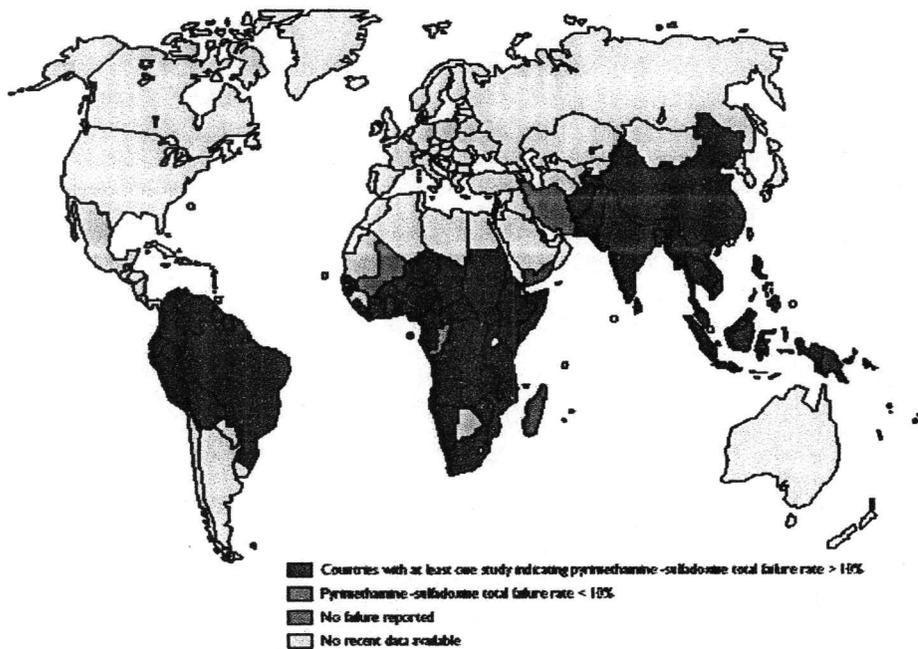
Karakterisasi molekuler: petanda molekuler ditaksir dengan PCR atau *gene sequencing* juga memberikan prediksi pada beberapa tingkat; resistensi beberapa obat dapat memperkirakan hasil uji molekuler dengan memberi gambaran penilaian (CDC, 2007).

Uji *in vivo*: adalah uji yang dilakukan di lapangan dengan mengambil sampel dari penderita malaria yang diberi pengobatan dengan obat antimalaria dan respons pengobatan diamati baik secara parasitologis maupun secara klinis (WHO, 2003).

2.4.4 Resistensi terhadap Sulfadoksin Pirimetamin

Resistensi pirimetamin di beberapa daerah timbul secara cepat sesudah penyebaran pengobatan, prophylaxis pada tahun 1950. Resistensi kedua komponen dari Sulfadoksin Pirimetamin dicatat secara singkat sesudah obat ini diperkenalkan secara berlebih pada beberapa decade kemudian. Di Asia Tenggara kejadian ini terjadi di perbatasan Thai-Kamboja pada pertengahan 1960. Resistensi menimbulkan masalah operasional di daerah yang sama sampai beberapa tahun perkenalan sulfadoksin-pirimetamin pada *malaria control programme* tahun 1975. Resistensi pada tingkat tinggi terdapat di beberapa bagian di Asia Tenggara, China Selatan, dan lembah sungai Amazon, dan resistensi pada tingkat rendah terlihat di pesisir Amerika Selatan, Asia bagian selatan, dan Oceania. Di Afrika bagian timur, sensitivitas sulfadoksin-pirimetamin telah diamati menjadi turun tahun 1980 dan resistensi berkembang ke arah barat melewati Afrika melebihi decade terakhir. Penilaian kegagalan klinik lebih dari 25% telah dilaporkan di Liberia, Guinea Bissau dan Malawi (WHO, 2006).

Di beberapa daerah kini ditemukan resistensi tingkat tinggi dengan penilaian kegagalan pengobatan yang tinggi pada anak-anak. Fakta terakhir memberi kesan umum bahwa *P. falciparum* asli yang resisten di Asia Tenggara ditemukan seperti seperti di beberapa daerah Afrika Tengah dan bagian selatan (*triple dhfr mutant*) (Gambar 2.4).



Gambar 2.4. Distribusi resistensi Sulfadoksin Pirimetamin (SP) dalam *P. falciparum* (WHO, 2006).

Permulaan mutasi pada *P. falciparum* yang berhubungan dengan resistensi SP adalah mutasi gen *P. falciparum* DHFR pada codon 108 (dari serin ke asparagin), yang merupakan pusat resistensi terhadap pirimetamin secara *in vitro* dan pada analisa genetik antara *P. falciparum* yang sensitif dan yang resisten terhadap pirimetamin menunjukkan bahwa Asn-108 merupakan determinan fenotip obat resisten (Peterson et al., 1988). Wu et al, 1996, menunjukkan transfektan parasit pada *P. falciparum* gen DHFR yang mengandung Asn-108 dan alele lain yang mengandung Asn-108, Ile-51 dan Arg-59 mampu menunjukkan resistensi pirimetamin dalam beberapa tingkat terhadap *P. falciparum* ini, dengan demikian mutasi gen DHFR dapat menyebabkan resistensi obat ini dalam parasit. Kemudian diikuti mutasi pada Asn-51-Ile dan Cys-59-Arg (Peterson et al., 1988; Khan et al, 1997; Aubouy et al., 2003; WHO, 2006).

Beberapa hasil penelitian yang menyangkut mutasi *PfDHFR codon 108* di beberapa wilayah yang pernah dilakukan antara lain di Purworejo-Jawa Tengah alel mutan Asn-108 dan Thr-108 (*in vitro*) sebesar 84,7% (Syafuruddin et al., 2003); mutasi *DHFR* Asn-108 di Alor-NTT 71,2%; dan Lampung 87,2% (Agustina, 2005); di Kenya mutasi Asn-108 merupakan pusat mutasi dari resistensi pirimetamin (Khan et al, 1997); di Tanzania mutasi Asn-108 dihubungkan dengan resistensi *in vivo* sebesar 100% (Jelinek et al, 1998); Peruvian Amazon mutasi Asn-108 terjadi pada semua infeksi 100% (Kublin et al, 1998); Brazil 90%, akan tetapi di Narin Columbia Asn-108 dan Thr-108 masing-masing sebesar 59% dan 11% (Giraldo, 1998); Nigeria mutasi Asn-108 79% (Happi et al, 2005); Mozambique *PfDHFR triple mutant* (Ile-51, Arg-59, Asn-108) sebesar 93% (Fernandes et al, 2007); dan Burkina Faso-Belgia *PfDHFR triple mutant* (Ile-51, Arg-59, Asn-108) 76,2% (Tinto et al, 2007).

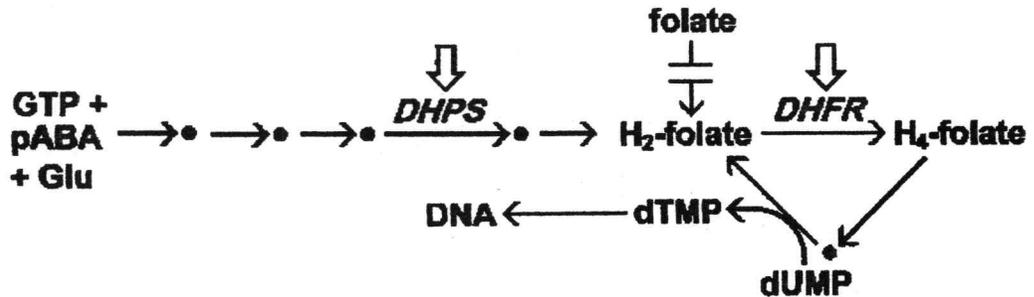
2.4.5 Mekanisme resistensi SP

Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen dan mutasi ini terjadi karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif (Tarigan, 2003). Setelah 4 hari pengobatan pirimetamin terhadap *mixture of sensitive* dan *resistant parasites*, hanya tertinggal parasit dengan phenotype *drug-resistant* (Nguyen-Dinh et al., 1982).

Pirimetamin bekerja dengan menghambat enzim *dihidrofolat reduktase* sehingga parasit tidak dapat membuat *asam tetrahidrofolat*, menyebabkan parasit tidak dapat melanjutkan siklus hidup hingga difagosit. Resistensi akan cepat terjadi pada *P. falciparum* yang telah mengalami mutasi hanya pada satu gen. Sulfadoksin bekerja dengan mengadakan kompetisi dengan *pABA* dalam

memperebutkan enzim *dihidrofolat sintetase* sehingga pembentukan asam *dihidrofolat* terganggu dan tidak terbentuk asam folat yang diperlukan parasit. Resistensi terhadap sulfadoksin terjadi karena parasit mampu menggunakan jalan pintas sehingga terhindar dari pengaruh sulfadoksin (Tarigan, 2003).

Ketidakmampuan parasit memanfaatkan *exogenous folates* membuat biosintesis folate sebagai target obat yang baik. Folate disintesis dari 3 bangunan dasar kompleks, GTP, *p-aminobenzoic acid* (pABA), dan *glutamate*, dalam sebuah *pathway* yang melibatkan 5 enzim. Satu dari enzim ini, *dihydropteroate synthase* (*dhps*), dihambat oleh obat *sulpha-based*. Sulfadoksin dan dapson adalah dua obat umum antimalaria pada target *dhps*. Obat sulfa secara struktur analog dengan pABA. Ini menyebabkan penipisan kelompok folate dan mengurangi jumlah thymidylate yang tersedia untuk sintesis DNA (Wiser, 2003).



Gambar 2.5. Skema metabolisme folate yang disederhanakan. Parasit malaria mensintesis folates *de novo*, tapi tidak memanfaatkan *preformed folates*. Keikutsertaan folate sebagai *co-factor* dalam beberapa proses biosintesis. Catatan khusus adalah *synthesis of thymidylate (dTMP)* yang diperlukan sintesis DNA synthesis. Dua target utama obat antimalaria dimana target metabolisme folate ditunjukkan dengan kotak tanda panah (Wiser, 2003).

dhfr adalah enzim yang terdapat dimana-mana yang ikut serta dalam siklus ulangan folate dengan mengurangi *dihydrofolate* ke *tetrahydrofolate*.

Tetrahydrofolate kemudian dioksidasi kembali menjadi *dihydrofolate* yang ikut dalam reaksi biosintesis (contoh, *thymidylate synthase*). *dhfr* mencegah formasi *thymidylate* dan menghambat sintesis DNA dan mengakibatkan kematian parasit. Pirimetamin dan proguanil adalah dua inhibitor *dhfr* yang umum digunakan sebagai antimalaria. Obat ini menghambat *dhfr* dari parasit ke tingkat yang lebih besar daripada enzim hos dan kemudian memperlihatkan toksisitas selektif ke arah parasit (Wiser, 2003).

Tabel 2.3. Protein dan Mutasi dihubungkan dengan resistensi obat

Protein	Function	Location	Drugs Effected	Major Mutations
DHPS	folate metabolism	Cytoplasm	sulfadoxine, dapsone	A437G (K540E, A581G)
DHFR	folate metabolism	Cytoplasm	pyrimethamine, proguanil	S108N (N51I, C59R, I164L)
CRT	transporter	food vacuole	chloroquine	K76T
MDR1	transporter	food vacuole	mefloquine, quinine (?)	increased copy #, D86Y*
Cytochrome b	electron transport	mitochondria	atovaquone	Y268S/N/C
ATPase 6	calcium transport	endoplasmic reticulum	artemisinins	S769N

Protein: CRT =; *chloroquine resistance transporter* MDR1 = *multi-drug resistance (P-glycoprotein homologue)*; DHFR = *dihydrofolate reductase*; DHPS = *dihydropterote sythetase*; ATPase6 = *sarco/endoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase orthologue*. *Dihubungkan dengan peningkatan sensitivitas mefloquine dan dihydroartemisinin dan mengurangi sensitivitas klorokuin (Wiser, 2003).

Kebanyakan inhibitor *dhps* dan *dhfr* digunakan dalam kombinasi (Tabel 2.3) yang mempunyai efek *synergistic* dan memperlambat resistensi obat. Mutasi titik spesifik dalam enzim ini menurunkan afinitas obat. Resistensi cenderung timbul secara cepat dengan tekanan obat dalam situasi mutasi tunggal. Penggunaan kombinasi obat akan memperlambat resistensi sejak terjadinya dua mutasi bebas dari resistensi dua obat yang berlainan. Kombinasi

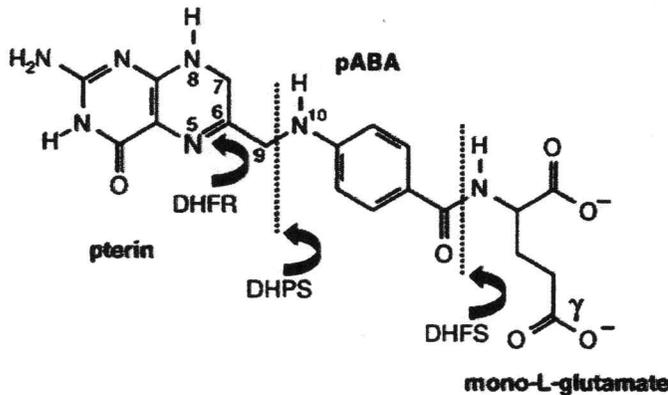
sulfadoksin dan pirimetamin, secara luas digunakan untuk pengobatan malaria falciparum tanpa komplikasi. Dalam beberapa kasus mutasi spesifik mempunyai hubungan dengan resistensi obat (Tabel 2.3). Resistensi SP dihubungkan dengan mutasi spesifik dalam target enzim oleh sulfadoksin dan pirimetamin (*dhps* dan *dhfr*) (Wiser, 2003).

2.5 Folate pathway

Metabolisme folate penting bagi kelangsungan parasit malaria dan jalan untuk mencapai profilaksis dan pengobatan penyakit lebih dari setengah abad, erat mengikuti pengenalan dan penemuan obat antifolat melawan infeksi bakteri. Penggunaan obat antimalaria lebih luas termasuk tipe pirimetamin, proguanil, sulfadoksin dan dapson, yang tidak dapat digunakan oleh negara miskin dan penting terutama sebagai obat antimalaria resisten, klorokuin, tak dapat dielakkan. Meskipun sangat penting dan berpengaruh kuat, kami tidak mempunyai gambaran pemahaman rinci yang mendasari metabolisme dalam parasit. Dalam organisme lain, *pathway* dalam *folate cofactor* dilibatkan termasuk produksi purine dan pirimidin dari replikasi DNA sebaik sintesis dan atau katabolisme beberapa asam amino (Met, Gly, Ser, Glu, His). Bagaimanapun, jenis *folate* tergantung reaksi parasit malaria. Hal ini tergantung pada persediaan eksternal purine dari hos, kemungkinan lain '*missing reactions*' lebih bersifat terkaan (Hyde,2005).

Tujuan *folate pathway* adalah menyediakan *cofactor* esensial bagi metabolik yang menyertai unit transfer satu-carbon (*C1*). Jadi, dalam kasus sintesis DNA, folate dalam bentuk *5,10-methylenetetrahydrofolate* (*methyleneTHF*) perlu untuk menyediakan *methyl group* yang mengubah *dUMP* menjadi *dTMP*, dimana derivat *triphosphate* digunakan oleh *DNA polymerase* dengan menambahkan 'T' nukleotida untuk rantai DNA bertumbuh. Istilah folate

digunakan untuk mencukupi metabolit sel yang membawa separuh *canonical folate*, tapi menjaga jumlah derivat dalam derajat oksidasi cincin *pterin* pada molekul posisi 5 dan 10; jumlah residu glutamat melepaskan sebagian *para-aminobenzoate* yang menghubungkan cincin *pterin* (Gambar 2.6) (Hyde, 2009).

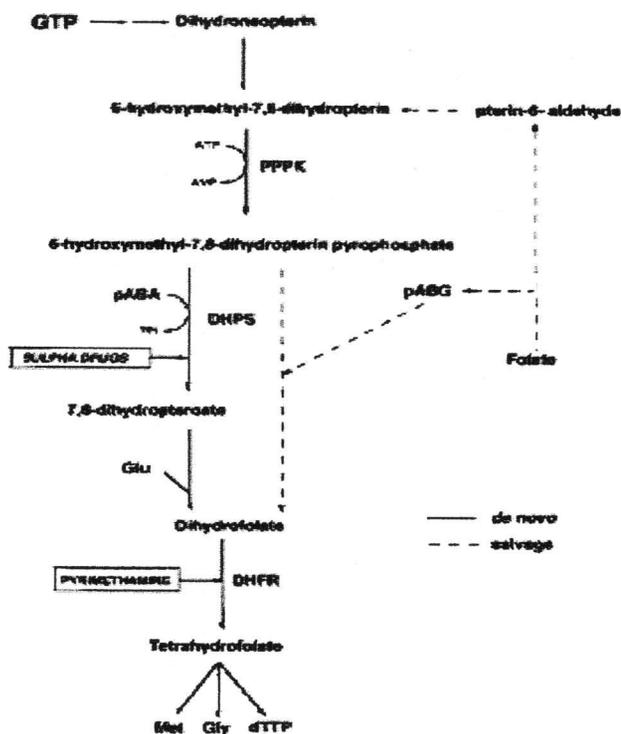


Gambar 2.6. Struktur *dihydrofolate (DHF)* menandakan susunan dari separuh *pterin*, *pABA* and *L-glutamate*. Enzim *dhps* menghubungkan *pABA* untuk mengaktifkan cincin *pterin* yang memberi *dihydropteroate*, yang mengubah *dihydrofolate* oleh penambahan residu single *L-glutamate* oleh *DHFS*. Ikatan rangkap 5,6 dalam *DHF* yang diturunkan oleh *DHFR* untuk memberi *tetrahydrofolate (THF)*; semua *folate cofactor* aktif yang terdapat dalam keadaan penurunan secara penuh. Mereka juga subjek proses polyglutamat oleh aktivitas *FPGS*, dengan jalan penambahan residu *glutamate* yang berhubungan melalui formasi ikatan peptida pada posisi gamma. Posisi atom penting pada separuh jumlah *dihydropteroate* (Hyde, 2009).

2.5.1 Biosynthesis Folate dalam Plasmodium.

Secara empiris antifolates melawan malaria jauh lebih dahulu ada daripada metabolisme *pathway* pada *Plasmodium spp.*. *De novo synthesis of folate* oleh *Plasmodium spp.* telah diperlihatkan lebih dari 25 tahun yang lalu, walaupun *exogenous folate salvage pathway* ada disekitarnya, tapi tidak tampak sebagai *Plasmodia's primary source of folate*. Tidak semua enzim terlibat dalam metabolisme folat yang diidentifikasi dalam *Plasmodium spp.* (Gambar 2.7), tetapi ini akan berubah dengan *sequencing of the malaria genome*. Gen yang mengkode enzim dalam *folate pathway* ditargetkan oleh adanya obat antifolate, *dihydrofolate reductase (DHFR)* dan *dihydropteroate synthase*

(*DHPS*), keduanya mempunyai *cloned and sequenced*, dan mutasi pada gen ini berperan dalam resistensi obat antifolate (Peterson et al., 1988). Gangguan sintesis folate oleh inhibitor *dhfr* dan *dhps* mudah menurunkan tingkatan secara penuh mengurangi *tetrahydrofolate*, keperluan *cofactor* dalam kepentingan *one-carbon transfer reactions* dalam purine, pyrimidine, dan asam amino *biosynthetic pathways*. Pada tingkat rendah hasil *tetrahydrofolate* dalam menurunkan konversi glisin menjadi serin, sintesis metionin berkurang, dan thymidylate tingkat terendah menangkap replikasi yang akan datang (Triglia and Cowman, 2009).



Gambar 2.7. Mengemukakan *de novo* and *salvage pathways* dari *tetrahydrofolate* pada *P. falciparum*. Memperlihatkan tempat aksi dari obat sulfa dan pirimetamin (Triglia and Cowman, 2009).

2.5.2 Target identifikasi obat Antifolate

Pada batas penelitian lebih awal profilaksis secara *in vivo* oleh Clyde and Shute tahun 1950, seleksi *in vitro* fenotip resisten obat ditunjukkan mengikuti pelaksanaan pengobatan akut pirimetamin. Sebagai contoh, 4 hari setelah

pengobatan pirimetamin terhadap *mixture of sensitive* dan parasit resisten, hanya tersisa parasit dengan *phenotype* yang resisten obat. Investigasi terpisah dinyatakan bahwa resistensi pirimetamin dan isolat sensitif mirip *uptake* pirimetamin, tapi aktivitas DHFR terhadap strain resisten 300 kali lebih sensitif terhadap efek penghambatan pirimetamin. Sejak permulaan penelitian *in vivo* dan *in vitro* resistensi berkembang cepat dalam menekan respon obat dalam mekanisme resistensi yang sederhana, seperti mutasi titik seseorang dalam gen tunggal. Fakta terhadap dasar genetik dari resistensi pertama antifolat timbul dari penelitian silang genetik dalam sensitivitas pirimetamin dan batas resisten parasit berlawanan dengan vektor nyamuk. Fenotip resistensi obat terpisah secara bebas terhadap petanda enzimatik lainnya, tapi cara serupa diperlihatkan bahwa rekombinasi dapat terjadi antara garis orangtua asli (Gregson and Plowe, 2005; Triglia and Cowman, 2009).

2.6 Mutasi gen *PfDHFR*

2.6.1 *Point Mutations* dalam respon *DHFR* dari resistensi *in vitro*

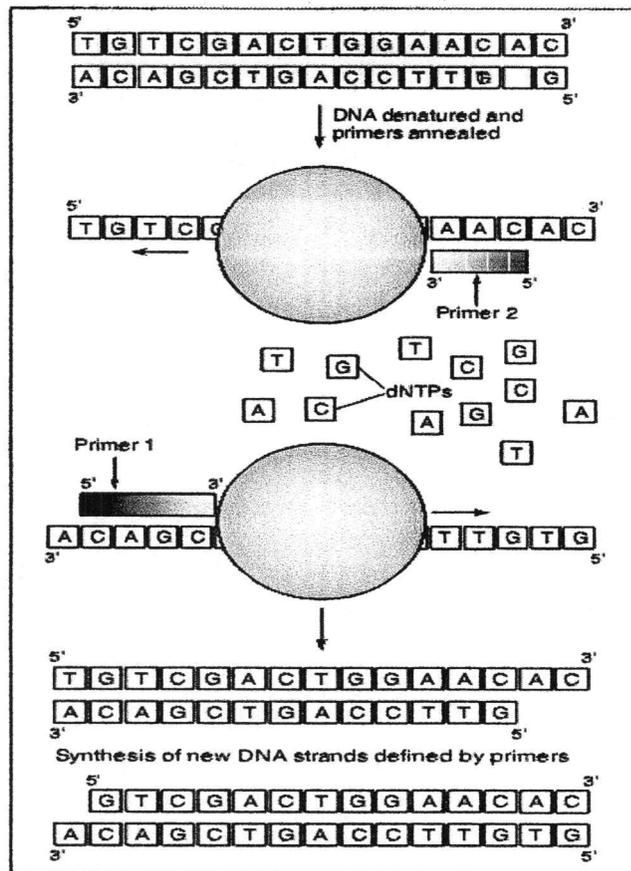
Lanjutan investigasi gen *DHFR* dengan *sequencing* akhir terhadap sensitif dan resisten secara fenotip *P. falciparum DHFR* menyajikan bukti pertama secara langsung bahwa *point mutations* dalam gen *DHFR* bertanggungjawab kepada fenotip resisten. *Dihydrofolate reductase* diambil dari *pyrimethamine-sensitive clone*, 3D7, dan dari isolat dengan berbagai derajat resistensi pada rangkaian pirimetamin. Serin bertempat pada posisi 108 dalam *clone* sensitif 3D7, tapi pada perubahan ke asparagin (Asn-108) dalam isolat resisten (Triglia and Cowman, 2009).

Selain mutasi Asn-108 isolat yang lebih resisten secara berurutan terjadi mutasi pada codon 51 (Ile-51), 59 (Arg-59), dan 164 (Leu-164). Dipercaya bahwa perubahan *conservative* dari *isoleucine* ke *leucine* pada *codon* 164 tidak mempunyai efek sangat besar yang mengikat pirimetamin. *The Palo Alto "clone"* membawa seperangkat mutasi unik, Val-16 ditambah Thr-108. Sebuah penelitian yang diterbitkan pada waktu yang sama dengan kelompok sejenis terdapat tambahan mutasi *DHFR* Ile-51 dan Arg-59 diberi tingkat yang lebih besar daripada Asn-108 sendiri (Peterson et al., 1988), memperkuat bukti bahwa *point mutation* pada *DHFR* disebabkan oleh resistensi pirimetamin. Sekali lagi, *allele* yang mengandung Val-16 dan Thr-108 ditemukan hanya pada satu isolat (*FCR3*). Pada kelompok kedua dikemukakan bahwa mutasi timbul secara bebas, sebagai contoh bahwa resistensi pirimetamin adalah sebagai ciri pembawaan yang didapat (Triglia and Cowman, 2009).

2.6.2 Pemeriksaan mutasi gen

1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu *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 2.8. 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/ 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* (Ciceron dkk, 1999, Bloland, 2001, Ohrt dkk, 2002, Tangpukdee dkk, 2009)

Kegunaan *PCR* dibatasi oleh metode yang kompleks, biaya yang tinggi, dan teknisi terlatih. Oleh karena itu, *PCR* dilaksanakan tidak secara rutin. 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. *PCR-RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Merupakan petanda molekul yang pertama kali ditemukan dan digunakan. Penggunaannya dimungkinkan sejak orang menemukan enzim nuklease restriksi (*RE*), suatu kelas enzim yang mampu mengenal dan memotong seurutan pendek basa *DNA* (biasanya 4-6 urutan basa).

RFLP bersifat kodominan dan cukup berlimpah serta polimorfik. Petanda ini juga mudah dipetakan dalam peta genetik dan bersifat stabil. Kelemahannya, petanda ini memerlukan *DNA* dalam jumlah besar, lama (memerlukan waktu 3 hari), serta melibatkan penggunaan pelabelan isotop

radioaktif (meskipun sekarang telah ditemukan teknik tanpa radioaktif) (Wikipedia, 2009).

3. *DNA sequencing*

Sekuensing asam nukleat adalah proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen *DNA* atau *RNA*. Hampir semua usaha sekuensing *DNA* dilakukan dengan menggunakan metode terminasi rantai yang dikembangkan oleh Frederick Sanger dkk. Teknik tersebut melibatkan terminasi atau penghentian reaksi sintetik *DNA in vitro* yang spesifik untuk sekuens tertentu menggunakan substrat nukleotida yang telah dimodifikasi.

Pada metode sekuensing terminasi rantai (metode Sanger), perpanjangan atau ekstensi rantai *DNA* dimulai pada situs spesifik pada *DNA* cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut primer yang komplementer terhadap *DNA* pada situs tersebut. Primer tersebut diperpanjang menggunakan *DNA* polimerase, enzim yang mereplikasi *DNA*. Bersama dengan primer dan *DNA* polimerase, diikutsertakan pula 4 jenis basa deoksinukleotida (suatu pembentuk *DNA*), juga nukleotida pemutus atau penghenti rantai (terminator rantai) dalam konsentrasi rendah. Penggabungan nukleotida pemutus rantai tersebut menghasilkan fragmen *DNA* yang berhenti bertumbuh hanya pada posisi *DNA* tempat nukleotida tersebut tergabungkan. Fragmen *DNA* dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis (Wikipedia, 2009).

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

SP merupakan salah satu obat anti malaria yang dapat digunakan sebagai profilaksis maupun sebagai obat dengan dosis tunggal setara dengan 1,25 mg pirimetamin/kg BB dan maksimal diberikan 3 tablet. Paparan terhadap parasit yang berulang serta proses penyerapan dan ekskresi obat yang lama (*half life* SP, 80-95 jam); tingkat penekanan obat dapat ditemukan dalam plasma sampai 2 minggu (Kakkilaya, 2006). Kombinasi sulfadoksin dan pirimetamin (SP), secara luas digunakan untuk pengobatan malaria falciparum tanpa komplikasi (Wiser, 2003). SP (termasuk golongan obat antifolat) sebagai obat alternatif yang bekerja menghambat pembentukan asam folat yang mengikat enzim *dhfr/dhps* (Harijanto, 2000).

Pirimetamin adalah salah satu inhibitor *dhfr* yang digunakan sebagai antimalaria. Obat ini menghambat *dhfr* dari parasit ke tingkat yang lebih besar dari enzim hos, kemudian memperlihatkan toksisitas selektif ke arah parasit. Inhibitor *dhps* dan *dhfr* memberi efek *synergistic* dan perkembangan yang lambat dari resistensi obat. Tekanan obat dapat menyebabkan resistensi dalam bentuk mutasi titik spesifik dari enzim *dhfr* yang menurunkan afinitas obat (Wiser, 2003).

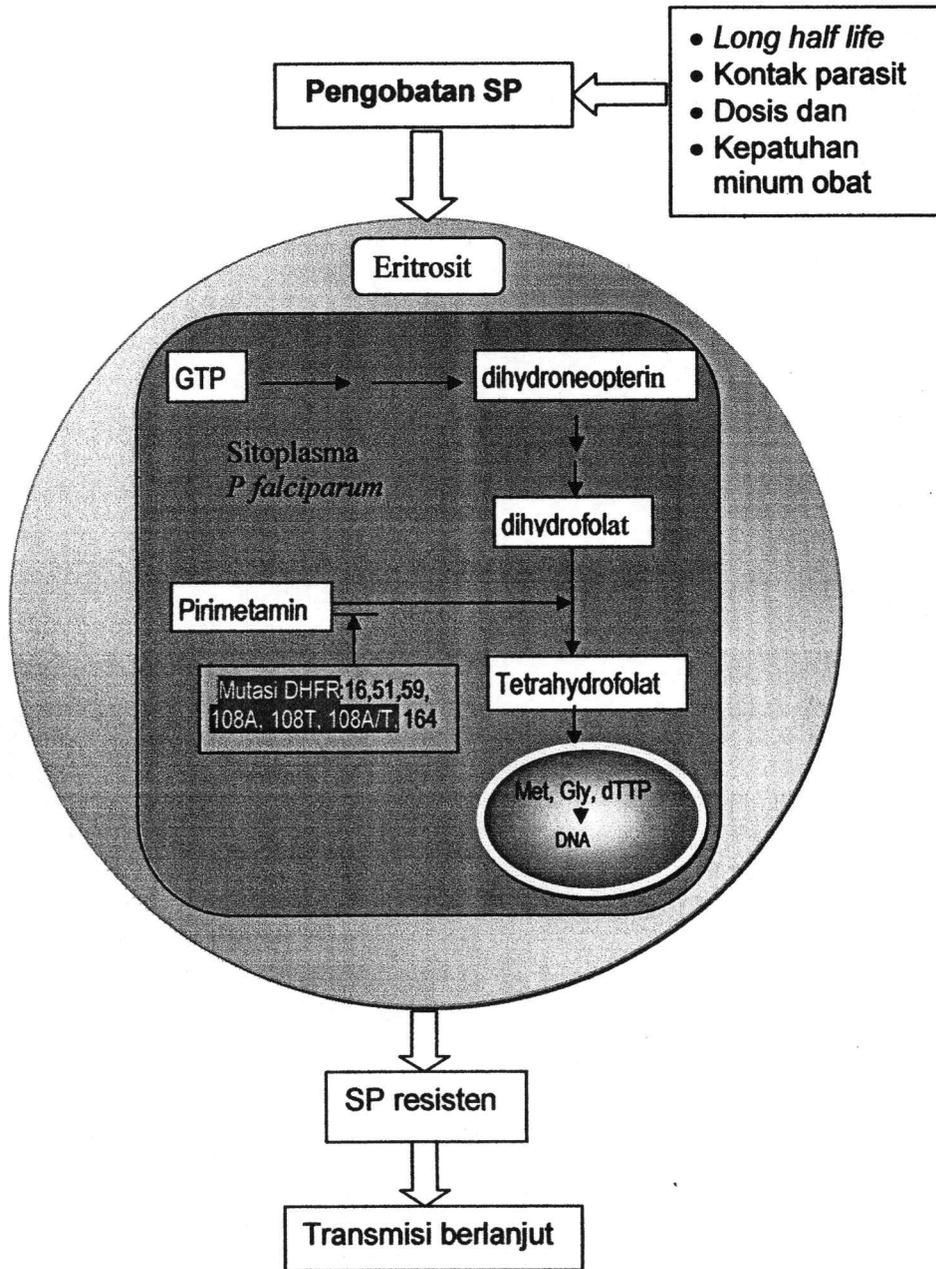
Resistensi SP disandi oleh dua gen yaitu *PfDHPS* untuk Sulfadoksin dan gen *PfDHFR* untuk Pirimetamin. Mutasi titik pada enzim *dhfr/dhps* berperan pada terjadinya resistensi obat antifolat yang masuk melalui sitoplasma (Wiser, 2003). Permulaan mutasi pada *P. falciparum* selalu terjadi pada posisi 108 (biasanya dari serin ke asparagin atau treonin = Ser-108-Asn/Thr), yang merupakan pusat resistensi terhadap pirimetamin; kemudian mutasi dapat diikuti pada alel 51-Ile, 59-Arg, 164-Leu, 16-Val, 50-Arg yang disandi oleh gen *DHFR* (Peterson et al., 1988; Cowman et

al, 1988; Khan et al, 1997; Plowe et al, 1997; Kublin et al, 1998; Giraldo, 1998; Wiser, 2003; WHO, 2006; Tinto et al, 2009; Syafruddin, 2010).

dhfr adalah enzim yang ikut serta mengurangi *dihydrofolate* ke *tetrahydrofolate*. Tetrahydrofolate dioksidasi kembali ke *dihydrofolate* dengan mengambil bagian dalam reaksi biosintesis (contoh, *thymidylate synthase*). *dhfr* akan menghambat dengan mencegah formasi *thymidylate* dan menahan sintesis DNA (inti parasit) sehingga mengakibatkan kematian parasit (Wiser, 2003). Pirimetamin menghambat *dihydrofolate* dari *plasmodia reduktase* dengan menghambat biosintesis purin dan pirimidin untuk sintesis DNA dan multiplikasi sel. Hal ini mengakibatkan kegagalan bagian inti pada saat pembentukan skizon dalam eritrosit dan hati (Kakkilaya, 2006).

Mutasi *PfDHFR* (Asn-108, Thr-108, dan atau Asn/Thr-108) menyebabkan pirimetamin tidak dapat menghambat perubahan *dihydrofolat* menjadi *tetrahydrofolate*; sehingga terbentuk gylsin, metionin dan dTTP untuk sintesis DNA dan perkembangbiakan parasit. Keadaan ini menyebabkan *P falciparum* resisten terhadap pengobatan SP. Resistensi SP menyebabkan transmisi penyakit malaria, khususnya malaria *falciparum* terus berlanjut.

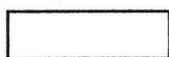
Kerangka konsep penelitian



Keterangan:



Variabel yang diteliti



Variabel yang tidak diteliti

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian eksploratif yang bersifat observasional laboratorik.

4.2 Populasi, besar sampel, dan tehnik pengambilan sampel

4.2.1 Populasi dan sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah penderita dengan gejala klinis malaria. Sedangkan sampel dalam penelitian ini adalah penderita dengan gejala malaria klinis dan dinyatakan positif *P falciparum* secara mikroskopis.

4.2.2 Besar sampel

Besar sampel penelitian adalah 52 penderita yang dinyatakan positif *P falciparum* secara mikroskopis yang diperoleh dari rumus:

$$n = \frac{4 p q}{L^2} \quad \text{dan} \quad n_1 = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}}$$

Keterangan:

n = jumlah sampel awal (215)

p = sifat suatu keadaan dalam persen, yaitu proporsi *PfDHFR-108* di beberapa wilayah = 84%

q = 100% - p = 16

L = derajat ketepatan yang dipergunakan, umumnya 5%

n₁ = jumlah sampel sebenarnya

N = jumlah populasi di daerah tempat pengambilan sampel = 69

Adapun kriteria sampel adalah

a. Kriteria inklusi:

- i. Penderita yang dinyatakan positif *P falciparum*.

- ii. Penderita yang dinyatakan positif *P falciparum* dan *P vivax*, *P malariae*, dan atau *P ovale* (malaria campuran)
 - iii. Bersedia ikut dalam penelitian setelah dijelaskan cara, maksud dan tujuan, serta menandatangani *informed consent*.
- b. Kriteria eksklusi:
- i. Penderita yang ditemukan bukan *P falciparum* dalam darahnya.
 - ii. Penderita yang dinyatakan positif malaria dan tidak bersedia ikut serta.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *Consecutive Sampling*, dimana sampel diambil ketika telah memenuhi syarat.

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah sampel yang diperoleh dari populasi dengan gejala klinis malaria, diambil darah kapiler untuk pemeriksaan mikroskopis (tetes tebal) dan pemeriksaan molekuler (kertas filter). Selain pengambilan sampel darah, penderita atau pendamping penderita diwawancara untuk pengisian kuisioner. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan gambaran demografi sampel dan gambaran penggunaan SP dan obat anti malaria lain. Adapun isi kuisioner terlampir pada Lampiran 4.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

Variabel *independent* pada penelitian ini adalah penderita malaria *falciparum*. Variabel *dependent* pada penelitian ini adalah mutasi gen *PfDHR*.



4.3.2 Defenisi operasional

1. Penderita malaria *falciparum* adalah penderita yang dalam darah perifer ditemukan *P falciparum* secara mikroskopis yang berasal dari beberapa Puskesmas di kabupaten Lombok Barat.
2. Mutasi gen *PfDHFR-108* adalah mutasi yang terjadi pada *codon* 108 dari urutan nukleotida gen penyandi *Plasmodium falciparum dihydrofolate reduktase (PfDHFR)* yang diketahui dengan pemeriksaan *PCR-RFLP* dari bercak darah pada kertas filter. Nukleotida yang disandi dari hasil identifikasi *PCR-RFLP* pada *codon* 108 dapat berupa serin sebagai *wild type* maupun asparagin dan atau treonin sebagai *mutant type*.

4.4 Instrumen penelitian

4.4.1 Instrumen untuk pengambilan darah:

1. Kapas alkohol
2. *Blood lancet*
3. Gelas objek

4.4.2 Instrumen untuk pemeriksaan mikroskopis:

1. Rak pengecatan
2. Mikroskop dengan objektif 100 X
3. *Tally counter*

4.4.3 Instrumen untuk pemeriksaan molekuler:

1. Mesin PCR
2. Pipet mikro
3. Aliquot

4.5 Lokasi dan waktu penelitian

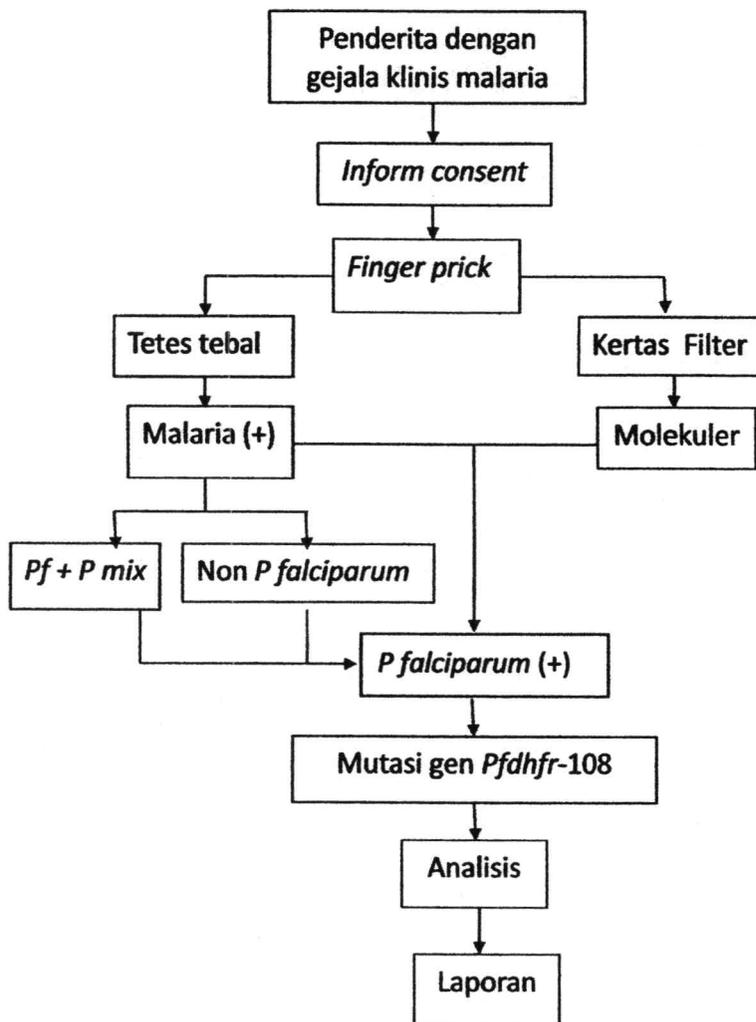
4.5.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian dalam penelitian dibagi menjadi:

1. Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Puskesmas Meninting, Gunungsari dan Puskesmas Tanjung.
2. Lokasi pemeriksaan Mikroskopis dilakukan di masing-masing Puskesmas dan di *crosscheck* di laboratorium malaria *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga Surabaya.
3. Lokasi analisa molekuler di laboratorium malaria ITD Universitas Airlangga Surabaya.

4.5.2 Waktu penelitian, dilaksanakan mulai bulan Nopember 2009 sampai dengan bulan Agustus 2010. Rincian dan jadual kegiatan terlampir.

4.6 Alur Penelitian



4.7 Prosedur pengambilan atau pengumpulan data

4.7.1 *Informed consent* (terlampir).

4.7.2. Teknik mikroskopis

a. Alat & bahan yang digunakan:

- 1). *Blood lancet*
- 2). Kapas alkohol
- 3). Gelas objek
- 4). Giemsa induk

5). Buffer fosfat pH 7,2

6) Minyak imersi

7) Mikroskop

b. Prinsip pemeriksaan:

Prinsip pemeriksaan malaria metode mikroskopis adalah sediaan tetes tebal dicat dengan Giemsa yang mengandung zat warna biru metilin, azur metilin, dan eosin yang menghasilkan warna merah muda pada eritrosit, lembayung tua pada inti sel leukosit, biru pada protoplasma parasit, dan merah pada butir kromatin parasit malaria.

c. Cara kerja:

- 1). Darah kapiler yang diambil dibuat sediaan tetes tebal.
- 2). Sediaan dikeringkan di atas lampu 15 Watt atau dibiarkan kering secara alami.
- 3). Sediaan tetes tebal, eritrosit dapat dilisiskan atau tanpa dilisiskan.
- 4). Giemsa induk diencerkan dengan larutan buffer pH 7,2 dengan perbandingan 1 tetes Giemsa dengan 1 ml larutan buffer untuk pengecatan lambat atau 3 tetes Giemsa dengan 1 ml buffer pH 7,2.

d. Metode penghitungan parasit per μ l darah (kuantitatif).

Menghitung parasit per μ l darah dalam tetes tebal adalah menghitung dalam hubungan terhadap jumlah standar leukosit (8000). Walaupun variasi jumlah leukosit antara orang sehat dengan rata-rata sebagian besar variasi diantara orang sehat dan sakit, standar ini memenuhi perbandingan yang layak (WHO,1991; Harijanto dkk, 2010).

Diperlukan dua alat penghitung, satu untuk menghitung parasit dan yang lain untuk menghitung lekosit

Langkah 1

- 1a) Jika setelah 200 lekosit terdapat 10 atau lebih parasit yang teridentifikasi, dilaporkan pada *form* laporan jumlah parasit per 200 lekosit.
- 1b). Jika setelah 200 lekosit dihitung 9 parasit atau kurang, dilanjutkan menghitung sampai 500 lekosit pada alat penghitung, kemudian dilaporkan jumlah parasit per 500 lekosit.

Langkah 2.

Dalam setiap kasus, jumlah parasit relatif pada penghitungan lekosit, dapat diubah menjadi parasit per μl darah dengan rumus matematika sederhana:

$$\frac{\text{Jumlah parasit} \times 8000}{\text{Jumlah lekosit}} = \text{parasit per } \mu\text{l darah}$$

Jika dihitung 200 lekosit, jumlah parasit dikali 40 dan jika 500 lekosit dihitung jumlah parasit dikali 16.

Catatan: Pada petunjuk normal jumlah seluruh spesies yang ditemukan dihitung dan dilaporkan secara terpisah gametosit *P falciparum* dan parasit aseksual. Hal ini sangat penting jika monitoring respon obat sizontosida, dimana tidak diharapkan berpengaruh pada gametosit (WHO, 1991).

4.7.3 Prosedur ekstraksi DNA dengan Qiagen DNA blood kit

1. Kertas saring dipotong-potong secara steril kemudian disimpan dalam aliquot 1,5 ml.
2. Sampel dalam aliquot 1,5 ml ditambah dengan 0,5 ml saponin 0,5% (w/w) dalam HBS buffer pada temperatur ruang (RT) selama 1,5 jam, setiap 30 menit dicampur dengan baik
3. Sentrifus 3000 *rpm* selama 1 menit, kemudian larutan di buang.

4. Sampel dicuci dengan menambahkan 0,5 – 1 ml HBS buffer pada RT selama 10 menit, dicampur dengan baik.
5. Sentrifus 3000 *rpm* selama 1 menit, kemudian ditambahkan 0,5 – 1 ml HBS buffer pada RT selama 10 menit
6. Sentrifus 3000 *rpm* selama 1 menit, kemudian larutan dibuang dengan sempurna
7. Ditambahkan ATL buffer 180 μ l, inkubasi 85°C selama 15 menit. Campur dengan baik sebelum diinkubasi
8. Ditambahkan proteinase K 20 μ l, campur dengan baik (*vortex*), inkubasi 56°C selama 1 jam.
9. Simpan pada RT sampai temperatur sama dengan RT
10. Ditambahkan AL buffer 200 μ l inkubasi 56°C selama 10 menit, campur dengan baik (*vortex*)
11. Dibiarkan di RT, sentrifus 5000 *rpm* 1 menit, kemudian larutan dipindahkan ke aliquot baru
12. Sentrifus 5000 *rpm* 1 menit, pindahkan larutan ke aliquot baru
13. Ditambahkan ethanol absolut 200 μ l, dicampur dengan baik
14. Sentrifus 3000 *rpm* 1 menit. Pindahkan larutan ke *column*, tunggu pada RT 1 menit dari *column* terakhir ke membran yang sudah tersaring sebagian.
15. Sentrifus 8000 *rpm* 1 menit, dipindahkan *column* ke aliquot baru
16. Ditambahkan AW 1 buffer 500 μ l, tunggu pada RT 1 menit dari *column* terakhir
17. Sentrifus 8000 *rpm* 1 menit, dipindahkan *column* ke aliquot baru
18. Ditambahkan AW 2 buffer 500 μ l, tunggu pada RT selama 1 menit dari *column* terakhir

19. Sentrifus 8000 rpm 1 menit
20. Aliquot di atas diubah sebelum dimasukkan sentrifus, kemudian sentrifus 8000 rpm 8-10 detik (cepat). Dipindahkan *column* ke *column* baru
21. Aliquot dengan tutup diberi label, dibuka tutupnya dan diletakkan di atas kertas *tissue*, kemudian diletakkan *column* di dalam aliquot
22. Ditambahkan 40 µl AE buffer pada bagian tengah membran, inkubasi RT selama 5 menit dari *column* terakhir.
23. Sentrifus 8000 rpm 1 menit, pindahkan posisi aliquot dan *column* ke posisi yang berlawanan.
24. Sentrifus 8000 rpm, 8-10 detik (cepat), transfer *column* ke tas plastik.
25. Aliquot ditutup dan disimpan dalam suhu -20°C hingga digunakan.

4.7.4 Prosedur identifikasi spesies *Plasmodium* dengan tehnik *nested PCR*

Total volume campuran 20 µl berisi 2 µl sampel DNA *template*, 200 µM dNTP, 0,4 µM masing-masing *primer* dan 1 U enzim taq DNA polimerase. Kondisi reaksi amplifikasi adalah : inisial denaturasi pada 94°C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 50°C selama 30 detik dan perpanjangan rantai (*extension*) pada 72°C selama 1 menit, diulang sebanyak 30 siklus, dengan perpanjangan akhir pada 60°C selama 5 menit. Untuk *nested PCR*, sebagai cetakan untuk reaksi amplifikasi adalah hasil *PCR* pertama yang diencerkan 50 kali. Sebagai *primer* untuk *PCR* kedua, adalah PF dan *primer* yang spesifik untuk masing-masing spesies *Plasmodium*. Reagensia dan kondisi untuk *PCR* kedua sama dengan *PCR* pertama, hanya saja jumlah siklusnya 20. Reaksi ini menggunakan *Gene Amp PCR System 2700, Applied*

Biosystem. Produk PCR dapat dilihat dengan menggunakan gel agarose 2% yang dijalankan dalam medan elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan ethidium bromida dan dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital. Hasil dianggap positif bila ditemukan pita pada ketinggian yang sesuai dengan ketinggian pita dari kontrol positif *P. falciparum* pada 100 bp DNA ladder.

4.7.5 Prosedur deteksi mutasi genik gen *PfDHFR* dengan teknik PCR-RFLP

PfDHFR, volume total reaksi 20 μ l berisi 2 μ l sampel DNA, 200 μ M dNTP, 0,4 μ M masing-masing primer dan 1 U enzim taq DNA polimerase. Untuk *nested PCR*, DNA dari hasil PCR I terlebih dahulu diencerkan 10x dengan H₂O, reagensia untuk PCR kedua sama dengan PCR pertama. Primer dan kondisi reaksi amplifikasi dapat dilihat pada tabel 4.1. Reaksi ini menggunakan *Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem*. Produk PCR dapat dilihat dengan menggunakan gel agarose 2% yang dijalankan dalam medan elektroforesis. Gel kemudian diwarnai dengan ethidium bromida dan dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital. Hasil dianggap positif bila ditemukan pita pada ketinggian yang sesuai dengan ketinggian pita dari kontrol positif *P. falciparum* pada 100 bp DNA ladder.

RFLP dilakukan dengan pemberian enzim pemotong pada suhu optimal dan waktu yang diperlukan sesuai dengan yang ditunjukkan pada brosur dari produsen. Produk PCR digunakan tanpa pemurnian, total volume 50 μ l terdiri dari 5 μ l sampel, enzim 5 U/ μ l, 5 μ l buffer, 5 μ l BSA dan 30 μ l H₂O. Selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan gel agarose 2% dan diwarnai

dengan ethidium bromida, marker (100 bp), dilihat dengan transluminator kemudian difoto dengan menggunakan foto digital.

Tabel 4.1. Primer, kondisi reaksi amplifikasi, enzim restriksi dan kontrol DNA untuk deteksi mutasi genetik gen *PfDHFR*.

Gen	Kodon	Primer	Panjang fragmen	Kondisi Reaksi	Enzim restriksi	Kontrol DNA
<i>DHFR</i> PCR I		PR1 PR2	720	95°C x 3 menit; 92°C x 30 detik, 45°C x 45 detik; 72°C x 45 detik, x 45 siklus; 72°C x 3 menit		
Nested	108	SRA SRB	700	94°C x 5 menit; 95°C x 30 detik, 52°C x 1 menit; 72°C x 1 menit, x 35 siklus; 72°C x 8 menit.	Alu I, Bsr I, Srf I.	3D7 FCR3 K1

Analisis molekuler dilakukan sesuai dengan yang dilakukan (Tinto et al, 2007). Sampel darah dianalisis secara molekuler yang dikumpulkan pada *filter paper* (Whatman 3, Whatman International, Ltd., Maidstone, UK)

Deteksi mutasi dalam *dhfr* Asn/Thr-108 dikerjakan menggunakan *PCR* diikuti dengan *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. *The first-round PCR amplification* dilakukan dalam 25- μ L campuran yang mengandung 1x *PCR buffer* (Promega, Madison, WI), 2.5 mmol/L $MgCl_2$ (Promega), 0.2 mmol/L of dNTPs, 0.5 pmol setiap primer, 1 U of *Taq polymerase* (Promega), dan 1 μ L ekstrak *DNA* parasit. Kumpulan *second round PCR* dikerjakan dalam 50- μ L campuran yang mengandung 1 μ L of *primary PCR product*. *The amplified DNA fragments* dipisahkan dengan *electrophoresis* dalam agarose gel 2%. Hasil kumpulan *second round PCR* ditambahkan enzim (New England Biolabs). Dari mutasi *DHFR* 108, *AluI* hanya memotong *wild-type gene* (Ser-108) dalam 323 dan 372 bp, *BsrI* hanya memotong *mutant gene* (Asn-108)

dalam 328 dan 372 bp, dan *SrfI* hanya memotong *mutant gene* (Thr-108) dalam 324 dan 376 bp. Setiap seri sampel, sebagai control negatif digunakan air. Untuk deteksi Asn-108, digunakan 3D7 DNA sebagai *wild-type control* dan Dd2-DNA sebagai *mutant control* (Tinto et al, 2007).

4.8 Cara pengolahan dan Analisa data

Data yang diperoleh dikumpulkan, dimasukkan kedalam tabulasi data.

BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

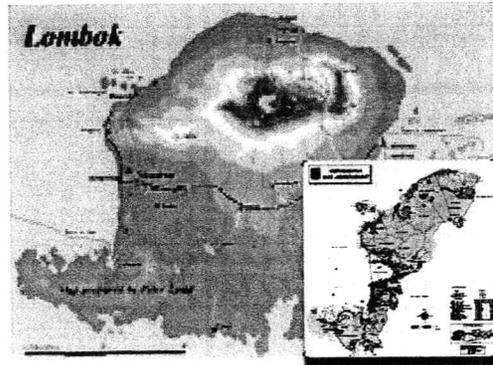
BAB V ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Gambaran Umum Lokasi Penelitian

1. Pulau Lombok

Lombok termasuk provinsi Nusa Tenggara Barat dan pulau ini dibagi menjadi 4 kabupaten dan 1 kota:

- Kota Mataram
- Kabupaten Lombok Barat
- Kabupaten Lombok Tengah
- Kabupaten Lombok Timur
- Kabupaten Lombok Utara



Gambar 5.1. Peta lokasi pulau Lombok, inset Lombok Barat. (Wikipedia-pulau Lombok, 16 Agustus 2010).

2. Kabupaten Lombok Barat

Luas kabupaten Lombok Barat 1.672 km². Terletak antara 115.46⁰ sampai 11.28⁰ BT dan 8.12⁰ sampai 8.55⁰ LS dengan batas-batas:

Sebelah utara : kabupaten Lombok Utara

Sebelah selatan : Samudera Indonesia

Sebelah barat : Selat Lombok

Sebelah timur : kabupaten Lombok Tengah

Jumlah penduduk 816.523 jiwa, kepadatan 488 jiwa/km², terbagi atas 15 kecamatan. Pembagian luas kecamatan dengan jumlah desa serta kepadatan penduduk dapat diamati pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Luas wilayah, jumlah desa, penduduk, rumah tangga, dan kepadatan penduduk menurut kecamatan di kabupaten Lombok Barat tahun 2008.

NO	KECAMATAN	LUAS WILAYAH (km ²)	JUMLAH DESA	JUMLAH PENDUDUK	JUMLAH RUMAH TANGGA	RATA-RATA JIWA/RUMAH TANGGA	KEPADATAN PENDUDUK /km ²
1	2	3	4	7	8	9	10
1	Bayan	329.1	9	46,480	12,362	3.8	141
2	Kayangan	126.35	8	41,234	10,156	4.1	326
3	Gangga	157.35	5	46,312	12,187	3.8	294
4	Tanjung	115.64	7	47,134	11,116	4.2	408
5	Pemenang	81.09	4	32,172	8,356	3.9	397
6	Batu Layar	34.11	6	38,665	9,690	4.0	1,134
7	Gunung Sari	89.74	12	77,128	23,586	3.3	859
8	Lingsar	96.58	10	68,037	15,393	4.4	704
9	Narmada	107.62	16	89,501	25,427	3.5	832
10	Labuapi	28.33	10	63,780	15,945	4.0	2,251
11	Kediri	21.64	8	57,042	15,543	3.7	2,636
12	Kuripan	21.56	4	34,140	9,177	3.7	1,583
13	Gerung	62.3	11	75,527	19,720	3.8	1,212
14	Lembar	70.29	5	47,828	12,788	3.7	680
15	Sekotong	330.45	6	51,543	14,854	3.5	156
JUMLAH (KAB/KOTA)		1,672.15	121	816,523	216,300	3.8	488

Sumber: Kantor Statistik Kabupaten/Kota

Angka malaria tertinggi ditemukan di kecamatan Batulayar (Puskesmas Meninting) dan Gunungsari. Kecamatan Batulayar mempunyai keunikan tersendiri, karena didukung oleh sarana pariwisata panorama pantai Senggigi dengan hamparan pasir putih. Batulayar berbatasan langsung dengan kota Mataram (9 km). Jarak kawasan Senggigi dengan ibukota Lombok Barat 30 km. Luas wilayah 34,11 km², dengan jumlah penduduk 38.214 jiwa (18.689 laki-laki dan 19.525 perempuan). Mata pencaharian penduduk kebanyakan petani, perkebunan dan pedagang kecil (<http://www.lombokbaratkab.go.id>).

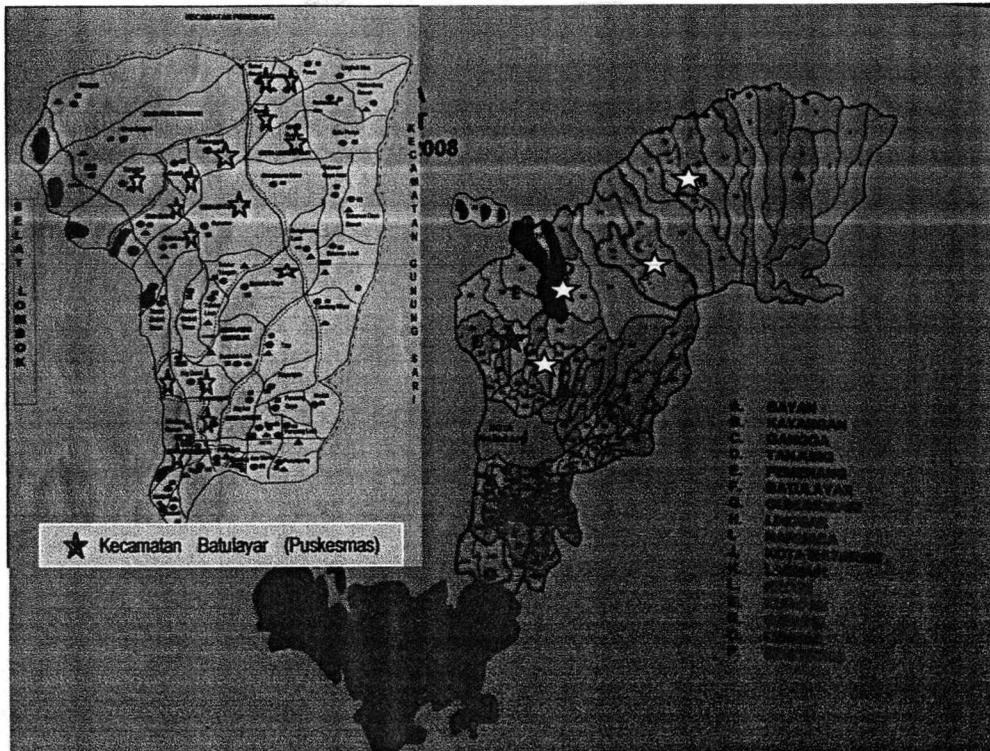
Kecamatan Gunungsari terdiri dari 12 desa, dengan luas wilayah 89,74 km² dan jumlah penduduk 77.128. Jarak dari ibukota kabupaten (Gerung) 29 km, dari ibukota provinsi 11 km, dan jarak dengan bandara Selaparang 4 km. sebagian besar penduduk bermata pencaharian bertani, berkebun, beternak, dan industri kecil kerajinan. Potensi lahan terdiri dari sawah dengan irigasi 2.196,46 Ha, tadah hujan 69,46 Ha, tegalan/kebun 3,971,66 Ha, hutan 1.697,2 Ha, lahan pekarangan 585 Ha, dan lain-lain seluas 454,22 Ha (<http://www.lombokbaratkab.go.id>).

5.2 Gambaran Malaria di Daerah Penelitian

Tahun 2008 kabupaten Lombok Barat terbagi atas 16 kecamatan, seperti yang terlihat pada peta endemisitas AMI (Gambar 5.2), bahwa tingkat endemisitas dibagi menjadi tiga, yaitu:

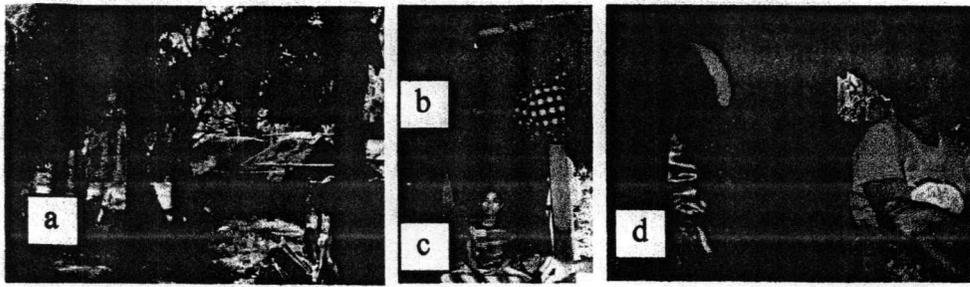
- *Hight Incidence Area/HIA* (AMI > 50 ‰) daerah yang bewarna merah
- *Meso Incidence Area/MIA* (AMI 10–50 ‰) daerah yang warna kuning
- *Low Incidence Area/LIA* (AMI 0 - 10 ‰) daerah yang berwarna hijau.

Sekotong termasuk daerah endemisitas tinggi; Tanjung merupakan daerah dengan semua tingkat endemisitas. Bayan, Batulayar, Gunungsari, Narmada dan Labuapi termasuk daerah dengan tingkat endemisitas rendah sampai sedang. Gerung dan Lingsar termasuk tingkat endemisitas rendah, sedangkan kecamatan Kayangan, Gangga, Pemenang, dan Lembar dengan tingkat endemisitas sedang. Sampai pertengahan tahun 2010, Sekotong bukan lagi termasuk daerah dengan tingkat endemisitas tinggi. Inset Gambar 5.2 adalah dusun sebagian besar asal sampel di Puskesmas Meninting.



Gambar 5.2 Lokasi Penelitian dan peta wilayah kabupaten Lombok Barat berdasarkan endemisitas malaria tahun 2008. Lokasi penelitian, ditandai dengan tanda bintang (☆), yaitu dari Puskesmas Kayangan, Gangga, Tanjung, dan Puskesmas Gunungsari. Tanda ★ (bintang berwarna merah adalah kecamatan Batulayar, asal sebagian besar sampel di wilayah kerja Puskesmas Meninting, pada inset ditandai dengan bintang berwarna kuning (☆).

Manusia merupakan *host intermediate* sedangkan nyamuk Anopheles merupakan *host defenitive*. Perilaku bermukim penduduk yang berkelompok membentuk suatu dusun, dan tinggal disekitar ternak (sapi, kambing) yang dimiliki. Kebiasaan penduduk pada malam hari duduk bercengkerama bahkan istirahat di serambi dan 'berugag' hingga larut malam. Sebagian penderita yang ditemukan bahkan sehari-hari beristirahat di 'berugag'. Kondisi seperti di atas terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Kondisi penduduk di daerah endemis malaria; a: ternak bersebelahan dengan tempat tinggal; b,c: 'berugag' digunakan sebagai tempat istirahat (beralih fungsi sebagai kamar bagi si sakit), d: serambi untuk menerima tamu dan bercengkerama.

Data malaria kabupaten Lombok Barat tahun 2006-2009 dapat diamati pada Tabel 5.2. Angka *P falciparum* yang menurun di tahun 2009, didukung oleh adanya *Global Fund* (GF) dalam program pemberantasan dan pengobatan malaria menggunakan *ACT* di Nusa Tenggara Barat sejak bulan Maret 2008.

Tabel 5.2 Data malaria kabupaten Lombok Barat tahun 2006-2009:

	2006	2007	2008	2009
Penduduk	737.491	782.943	796.106	588.110
Klinis malaria	15.854	17.600	14.831	7.053
AMI (%)	21,50	22,5	18,63	11,99
Sediaan darah diperiksa	11.814	15.025	13.214	6.689
Jumlah positif	2.078	3.212	1.498	1.352
SPR (%)	17,6	21,38	11,34	20,21
Angka falciparum (%)	69,39	78,86	77,44	61,46

Angka *P falciparum* di Jawa-Bali tahun 2000-2007 berturut-turut sebesar 29,54 – 41,87 – 41,87 – 46,76 – 29,89 – 21,26 – 33,95 – 51,05%; Luar Jawa-Bali 19,79 – 27,19 – 24,06 – 27,51 – 36,65 – 46,80 – 46,33 – 49,56 % (Laihad & Arbani, 2010). Peningkatan angka *P falciparum* di Luar Jawa-Bali menunjukkan adanya resistensi yang terus meningkat dari tahun ke tahun berikut. Angka *P falciparum* NTB yang rendah disebabkan dominasi *P vivax* yang sangat tinggi di Sumbawa dan Bima. Angka *P falciparum* yang tinggi di

Lombok Barat menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap *P falciparum*. Perbandingan data malaria di Luar Jawa-Bali, NTB, Lombok Barat, dan Puskesmas yang menjadi daerah penelitian dapat diamati pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Perbandingan data malaria Luar Jawa-Bali, NTB, kabupaten Lombok Barat dan Puskesmas

	Malaria Klinis	Sediaan Darah diperiksa	Total (+)	Total Pf(+)	Angka Pf (%)
A. Malaria di Luar Jawa-Bali tahun 2006-2007					
Tahun 2006	1.754.444	820.750	340.411	157.707	46,33
Tahun 2007	1.548.439	706.081	307.170	152.220	49,56
B. Malaria di NTB tahun 2006-2008					
Tahun 2006	79.958	52.771	13.441	3.346	24,89
Tahun 2007	90.842	69.271	21.228	5.487	25,85
Tahun 2008	103.154	79.428	22.413	5.125	22,87
C. Malaria di Lombok Barat tahun 2006-2008					
Tahun 2006	15.854	11.814	2.078	1.442	69,39
Tahun 2007	17.600	15.025	3.212	2.533	78,86
Tahun 2008	14.831	13.214	1.498	1.160	77,44
D. Malaria di Puskesmas Lombok Barat tahun 2006					
Gangga	1.227	1.227	474	355	70,68
Kayangan	2.460	514	194	144	74,23
Tanjung	2.855	2.855	601	455	75,71
Gunungsari	1.220	1.139	145	107	73,79
Meninting	268	268	65	46	70,77
Penimbung	589	534	37	21	56,76
E. Malaria di Puskesmas Lombok Barat tahun 2007					
Gangga	1.450	1.450	480	355	73,96
Kayangan	2.021	1.136	414	414	92,83
Tanjung	3.503	3.503	770	617	80,13
Gunungsari	1.371	1.316	211	187	88,63
Meninting	731	731	377	350	92,84
Penimbung	552	439	79	56	70,89

Hasil pencarian dan penemuan penderita menunjukkan bahwa *P falciparum* merupakan jenis parasit terbanyak, diikuti oleh *P vivax* dan beberapa kasus *P malariae*. Berdasarkan laporan bulanan penemuan dan pengobatan malaria kabupaten Lombok Barat periode Januari – Desember 2009 tercatat tiga Puskesmas dengan jumlah penderita malaria tertinggi adalah Penimbung, Gunungsari dan Meninting 405, 395, dan 354. Pada periode Januari – Mei 2010, Puskesmas Meninting, Gunungsari, dan Penimbung menunjukkan jumlah penderita tertinggi kasus positif malaria masing-masing sebesar 254, 183, dan 176.

Tempat perindukan nyamuk *Anopheles* sebagian besar berada di daerah pantai seperti lagoon, muara sungai, tambak, aliran sungai terputus, sawah, dan genangan-genangan air lain, seperti yang terlampir pada Lampiran 7 (Gambar lahan-lahan tempat perindukan nyamuk *Anopheles* di kabupaten Lombok Barat). Curah hujan sangat berpengaruh terhadap habitat nyamuk antara lokasi daerah pantai dan pegunungan dengan puncak populasi nyamuk yang berbeda (Dinkes Lobar, 2002).

5.3 Karakteristik Penderita Malaria Falciparum

Gejala klinis malaria di Nusa Tenggara Barat, khususnya Lombok Barat sangat bervariasi, dari gejala klasik malaria yang terdiri dari tiga stadium yang berurutan, yaitu *menggigil*, *demam*, *berkeringat*, suhu $> 37,5^{\circ}\text{C}$, dapat ditemukan pembesaran limpa dan anemia.

Di lokasi pengambilan sampel, gejala klasik di atas (*menggigil*, *demam*, dan *berkeringat*) tidak timbul berurutan, bahkan tidak semua gejala tersebut dapat ditemukan. Selain gejala klasik, dapat juga disertai gejala lain seperti

lemas, sakit kepala, mialgia, sakit perut, sakit pinggang, mual, dan diare. Bahkan pada beberapa penderita tidak ada kenaikan suhu tubuh, namun hasil pemeriksaan mikroskopis dinyatakan positif malaria.

Hasil pengumpulan sampel sebesar 117, yang memenuhi kriteria 82 sampel yang terdeteksi seperti ditunjukkan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Karakteristik penderita dengan gejala klinis malaria

	Lombok Barat N= 82	%-ase
Jenis kelamin		
Laki-laki	49	59,8
Perempuan	33	40,2
Umur		
0 – 4	5	6,1
5 – 9	11	13,4
10 – 14	21	25,6
> 15	45	54,9
Penduduk		
Asli	77	93,9
Pendatang	5	6,1

Karakteristik penderita dengan gejala klinis malaria berdasarkan jenis kelamin lebih banyak pada laki-laki (59,8%) dibandingkan perempuan. Berdasarkan karakteristik umur penderita dibedakan menurut kelompok umur terendah pada anak umur 0 – 4 tahun 6,1% (5/82) dan tertinggi pada kelompok umur dewasa (> 15 tahun) 54,9% (45/82). Karakteristik berdasarkan jenis kependudukan dibedakan atas penduduk asli dan pendatang 93,9% dan 6,1%. Data karakteristik penduduk penderita malaria di Lombok dapat dilihat pada Lampiran 8.

Jumlah sampel sebanyak 82 tadi kemudian dilakukan *cross check* di laboratorium malaria *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya baik mikroskopis maupun secara molekuler (*nested PCR*). Hasil *nested PCR* yang mengandung *P falciparum* baik sebagai infeksi tunggal (*P falciparum*) maupun

infeksi campuran (*P falciparum* dan *P vivax*) diperiksa adanya mutasi *DHFR* pada *codon* 108. Hasil pemeriksaan mikroskopis diperoleh 76 penderita malaria positif, data seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.5. Hasil pemeriksaan dibedakan berdasarkan jenis kelamin 59,2% (45/76) laki-laki dan 40,8% (31/76) perempuan. Berdasarkan kelompok umur terendah pada anak umur 0 – 4 tahun sebesar 5,3% (4/76) dan tertinggi pada kelompok umur dewasa (> 15 tahun) sebesar 53,9% (41/76). Penderita yang dinyatakan positif malaria dengan demam (suhu tubuh > 37,5°C) 89,5%. Berdasarkan jenis malaria dari hasil pemeriksaan mikroskopis masing-masing malaria *falciparum*, malaria *vivax*, dan malaria campuran (malaria *falciparum* + *vivax*) diperoleh 61,8%; 19,7%, dan 18,4%.

Tabel 5.5 Karakteristik penderita malaria di pulau Lombok.

	Lombok Barat N = 76	%-ase
Jenis kelamin		
Laki-laki	45	59,2
Perempuan	31	40,8
Umur		
0 – 4	4	5,3
5 – 9	11	14,5
10 – 14	20	26,3
> 15	41	53,9
Suhu > 37,5°C	68	89,5
Jenis malaria*		
Malaria <i>falciparum</i>	47	61,8
Malaria <i>vivax</i>	15	19,7
Malaria <i>falciparum</i> dan <i>vivax</i>	14	18,4

*Jenis malaria didefinisikan sebagai malaria yang disebabkan oleh *P falciparum* (malaria *falciparum*), *P vivax* (malaria *vivax*), *P falciparum* dan *P vivax* (malaria *falciparum* dan *vivax*). Identifikasi berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis.

Berdasarkan jenis kependudukan diperoleh sampel sebesar 77 berasal dari penduduk asli dan 5 sampel berasal dari pendatang; dari 77 sampel 7,8% (6/77) yang negatif dan yang mengandung *P falciparum* sebagai infeksi tunggal sebesar 43 sampel dan 13 sampel sebagai infeksi campuran. Sedangkan pada pendatang semua sampel (5) mengandung *P falciparum*.

Tabel 5.6 Hasil pemeriksaan mikroskopis berdasarkan jenis kependudukan dari penderita malaria di Lombok

	Jumlah sampel	F*	Hasil pemeriksaan mikroskopis						Total (+)	
			%	V*	%	Mix*	%	-		%
Penduduk asli	77	43	55,8	15	19,5	13	16,9	6	7,8	71
Pendatang	5	4	80	0	0	1	20	0	0	5
Jumlah	82	47		15		14		6		76

Hasil pemeriksaan mikroskopis pada Tabel 5.6 ditandai dengan F* adalah *Plasmodium falciparum*, V adalah *P vivax*, dan Mix adalah campuran antara *P falciparum* dan *P vivax*.*

Jumlah sampel yang terdiri dari 82 orang, yang pernah mendapatkan pengobatan malaria sebanyak 31, dimana 29 orang diantaranya positif malaria dengan rincian seperti yang diperlihatkan pada Tabel 5.7. Dua orang lainnya dinyatakan negatif secara mikroskopis dengan dan tanpa demam. Penggunaan klorokuin dan ACT (23,3%) untuk penderita malaria falciparum, menempati urutan kedua setelah klorokuin digunakan untuk pengobatan malaria vivax (26,7%); sedangkan penderita yang teridentifikasi infeksi campuran yang pernah mendapat pengobatan masing-masing 10% untuk klorokuin dan ACT dan hanya 3,3% (satu orang) yang pernah mendapat pengobatan dengan SP. Data karakteristik pengobatan penduduk dengan gejala klinis malaria di Lombok, menurut hasil pemeriksaan mikroskopis dapat diperhatikan pada Lampiran 9.

Tabel 5.7 Riwayat pengobatan penderita malaria di Lombok Barat

N = 29	Klorokuin	SP	ACT
Malaria falciparum	7 (23,3)	-	7 (23,3)
Malaria vivax	8 (26,7)	-	1 (3,3)
Malaria falciparum dan vivax	3 (10)	1 (3,3)	3 (10)

Tabel 5.7: Jenis obat yang pernah di gunakan penderita sebelumnya saat penderita diambil sebagai sampel dalam penelitian, yaitu Klorokuin, SP untuk Sulfadoksin Pirimetamin, dan ACT (*Artemisinin Combination Therapy*).

Penderita malaria yang pernah mendapat pengobatan baik dengan Klorokuin, SP, maupun ACT sejumlah 29 orang. Penderita yang demam (suhu > 37,5°C) sebanyak 26 malaria positif secara mikroskopis, yaitu 13 (50%) yang

terinfeksi malaria *falciparum*, 6 (23,1%) yang terinfeksi malaria *vivax*, dan 7 (26,9%) yang terinfeksi malaria campuran; sedangkan tiga orang lainnya terdeteksi dengan suhu tubuh tidak meningkat tapi *P vivax* positif, dan satu orang penderita (LB-91) pernah mendapat pengobatan dengan dua jenis obat, yaitu Klorokuin dan ACT. Perbandingan jenis malaria dengan demam, kepadatan parasit dan pengobatan ditunjukkan pada Tabel 5.8. Jenis obat yang digunakan diperoleh dari wawancara, umumnya penderita pernah mengkonsumsi satu jenis obat malaria dan hanya satu orang yang mempunyai riwayat pengobatan dengan SP (LB-1) yang dinyatakan positif malaria. Hanya satu orang penderita (LB-91) pernah mendapat pengobatan dengan dua jenis obat, yaitu Klorokuin dan ACT.

Plasmodium menginfeksi eritrosit dalam stadium yang berbeda tergantung jenis parasit dan lamanya infeksi, sehingga kepadatan parasit dinyatakan sebagai jumlah parasit per μl darah. Jumlah parasit per μl darah berkisar antara 400 – 14.720, kecuali jumlah parasit ekstrim tinggi adalah LB-119 sebesar 172.923 parasit per μl darah dari infeksi *P falciparum*. Jumlah ekstrim rendah yaitu LB-8, LB-111 dan LB-114 dengan jumlah parasit 120, 200 dan 112 per μl darah yang terdeteksi *P vivax* (dua yang pertama) dan sebagai infeksi campuran (*P falciparum* dan *P vivax*).

Tabel 5.8 Perbandingan jenis malaria dengan demam, kepadatan parasit dan pengobatan di kabupaten Lombok Barat

N = 26	> 37,5°C	Kepadatan parasit*	Pengobatan		
			Klorokuin	SP	ACT
Malaria <i>falciparum</i>	13 (50)	17.071	7	-	7
Malaria <i>vivax</i>	6 (23,1)	2.560	5	-	1
Malaria <i>falciparum</i> dan <i>vivax</i>	7 (26,9)	4.016	3	1	3

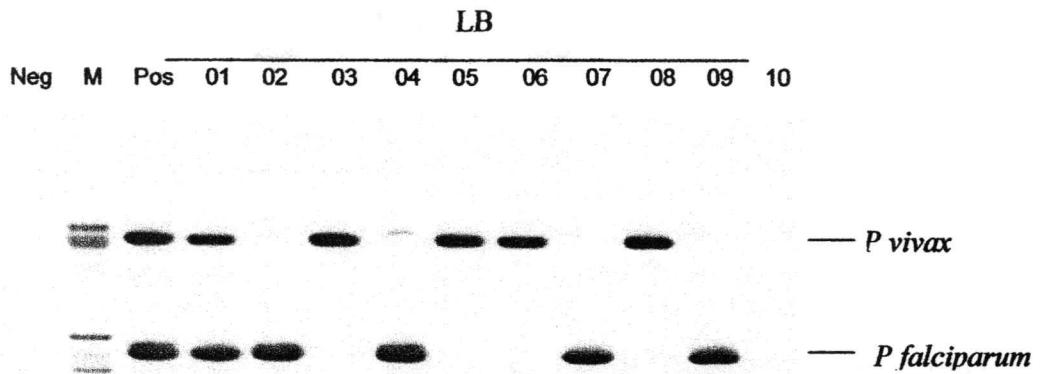
Tabel 5.8 Kepadatan parasit*, jumlah parasit dihitung dalam 200 lekosit dikalikan 8000 dan dinyatakan sebagai jumlah parasit per μl darah.

5.4 Hasil Identifikasi Mutasi gen *PfDHFR* codon 108 .

Pemeriksaan mikroskopis masih digunakan sebagai *gold standard* untuk pemeriksaan malaria walaupun saat ini sudah ada metode yang diyakini lebih sensitif, yaitu metode *nested PCR*. Hasil pemeriksaan secara mikroskopis menunjukkan bahwa dari 82 sampel yang diperiksa, perbedaan hasil pemeriksaan mikroskopis dan *nested PCR* ditemukan sebanyak 30,5% (25 dari 82 sampel); 6 sampel negatif dan 7 sampel sebagai *P vivax*, sisanya 44 teridentifikasi mengandung *P falciparum* (*P falciparum* dan *P falciparum* + *P vivax*). Hasil pemeriksaan *nested PCR* dan mikroskopis walaupun menempati frekuensi yang sama, tapi berbeda dalam komposisinya seperti yang terlihat pada Tabel 5.9. Perbandingan hasil pemeriksaan mikroskopis dan *nested-PCR* selengkapnya diperlihatkan pada Lampiran 10. Contoh hasil pemeriksaan *nested-PCR* seperti yang diperlihatkan pada gambar 5.4, yaitu sampel no 2,4,7,9 adalah *P falciparum*, sampel no 1 *P falciparum* dan *P vivax* (infeksi campuran), dan sampel 3, 5, 6 dan 8 adalah *P vivax*; sehingga sampel yang terdapat *P falciparum* baik sebagai infeksi tunggal (*P falciparum* saja) maupun infeksi campuran terdapat pada sampel 1, 2, 4, 7, dan 9.

Tabel 5.9 Hasil pemeriksaan mikroskopis, *nested-PCR*, dan identifikasi mutasi gen *PfDHFR* codon 108 penderita malaria di Lombok.

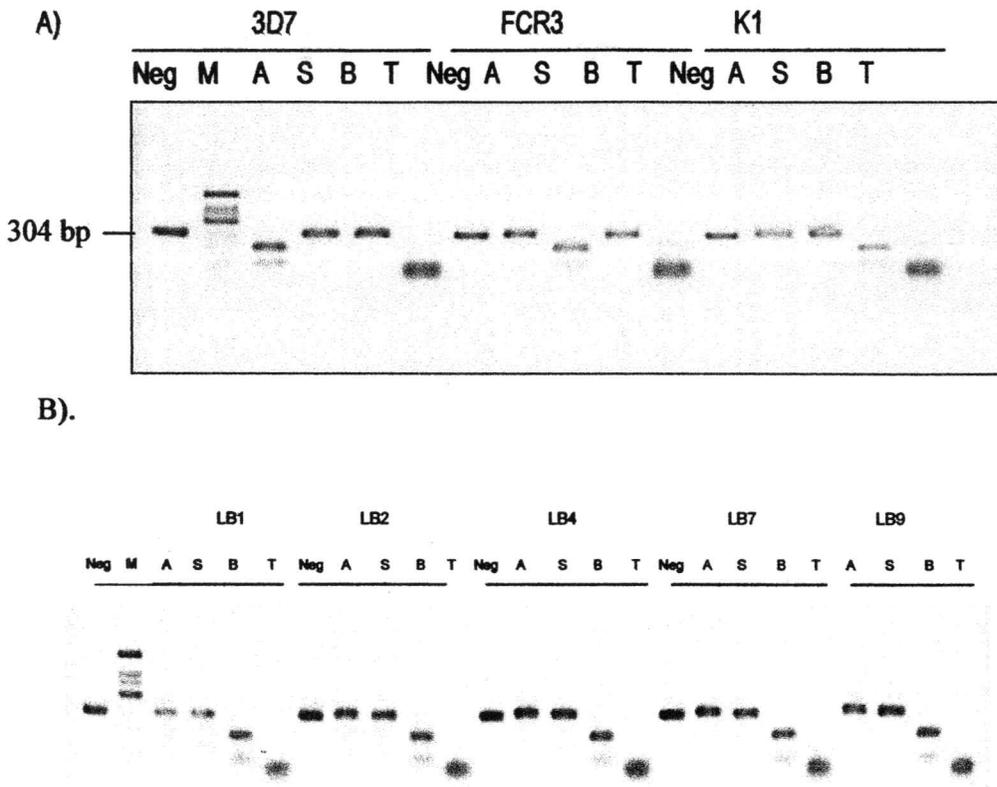
Puskesmas	Mikroskopis				Nested-PCR				PCR-RFLP		
	F	V	Mix	Neg	F	V	Mix	Neg	Ser	Asn	Thr
Meninting	34	9	12	3	36	9	5	8	-	41	-
Gunungsari	8	2	1	1	9	-	1	2	-	10	-
Kayangan	1	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-
Gangga	1	3	1	-	-	-	-	5	-	-	-
Tanjung	3	1	-	-	2	1	1	-	-	3	-
Total	47	15	14	6	47	10	7	18	-	54	-
%-ase	57,3	18,3	17,1	7,3	57,3	12,2	8,5	22	-	100	-



Gambar 5.4 Identifikasi spesies Plasmodium dengan metode *nested PCR*.

M adalah *Marker one step-9* untuk mengetahui letak DNA yang teramplifikasi. Hasil amplifikasi DNA sampel oleh primer spesifik yang mengkode gen 18s rRNA untuk spesies *Pf* dan *Pv* terlihat pada kolom 3-13 (LB 1-10), LB 1 menunjukkan hasil positif *P. falciparum* dan *P. vivax*; LB 2,4,7,9 menunjukkan hasil positif *P. falciparum*; LB 3,5,6,8 menunjukkan hasil positif *P. vivax*; sedangkan LB 10 menunjukkan hasil pemeriksaan negatif. Kontrol negatif *Pf* dan *Pv* pada kolom 1 Kontrol positif *Pf* dan *Pv* pada kolom 3.

Penentuan hasil pemeriksaan *nested PCR* dilanjutkan dengan identifikasi mutasi gen *PfDHFR codon 108*. Contoh hasil pemeriksaan mutasi gen *PfDHFR codon 108* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.5. Hasil pemeriksaan mutasi *PfDHFR codon 108* selengkapnya dapat diperhatikan pada Lampiran 11.



Gambar 5.5 Identifikasi mutasi gen *PfdHFR* dengan metode *nested PCR-RFLP*. M adalah *marker one step-9* menunjukkan lokasi amplifikasi DNA yang terpotong oleh enzim-enzim restriksi : *Alu I* (kolom A = serin-108/*wild tipe*), *ScrF I* (kolom S = 108-treonin), *Bsr I* (kolom B = 108-asparagin). 3D7 dan FCR3 adalah strain *P. falciparum* yang berasal dari Afrika, K1 adalah strain *P. falciparum* yang berasal dari Thailand

- A) Mutasi *PfdHFR* di *codon* 108 ditunjukkan dengan pemotongan enzim restriksi *Bsr I* (serin 108 asparagin) pada strain *P. falciparum* K1 (Kontrol N108), pemotongan enzim *ScrF I* (serin 108 threonin) pada strain *Pf FCR3* (Kontrol T108), dan pemotongan enzim restriksi *Alu I* pada strain *Pf 3D7* menunjukkan *wild type* (S108). Mutasi *PfdHFR* di kodon 51 ditunjukkan dengan pemotongan enzim restriksi *TSP 509 I* (asparagin 51 isoleusin) yaitu Ile-51.
- B) Mutasi *PfdHFR* di *codon* 108 pada sampel LB 1,2,4,7,dan 9 menunjukkan Asn-108.

Tabel 5.10 Mutasi gen *PfdHFR codon* 108 dengan metode *PCR-RFLP* di Lombok

Asal Sampel	<i>PfdHFR codon-108</i>	Frekuensi (%)
Meninting	Asn	41 (75,9)
Gunungsari	Asn	10 (18,5)
Tanjung	Asn	3 (3,7)

Hasil positif *P falciparum* yang teridentifikasi dengan metode *nested PCR* dilakukan *nested PCR-RFLP* dan didapatkan bahwa dari 82 sampel, 76 sampel positif malaria. Sedangkan penderita yang didalam darahnya secara mikroskopis ditemukan *P falciparum*, baik berupa infeksi tunggal (malaria falciparum) maupun infeksi campuran (malaria falciparum dan vivax) sejumlah 61 sampel sedangkan dengan metode *nested-PCR* 54 sampel. Hasil identifikasi mutasi *PfDHFR* pada *codon* 108 dinyatakan semua sampel mengalami mutasi pada *codon* 108 dalam bentuk *asparagin (Asn)*, dengan perincian di Puskesmas meninting 75,9% (41/54); Puskesmas Gunungsari 18,5% (10); Puskesmas Tanjung 3,7% (3/54) jumlah total sebanyak 54 (100%).

BAB 6 PEMBAHASAN

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Gambaran malaria di daerah penelitian

Penyakit malaria tercatat pada urutan kedua dalam kelompok penderita penyakit berpotensi wabah, pada tahun 2000 tercatat empat kali. Sejak tahun 1995 - 2000 AMI NTB berkisar 46,21 – 53,26 ‰ (AMI Nasional 28,06 ‰). Pada dua tahun terakhir terjadi KLB di beberapa kecamatan, yaitu di Sekotong, Tanjung dan Pemenang.

Topografi daerah merupakan daerah pesisir sepanjang pantai utara ke selatan dan pegunungan serta daerah pertanian. Mata pencaharian sebagian besar penduduk adalah buruh tani dan nelayan dengan latar belakang pendidikan relatif rendah. Sebagian penduduk bermukim di sepanjang pantai yang merupakan daerah endemis malaria; sebagian lagi di daerah pedesaan/pegunungan. Penduduk tinggal secara berkelompok dan banyak yang berada di lingkungan tempat perindukan potensial nyamuk Anopheles, dan tidak mempunyai batas pekarangan yang jelas (Dinkes Lobar, 2002).

Program pemberantasan malaria yang dilakukan di daerah endemis malaria salah satunya adalah penggunaan kelambu yang berinsektisida. Sebagian besar penderita yang mempunyai kelambu tidak menggunakan secara efektif, seperti:

- Kelambu yang sudah dibagikan pada kelompok masyarakat tertentu tidak dimanfaatkan, masih terbungkus rapi dalam plastik walaupun telah diterima dalam waktu lebih dari tiga bulan.
- Insektisida yang dicelupkan pada kelambu beraroma tajam, mata terasa perih, sehingga kelambu enggan digunakan.

- Pada masyarakat pesisir kelambu ada yang beralih fungsi.
- Perilaku masyarakat membiarkan bayi dan balita tidur di luar ('berugag') hingga hampir larut malam baru pindah tidur kedalam rumah dengan atau tanpa kelambu. Hal ini memberikan waktu kontak dengan nyamuk menjadi lebih panjang dan memungkinkan terjadi penularan.

Hasil pencarian dan penemuan penderita secara *Passive Case Detection* (PCD), AMI tahun 1996 - 2000 berkisar 44,22 – 50,78 %. Ditinjau dari sisi kuantitas terjadi penurunan tapi kualitas meningkat dengan beberapa kali terjadi KLB, dengan peningkatan kasus positif terhadap malaria *falciparum* yang pada tahun 2000 terjadi 69,21 % dari 2.576 kasus (Dinkes Lobar, 2002).

Angka kesakitan malaria tahun 2000 dengan nilai di atas angka kesakitan malaria untuk Lombok Barat terjadi di kecamatan Bayan 188,74 %, Gangga 79,73 %, Pemenang 91,44 %, Lembar 79,56 %, dan Sekotong 110,17 % (Dinkes Lobar, 2002).

Peningkatan angka *P falciparum* di Luar Jawa-Bali menunjukkan adanya resistensi yang terus meningkat dari tahun ke tahun berikut. Angka *P falciparum* NTB menjadi rendah disebabkan dominasi *P vivax* yang sangat tinggi di Sumbawa dan Bima. Angka *P falciparum* yang tinggi di Lombok Barat menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap *P falciparum*.

Hasil pencarian dan penemuan penderita menunjukkan bahwa *P falciparum* merupakan jenis parasit terbanyak, diikuti oleh *P vivax* dan beberapa kasus *P malariae*. Pengobatan malaria sebelum periode Maret 2008 digunakan Klorokuin untuk malaria *vivax* dan SP untuk pengobatan malaria *falciparum* tanpa komplikasi. Ada kecenderungan angka *P falciparum* di

Lombok Barat terus meningkat, tapi dengan masuknya program pengobatan dengan menggunakan ACT/Arsuamor dan pemberantasan malaria oleh *Global Fund* yang dimulai pada bulan Maret 2008 terjadi penurunan jumlah dari klinis malaria, sediaan darah (SD), jumlah positif malaria, dan juga penurunan angka *P falciparum* dari 78,86 % tahun 2007 menjadi 77,44% tahun 2008 (lihat Tabel 5.3 di halaman 63); dan pada tahun 2009 turun lebih banyak menjadi 61,46% .

Walaupun Puskesmas-Puskesmas yang digunakan sebagai lokasi penelitian menjadi 'donatur' tingginya angka *P falciparum* di Lombok Barat, tapi dalam penelitian ini kasus lebih banyak ditemukan di puskesmas Meninting, diikuti oleh puskesmas Gunungsari dan Tanjung. Banyaknya sampel yang berasal dari Puskesmas Meninting karena pencarian penderita dilaksanakan lebih intensif dibandingkan pada Puskesmas lain. Pengambilan sampel juga dilakukan langsung ke kantong-kantong malaria, serta bantuan dari kegiatan lapangan oleh mahasiswa STIKES maupun Poltekkes. Sebagian penderita yang datang ke Puskesmas Gunungsari tidak hanya berasal dari wilayah setempat, tapi juga berasal dari daerah sekitar, seperti dari Penimbung, Meninting, bahkan dari Pemenang (Setangi). Puskesmas Gunungsari merupakan Puskesmas dengan pelayanan rawat inap.

Wilayah kerja Puskesmas Meninting 6 desa, yaitu Lembah Sari, Batu Layar, Senggigi, Senteluk, Sandik, dan Meninting. Lebih dari sebagian kampung/dusun di desa Lembah Sari, Batu Layar, Senggigi dan Senteluk merupakan daerah pegunungan yang sulit dijangkau, sedang kampung lainnya dataran rendah dan pantai dengan banyak lagoon. Lagoon di daerah pantai merupakan tempat perindukan nyamuk, terutama *Anopheles*. Meningkatnya

malaria di daerah pegunungan di dukung oleh mata air dan tempat penampungan air berupa bak terbuka yang dapat menjadi tempat perindukan nyamuk. Berkurangnya debit air sungai karena perubahan lingkungan dan pemanasan global, mempercepat surut, penyempitan aliran sungai menyebabkan aliran sungai terputus, muara sungai menutup. Hal ini juga dapat menambah tempat perindukan nyamuk.

Perubahan cuaca dan musim yang tidak menentu memperpanjang masa penularan. Menurut periode sebelumnya, setelah bulan Juni biasanya kasus malaria menurun. Penurunan kasus pada bulan Juni-Juli memang terjadi di semua Puskesmas, yang didukung dengan suksesnya kegiatan *malaria blood survey* (MBS) pada periode tersebut. Dampak pemanasan global dan perubahan musim pada akhir bulan Juli - Agustus dengan kembalinya curah hujan yang cukup tinggi dan panas yang berselang menyebabkan transmisi malaria meningkat. Curah hujan sangat berpengaruh terhadap habitat nyamuk.

Dasar pendidikan penduduk yang rendah kebanyakan hanya sekedar untuk mencukupi kebutuhan dasar, yaitu pangan. Penduduk di daerah pegunungan mencari nafkah dengan mencari kayu bakar di hutan, berkebun, pedagang kecil baik di rumah maupun berdagang di daerah pantai. Rendahnya penghasilan menyebabkan sebagian penduduk di pegunungan tidak mampu untuk datang berobat. Bahkan sebagian penderita yang dikunjungi ke rumah sudah mengidap demam satu sampai dua minggu. Obat yang diminum pun, sekedar untuk menghilangkan rasa sakit. Dari kondisi ini terlihat bahwa mobilitas penduduk tidak tinggi, hanya disekitar daerah tersebut.

6.2. Karakteristik penderita malaria falciparum.

Di daerah endemis malaria, seperti di lokasi pengambilan sampel penderita yang telah mempunyai imunitas terhadap malaria, gejala klasik malaria (menggigil, demam, berkeringat) tidak timbul secara berurutan, bahkan tidak semua gejala dapat ditemukan. Selain gejala klasik, dapat disertai gejala lain seperti lemas, sakit kepala, mialgia, sakit perut, sakit pinggang, mual/muntah, dan diare (Suparman, 2005). Bahkan pada beberapa penderita tidak ditemukan kenaikan suhu tubuh, namun malaria positif secara mikroskopis.

Hasil pengumpulan sampel sebesar 82, hasil *cross check* menunjukkan 6 sampel negatif dan 92,7% (76 dari 82) sampel dinyatakan malaria positif dengan karakteristik penderita dibedakan atas jenis kelamin adalah 59,2% (45/76) laki-laki dan 40,8% (31/76) perempuan. Berdasarkan karakteristik umur penderita dibedakan menurut kelompok umur 0 – 5 tahun; 5 – 10 tahun; 10 – 15 tahun; dan > 15 tahun secara berurutan 5,3 % (4/76); 14,5% (11/76); 26,3% (20/76); 53,9% (41/76). Karakteristik penderita yang mengalami demam 89,5% (68/76). Karakteristik menurut jenis kependudukan, penduduk asli dan pendatang dibedakan berdasarkan jenis malaria, maka penduduk asli yang terinfeksi malaria falciparum 56,6% (43/76), malaria vivax 19,7% (15/76), dan infeksi campuran (malaria falciparum dan malaria vivax) 17,1% (13/76). Pendatang 80% (4/5) menderita malaria falciparum dan 20% (1/5) malaria falciparum & vivax.

Diantara jumlah penderita malaria pada penelitian sebanyak 76 orang, yang pernah mendapatkan pengobatan malaria 26 orang. Penderita lain mengaku tidak pernah mengonsumsi obat antimalaria Klorokuin, SP, maupun ACT. SP merupakan obat antimalaria dosis tunggal sekali minum 2 atau 3

tablet untuk orang dewasa. Rendahnya pendidikan dan tingkat pengetahuan penderita juga merupakan salah satu penyulit untuk menggali informasi tentang pemakaian SP. Klorokuin dan ACT lebih mudah dikenali karena dosis yang khas. Dari data penelitian diperoleh 34,2% (26 dari 76) penderita yang pernah menggunakan obat antimalaria. Diantara 61 orang penderita di dalam tubuhnya mengandung *P falciparum* , hanya 21 orang (34,4%) yang diketahui mempunyai riwayat pengobatan dengan obat antimalaria.

Karakteristik penderita malaria falciparum, baik sebagai infeksi tunggal maupun infeksi campuran antara malaria falciparum dan malaria vivax pada laki-laki 59% (36 dari 61 kasus), sedangkan pada perempuan 41% (25 dari 61 kasus). Karakteristik menurut kelompok umur 0 – 4 tahun 3,3% (2/61 kasus), 5 – 9 tahun 11,5% (7/61), 10 – 14 tahun 24,6% (15/61), dan > 15 tahun/dewasa 60,7% (37 dari 61 kasus). Karakteristik penderita yang demam merupakan jumlah terbesar dari sampel penelitian, yaitu 86,9% (53 dari 61 kasus), sedangkan yang tidak demam tapi malaria falciparum positif sebanyak 13,1% (8/61) dan sebagian besar penderita berasal dari penduduk asli (56 dari 61 = 91,8%).

Plasmodium menginfeksi eritrosit dalam stadium yang berbeda tergantung jenis parasit dan lamanya infeksi. *P. vivax* (mungkin juga *P. ovale*) menyerang eritrosit termuda (retikulosit), sehingga pada saat penemuan eritrosit yang terserang tidak lebih dari 2%. *P. malariae* cenderung menyerang eritrosit yang lebih matang dan infeksi jarang lebih dari 1 %. Sedangkan parasit *P. falciparum* mempunyai afinitas terhadap setiap eritrosit tanpa memandang umur, sehingga angka infeksi eritrosit menjadi sangat tinggi dan sering menyebabkan komplikasi berat. Beratnya malaria falciparum adalah

proporsional terhadap densitas parasit didalam pembuluh internal dan bukan pada sirkulasi perifer (Harijanto, 2000).

Kepadatan parasit dinyatakan sebagai jumlah parasit per μl darah. Jumlah parasit per μl darah dari penderita malaria yang pernah mendapat pengobatan berkisar antara 440 – 14.720, kecuali jumlah parasit ekstrim tinggi adalah LB-119 sebesar 172.923 parasit per μl darah dari infeksi *P. falciparum*. Jumlah ekstrim rendah yaitu LB-8, dengan jumlah parasit 120 per μl darah yang terdeteksi *P. vivax*. Kepadatan parasit rata-rata pada penderita yang pernah mendapat pengobatan antimalaria untuk malaria falciparum 17.071, malaria vivax 2.560 dan infeksi malaria campuran 4.016 parasit per μl darah. Keadaan ini tidak banyak berbeda dengan kepadatan parasit pada penderita malaria yang belum pernah mengkonsumsi obat antimalaria, yaitu 11.744; 3.892; dan 6.226 parasit per μl darah untuk masing-masing jenis malaria seperti yang tersebut di atas. Kepadatan parasit tergolong pada *low to moderate transmission area*, kecuali pd LB-63 dan LB-119, yaitu anak berumur 9 & 7 tahun yang berasal dari daerah pantai (Montong & Tegal Maja). Kepadatan parasit rata-rata dari penderita dengan infeksi tunggal oleh *P. falciparum* maupun infeksi campuran antara *P. falciparum* dan *P. vivax* adalah 10.990 parasit/ μl darah, sehingga penyebaran parasit termasuk pada daerah *low to moderate transmission area*.

Kepadatan parasit lebih tinggi pada anak-anak dibandingkan dewasa. Hal ini juga terungkap pada hasil penelitian Hoffman et. al. berikut ini: Perbedaan genetik memainkan peran penting dalam imunitas dapatan alamiah pada infeksi malaria. Di daerah hiper endemik dan holo endemik angka infeksi malaria dan kepadatan parasit *P. falciparum* pada orang dewasa lebih

rendah daripada anak-anak, yang dapat dikarakterisasi sebagai fungsi imunitas anti parasit. Hasil penghitungan rata-rata kepadatan parasit dari 225 sampel positif PCR dari Kabarole District of West Uganda yang tertinggi dalam kelompok umur anak-anak lebih dari 2 tahun (375/ul) dan menurun secara berurutan dengan bertambahnya umur (> 25 tahun: 25/ul). Pada tren/kelompok umur yang sama telah di observasi di Dielmo, sebuah daerah *hight endemic* di Senegal. (Hoffmann et. al., 2001).

6.3. Hasil identifikasi mutasi gen *PfDHFR codon 108*.

Pemeriksaan mikroskopis masih digunakan sebagai *gold standard* untuk pemeriksaan malaria walaupun saat ini sudah ada metode yang diyakini lebih sensitif, yaitu metode *nested PCR*. Uji dasar *polymerase chain reaction (PCR)* untuk spesies spesifik Plasmodium lebih sensitif dan spesifik daripada uji lain, mendeteksi kurang dari 10 parasites/ μ l darah (Kakkilaya, 2009).

Parasit tidak ditemukan antara waktu serangan, sesudah pengobatan, dan selama proses terapi. Darah diperiksa pada 3-4 hari berturut-turut sebelum malaria dapat mengulang siklus baru. Pada hapusan dapat diperiksa kira-kira 15 menit. Pigmen dilihat pada netrofil (*polymorphonuclear =pmn*). Pada tetes tebal untuk petugas yang berpengalaman metode ini lebih dapat dipercaya untuk deteksi parasit malaria, khususnya bila jumlah parasit sedikit. Bila diagnosis laboratorium negatif atau tidak tersedia, kepercayaan harus ditempatkan pada gejala dan tanda-tanda klinik serta respon obat (Brown, 1969).

Sebelum melaporkan hasil negatif pada paling sedikit 200 hasil pengamatan pada perbesaran 1000x yang diperiksa pada tetes tebal dan hapusan tipis, yang mempunyai sensitivitas 90%. Uji yang paling sederhana dan pasti adalah mempelajari waktu yang tepat hapusan darah tepi dari parasit malaria.

Tidak satupun uji terbaru lain melebihi 'gold standard' hapusan darah tepi (Kakkilaya, 2009).

Parasitemia dapat diperlihatkan sebagai salah satu persentase parasitisasi eritrosit atau sebagai jumlah parasit/ul darah. Pada malaria non falciparum, parasitemia jarang ditemukan melebihi 2%, sebaliknya dapat menjadi amat tinggi (>50%) pada malaria falciparum. Di dalam individu yang non imun, hiperparasitemia (parasitemia >5% atau >250.000 parasit/ul) dihubungkan dengan penyakit berat (Kakkilaya, 2009).

Hasil pemeriksaan mikroskopis dan *nested-PCR* dalam penelitian ini ditemukan perbedaan sebanyak 30,5% (25 dari 82 sampel). Hasil pemeriksaan mikroskopis yang sesuai adalah 57 terdiri dari *Pf* 40 (70,2%), *Pv* 7(12,3%) , *Pf+Pv* 5 (8,8%) , dan malaria negatif 5 sampel (8,8%), sehingga bila dikurangi hasil *Pv* dan negatif adalah 44 sampel.

Hasil yang tidak terdeteksi dengan *nested-PCR* (PCR negatif) tapi terdeteksi secara mikroskopis positif (+) sebesar 52% (13/25) sampel. PCR bila dikerjakan dengan baik dan teliti serta pereaksi yang baik seharusnya member hasil yang lebih sensitive dibandingkan metode mikroskopis. Adanya parasit yang terdeteksi secara mikroskopis, tapi PCR negatif dapat disebabkan oleh adanya artefak atau sisa zat warna yang menyerupai parasit atau kesalahan teknis bahwa pengambilan sampel molekuler tidak dilakukan pada waktu yang bersamaan, sehingga pada saat pengambilan sampel untuk pemeriksaan positif tapi setelah beberapa waktu berselang parasit sudah menghilang dari peredaran darah tepi. Hanya ada 4% (1/25) sampel mikroskopis (-) tapi *nested-PCR* (+) *Pf*, yaitu LB-92; hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa metode PCR lebih sensitif daripada metode mikroskopis.

Hasil yang bertolak belakang, seperti mikroskopis *Pf* tapi *nested-PCR Pv* atau sebaliknya 16% (4/25). Hasil mikroskopis terdeteksi *Pf + Pv*, tapi *nested-PCR* sebagai *Pf* 24% (6/25), dan sampel secara mikroskopis *Pf* tapi *nested-PCR Pf + Pv* 8% (2/25). Hasil yang bertolak belakang antara mikroskopis dan PCR dapat disebabkan oleh kesalahan dalam mengidentifikasi, adanya artefak atau sisa zat warna yang menyerupai parasit. Sensitifitas *nested-PCR* pada penelitian ini adalah 84,2% (64 dari 76 yang positif secara mikroskopis). Hal ini seperti yang diperoleh Nandwani, yaitu sensitifitas PCR sebesar 96,8% untuk *P. falciparum* lebih rendah dibandingkan mikroskopis. Para pekerja lain telah melaporkan sensitivitas yang bervariasi dari 79% sampai lebih dari 90% (Nandwani, Mathur, and Rawat, 2005). Namun berlainan dengan hasil penelitian Johnston et al, yaitu sensitifitas mikroskopis sebesar 93,3% (97 dari 104 sampel yang positif).

Perbedaan hasil pemeriksaan antara mikroskopis dan PCR selengkapnya kemukakan oleh Nandwani (2005) dan Johston (2006) seperti diuraikan:

1. Evaluasi analisis *PCR* untuk diagnosis malaria *falciparum* di Delhi India oleh Nandwani, Mathur, and Rawat.

Koleksi darah untuk teknik pewarnaan Giemsa sederhana dan dapat dilakukan dengan pelatihan yang minimal. Jenis, stadium dan densitas parasit dapat diidentifikasi secara akurat seperti yang dilaporkan sebelumnya. Pemeriksaan menggunakan metode PCR mahal dan membutuhkan peralatan yang terbatas. Namun, menyiapkan hapusan yang berkualitas baik diperlukan latihan dan standardisasi untuk pengenceran zat warna Giemsa yang diperlukan, waktu pewarnaan dan persiapan buffer dengan pH yang tepat untuk memberikan kualitas yang memadai hapusan berwarna. Kerugian utama dari teknik

pewarnaan Giemsa, seperti penelitian lain menunjukkan bahwa hal itu dapat memberikan hasil yang kurang tepat (negatif) dalam kasus parasitemia rendah. Sulit untuk menafsirkan tebal hapusan ketika parasitemia darah kurang dari 500 per mikroliter darah. Analisis PCR untuk *P. falciparum* dalam penelitian ini memberikan sensitivitas 96,8%. Para pekerja lain telah melaporkan sensitivitas yang bervariasi dari 79% sampai lebih dari 90% (Nandwani, Mathur, and Rawat, 2005).

Uji dengan pewarnaan Giemsa negatif untuk dua sampel di antara total 63 kasus *P. falciparum*. Meskipun PCR secara teoritis telah dinyatakan mampu mendeteksi parasit tunggal per mikroliter darah, hal ini jarang tercapai. Hasil negatif bisa disebabkan oleh berbagai zat penghambat dalam darah seperti antikoagulan (heparin atau EDTA) dan zat intraseluler (cincin porfirin heme), yang mengikat Taq polimerase. Degradasi DNA target karena ekstraksi dengan pembekuan dan pencairan berulang atau sequen *P. falciparum* yang kurang diakui oleh primer atau kesalahan teknis penyimpanan sementara DNA mungkin memberikan hasil negatif. Spesifisitas PCR untuk *P. falciparum* dalam penelitian ini adalah 100%. Laporan lain memberikan spesifisitas 69% sampai lebih dari 90%.

Salah satu sampel dengan infeksi campuran *P. vivax* dan *P. falciparum* terdeteksi dengan analisis PCR. Tiga kasus yang tidak terjawab sebelumnya oleh Giemsa namun positif dengan analisis PCR ditemukan memiliki parasit aseksual sangat sedikit dengan parasitemia kurang dari 100 parasit per mikroliter darah, (pemeriksaan di lanjutkan sampai 600 lapangan pandang). Penelitian lain juga melaporkan kemampuan PCR untuk mendiagnosis infeksi campuran terdeteksi oleh mikroskop konvensional. Namun, teknik ini

memerlukan tenaga kerja yang intensif dan keahlian tingkat tinggi serta terstandardisasi. Setiap sampel membutuhkan waktu 10-11 jam, yang akan berkurang jika sampel diolah dalam jumlah lebih besar (Nandwani, Mathur, and Rawat, 2005).

2. PCR sebagai teknik konfirmasi diagnosis laboratorium terhadap malaria, oleh Johnston et. al.

Pada penelitian ini membandingkan PCR dengan mikroskopis menggunakan modifikasi dari teknik original yang diuraikan oleh Snounou et al. dengan target primer *Plasmodium spp. 18S rRNA genes* (Johnston et al, 2006)

Spesies *Plasmodium* yang tidak dapat ditentukan 17 (9.7%) dari total sampel yang dianalisis ($n = 174$) dan dalam 16 (42.1%) dari 38 spesimen disampaikan sebagai kasus *telediagnosis*. Satu infeksi campuran *P. falciparum* dan *P. ovale* yang diidentifikasi secara mikroskopis. DNA *Plasmodium* telah dideteksi dalam 59.8% (104 dari 174) terhadap pemeriksaan sampel darah EDTA menggunakan *nested PCR* dan dalam 55.7% terhadap pewarnaan hapusan oleh mikroskopis (97 dari 174). Identifikasi pada tingkat spesies tercapai dengan *nested PCR* 82.5%, 97 dari seluruh 104 spesimen ditetapkan menjadi positif secara mikroskopis. Lima infeksi campuran diidentifikasi menggunakan *nested PCR*; hanya satu yang terdeteksi menggunakan mikroskop. Semua hasil penelitian antara mikroskopis dan *nested-PCR* tidak sesuai; *nested PCR* mampu mendeteksi DNA *Plasmodium* dalam total 7 spesimen yang ditentukan negatif secara mikroskopis. Oleh karena itu sensitifitas mikroskopis dan *nested PCR* adalah 93.3 dan 100%, secara berurutan. Infeksi campuran dideteksi dalam lima kasus dimana hanya satu dihasilkan secara mikroskopis.

Hasil *PCR* dapat direproduksi, ketidaktepatan penentuan spesies *P. vivax* dan *P. ovale* menggunakan mikroskop terdapat dalam 3 sampel. *P. ovale* diidentifikasi oleh mikroskop dalam 2 spesimen yang kemudian diidentifikasi sebagai *P. vivax* menggunakan *PCR*. Dengan cara yang sama, 1 spesimen yang diidentifikasi sebagai *P. vivax* oleh mikroskop diidentifikasi sebagai *P. ovale* oleh *PCR*. Dalam penelitian ini, *nested PCR* lebih sensitif dibandingkan dengan mikroskopis membiarkan deteksi *Plasmodium* dalam kasus dengan parasitemia rendah, seperti pada infeksi malaria campuran. Dalam semua contoh, specimen dengan *PCR* positif dan mikroskopis dikumpulkan dari gejala penderita dengan sejarah perjalanan ke daerah endemis malaria. *Nested PCR* juga mampu mendeteksi 1 infeksi campuran dengan *P. falciparum* dan *P. ovale* yang luput secara mikroskopis, seperti mendeteksi 3 specimen dari kasus telediagnosis. *PCR* juga lebih baik membedakan antara *P. vivax* dan *P. ovale*. Kami mendapatkan bahwa 2.2% sampel salah diidentifikasi sebagai *P. vivax* atau *P. ovale* secara mikroskopis (Johnston et al, 2006).

Hasil pemeriksaan *PCR-RFLP* mutasi gen *PfDHFR* codon 108 pada ke 54 sampel penelitian menunjukkan mutasi menjadi Asparagin pada semua sampel (100%). Penelitian-penelitian lain menemukan mutasi *PfDHFR* pada Asn-108 sebesar masing-masing 100% di Tanzania (Jelinek et al, 1998), Amazon (Kublin et al, 1998), Iran (Zakeri et al, 2007) dan di Timor Timur (Almeida et al, 2009), di lokasi yang berbeda juga Almeida menemukan mutasi sebesar 97% (62/64). Mutasi Asn-108 lainnya sebesar 95% (87/92) di Mozambique (Fernandes et al, 2007); 93% (84/86) di Tanzania (Schonfeld et al, 2007); 84,9% (79/93) di Iran (Razavi et al, 2008); 79% (86/109) di Nigeria (Happi et al, 2005); 57% (12/21) di Belgia (Tinto et al, 2007); di Indonesia, Alor dan Lampung masing-masing

sebesar 71,2% dan 87,2% (Agustina, 2005).

Adanya mutasi Asn-108 belum menunjukkan kegagalan pengobatan. Penelitian ini pun hanya mendeteksi secara *screening* awal dari mutasi pada *PfDHFR*. Pada *P. falciparum*, permulaan mutasi selalu berubah pada posisi 108 (biasanya dari serine ke asparagine), yang menurunkan hanya sepuluh kali kerentanan obat, dan tidak mempengaruhi respon terapi terhadap sulfadoksin pirimetamin. Keadaan ini dapat dibandingkan dengan penelitian dari Kublin et al, Mutasi Asn-108 ditemukan pada semua sampel (45), baik dengan hasil pengobatan yang dinyatakan 11 sampel sensitif, 13 sampel R I, 13 sampel R II, maupun pada 8 sampel R III. Namun pada *codon-codon* yang lain ada yang sebagian mutasi dan bahkan DHFR 59 dan 50 sama sekali tidak ada mutasi; begitu juga pada DHPS 436 dan 613 (Kublin et al, 1998).

6.4. Gambaran mutasi gen *PfDHFR* codon 108

Gambaran mutasi gen yang diperoleh dari penelitian ini semua sampel mutasi gen *PfDHFR* codon 108 adalah Asparagin (Asn-108). Tidak ditemukan adanya variasi lain, baik Serin sebagai *wild tipe* maupun treonin dari jenis mutan tipe lainnya. Hal ini kemungkinan karena sampel sebagian besar berasal dari penduduk asli dan sampel lain yang berasal dari pendatang yang menderita malaria setelah berada di daerah penelitian.

Penderita dengan mutasi Asn-108, 22/54 (40,7%) tinggal di daerah pantai (Batu Bolong dan sekitarnya), 19/54 (35,2%) tinggal di daerah pegunungan (Duduk Atas dan Penanggak); 13/54 (24,1%) di dataran rendah lainnya. Dusun Batu Bolong (daerah pantai) menempati urutan tertinggi jumlah penderita, yaitu 27,6% (21/76); 52,4% (11/21) laki-laki dengan hasil pemeriksaan terhadap mutasi gen *PfDHFR* sebanyak 71,4% (10/14) Asn-108 laki-laki.

Gambaran mutasi Asn-108 juga ditemukan pada beberapa penelitian yang telah dilakukan di Indonesia seperti: alel Asn-108 dari 31,5% menjadi 24,75 pada musim panas; tidak ditemukan mutasi Thr-108 (Puji dkk, 2009). Pada penelitian Syafruddin dkk, 2003: 42 isolat (30,2%) membawa alel asn-108 dan Arg-59, 34 isolat (27,4%) membawa alel Thr-108, 32 isolat berpasangan dengan Val-16. Alel mutan pada codon 50, 51, dan 164 tidak terobservasi pada sampel yang diperiksa. Mutasi Asn-108 meningkatkan resistensi terhadap pirimetamin kira-kira 100 kali dibandingkan dengan *wild-type*, alel Ser-108. Dan pada penelitian Syafruddin dkk, 2007: dari 69 isolat, 52 membawa Asn-108 tapi tidak ditemukan Thr-108. Mutasi juga ditemukan pada Arg-59 tapi tidak ada polimorfisme pada codon 16, 50,51, atau 164.

Mutasi *PfDHFR* pada codon 108 (asparagin), merupakan kunci resistensi yang akan membuka mutasi pada codon DHFR yang lain dan DHPS. Dampak mutasi hanya menurunkan kerentanan obat hanya sepuluh kali lipat, tetapi tidak mempengaruhi respon terapi, sehingga respon pengobatan makin lama. Bila mutasi berlanjut pada codon 51 dan 59, hal ini dihubungkan dengan meningkatnya resistensi pirimetamin.

Pengobatan malaria di Puskesmas disesuaikan dengan kebijakan Nasional Program Pengendalian Malaria. Sejak tahun 2004, pengobatan malaria tanpa komplikasi adalah *Artemisinin Combination Therapy* (ACT). Di NTB program pengobatan menggunakan ACT dimulai pada bulan Maret 2008. Mutasi Asn-108 yang teridentifikasi pada penelitian ini adalah efek dari penggunaan Sulfadoksin Pirimetamin (SP) di luar program.

6.4.1 Malaria yang resisten terhadap obat

Laporan adanya resistensi obat anti malaria di Indonesia pertama kali untuk Klorokuin pada tahun 1973 dan SP tahun 1979. Sejak itu menyebar dengan cepat di seluruh Nusantara. Baru-baru ini kasus Klorokuin resisten telah dilaporkan di seluruh propinsi dengan derajat resistensi dari resistensi moderat (RI) sampai resistensi tinggi (RIII) dan dalam beberapa kasus resistensi juga terjadi terhadap lebih dari satu agen antimalaria. Di sisi lain, penelitian yang dilakukan di beberapa daerah juga mengindikasikan adanya *P. vivax* resisten klorokuin-di tempat-tempat tertentu. Dengan munculnya penyebaran resistensi yang luas terhadap klorokuin di Indonesia, kombinasi antifolat sulfadoksin dan pirimetamin (SP) menjadi lebih umum digunakan. Namun, hanya beberapa tahun setelah pengenalan, resistensi terhadap kombinasi obat ini telah diamati dalam beberapa kasus dan sekarang telah menyebar ke sedikitnya di 11 provinsi baik resistensi *in vivo* maupun *in vitro*. Di Purworejo, prevalensi resistensi SP ditemukan menjadi 33%. Resistensi parasit malaria terhadap obat antimalaria utama; Klorokuin dan Fansidar (SP) juga telah dikonfirmasi dengan analisis molekuler dari berbagai isolat *P. falciparum* berbeda di Indonesia (WHO, 2007).

Terungkap bahwa isolat *P. falciparum* di Indonesia memang membawa mutasi gen dalam obat resisten. Meskipun resistensi antimalaria di Indonesia menyebar, Klorokuin dan SP masih digunakan sebagai lini pertama dan kedua obat antimalaria. Hal ini membuat pengobatan malaria di Indonesia kurang efektif dan menekankan perlunya farmakologi inisiatif baru untuk melawan kejadian peningkatan mortalitas dan morbiditas malaria (WHO, 2007).

Sejak tahun 2004, program pemberantasan malaria, tidak menggunakan Klorokuin sebagai obat utama malaria *falciparum* karena telah dinyatakan

resisten. Sebagai obat pilihan utama digunakan obat kombinasi artesunate derivat artemisinin dan amodiakuin (AAQ) dan untuk malaria berat obat utama yang digunakan adalah artemeter injeksi disamping kina (Surat Ditjen PPM & PL nomor: PM.00.01.3.541 tanggal 15 Desember tahun 2004, perihal pengobatan malaria falciparum di Indonesia). Sedangkan pengobatan dengan *P vivax* tetap masih digunakan Klorokuin (Laihat & Arbani, 2010).

Data resistensi *P falciparum* terhadap SP, menurut Laihat & Arbani: Di ke-26 provinsi di Indonesia uji resistensi telah dilakukan *in vivo* dan atau *in vitro*. Uji *in vivo* dilakukan di 12 provinsi dan hanya di 3 provinsi dinyatakan resisten, yaitu Jawa Tengah, Sulawesi Selatan, dan Papua. Sedangkan uji *in vitro* dilakukan di semua provinsi dengan hasil resisten dinyatakan di 7 provinsi, yaitu D I Aceh, Sumatera Utara, Riau, Jawa Tengah, Kalimantan Timur, Sulawesi Selatan, dan Nusa Tenggara Timur. Adapun Nusa Tenggara Barat, uji resistensi dilakukan hanya *in vitro* dengan hasil sensitif pada tahun 1993 oleh Depkes (Laihat & Arbani, 2010).

6.4.2 Hubungan mutasi gen *PfDHFR* dan resistensi SP

Permulaan mutasi pada *P falciparum* selalu berubah pada posisi 108 (biasanya dari serine ke asparagine), yang menurunkan hanya sepuluh kali kerentanan obat, dan tidak mempengaruhi respon terapi terhadap sulfadoksin pirimetamin. Resistensi terhadap obat anti malaria muncul sebagai hasil mutasi 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 tapi tidak memadai untuk menghambat parasit yang mutan; hal ini disebut 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).

6.4.3 Resistensi *Plasmodium*

Meningkatnya insiden malaria disebabkan oleh berbagai faktor, seperti Kasus malaria yang resisten terhadap obat anti malaria. Resistensi parasit malaria muncul pertama kali di Thailand tahun 1961 dan di Amerika Serikat tahun 1962, kemudian menyebar ke seluruh dunia. Di Afrika resistensi *P falciparum* terhadap klorokuin meningkat dengan cepat dan intensif sejak tahun 1979. Bersamaan dengan itu resistensi *P falciparum* terhadap SP sejak tahun 1980. Di Indonesia resistensi *P falciparum* terhadap klorokuin ditemukan pertama kali di Kalimantan Timur tahun 1974, kemudian terus menyebar dan tahun 1996 kasus malaria resisten klorokuin sudah ditemukan di seluruh provinsi di Indonesia. Kecepatan penyebaran resistensi plasmodium terhadap obat anti malaria tidak sama di masing-masing daerah atau Negara. Menurut White, ada 3 faktor yang menimbulkan resistensi, yaitu:

1. Faktor operasional, seperti dosis subterapi, kepatuhan penderita yang kurang
2. Faktor farmakologik
3. Faktor transmisi malaria, termasuk intensitas, tekanan obat, dan imunitas.

Untuk mencegah dan memperlambat laju resistensi, terapi kombinasi yang rasional sangat dianjurkan, seperti yang telah dilakukan di Nias Sumatera Utara dengan terapi kombinasi Artesunate dan Sulfadoksin Pirimetamin (AR + SP) pada satu kelompok uji dan AM (Amodiaquine) + SP pada kelompok uji lain yang diberikan pada penderita dengan malaria faciparum sebagai infeksi

tunggal menghasilkan efikasi terapi yang sama tanpa *early treatment failure* (ETF) maupun *late treatment failure* (LTF). Terjadi penurunan kepadatan parasit yang signifikan, tapi tidak ada perbedaan bermakna kepadatan parasit antara kelompok (Sony, 2008). Pada uji klinis ini menunjukkan pengobatan baik yang berbasis artesunate/artemisinin maupun non artemisinin memberikan efek terapi yang sama. Berbagai penelitian terus dilakukan dalam rangka mengatasi resistensi obat anti malaria. Salah satu usaha yang dilakukan dengan pengobatan kombinasi (Zein, 2005). Termasuk dengan program yang tengah dijalankan saat ini, yaitu hasil pemeriksaan mikroskopis positif diterapi dengan ACT/Arsuamor pada pengobatan malaria *falciparum*.

BAB 7 PENUTUP

BAB 7 PENUTUP

7.1 KESIMPULAN

1. Karakteristik penderita malaria falciparum (juga infeksi campuran, yaitu malaria falciparum + malaria vivax) lebih banyak laki-laki (59%, yaitu 36 dari 61) dibanding perempuan, kelompok umur dewasa (> 15 tahun = 60,7% yaitu 37/61), penderita yang tidak demam tapi malaria falciparum positif sebanyak 13,1% (8/61) dan sebagian besar penderita berasal dari penduduk asli (56 dari 61 = 91,8%). Diantara 61 orang penderita, hanya 21 orang (34,4%) yang diketahui mempunyai riwayat pengobatan dengan obat antimalaria. Kepadatan parasit rata-rata 10.990 parasit/ μ l darah, sehingga termasuk pada *low to moderate transmission area*.
2. Hasil identifikasi mutasi gen *PfDHFR* pada *codon* 108 sebanyak 54 (100%).
3. Jenis mutasi yang ditemukan adalah Asparagin (Asn-108), tidak ditemukan *wild type* (Ser-108) maupun *mutant type* (Thr-108).
4. SP masih digunakan sebagai obat antimalaria (OAM) pada malaria falciparum tanpa komplikasi; mutasi *PfDHFR* perlu diwaspadai; adanya Mutasi Asn-108 ternyata ditemukan, sehingga hasil ini dapat menjadi masukan bagi program pemberantasan dan pengobatan malaria apakah SP masih layak digunakan atau penggunaannya sama sekali harus dihentikan sementara.

7.2 Saran

1. Resistensi ditemukan pada penduduk asli dan pendatang; mobilitas di kalangan penduduk tidak tinggi; diperlukan analisis persentase jumlah mutasi gen diantara penduduk asli dan pendatang untuk mengetahui faktor mobilitas terhadap status resistensi Sulfadoksin Pirimetamin.

2. Pencarian penderita langsung ke lapangan (PCD) dari rumah ke rumah sangat membantu masyarakat dalam penemuan dan pengobatan malaria, sehingga masyarakat di daerah terpencil dapat menikmati program besar yang dijalankan pemerintah. Dan informasi yang diberikan oleh petugas kesehatan akan sangat membantu masyarakat dalam memahami kondisi yang tengah dialami pada saat penderita sakit. Penyuluhan dari rumah ke rumahpun dapat membantu penderita maupun keluarganya.
3. Untuk mencari gambaran spesifik dari mutasi *PfDHFR*, hendaknya identifikasi dilanjutkan pada *codon* yang lain (*codon* 51, 59, dan atau 164). Juga selain *PfDHFR* dilanjutkan juga dengan *PfDHPS*. Untuk dapat menentukan hasil identifikasi ini sebagai petunjuk pengobatan, penelitian perlu dilanjutkan dengan efikasi pengobatan dengan Sulfadoksin Pirimetamin (SP).
4. Program pemberantasan dan pengobatan malaria dengan kombinasi OAM (seperti SP + Artesunate dan SP + Amodiaquin di Nias Sumatera Utara) sangat membantu dalam menurunkan resistensi terhadap *P falciparum*. Penghentian obat yang sudah resisten *P falciparum* untuk sementara, akan memulihkan kembali efikasi obat di masa mendatang sehingga kita masih mempunyai pilihan lain bila obat antimalaria yang menjadi program pengobatan sekarang menjadi resisten.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina Ika Susanti, 2005. *Mutasi Gen Hidrofolat Reduktase (DHFR) dan Dihidropteroat Sintase (DHPS) Plasmodium falciparum dari Dua Daerah dengan Hasil Efikasi Sulfadoksin/Pyrimetamin yang Berbeda*. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia Research Report from JKPKBPPK / 2005-03-08 02:57:00
- Almeida de Afonso, Ana Paula Arez, Pedro VL Cravo and Virgílio E do Rosário. 2009. *Analysis of genetic mutations associated with anti-malarial drug resistance in Plasmodium falciparum from the Democratic Republic of East Timor*. *Malaria Journal* 2009, 8:59.
- Anonim, 1999. Modul Pelatihan- *Penatalaksanaan Kasus Malaria Untuk Dokter Rumah Sakit Kabupaten*, Direktorat Jenderal PPM & PLP- Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang, Depkes R I, Jakarta.
- Anonim, 2003. Modul Pelatihan- *Penatalaksanaan Kasus Malaria Untuk Dokter Rumah Sakit Kabupaten*, Direktorat Jenderal PPM & PLP- Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang, Depkes R I, Jakarta.
- Anonim, 2006. *Data Penyakit Malaria Kabupaten Lombok Timur*. Dinas Kesehatan Kabupaten Lombok Timur
- Asih Puji BS, William O Rogers, Agustina I Susanti, Agus Rahmat, Ismail E Rozi, Mariska A Kusumaningtyas, Krisin, Sekartuti, Rita M Dewi, Farah N Coutrier, Awalludin Sutamihardja, Andre JAM van der Ven, Robert W Sauerwein and Din Syafruddin. 2009. *Seasonal distribution of anti-malarial drug resistance alleles on the island of Sumba, Indonesia*. *Malaria Journal*, 8:222
- Aubouy A, Sayeh Jafari, Virginie Huart, Florence Migot-Nabias, Justice Mayombo, Rémy Durand, Mohamed Bakary, Jacques Le Bras dan Philippe Deloron. 2003. *DHFR and DHPS genotypes of Plasmodium falciparum isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 43-49. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 43-49.
- Azwar Azrul, Prihartono Joedo. 2003. *Metodologi penelitian kedokteran dan Kesehatan Masyarakat*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Bloiland PB, 2001. *Drug resistance in malaria*. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4
- Brown, W Harold. *Basic Clinical Parasitology*, 3rd ed. Appleton-Century-Crfts, educational Division, Meredith Corporation, 440 Park Avenue South, New York. 1969.

- CDC. 1960. Illustrations from: Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington.
- CDC. 1971. Illustrations from: Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. *The Primate Malarias*. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda.
- CDC. 2004. Departement of Health and Human Service-Center for Disease control and Prevention(CDC). *Epimediology: malaria*.
- Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, and Danis M, 1999. *Development of a Plasmodium PCR for Monitoring Efficacy of Antimalarial Treatment*. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 35–38.
- Cowman AF, 1998. *The molecular basis of resistance to the sulfones, sulfonamides, and dihydrofolate reductase inhibitor*. In: Sherman I W. 1998. *Malaria: arasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM Press. Washington DC,pp:317-330.
- Depkes R I. 2007. *Pedoman Pengobatan Malaria*.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Lombok Barat, 2002. *Rencana Strategi Gebrak Malaria di kabupaten Lombok Barat, tahun 2002-2004*.
- Dinas Kesehatan Provinsi NTB, 2009. *Laporan Tahunan Penemuan dan Pengobatan Malaria Prov. NTB Tahun 2008*
- Dinas Kesehatan Prov. NTB. 2010. *Laporan Tahunan Penemuan dan Pengobatan Malaria Prov. NTB Tahun 2009*.
- Fernandes N, Paula V, Virgilio E R, and Pedro Cravo. 2007. *Analysis of sulphadoxine/pyrimethamine resistance-conferring mutations of Plasmodium falciparum from Mozambique reveals the absence of the dihydrofolate reductase 164L mutant*. *Malaria Journal* 10.1186/1475-2875-6-35.
- Giraldo LE, Acosta ME, Labrada LA, Praba A, Montenegro-James S, saravia NG, Krogstad DJ. 1998. *Frequency of the Asn-108 and Thr-108 point mutations in the dihydrofolate reductase gene in Plasmodium falciparum isolates from south-west Colombia*. *Am J Trop Med Hyg* 59:124-128.
- Gregson A and Plowe V. 2005. *Mechanism of resistance of malaria parasites to antifolates*. *Pharmacol Rev* 57:117-145.
- Gunawan Carta A. 2010. *Obat Antimalaria*. Dalam Harijanto dkk, 2010. *Malaria-dari molekuler ke klinis*. EGC. Jakarta:118-144.

- Hananto, Antonius J R Sri. 2000. *Uji Sensitivitas Secara in Vivo dan Faktor-faktor yang Mempengaruhi Resistensi Plasmodium falciparum terhadap Klorokuin (Studi di Kintap Kabupaten Tanah Laut Provinsi Kalimantan Selatan)*. Perpustakaan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Research Report from JKPKBPPK / 2005-06-06 10:29:00
- Happi CT, GO Gbotosho, OA Folarin, DO Akinboye, BO Yusuf, OO Ebong, A Sowunmi, DE Kyle, W Milhous, DF Wirth, AMJ Oduola. 2005. *Polymorphisms in Plasmodium falciparum dhfr and dhps genes and age related in vivo sulphadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria*. Acta Tropica 95 (2005):183-193.
- Harijani, AM. 2002. *Resistensi P. falciparum terhadap Pyrimethamine dan Fansidar di Indonesia*. Center for Research and Development of Disease Control, NIHRD. Research Report from JKPKBPPK / 2002-12-31 12:50:00
- Harijanto, P N, 2000. *Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, dan Penanganan*, EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Hoffmann G P, Jelinek T, Killian A, Kabagambe G, Metzger W G, Sonnenburg von F. 2001. *Genetic diversity of plasmodium falciparum and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda*. Tropical Medicine and International Health, vol 6 no 8 pp 697-613. Blackwell Science Ltd.
- Hyde J E. 2005. *Exploring the folate pathway in Plasmodium falciparum* . Acta Trop. 2005 June ; 94(3): 191–206.
- Jelinek T, Rønn A M, Lemnge M M, Curtis J, Mhina J, Duraisingh M T, Bygbjerg I C and Warhurst D C. 1998. *Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of Plasmodium falciparum and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania*. Tropical Medicine and International Health volume 3 no 8 pp 605–609.
- Johnston S P, Norman J. P, Xayavong M V, Slemenda S B, Wilkins P P, and Alexandre J. da Silva. 2006 . *PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria*. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2006, p. 1087–1089 Vol. 44, No. 3
- Laihad F J dan Arbani PR, 2010. *Situasi malaria di Indonesia*. Dalam Harijanto dkk, 2010. *Malaria-dari molekuler ke klinis*. EGC. Jakarta:1-16
- Kakkilaya B.S.2006. *Malaria* Website. Last updated: April 14, 2006. Malariasite.com.
- Kakkilaya B.S. 2009. *Malaria*. Website. Last updated: May 15 2009. Malariasite.com.
- Khan B, Omar S' , Kanyara I N', Warren-Perr M, Nyalwidhel J, Peterson D S, Wellem T, Kaniarul S, Gitonga J , Mulaa F J and Koechl K D. 1997. *Antifolate drug resistance and point mutations in Plasmodium falciparum in Kenya*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91:456–460.

- Kublin J G, Richard S Witzig, Anuraj H Shankar, Jorge Quintana Zurita, Robert H Gilman, Javier Aramburú Guarda, Joseph F Cortese, Christopher V Plowe. 1998. *Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria*. *Lancet* 351:1629–1630.
- McPherson MJ and Møller SG, 2006. *PCR (The Basic)* second edition. Taylor & Francis Group.
- Nandwani S, Mathur M, Rawat S. 2005. *Evaluation of the polymerase chain reaction analysis for diagnosis of falciparum malaria in Delhi, India*. *Indian J Med Microbiol* 2005;23:176-8.
- Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja MA, Tang D, and Kain KC, 2002. *Impact of Microscopy Error on Estimates of Protective Efficacy in Malaria-Prevention Trials*. *The Journal of Infectious Diseases* 186:540–6
- Prabowo A. 2004. *Malaria Mencegah dan Mengatasinya*.
books.google.co.id/books?isbn=9793567252
- Peterson, D. S., Walliker, D. & Wellems, T. E. 1988. *Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85, 9114-9118.
- Peterson, D. S., Milhous, W. K. & Wellems, T. E. (1990). *Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in Plasmodium falciparum malaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87, 3018-3022.
- Razavi MR, SR Naddaf, JLe Bras, A Raesi, AR Esmaeili, M Assmar. 2007. *Frequency of Pfcrt dan Pfdhfr Asn-108 drug resistance mutations in falciparum malaria in Southeastern malaria endemic area of Iran*. *Iranian J Puj Health*: 37-1:pp 31-34.
- Schonfeld M, IB Miranda, M Schunk, I Maduhu, L Maboko, M Hoelscher, N Barends-Riha, A Kitua, and T Loscher. 2007. *Molecular surveillance of drug resistance associated mutations of Plasmodium falciparum in south-west Tanzania*. *Malaria Journal* 2007,6:2
- Sony P D. 2007. *Perbandingan efikasi terapi kombinasi Sulfadoksin-Pirimetamin + Artesunat dan Sulfadoksin-Pirimetamin + Amodiakuin pada penderita malaria falciparum tanpa komplikasi*. Tesis. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Syafruddin D, Puji B S Asih, Sona L Aggarwal, and Anuraj H Shankar. 2003. *Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of Plasmodium falciparum in Purworejo district, Central Java province, Indonesia*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(6), 2003, pp. 614–620.

- Syafruddin D, Puji B S Asih, Farah N Coutrier, Leily trianti, Rintis Noviyanti, Yaveth Luase, Wajiyo Sumarto, Marten Caley, Andre J A M van der Ven, and Robert W Sauerwein. 2006. *Malaria in Wanokaka and Loli sub-district, West Sumba District, East Nusa Tenggara province, Indonesia*. . *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(5), 2006, pp. 733–737.
- Syafruddin D, Puji BS Asih, Isra Wahid, Rita M Dewi, Sekar Tuti, Idaman Laowo, Waozidohu Hulu, Pardamean Zendrato, Ferdinand Laihad and Anuraj H Shankar. 2007. *Malaria prevalence in Nias District, North Sumatra Province, Indonesia*. *Malaria Journal*, 6:116
- Syafruddin D, 2010. *Dasar molekul resistensi parasit terhadap obat antimalaria*. Dalam Harijanto dkk, 2010. *Malaria dari molekuler ke klinis*. EGC. Jakarta:64-84.
- Sulzer AJ, and Wilson M. *The fluorescent antibody test for malaria*. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1971;2:601-609. Dalam Wikipedia, 15 Juni 2009.
- Suparman Edi. 2005. *Malaria pada Kehamilan*. Bagian/SMF Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi/ Rumah Sakit Umum Pusat Manado Cermin Dunia Kedokteran No. 146, 2005 19.
- Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P and Krudsood S, 2009. *Malaria Diagnosis: A Brief Review*. *Korean J Parasitol*. Vol. 47, No. 2: 93-102
- Tarigan Jerahim. 2003. *Kombinasi Kina Tetrasiklin pada pengobatan malaria falciparum tanpa komplikasi di daerah resisten multidrug malaria*. Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Tham J M, Shu Hee Lee, Theresa M C Than, Robert C Y Ting, Ursula A K Kara. 1999. *Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf test in a clinical environment*. *JCM*, May-1999, p. 1269-1273.
- Tinto H, J B Ouedraogo, I Zongo, Chantal V O, Eric V M, T R Guiguemde, and U d'Alessandro. 2007. *Sulphadoxine Pyrimethamine efficacy and selection of Plasmodium falciparum DHFR mutations in Burkina Faso before preventive treatment for pregnant women*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(4), 2007, pp. 608-613
- Triglia T and Cowman A F. 2009. *The mechanism of resistance to sulfa drugs in Plasmodium falciparum*. The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* Vol. 57, No. 1:117-145.
- Wikipedia, 2008. *the free encyclopedia Malaria antigen_detection_tests*. Halaman ini terakhir diubah pada 29 April 2008 pada 20:08.
- Wikipedia, 2009. *Plasmodium*. Halaman ini terakhir diubah pada 10:17, 30 Agustus 2009.

- Wiser M F, 2003. *Mechanisms of Drug Action and Resistance (Focus on antimalarials)*. Tulane University.
- WHO (World Health Organization), 1991. *Basic Malaria Microscopy Part I Learner's Guide.*, Geneva.
- WHO (World Health Organization), 2000. *Severe falciparum malaria*. Trans R soc trop Med Hyg.94
- WHO (World Health Organization), 2001. *The Use of antimalarial drugs, Report of an Informal Consultation*. Geneva
- WHO (World Health Organization), 2003. *Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria*. Geneva.
- WHO (World Health Organization), 2006. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Switzerland.
- 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. 1996; 93:1130-1134.
- Yuthavong Yongyuth, 1996. *The antimalarial folate pathway and molecular targets for antimalarial development*. J. Sci.Soc. Thailand, 22(1996): 181-186.
- Zakeri S, M Afsharpad, A Raeisi, and ND Djadid. 2007. *Prevalence of mutations associated with antimalarial drugs in Plasmodium falciparum isolates prior to the introduction of sulphadoxine-pyrimethamine as first-line treatment in Iran*. Malaria Journal 2007,6:148.
- Zein Umar, 2005; *Penanganan terkini malaria falciparum*; dikutip dari <http://www.USU-Repository.2005> Universitas Sumatera Utara.

LAMPIRAN

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Nopember 2009 s.d Agustus 2010. Untuk lebih jelasnya di bawah ini diuraikan rencana kegiatan penelitian sebagai berikut:

Rencana Kegiatan dan Waktu Penelitian

K e g i a t a n	B u l a n									
	Nop '09	Des '09	Jan '10	Peb '10	Mar '10	Apr '10	Mei '10	Jun '10	Jul '10	Agt '10
Konsultasi dan Diskusi proposal	X	X	X							
Seminar Proposal			X							
Ujian Proposal				X						
Etik/uji kelayakan dan ijin pengambilan data					X	X				
Pengambilan, pengumpulan, dan pemeriksaan sampel						X				
Pengumpulan dan analisa data						X	X	X	X	
Pembahasan hasil penelitian								X	X	
Ujian Tesis										X

Lampiran 2.**PENJELASAN DAN FORM PERSETUJUAN PENELITIAN**

Judul Penelitian :

Identifikasi Mutasi gen *Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (Pfdhfr)* codon 108 pada penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria pulau Lombok

Malaria masih merupakan masalah kesehatan di dunia, terutama di daerah endemis malaria, karena angka kesakitan dan kematiannya masih tinggi. Setiap tahun diperkirakan 350-500 juta orang terkena malaria dan menyebabkan kematian 1 sampai 3 juta orang yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*

Hampir dua pertiga wilayah di Indonesia merupakan wilayah endemis malaria, terutama di luar Jawa-Bali. Di Pulau Lombok yang berada di Nusa Tenggara Barat, malaria masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat, pada tahun 2006-2008 terjadi Kejadian Luar Biasa (KLB). Berdasarkan data malaria propinsi NTB dengan API yang tinggi merupakan ancaman bagi turis domestik dan mancanegara untuk berkunjung. Penemuan *P falciparum* pada bulan Oktober 2009 tinggi berturut-turut di Puskesmas Penimbung, Pelangan, Gunungsari Lobar, serta Puskesmas Keruak dan Labuan Haji Lotim.

Permulaan mutasi pada *P. falciparum* yang berhubungan dengan resistensi SP adalah mutasi gen *P. falciparum* DHFR pada codon 108 (dari *serine* ke *asparagine*), yang merupakan pusat resistensi terhadap pirimetamin secara *in vitro* dan pada analisa genetik antara *P. falciparum* yang sensitif dan yang resisten terhadap pirimetamin menunjukkan bahwa Asparagin-108 merupakan determinan fenotip obat resisten.

SP di NTB sudah banyak digunakan pada tahun 1987 dengan hasil uji resistensi secara *in vitro* yang dinyatakan sensitif pada tahun 1993. Pola resistensi SP dapat terjadi karena termasuk obat dengan *long half life*, kontak parasit yang terus menerus dan penggunaan SP sebagai profilaksis maupun pengobatan dalam waktu lama dan masih banyak beredar di masyarakat memungkinkan adanya resistensi.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka kami bermaksud melakukan pemeriksaan dan penelitian untuk memeriksa darah anda untuk diagnosis malaria serta melakukan identifikasi adanya mutasi genetik yang terkait dengan resistensi terhadap obat Sulfadoksin-Pirimetamin (SP), hal ini berguna sebagai bahan pertimbangan dalam menentukan kebijakan obat untuk pencegahan dan pengobatan malaria.

Bila anda setuju mengikuti penelitian ini, kami akan memberikan beberapa pertanyaan yang berkaitan dengan malaria termasuk pengobatan malaria, riwayat menderita malaria, pencegahan, pengobatan dan riwayat bepergian 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. Anda dapat mengundurkan diri dari keikutsertaan dalam penelitian setiap saat, tanpa mempengaruhi perawatan medik selanjutnya.

Keuntungan

Kami akan melakukan tes malaria dari sedikit darah anda. Jika kami menemukan parasit malaria dalam darah anda, petugas Puskesmas akan memberi pengobatan. Bila, kami berpikir anda membutuhkan pengobatan lebih lanjut, maka kami akan merujuk agar diberikan pengobatan yang dibutuhkan.

Prosedur pengambilan darah

Saya dan beberapa petugas kesehatan akan mengambil beberapa tetes darah dari ujung jari anda. Pertama-tama ujung jari anda akan dibersihkan dengan alkohol, kemudian dengan lanset steril akan dilakukan pengambilan darah. Tetesan darah pertama akan diseka, tetesan berikutnya akan digunakan untuk pemeriksaan malaria.

Resiko ketidaknyamanan

Pada saat pengambilan darah dengan lanset steril, anda akan merasa seperti ada cubitan yang mungkin terasa sakit selama beberapa detik. Jarang sekali ada luka memar yang muncul pada titik dimana darah tersebut diambil. Titik bekas tusukan tersebut biasanya akan menghilang dengan sendirinya tanpa perawatan. Darah yang terambil adalah sedikit dan tidak mengakibatkan sakit. Bila darah anda menunjukkan malaria, akan diberikan pengobatan.

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

Demikian atas perhatian dan sumbangsih Saudara, saya ucapkan banyak terima kasih.

Surabaya, tanggal.....

Yang memberi penjelasan,
.....

Yang menerima penjelasan,
(hubungan dengan subyek)

Pancawati Ariami, S.Si.
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

Lampiran 3.***INFORMED CONSENT***

Dengan ini saya selaku pasien/ keluarga pasien menyatakan bahwa setelah membaca lembar informasi penelitian :

Saya telah mendapat cukup informasi mengenai pemeriksaan dan penelitian yang akan dilakukan mencakup tujuan, manfaat, prosedur pemeriksaan, dan penelitian yang akan dilakukan dan kemungkinan efek samping

Saya setuju ikut serta dalam penelitian ini

Saya tahu bahwa semua data dalam penelitian ini akan dirahasiakan oleh peneliti

Saya bersedia semua data yang didapatkan diproses sesuai prosedur penelitian dan saya berhak mengetahui dan mendapatkan arsip saya kepada peneliti

Saya setuju mengikuti penelitian ini

Tanda tangan

(nama terang)

Saksi

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

Tanda tangan

(nama terang)

Lampiran 4. Kuisisioner*

Nama	No sampel	Tanggal
------	-----------	---------

L o k a s i	
Puskesmas	Kecamatan
Alamat:	
Penduduk: <input type="checkbox"/> Asli, <input type="checkbox"/> Pendatang, <input type="checkbox"/> tahun	Transportasi: kendaraan <input type="checkbox"/> Roda 2 <input type="checkbox"/> roda 4 <input type="checkbox"/> jalan kaki
Rumah: <input type="checkbox"/> Papan <input type="checkbox"/> bambu <input type="checkbox"/> mbok	Memiliki ternak: <input type="checkbox"/> tidak <input type="checkbox"/> Ya, jarak kandang-rumah m

Data Penderita	
Tanggal lahir (tgl/bln/thn) <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	atau umur: <input type="text"/> tahun
Jenis kelamin <input type="checkbox"/> laki-laki <input type="checkbox"/> perempuan	
Tinggi badan <input type="text"/> cm, Berat badan <input type="text"/>	
Pekerjaan: <input type="checkbox"/> ibu RT, <input type="checkbox"/> petani, <input type="checkbox"/> nelayan, <input type="checkbox"/> lainnya,	
Pendidikan: <input type="checkbox"/> Tidak sekolah, <input type="checkbox"/> SD, <input type="checkbox"/> SMP, <input type="checkbox"/> SMA, <input type="checkbox"/> PT dan <input type="checkbox"/> Tamat, <input type="checkbox"/> tidak tamat sekolah	

Pemeriksaan	
Suhu tubuh <input type="text"/> °C, sejarah panas dalam waktu 24 jam <input type="checkbox"/> ya <input type="checkbox"/> tidak	
Subconjunctiva pucat <input type="checkbox"/> ya <input type="checkbox"/> tidak	
Limpa <input type="checkbox"/> tidak membesar, <input type="checkbox"/> membesar, H (Hacket)	

Tetes tebal: <i>P falciparum</i> atau <i>P mix</i> (<i>P falciparum</i> + <i>P vivax</i>)		
Jenis parasit <input type="checkbox"/> <i>Pf</i> <input type="checkbox"/> <i>Pf+Pv</i>	Jumlah parasit/ μ l darah <input type="text"/>	Gametosit <i>Pf</i> <input type="checkbox"/> ya <input type="checkbox"/> tidak

Kertas filter untuk PCR

Apakah darah diambil dengan kertas filter? Ya tidak

Pengobatan sebelumnya

Apakah telah diberikan obat malaria ya tidak

Jenis obat SP CQ ACT lainnya,

a. Obat antimalaria yang diminum 14 hari sebelumnya

Nama obat (nama generik)	Tgl mulai/ tgl berhenti minum obat	Obat yg diminum masih berlangsung	Total dosis obat/hari atau unit (..... mg)	Cara penggunaan obat	Indikasi penggunaan obat
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Ya		<input type="checkbox"/> Oral	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Tidak		<input type="checkbox"/> Infus	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Ya		<input type="checkbox"/> Oral	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Tidak		<input type="checkbox"/> Infus	

Riwayat penyakit sebelumnya

Apakah pernah menderita panas menggigil/malaria? Ya tidak

Bila ya, pernahkah masuk rumahsakit karena malaria: ya tidak

Bila ya, jenis obat malariayang diminum :

Nama obat	Bulan/ tahun	Didapat dari: mantri, perawat, bidan, dokter, tetangga, beli sendiri	Cara penggunaan obat (oral/infus)	Dosis	Jumlah pemakaian (berapa kali)

Apakah memiliki bednet/kelambu ya tidak

Bila ya, kelambu celup, pemeliharaan dengan cara

tidak celup

Tanda tangan petugas: _____ Nama petugas: _____

*dikutip dari modified Sukmawati, Polimorfisme gen penyandi resisten terhadap obat malaria pada parasit malaria dari isolat malaria di Indonesia.



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 47/EC/KEPK/FKUA/2010

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Identifikasi Mutasi Gen Plasmodium Falciparum Dihydrofolate Reductase (Pfdhfr)
Codon 108 pada Penderita Malaria Falciparum di Daerah Endemis Malaria
Pulau Lombok**

PENELITI UTAMA :

Pancawati Ariami

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

- Puskesmas Tanjung, Puskesmas Gangga dan Puskesmas Kayangan, Lombok Utara
- Puskesmas Meninting, Puskesmas Gunungsari dan Puskesmas Penimbung, Lombok Barat
- Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Surabaya, 2 September 2010



M. Sajid Darmadipura
Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS



PEMERINTAH PROVINSI NUSA TENGGARA BARAT
BADAN LINGKUNGAN HIDUP DAN PENELITIAN
IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
(BLHP)

Jalan Majapahit Nomor 56, Telepon (0370) 621784, 628647, 632572, fax. 644782
M A T A R A M

SURAT IZIN

Nomor : 050.7/1290/III/BLHP/2010

TENTANG

PENELITIAN

- Dasar :
- Peraturan Daerah Provinsi Nusa Tenggara Barat Nomor 8 Tahun 2008 Tentang Pembentukan, Kedudukan, Tugas, Fungsi, Susunan Organisasi Dan Tata Kerja Inspektorat, Bappeda Dan Lembaga Teknis Daerah Provinsi Nusa Tenggara Barat;
 - Surat Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Nomor : 1558 / H3.1.1/ PPD.17/ 2010, tanggal 29 Juni 2010, perihal Permohonan Izin Penelitian.

MENGIZINKAN

- Kepada :
N a m a : **Pancawati Ariami**
Nim : **090810432M**
Alamat : **Mataram**
Untuk : Melakukan penelitian dalam rangka penyusunan skripsi dengan judul :
" Identifikasi Mutasi Gen Plasmodium Falciparum Dihydrofolate Reductase (Pfdhfr) Codon 108 pada Penderita Malaria Falciparum di Daerah Endemis Malaria Pulau Lombok. "
Lokasi : **Di Kabupaten Lombok Utara dan Kab. Lombok Barat.**
Waktu : **Selama 2 (dua) bulan sejak Izin Penelitian ini di terbitkan.**

Dikeluarkan di Mataram

Pada tanggal, 3 Juli 2010

PLH KEPALA BADAN LINGKUNGAN HIDUP
DAN PENELITIAN PROVINSI NTB,



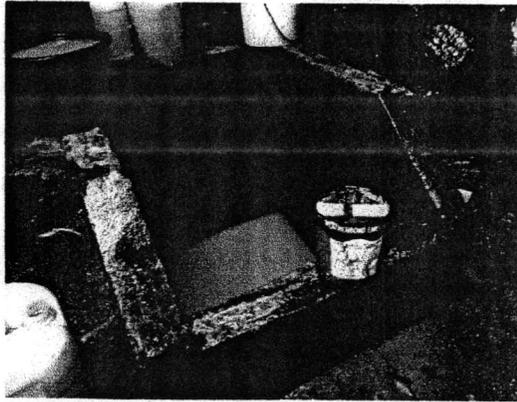
Ir. NYOMAN SUDARMA, MM.

NIP. 196003051987031012

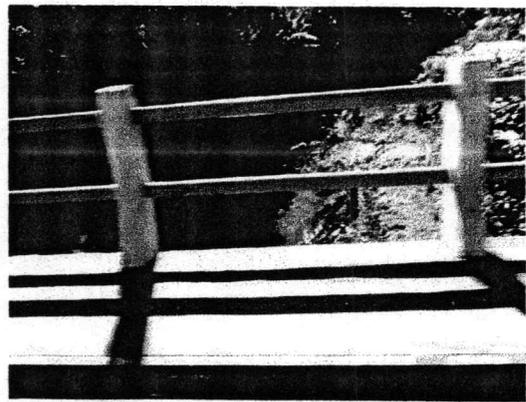
TEMBUSAN disampaikan kepada Yth:

- Bupati Lombok Utara; dan Kab. Lombok Barat.
- Dekan Fakultas Kedokteran Univ. Airlangga;
- Ketua Jurusan / Program Study;
- Kepala Dinas / Instansi Terkait;
- Pertinggal.

Lampiran 7. Lahan-lahan yang menjadi tempat perindukan nyamuk Anopheles di kabupaten Lombok Barat.



Salah satu sumber air di dusun Seraye, desa Lembahsari.



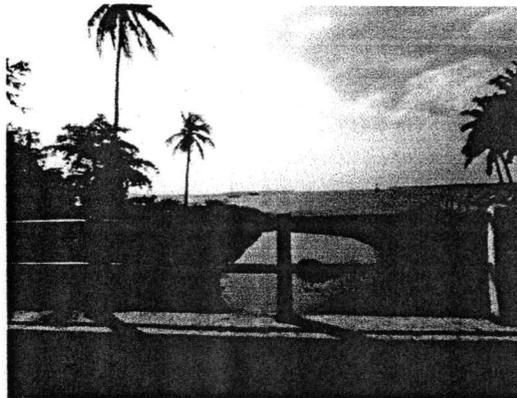
Sungai kecil dengan debit air rendah yang banyak ditemukan menjelang musim kemarau.



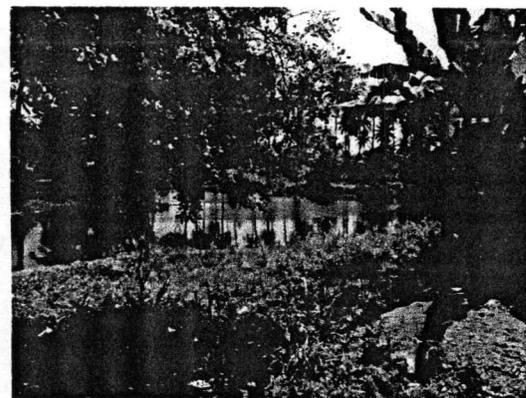
Aliran air di daerah persawahan sering ditemukan genangan air. Banyak ditemukan di seluruh wilayah Lombok.



Genangan air pada cekukan tanah di sepanjang jalan Pemenang ke Tanjung.



Aliran sungai terputus banyak ditemukan di sepanjang pinggiran pantai di Lombok Barat.



Salah satu lagoon di desa Medana, Tanjung.

Lampiran 8. Data karakteristik penduduk dengan gejala klinis malaria di Lombok

No	Kode	Sex		Umur				Penduduk		Suhu		Mikroskopis				
		L	P	0-4	5-9	10-14	>15	A	P	N	>N	F	V	FV	g	(-)
1	LB-1	v					27	v			v			FV	g	
2	LB-2	v					50	v				F			g	
3	LB-3	v			6			v			v		V			
4	LB-4	v					52					F			g	
5	LB-5		v			13		v			v		V			
6	LB-6		v				40					F				
7	LB-7	v				12						F				
8	LB-8	v			8			v			v		V			
9	LB-9		v				29	v			v	F				
10	LB-10		v				52	v		v		F				
11	LB-11		v				40	v		v		F			g	
12	LB-12		v				v	v			v	F				
13	LB-13	v					60	v			v					-
14	LB-14		v				v	v			v	F				
15	LB-15		v				34	v			v			FV		
16	LB-17		v				27	v			v			FV		
17	LB-18	v					40	v			v	F				
18	LB-19		v				35	v			v			FV		
19	LB-20	v		3				v			v	F				
20	LB-21	v				11		v			v			FV		
21	LB-22	v			7			v			v		V			
22	LB-23		v			13		v			v		V			
23	LB-24		v				23	v			v			FV		
24	LB-25	v					v	v			v	F			g	
25	LB-26		v		7			v			v			FV		
26	LB-28		v				30	v		v						-
27	LB-29	v				14		v			v	F			g	
28	LB-30	v					17	v		v				FV		
29	LB-31	v					21		v		v	F				
30	LB-33		v			11		v			v			FV		
31	LB-34	v					38	v			v	F				
32	LB-38		v		8			v			v			FV		
33	LB-42	v					42	v			v	F			g	
34	LB-44	v				11		v			v		V			
35	LB-48		v				30	v			v	F			g	
36	LB-49	v				13		v			v	F			g	
37	LB-52	v					17	v			v	F			g	
38	LB-54		v		9			v			v	F				
39	LB-55		v			12		v			v	F				
40	LB-56	v					16	v			v	F				
41	LB-57	v			6			v			v	F				
42	LB-58	v			8			v			v	F			g	
43	LB-59	v				14		v			v	F				
44	LB-61		v				35	v		v		F			g	
45	LB-62		v				20	v		v				FV	g	
46	LB-63	v			9			v			v	F				
47	LB-65		v			12		v			v	F				
48	LB-66	v				10		v			v			FV		
49	LB-69		v				60	v		v			V			
50	LB-76		v			11		v			v	F				
51	LB-77	v				14		v		v			V			
52	LB-79		v				60	v			v	F				
53	LB-80		v	4				v			v		V			

No	Kode	Sex		Umur				Penduduk		Suhu		Mikroskopis				
		L	P	0-4	5-9	10-14	>15	A	P	N	>N	F	V	FV	g	-
54	LB-81	v					36	v		v		F				
55	LB-82		v				34	v			v	F				
56	LB-83		v		6			v			v	F				
57	LB-84	v		1				v			v	F				
58	LB-85	v					33		v		v			FV		
59	LB-86		v	3				v			v					-
60	LB-89	v				13		v			v	F				
61	LB-90	v					29	v			v	F			g	
62	LB-91	v				14		v			v	F				
63	LB-92	v					20	v		v						-
64	LB-93	v					50	v			v		V			
65	LB-94		v	3				v			v		V			
66	LB-97		v				20	v			v	F				
67	LB-98	v					31	v			v	F				
68	LB-99	v					26		v		v	F				
69	LB-100	v					23		v	v		F			g	
70	LB-101	v					25		v	v		F				
71	LB-107	v			13	13		v			v					-
72	LB-108	v			40		40	v			v					-
73	LB-109	v				10		v			v	F				
74	LB-110	v				10		v			v		V			
75	LB-111	v				10		v			v		V			
76	LB-112	v					50	v			v		V			
77	LB-113		v				37	v			v	F				
78	LB-114	v				10		v			v			FV		
79	LB-118	v					26	v			v	F			g	
80	LB-119	v			7			v			v	F				
81	LB-120		v				27	v			v		V			
82	LB-121	v					55	v			v	F				

Lampiran 8. Karakteristik penduduk dibedakan menurut jenis kelamin: L, P. ; kelompok umur: 0-4 tahun, 5-9 tahun, 10-14 tahun, dan diatas 15 tahun; penduduk dibedakan atas penduduk asli dan pendatang; Suhu tubuh dibedakan menjadi suhu normal (N) dan demam/di atas normal (>N); Mikroskopis adalah hasil pemeriksaan mikroskopis yang dilakukan di ITD_Unair Surabaya, yaitu F, V, FV, g, (-) yang masing-masing mewakili *P falciparum*, *P vivax*, *Plasmodium falciparum* dan *P vivax*, gametosit dari *P falciparum*, dan negatif.

Lampiran 9. Data karakteristik pengobatan penduduk dengan gejala klinis malaria di Lombok

No	Kode	Suhu		Mikroskopis					Σ prst /ul darah	Obat		
		N	>N	F	V	FV	g	-		S	C	A
1	LB-1		v			FV	g		2.080	v		
2	LB-8		v		V				120		v	
3	LB-9		v	F					16.154		v	
4	LB-11	v			V		g		760		v	
5	LB-15		v			FV			5.040			v
6	LB-17		v			FV			5.360			v
7	LB-18		v	F					2.040		v	
8	LB-19		v			FV			10.320		v	
9	LB-23		v		V				7.922		v	
10	LB-29		v	F					1.920			v
11	LB-33		v			FV			4.760			v
12	LB-49		v	F			g		14.720			v
13	LB-54		v	F					5.163		v	
14	LB-69	v			V				560		v	
15	LB-76		v	F					560			v
16	LB-77	v			V				3.360		v	
17	LB-82		v	F					1.720		v	
18	LB-85		v			FV			440		v	
19	LB-90		v	F			g		760		v	
20	LB-91		v	F					3.280		v	v
21	LB-92	v						-	-		v	
22	LB-108		v					-	-	v		
23	LB-110		v		V				400		v	
24	LB-111		v		V				200		v	
25	LB-112		v		V				440		v	
26	LB-113		v	F					400		v	
27	LB-114		v			FV			112		v	
28	LB-118		v	F			g		560			v
29	LB-119		v	F					172.923			v
30	LB-120		v		V				6.280			v
31	LB-121		v	F					1.720			v

Lampiran 9. Adalah data karakteristik pengobatan penduduk dengan gejala klinis malaria yang dibedakan atas Suhu tubuh: suhu normal (N) dan demam/di atas normal (>N); Mikroskopis adalah hasil pemeriksaan mikroskopis yang dilakukan di ITD_Unair Surabaya, yaitu F, V, FV, g, (-) yang masing-masing mewakili *P falciparum*, *P vivax*, *Plasmodium falciparum* dan *P vivax*, gametosit dari *P falciparum*, dan negatif. Jumlah parasit per μ l darah. Obat dibedakan atas obat pernah digunakan penderita pada waktu sakit sebelumnya, yaitu S, C, dan A masing-masing untuk Sulfadoksin Pirimetamin (SP), Klorokuin, dan Artemisinin-based Combination Therapy (ACT).

Lampiran 10. Hasil pemeriksaan *nested-PCR* pada penderita malaria di daerah endemis malaria pulau Lombok

No	Kode	Mikroskopis/gmts					PCR				Σ prs /µl	Obat		
		F	V	FV	-	Gmt	F	V	FV	-		S	C	A
1	LB-1			FV		g			FV		2.080	V		
2	LB-2	F				g	F				2.344			
3	LB-3		V					V			12.000			
4	LB-4	F				g	F				2.212			
5	LB-5		V					V			1.327			
6	LB-6	F						V			1.280			
7	LB-7	F					F				12.528			
8	LB-8		V					V			120		v	
9	LB-9	F					F				16.154		v	
10	LB-10	F								-	3.564			
11	LB-11	F				g		V			760		v	
12	LB-12	F					F				480			
13	LB-13				-					-	-			
14	LB-14	F					F				2.520			
15	LB-15			FV			F				5.040			v
16	LB-17			FV					FV		5.360			v
17	LB-18	F					F				2.040		v	
18	LB-19			FV						-	10.320		v	
19	LB-20	F					F				46.154			
20	LB-21			FV			F				10.280			
21	LB-22		V					V			6.920			
22	LB-23		V							-	7.922		v	
23	LB-24			FV			F				9.840			
24	LB-25	F				g	F				433			
25	LB-26			FV			F				1.120			
26	LB-28				-					-	-			
27	LB-29	F				g	F				1.920			v
28	LB-30			FV					FV		720			
29	LB-31	F					F				2.160			
30	LB-33			FV				V			4.760			v
31	LB-34	F					F				1.040			
32	LB-38			FV					FV		5.600			
33	LB-42	F				g	F				2.040			
34	LB-44		V				F				560			
35	LB-48	F				g	F				2.560			
36	LB-49	F				g	F				14.720			v
37	LB-52	F				g	F				5.860			
38	LB-54	F								-	5.163		v	
39	LB-55	F					F				2.160			
40	LB-56	F					F				9.680			
41	LB-57	F					F				1.200			
42	LB-58	F				g	F				1.840			
43	LB-59	F					F				440			
44	LB-61	F				g	F				520			
45	LB-62			FV					FV		760			
46	LB-63	F					F				114.000			
47	LB-65	F					F				23.360			
48	LB-66			FV			F				15.260			
49	LB-69		V							-	560		v	
50	LB-76	F					F				560			v
51	LB-77		V					V			3.360		v	
52	LB-79	F					F				1.120			

No	Kode	Mikroskopis/gmts					PCR				Σ prs / μ l	Obat		
		F	V	FV	-	Gmt	F	V	FV	-		S	C	A
53	LB-80		V					V			440			
54	LB-81	F					F				3.440			
55	LB-82	F					F				1.720		v	
56	LB-83	F							FV		59.200			
57	LB-84	F					F				4.160			
58	LB-85			FV						-	440		v	
59	LB-86				-					-	-			
60	LB-89	F					F				6.760			
61	LB-90	F					F				760		v	
62	LB-91	F					F				3.280		v	v
63	LB-92				-		F				-		v	
64	LB-93		V				F				320			
65	LB-94		V							-	5.680			
66	LB-97	F					F				18.754			
67	LB-98	F					F				10.480			
68	LB-99	F					F				2.520			
69	LB-100	F				g	F				2.860			
70	LB-101	F					F				28.148			
71	LB-107				-					-	-			
72	LB-108				-					-	-	V		
73	LB-118	F				g			FV		560			v
74	LB-119	F					F				172.923			v
75	LB-120		V					V			6.280			v
76	LB-121	F					F				1.720			v

Lampiran 10. Hasil pemeriksaan *nested-PCR* pada penderita malaria yang dibandingkan dengan hasil pemeriksaan mikroskopis, jumlah parasit dan jenis obat yang pernah digunakan penderita pada masa sakit sebelumnya.

Lampiran 11. Hasil pemeriksaan PCR-RFLP codon 108 penderita malaria falciparum di daerah endemis malaria Lombok

No	Kode	Mikroskopis/gmts					Nested-PCR				RFLP-108			Σ prs /µl	Obat		
		F	V	FV	-	Gmt	F	V	FV	-	S	N	T		S	C	A
1	LB-1			FV		g			FV			N		2.080	v		
2	LB-2	F				g	F					N		2.344			
3	LB-4	F				g	F					N		2.212			
4	LB-7	F					F					N		12.528			
5	LB-9	F					F					N		16.154		v	
6	LB-12	F					F					N		480			
7	LB-14	F					F					N		2.520			
8	LB-15			FV			F					N		5.040			v
9	LB-17			FV					FV			N		5.360			v
10	LB-18	F					F					N		2.040		v	
11	LB-20	F					F					N		46.154			
12	LB-21			FV			F					N		10.280			
13	LB-24			FV			F					N		9.840			
14	LB-25	F				g	F					N		433			
15	LB-26			FV			F					N		1.120			
16	LB-34	F					F					N		1.040			
17	LB-38			FV					FV			N		5.600			
18	LB-42	F				g	F					N		2.040			
19	LB-44		V				F					N		560			
20	LB-48	F				g	F					N		2.560			
21	LB-49	F				g	F					N		14.720			v
22	LB-52	F				g	F					N		5.860			
23	LB-55	F					F					N		2.160			
24	LB-56	F					F					N		9.680			
25	LB-57	F					F					N		1.200			
26	LB-58	F				g	F					N		1.840			
27	LB-59	F					F					N		440			
28	LB-62			FV					FV			N		760			
29	LB-63	F					F					N		114.000			
30	LB-65	F					F					N		23.360			
31	LB-66			FV			F					N		15.260			
32	LB-76	F					F					N		560			v
33	LB-79	F					F					N		1.120			
34	LB-81	F					F					N		3.440			
35	LB-82	F					F					N		1.720		v	
36	LB-83	F							FV			N		59.200			
37	LB-84	F					F					N		4.160			
38	LB-89	F					F					N		6.760			
39	LB-90	F					F					N		760		v	
40	LB-91	F					F					N		3.280		v	v
41	LB-92						F					N		-		v	
42	LB-29*	F				g	F					N		1.920			v
43	LB-30*			FV					FV			N		720			
44	LB-31*	F					F					N		2.160			
45	LB-61*	F				g	F					N		520			
46	LB-93*		V				F					N		320			
47	LB-97*	F					F					N		18.754			
48	LB-98*	F					F					N		10.480			
49	LB-99*	F					F					N		2.520			
50	LB-100*	F				g	F					N		2.860			
51	LB-101*	F					F					N		28.148			
52	LB-118**	F				g			FV			N		560			v
53	LB-119**	F					F					N		172.923			v
54	LB-121**	F					F					N		1.720			v

Lampiran 11. Hasil pemeriksaan PCR-RFLP codon 108 pada penderita malaria falciparum, yang membandingkan mikroskopis dengan nested-PCR; hasil pemeriksaan PCR-RFLP pada codon 108 untuk identifikasi mutasi gen *PfDHFR*; jumlah parasit dan jenis obat yang pernah digunakan penderita pada masa sakit sebelumnya Kode sampel tanpa tanda * berasal dari Puskesmas Meninting; kode sampel dengan tanda * berasal dari Puskesmas Gunungsari; dan kode sampel dengan tanda ** berasal dari Puskesmas Tanjung.

