

**IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)
KODON 1034 GEN Pfm_{dr}1 PADA PENDERITA MALARIA
FALCIPARUM DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA,
KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG**

Skripsi

Oleh

PUJI INDAH PERMATASARI



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

**IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)
KODON 1034 GEN Pfm^{dr}1 PADA PENDERITA MALARIA
FALCIPARUM DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA,
KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG**

Oleh

Puji Indah Permatasari

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Lulus Sarjana Kedokteran

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CODON 1034 *Pfmdr1* GENE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ON MALARIA PATIENTS IN WORKING AREA PRIMARY HEALTH CARE HANURA, PESAWARAN, LAMPUNG

By

Puji Indah Permatasari

Background: *Plasmodium falciparum* is one of Plasmodium which can cause malaria. *Plasmodium falciparum* that is resistant to anti-malaria drugs caused by genetic mutations. The presence of a single nucleotide polymorphism in codon 1034 of the Plasmodium Falciparum Multidrug gene Resistance 1 (*Pfmdr1*) can be a genetic marker of chloroquine drug resistance to Plasmodium falciparum. Examinations carried out based on molecular biology have been widely investigated to detect gene polymorphisms through Polymerase Chain Reaction (PCR) and analyzed sequentially.

Method: This research used a survey research design with descriptive method. Sample obtained from 22 stored Archived Biological Materials (ABM). The examination was carried out by using the PCR method and analyzed by sequencing to detect the polymorphism of codon 1034 gene *Pfmdr1*.

Result: There were 22 samples that had been carried out nested PCR, then 12 samples were continued sequencing with the result of codon 1034 *Pfmdr1* gene in all samples were wild-type.

Conclusion: There are no Single Nucleotide Polymorphism codon 1034 Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance 1 (*Pfmdr1*).

Keyword: Codon, *Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance 1 (Pfmdr1)*, Polymerase Chain Reaction (PCR).

ABSTRAK

IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) KODON 1034 GEN PFMDR1 PADA PENDERITA MALARIA FALCIPARUM DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG

Oleh

Puji Indah Permatasari

Latar Belakang: *Plasmodium falciparum* merupakan salah satu jenis Plasmodium yang dapat menyebabkan penyakit malaria. *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap obat anti malaria disebabkan oleh adanya mutasi genetik. Adanya *Single Nucleotide Polymorphism* pada kodon 1034 gen *Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance 1* (Pfm_{dr}1) dapat menjadi penanda genetik resistensi obat klorokuin terhadap *Plasmodium falciparum*. Pemeriksaan yang dilakukan berbasis biologi molekuler sudah banyak diteliti untuk mendeteksi polimorfisme gen melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dianalisa secara sekuensing.

Metode: Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian survey dan bersifat deskriptif. Sampel penelitian diperoleh dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) sebanyak 22 sampel. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR yang dianalisis dengan metode sekuensing untuk mendeteksi polimorfisme pada kodon 1034 gen Pfm_{dr}1.

Hasil: Terdapat 22 sampel yang telah dilakukan nested PCR, kemudian 12 sampel dilanjutkan sekuensing dengan hasil kodon 1034 gen Pfm_{dr}1 pada seluruh sampel adalah bersifat *wild-type*.

Kesimpulan: Tidak terdapat *Single Nucleotide Polymorphism* kodon 1034 gen *Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance 1* (Pfm_{dr}1).

Kata Kunci: Kodon, *Plasmodium Falciparum Multidrug Resistance 1* (Pfm_{dr}1), *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

**Judul Skripsi : IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE
POLYMORPHISM (SNP) KODON 1034
GEN Pfmdr1 PADA PENDERITA
MALARIA FALCIPARUM DI WILAYAH
KERJA PUSKESMAS HANURA,
KABUPATEN PESAWARAN,
PROVINSI LAMPUNG**

Nama Mahasiswa : Puji Indah Permatasari

Nomor Pokok Mahasiswa : 1518011011

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran



Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked, M.Kes
NIP. 197608312003121003

dr. Giska Tri Putri, S.Ked
NIK. 231612900307201

2. Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Muhartono, S. Ked, M. Kes, Sp. PA
NIP.197012082001121001

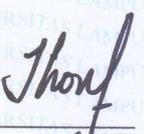
MENGESAHKAN

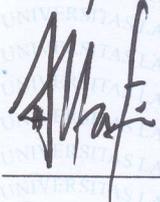
1. Tim Penguji

Ketua : Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes

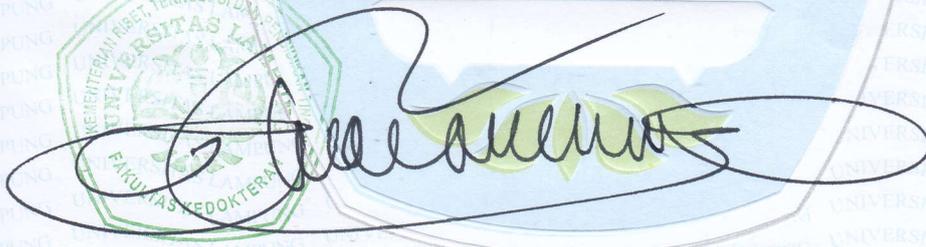
Sekretaris : dr. Giska Tri Putri, S.Ked

**Penguji
Bukan Pembimbing : dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes**





2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 Januari 2019

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul “**IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM KODON 1034 GEN Pfmdr1 PADA PENDERITA *Malaria falciparum* DI WILAYAH KERJA PUSKESMAS HANURA, KABUPATEN PESAWARAN, PROVINSI LAMPUNG KABUPATEN PESAWARAN**” adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarism.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Januari 2019

Pembuat pernyataan



Puji Indah Permatasari

NPM 1518011011

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, Lampung pada 3 September 1997, sebagai anak ketiga dari empat bersaudara, dari Bapak Ir. H. Erlan Murdiantono, MM dan Ibu Dra. Yurida Herawati.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Taman Kanak-kanak (TK) Dharmawanita Kalianda pada tahun 2003, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 3 Kalianda pada tahun 2010, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 1 Kalianda diselesaikan pada tahun 2012, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 1 Kalianda diselesaikan pada tahun 2015.

Pada tahun 2015, penulis terdaftar sebagai mahasiswa pada Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (FK Unila). Pada masa perkuliahan penulis mengikuti lembaga kemahasiswaan yaitu Forum Studi Islam Ibnu Sina (FSIIS) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, serta menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Karang Sari, Kabupaten Tanggamus pada tahun 2018.

PERSEMBAHAN

Segala puji kehadiran Allah SWT yang telah memberikan Karunia, Rahmat dan Ampunan-Nya kepada penulis. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Rasulullah SAW beserta keluarga dan para sahabat beliau

Dengan penuh syukur kupersembahkan ini teruntuk

"Orang tua, Kakak dan Adikku yang tersayang"

Yang selalu memberi dukungan dalam setiap proses pembelajaran dihidupku

SANWACANA

Puji dan syukur Penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad S.A.W.

Skripsi dengan judul “*Identifikasi Single Nucleotide Polymorphism Kodon 1034 Gen Pfmdr1 Pada Penderita Malaria Falciparum Di Wilayah Kerja Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes, Sp.PA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Utama dan Pembimbing Akademik yang selalu bersedia menyempatkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberi masukan dan nasihat selama proses penyelesaian penelitian serta ilmu yang begitu bermanfaat selama penelitian skripsi ini.
4. dr. Giska Tri Putri, S.Ked selaku Pembimbing Kedua atas kesabaran dan kesediaan memberikan bimbingan, ilmu, saran, dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
5. dr. Hanna Mutiara, S.Ked., M.Kes., selaku Penguji Utama untuk masukan dan saran-saran yang telah diberikan pada pada proses penyelesaian skripsi ini.

6. Terima kasih kepada relawan yang telah bersedia ikut serta dalam penelitian ini dengan memberikan darahnya untuk dijadikan sampel penelitian.
7. Terima kasih kepada para laboran Laboratorium Biomolekular FK Unila, Ibu Nuriyah dan Mbak Yani, atas seluruh bantuan serta bimbingan dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih atas ilmu dan kesabaran yang selalu diberikan kepada kami selama ini.
8. Seluruh staf dosen dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu dan waktu yang telah diberikan selama perkuliahan.
9. Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Bapak (Ir. Erlan Murdiantono, MM), Ibu (Dra. Yurida Herawati), Kakak-kakakku (Puji Permata Utami, SP. dan Puji Kurnia Putri, SE.), serta Adikku (Muhammad Puji Prawiroyudo) yang selama ini yang telah memberikan segala kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi dan nasihat serta setiap doa yang telah dipanjatkan selama ini. Terima kasih atas perjuangan kalian selama ini yang telah diberikan yang terbaik untukku. Semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan dan lindungan dan menjadikan ladang pahala.
10. Seluruh Keluarga Besar yang telah membantu dalam berbagai hal, doa, dukungan dan motivasi.
11. Terima kasih kepada teman seperjuangan, Syfa Dinia Putri dan Fitria Putridewi Abidin atas perjalanan dan pengalaman penelitan selama ini. Terima kasih untuk doa, waktu, tenaga dan seluruh dukungan serta semangat yang telah diberikan.
12. Terima kasih kepada sahabatku, teman seperjuanganku, Aliezsza, Syfa, Pita, Shafa, Maya, Fadila, Icha, Mega.

13. Seluruh sahabat dari kecil hingga saat ini yang telah membantu dalam berbagai hal dan mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
14. Keluarga Besar FK Unila 2015 (Endom15ium) yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas kekompakan, canda, tawa, proses pembelajaran yang telah memberikan warna serta makna tersendiri. Semoga kebersamaan dan kekompakan selalu terjalin baik sekarang maupun ke depan nanti.
15. Kakak-kakak dan adik-adik tingkat saya (angkatan 2002-2018) yang sudah memberikan semangat kebersamaan dalam satu kedokteran.

Penulis menyadari skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Namun, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan pengetahuan baru kepada setiap orang yang membacanya. Semoga segala perhatian, kebaikan dan keikhlasan yang diberikan selama ini mendapat balasan dari Allah SWT. Aamiin.

Bandar Lampung, Januari 2019
Penulis,

Puji Indah Permatasari
1518011011

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	iv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Malaria Secara Umum.....	6
2.2 Pengobatan Malaria.....	17
2.3 Klorokuin	20
2.4 Resistensi <i>Plasmodium falciparum</i> Terhadap Klorokuin	21
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	24
2.6 Sekuensing DNA.....	25
2.7 Genetika Secara Umum.....	28
2.8 Mutasi Secara Umum.....	31
2.9 Kerangka Teori.....	32
2.10 Kerangka Konsep.....	33
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1 Rancangan Penelitian	34
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	34
3.3 Populasi dan Sample Penelitian	34
3.3.1 Kriteria Inklusi.....	35
3.3.2 Kriteria Eksklusi	35
3.3.3 Besar Sampel	35

3.4 Definisi Operasional.....	35
3.5 Alat dan Bahan.....	36
3.6 Prosedur Penelitian.....	39
3.7 Analisis Data	45
3.8 Etika Penelitian	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1 Hasil Penelitian.....	46
4.2 Pembahasan Hasil Penelitian.....	50
4.3 Keterbatasan Penelitian.....	55
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
5.1 Kesimpulan.....	56
5.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Nyamuk Anopheles.....	8
2. Siklus Hidup Plasmodium.	10
3. Sporozoit Plasmodium falciparum pada Kelenjar Saliva	11
4. Skizon matur Plasmodium falciparum pada	11
5. Trofozoit stadium lanjut Plasmodium falciparum	12
6. Gametosit Plasmodium falciparum pada	13
7. Struktur DNA.....	28
8. Rumus Bangun Kimia Nukleotida.....	29
9. Kerangka Teori	32
10. Kerangka Konsep.....	33
11. Diagram Alur Penelitian.	44
12. Hasil Elektforesis PCR Nested 1	47
13. Hasil Analisis Sekuensing Basa Nukleotida Gen Pfmdr1	49
14. Hasil Analisis Sekuensing Asam Amino Gen Pfmdr1	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Taxonomi Plasmodium	9
2. Kodon dan Protein yang Disandikan.	30
3. Definisi Operasional	36
4. Daftar Primer	38
5. Kondisi PCR pada saat Amplifikasi	42

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit Plasmodium, yaitu makhluk hidup bersel satu yang termasuk ke dalam kelompok protozoa. Terdapat lima spesies yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi*. Spesies yang banyak ditemui di Indonesia adalah *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2016).

Di Indonesia morbiditas malaria pada suatu wilayah ditentukan oleh *Annual Parasite Incidence* (API) per tahun. Nilai API merupakan jumlah kasus positif malaria per 1.000 penduduk dalam satu tahun. Provinsi dengan API tertinggi pada tahun 2016 di Indonesia, yaitu 45,85 per 1.000 penduduk adalah Papua (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Nilai API di Provinsi Lampung pada tahun 2015 tertinggi ada di Kabupaten Pesawaran yaitu 6,36, Pesisir Barat yaitu 3,47, dan Kota Bandar Lampung yaitu 0,58 (Dinas Kesehatan Kota Bandar Lampung, 2015).

Terdapat beberapa upaya yang dilakukan dalam program pengendalian malaria, salah satu program yang penting adalah pengobatan malaria. Pengobatan malaria selalu mengalami perkembangan karena adanya laporan kasus resistensi (Kementerian Kesehatan RI, 2011). Pertama kali laporan kasus resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin muncul di Kalimantan Timur pada tahun 1973, kemudian menyebar ke seluruh provinsi di Indonesia. Resistensi obat malaria adalah kemampuan dari Plasmodium untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak, dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun dengan dosis yang lebih tinggi yang masih bisa ditolerir oleh pemakai obat.

Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin terjadi secara multigenik karena mutasi terjadi pada gen yang mengkode *Plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter* (Pfcr1) dan *Plasmodium falciparum multidrug resistant* (Pfmdr-1). Gen Pfmdr-1 merupakan kontributor utama parasit menjadi resisten terhadap klorokuin (Simamora dan Fitri, 2008). Terdapat beberapa posisi *point-mutation* yang dapat terjadi pada gen Pfmdr1, yaitu pada kodon posisi 86, 184, 1034, 1042 dan 1246. Perubahan basa pada posisi-posisi kodon tersebut memegang peranan penting terhadap timbulnya resistensi terhadap klorokuin baik secara tunggal maupun bersama-sama (Rajeev *et al.*, 2008). Pada penelitian yang dilakukan di Hanura, Provinsi Lampung menunjukkan bahwa pada semua sampel darah penderita malaria ditemukan mutasi gen Pfmdr1 pada posisi 86, namun tidak

terdapat mutasi pada posisi 1042 (Syafruddin *et al.*, 2005). Selain itu, penelitian yang dilakukan di Hanura, Provinsi Lampung didapatkan hasil bahwa telah terdapat mutasi di semua isolat sampel darah pada posisi 86 (Suwandi, 2014).

Saat ini telah dikembangkan pengobatan malaria dengan menggunakan obat, yaitu dengan pengobatan kombinasi yaitu dengan *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) (Kementerian Kesehatan RI, 2011). Sejak tahun 2004, pemerintah telah menetapkan penggunaan ACT sebagai standar pengobatan malaria dalam upaya eliminasi malaria (Ipa dan Dhewantara, 2015).

Dalam kurun waktu 12 tahun penggunaan klorokuin dihentikan sebagai obat anti malaria, maka ada kemungkinan bahwa spesies *Plasmodium falciparum* *wild-type* yang sensitif terhadap klorokuin muncul kembali akibat paparan terhadap klorokuin dihentikan. Adanya spesies *Plasmodium falciparum* yang sensitif terhadap klorokuin memungkinkan penggunaan kembali obat klorokuin sebagai tatalaksana farmakologi pada penderita Malaria *falciparum*.

Berdasarkan penjelasan tersebut, peneliti tertarik untuk mengidentifikasi adanya *single nucleotide polymorphism* kodon 1034 gen *Pfmdr1* pada penderita *Malaria falciparum* yang terdapat di daerah endemis, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung untuk mengetahui adanya kemungkinan

munculnya kembali *Plasmodium falciparum wild-type* yang sensitif terhadap klorokuin.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah “Apakah terdapat *single nucleotide polymorphism* kodon 1034 gen *Pfmdr1* pada penderita malaria *falciparum* di kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung?”.

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi adanya *single nucleotide polymorphism* kodon 1034 gen *Pfmdr1* pada penderita malaria *falciparum* di Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Penelitian ini bermanfaat untuk meningkatkan keterampilan peneliti dalam melakukan penelitian khususnya dalam bidang parasitologi molekuler dan sebagai referensi pustaka mengenai polimorfisme kodon 1034 gen *Pfmdr1* pada *Plasmodium falciparum* bagi peneliti selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Bagi Pemerintah

Sebagai data dasar bagi kebijakan pelaksanaan pengendalian penyakit malaria di Provinsi Lampung

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria Secara Umum

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit Plasmodium melalui nyamuk Anopheles betina, parasit tersebut akan hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah manusia. Penyakit ini dapat menyerang laki-laki ataupun perempuan pada semua golongan umur (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Pada tahun 2016, dilaporkan terdapat 216 juta kasus malaria di 91 negara, meningkat 5 juta lebih dari 211 juta kasus yang dilaporkan pada tahun 2015. Angka kematian akibat malaria pada tahun 2016 diperkirakan mencapai 445.000 jiwa. Persentase angka kematian akibat malaria pada tahun 2016 tertinggi terjadi di wilayah Afrika yaitu 91% kemudian Asia Tenggara sebanyak 6%. Namun terjadi penurunan angka kematian pada tahun 2016 bila dibandingkan dengan 2010, di mana penurunan tingkat kematian terbesar terjadi di Asia Tenggara (44%), Afrika (37%), dan Amerika (27%) (WHO, 2017).

Tingkat endemisitas malaria pada tahun 2016 di Indonesia menunjukkan bahwa 48,1% kabupaten/kota sudah tersertifikasi bebas malaria, 32,2% kabupaten/kota memiliki status endemis rendah ($API < 1$), 11,7% kabupaten/kota memiliki status endemis sedang ($API 1-5$), dan 8,0% kabupaten/kota memiliki status endemis tinggi ($API > 5$). Pada tahun 2009 penduduk berisiko penyakit malaria di Indonesia adalah 1,8 per 1.000, kemudian menurun menjadi 0,84 per 1.000 penduduk berisiko pada tahun 2016. Empat provinsi dengan API per 1.000 penduduk tertinggi lainnya, yaitu Papua Barat (10,20), Nusa Tenggara Timur (5,17), Maluku (3,83), dan Maluku Utara (2,44). Sebanyak 83% kasus berasal dari Papua, Papua Barat, dan Nusa Tenggara Timur (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

Malaria saat ini masih endemis pada sebagian daerah di Provinsi Lampung, yaitu sebanyak 223 desa atau 10% dari seluruh jumlah desa, merupakan desa endemis malaria. Angka kesakitan malaria di Provinsi Lampung pada tahun 2015 tertinggi ada di Kabupaten Pesawaran, Kota Bandar Lampung dan Pesisir Barat. Angka Kesakitan Malaria (AMI) per 1000 penduduk Provinsi Lampung tahun 2015 sebesar 1,60 per 1.000 penduduk. Sedangkan AMI provinsi Lampung tahun 2015 sebesar 3,29 per 1.000 penduduk, angka ini telah mencapai target sebesar 5 per 1.000 penduduk (Dinas Kesehatan Kota Bandar Lampung, 2015).

Vektor utama malaria adalah nyamuk Anopheles. Nyamuk Anopheles merupakan serangga kosmopolit terutama di daerah tropis dan subtropis. Nyamuk di seluruh dunia diketahui sekitar 3453 spesies, 400 spesies diantara jumlah itu adalah Anopheles seperti pada Gambar 1. Sebanyak 80 spesies Anopheles ada di Indonesia, dan 18 spesies dipastikan sebagai vektor malaria yang tersebar di banyak pulau. Di antara 18 spesies itu, terdapat 7 spesies yang diketahui paling efisien sebagai vektor malaria yaitu: *An. sundaicus*, *An. aconitus*, *An. barbirostris*, *An. sinensis*, *An. farauti*, *An. subpictus*, dan *An. balabacensis* (Mandasari, 2012; Soedarto, 2016).



Gambar 1. Nyamuk Anopheles (CDC, 2018).

Semua vektor hidup sesuai dengan kondisi ekologiannya, antara lain ada yang hidup di air payau pada tingkat salinitas tertentu (*An. sundaicus*, *An. subpictus*), ada hidup di sawah (*An. aconitus*), air bersih di pegunungan (*An. maculatus*), genangan air yang dapat sinar matahari (*An. punctulatus*, *An. farauti*) (Nurhayati *et al*, 2014; Soedarto, 2016).

Malaria disebabkan oleh Plasmodium yang ditransmisikan ke manusia melalui nyamuk Anopheles betina. Terdapat 5 spesies Plasmodium yang diketahui

dapat menyebabkan infeksi malaria pada manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi* (Liwan, 2015; Soedarto 2016; Gusra *et al.*, 2013).

Penjelasan secara *taxonomi* dari Plasmodium dijelaskan pada tabel satu.

Tabel 1. *Taxonomi Plasmodium*

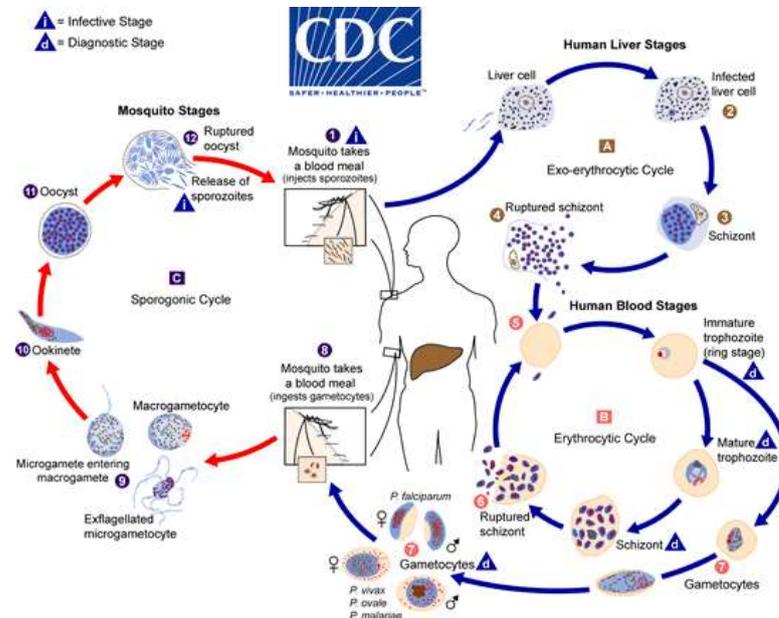
Klasifikasi	Jenis Klasifikasi
<i>Kingdom</i>	<i>Protozoa</i>
<i>Subkingdom</i>	<i>Baciliata</i>
<i>Phylum</i>	<i>Myzozoa</i>
<i>Subphylum</i>	<i>Apicomplexa</i>
<i>Class</i>	<i>Aonoidasida</i>
<i>Ordo</i>	<i>Haemosporina</i>
<i>Genus</i>	<i>Plasmodium</i>

Sumber: (Bannister dan Sherman, 2009; Igweh, 2012)

Di Indonesia, spesies Plasmodium yang dominan adalah *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Perbedaan spesies parasit ini mempengaruhi tipe gejala klinik yang timbul dan kecenderungan untuk terjadinya relaps. *Plasmodium falciparum* adalah penyebab infeksi yang berat dan bahkan dapat menimbulkan suatu variasi manifestasi-manifestasi akut dan jika tidak diobati, dapat menyebabkan kematian (Hakim, 2011; Liwan, 2015; Putra, 2011).

Sebagai mana makhluk hidup lainnya, Plasmodium juga melakukan proses kehidupan yaitu berkembang biak. Dalam berkembang biak, parasit ini memiliki dua siklus yaitu siklus aseksual dan seksual seperti pada Gambar 2. Siklus aseksual dalam tubuh manusia dikenal sebagai skizogoni, sedangkan

siklus seksual dalam tubuh nyamuk yang membentuk sporozoit dikenal sebagai sporogoni (Hakim, 2011; Syam *et al.*, 2014).



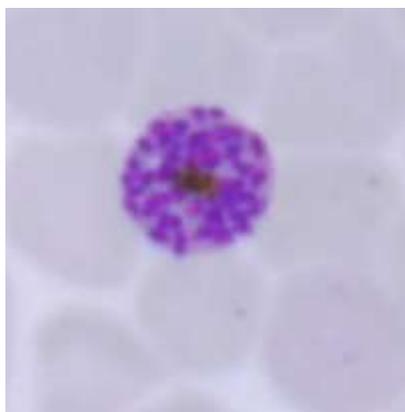
Gambar 2. Siklus Hidup Plasmodium (CDC, 2018).

Sporozoit yang aktif dapat ditularkan ke dalam tubuh manusia melalui air liur nyamuk, kemudian akan menempati jaringan parenkim hati. Morfologi sporozoit *Plasmodium falciparum* pada mikroskop perbesaran 1000x dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Sporozoit *Plasmodium falciparum* pada Kelenjar Saliva Nyamuk Anopheles (Marie Bashir Institute, 2018).

Sporozoit yang menempati jaringan parenkim hati akan tumbuh sebagai skizon ekso-eritrositer atau skizon pra-eritrositer. Skizon praeritrositer pada *Plasmodium falciparum* berisi 40.000 merozoit yang berukuran 60 mikron kali 30 mikron (Soedarto, 2016; Syam *et al*, 2014). Morfologi mikroskopis skizon *Plasmodium falciparum* dapat dilihat pada Gambar 4.

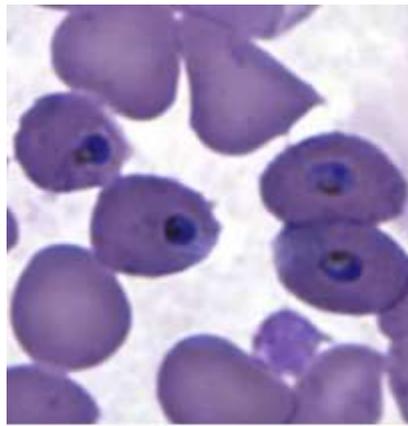


Gambar 4. Skizon matur *Plasmodium falciparum* pada sediaan apus darah tepi (CDC, 2018).

Sel hati yang berisi parasit akan pecah dan mengeluarkan merozoit. Merozoit akan masuk ke dalam eritrosit (stadium eritrositer) dan tampak sebagai kromatin kecil dikelilingi oleh sedikit sitoplasma yang mempunyai bentuk cincin, disebut sebagai trofozoit. Plasmodium memiliki trofozoit yang

berbeda bentuknya antara trofozoit muda yang baru terbentuk dengan trofozoit lanjut (Hakim, 2011; Soedarto, 2016; Syam *et al*, 2014).

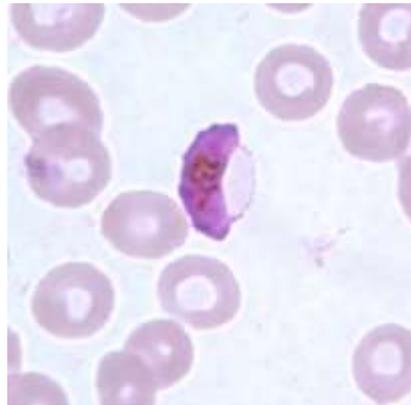
Trofozoit muda pada *Plasmodium falciparum* berbentuk cincin yang mempunyai inti dan tampak sebagian dari sitoplasma parasit berada di bagian tepi dari eritrosit, bentuk ini disebut sebagai *accolé* atau *form applique*. Trofozoit lanjut (*late trophozoite*) pada *Plasmodium falciparum* seperti pada Gambar 5 mengandung banyak bitnik-bintik Maurer (*Maurer dots*) (Soedarto, 2016; Syam *et al*, 2014).



Gambar 5. Trofozoit stadium lanjut *Plasmodium falciparum* pada sediaan apus darah tipis (CDC, 2018).

Trofozoit akan membentuk skizon muda kembali dan setelah matang, akan membelah mengeluarkan merozoit. Setelah proses pembelahan eritrosit akan hancur, merozoit, pigmen, dan sel sisa akan keluar dan berada di dalam plasma. Parasit akan difagositosis oleh RES. Plasmodium yang dapat menghindar akan masuk kembali ke dalam eritrosit lain untuk mengulangi stadium skizogoni kembali (Soedarto, 2016; Syam *et al*, 2014).

Sebagian dari merozoit akan berkembang menjadi bentuk gametosit yang dapat menginfeksi nyamuk *Anopheles*. Pembentukan gametosit terjadi di dalam eritrosit yang terdapat di dalam kapiler-kapiler limpa dan sumsum tulang. Gametosit *Plasmodium falciparum* seperti pada Gambar 6 mempunyai bentuk khas seperti pisang, dengan ukuran panjang gametosit lebih besar dari ukuran diameter eritrosit (Soedarto, 2016; Syam *et al.*, 2014).



Gambar 6. Gametosit *Plasmodium falciparum* pada sediaan apus darah tipis (CDC, 2018).

Dalam tubuh nyamuk, parasit berkembang secara seksual (sporogoni). Sporogoni memerlukan waktu 8-12 hari. Dalam lambung nyamuk, makro dan mikrogametosit berkembang menjadi makro dan mikrogamet yang akan membentuk zigot, disebut sebagai ookinet. Selanjutnya, ookinet menembus dinding lambung nyamuk membentuk ookista yang membentuk banyak sporozoit. Kemudian sporozoit akan dilepaskan dan masuk ke dalam kelenjar liur nyamuk. Siklus tersebut disebut masa tunas ekstrinsik (Soedarto, 2016; Syam *et al.*, 2014).

Manifestasi klinis malaria timbul saat pecahnya eritrosit yang mengandung parasit. Demam mulai timbul bersamaan pecahnya skizon darah yang mengeluarkan macam-macam antigen. Antigen ini akan merangsang makrofag, monosit atau limfosit yang mengeluarkan berbagai macam sitokin, diantaranya *Tumor Necrosis Factor* (TNF). *Tumor Necrosis Factor* akan dibawa aliran darah ke hipotalamus, yang merupakan pusat pengatur suhu tubuh manusia. Sebagai akibat demam terjadi vasodilasi perifer yang mungkin disebabkan oleh bahan vasoaktif yang diproduksi oleh parasit. Limpa merupakan organ retikuloendotelial sistem. Pembesaran limpa disebabkan oleh terjadi peningkatan jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit, teraktifasinya sistem retikuloendotelial untuk memfagositosis eritrosit yang terinfeksi parasit dan sisa eritrosit akibat hemolisis. Anemia terutama disebabkan oleh pecahnya eritrosit dan fagositosis oleh sistem retikuloendotelial. Kelainan patologik pembuluh darah kapiler pada malaria tropika, disebabkan karena sel darah merah terinfeksi menjadi kaku dan lengket, perjalanannya dalam kapiler terganggu sehingga melekat pada endotel kapiler karena terdapat penonjolan membran eritrosit. Setelah terjadi penumpukan sel dan bahan-bahan pecahan sel maka aliran kapiler terhambat dan timbul hipoksia jaringan, terjadi gangguan pada integritas kapiler dan dapat terjadi perembesan cairan bukan perdarahan ke jaringan sekitarnya dan dapat menimbulkan malaria cerebral, edema paru, gagal ginjal dan malabsorpsi usus (Putra, 2011; Soedarto 2016; Syam 2014).

Penderita malaria biasanya menunjukkan gejala utama demam tinggi yang bersifat paroksismal disertai menggigil, berkeringat, dan nyeri kepala. Selain

itu, sering ditemukan kelelahan, anoreksia, nyeri punggung, mialgia, pucat, dan muntah. Manifestasi klinis malaria pada anak berbeda dengan orang dewasa, sehingga sering salah diinterpretasikan dengan gastroenteritis akut atau infeksi virus akut lainnya. Anak-anak yang berasal dari daerah endemis malaria (*partially immune*) umumnya menunjukkan gejala minimal seperti berkurangnya aktivitas, anoreksia atau bahkan asimtomatik; tidak harus disertai demam, terutama bagi anak di daerah endemis. Pada anak dengan asimtomatik yang positif parasit malaria di darah, dapat hanya menunjukkan splenomegali sebagai temuan tunggal (Liwan, 2015; Syam *et al.*, 2014).

Malaria berat yaitu ditemukan *Plasmodium falciparum* stadium aseksual dengan satu atau beberapa manifestasi klinis dibawah ini:

1. Malaria dengan gangguan kesadaran (apatis, delirium, stupor dan koma) atau GCS (Glasgow Coma Scale) <14 untuk orang dewasa dan < 5 untuk anak-anak. Gangguan kesadaran menetap >30 menit atau menetap setelah panas turun;
2. Malaria dengan ikterus (bilirubin serum >3 mg %);
3. Malaria dengan gangguan fungsi ginjal (uliguria <400 ml/24 jam atau kreatinin serum >3 mg %);
4. Malaria dengan anemia berat (Hb <5 gr % atau hematokrit <15%);
5. Malaria dengan edema paru (sesak nafas, gelisah);
6. Malaria dengan hipoglikemi (gula darah <40 mg %);
7. Malaria dengan gangguan sirkulasi atau syok (tekanan sistolik <70 mmhg pada orang dewasa atau <50 mmhg pada anak 1-5 tahun);

8. Malaria dengan hiperparasitemia (plasmodium >5%);
9. Malaria dengan manifestasi perdarahan (gusi, hidung, dan/atau tanda-tanda *disseminated intravascular coagulation /DIC*);
10. Malaria dengan kejang-kejang yang berulang, lebih dari 2 kali dalam 24 jam;
11. Malaria dengan asidosis (ph darah <7,25 atau plasma bikarbonat < 15 mmo/L);
12. Malaria dengan hemoglobinuria makroskopik;
13. Malaria dengan hipertermia (suhu badan >40°C);
14. Malaria dengan kelemahan yang ekstrem (prostration); penderita tidak mampu duduk atau berjalan, tanpa adanya kelainan neurologi tertentu (Putra, 2011; Syam *et al.*, 2014).

Diagnosis pasti malaria adalah dengan pemeriksaan apusan darah tebal dan apusan darah tipis. Apusan darah tebal dibuat dengan pewarnaan Giemsa atau *Field Stain*, sedangkan apusan darah tipis dengan pewarnaan *Wright* atau Giemsa. Pemeriksaan apusan darah tebal bertujuan melihat jumlah eritrosit dalam darah, sementara pemeriksaan apusan darah tipis bertujuan melihat perubahan bentuk eritrosit, jenis Plasmodium, dan persentase eritrosit yang terinfeksi (Hakim, 2011; Liwan, 2015; Putra, 2011; Syam *et al.*, 2014).

2.2 Pengobatan Malaria

Pengobatan malaria adalah salah satu upaya penting untuk pengendalian penyakit malaria. Penggolongan obat antimalaria dapat dibedakan menurut cara kerja obat pada siklus hidup Plasmodium dan berdasarkan struktur kimia obat.

2.2.1 Penggolongan obat malaria berdasarkan cara kerja obat pada siklus hidup Plasmodium, yaitu:

1. Obat yang melenyapkan Plasmodium dorman atau yang sedang terbentuk pada jaringan hepar, dan mencegah invasinya ke dalam sel darah disebut skizontisida jaringan. Obat yang termasuk golongan ini adalah primakuin, proguanil, dan pirimetamin;
2. Obat yang bekerja pada parasit eritrositik disebut skizontisida darah, anti malaria jenis ini berfungsi untuk pencegahan dan mengakhiri serangan klinis. Obat yang termasuk golongan ini adalah klorokuin, kuinin, kuinidin, meflokuin, halofantrin, sulfonamida, tetrasiklin, atovakuon, dan artemisinin serta turunannya;
3. Obat yang mematikan parasit stadium gametosit di darah dan mencegah penularan ke nyamuk disebut gametosida. Obat yang termasuk golongan ini adalah primakuin (Katzung *et al.*, 2014).

2.2.2 Penggolongan obat antimalaria berdasarkan tempat kerja obat anti malaria pada organel subseluler Plasmodium, yaitu:

1. Obat golongan klorokuin, amodiakuin, kuinin, dan meflokuin berkonsentrasi dalam vakuola makanan yang bersifat asam. Obat golongan ini mengganggu proses pencernaan hemoglobin oleh

parasit dengan cara mengadakan interaksi dengan β -hematin atau menghambat pembentukan hemozoin. Target baru obat golongan ini adalah menghambat enzim plasmepsin dan enzim falcipain yang berperan dalam pemecahan globin menjadi asam amino. Hemozoin dan asam amino diperlukan untuk pertumbuhan parasit sehingga jika pembentukan dihambat maka parasit akan mati;

2. Antibiotik seperti azitromisin, doksisisiklin, dan klindamisin bekerja dalam menghambat translasi protein sehingga parasit yang diberi obat mengalami kematian;
3. Atovakuon menghambat transport elektron dalam mitokondria melalui penghambatan oksidoreduktase sitokrom C;
4. Obat anti-malaria Sulfadoksin Pirimetamin (SP) dan Klorproguanil-Dapson (Lapdap) merupakan inhibitor kompetitif yang berperan dalam jalur folat;
5. Generasi obat dari Artemisinin menghasilkan radikal bebas yang berfungsi untuk mengalkilasi membran parasit (Kinansi *et al.*, 2017; Katzung *et al.*, 2014).

Perbedaan mekanisme aksi obat anti-malaria ini sebagai dasar pengobatan malaria secara kombinasi. Pengobatan malaria secara kombinasi bertujuan untuk meningkatkan efikasi dan menurunkan perkembangan resistensi. Berkembangnya resistensi pengobatan malaria, baik di luar negeri dan di dalam negeri, menjadikan penanganan malaria menjadi sulit karena terjadi

peningkatan potensi malaria berat yang dapat mengakibatkan kematian (Katzung *et al.*, 2014; Muti'ah, 2012).

Pengobatan kombinasi adalah penggunaan dua atau lebih obat antimalaria schizontosidal darah secara simultan, masing-masing obat mempunyai cara kerja yang independen dan memiliki target biokimia yang berbeda terhadap parasit. Sejak tahun 2004, pemerintah telah menganjurkan penggunaan pengobatan kombinasi ACT secara bertahap dalam upaya eliminasi malaria dan menghentikan penggunaan klorokuin karena adanya resistensi tersebut. Derivat artemisinin dipilih sebagai dasar terapi kombinasi antimalaria yang penting karena mampu menurunkan parasitemia lebih cepat sepuluh kali dari pada obat antimalaria lainnya (Ipa dan Dhewantara, 2015; Kinansi *et al.*, 2017; Syam *et al.*, 2014).

ACT merupakan kombinasi pengobatan yang berbeda, karena artemisinin memiliki kemampuan antara lain: 1) menurunkan *biomass parasite* dengan cepat, 2) menghilangkan simptom dengan cepat, 3) efektif terhadap parasit *multi-drug resistance*, 4) semua bentuk/stadium parasit dari bentuk muda sampai tua yang berkuestrasi pada pembuluh kapiler, 5) menurunkan pembawa gamet, 6) menghambat transmisi, 7) belum ada resistensi terhadap artemisinin, dan 8) memiliki efek samping minimal (Kinansi *et al.*, 2017; Syam *et al.*, 2014).

2.3 Klorokuin

Klorokuin merupakan obat derivat 4-aminokuinolin sebagai skizontisida darah (skizontisida eritrositik). Klorokuin selain bekerja terhadap merozoit pada fase eritrositik aseksual dan mengganggu skizogoni eritrositik, obat ini juga sebagai gametositosida. Klorokuin akan menghancurkan bentuk eritrositik seksual (gametosit) sehingga mencegah penyebaran plasmodium ke nyamuk *Anopheles* (Laksono, 2011; Katzung *et al.*, 2014).

Klorokuin merupakan obat pilihan untuk pencegahan dan pengobatan serangan akut malaria. Kombinasi dengan primakuin digunakan untuk pencegahan serangan semua jenis malaria. Pada dosis kumulatif, profilaksis lebih dari 100 gram (lebih dari 5 tahun profilaksis) meningkatkan risiko retinopati, yang diduga berhubungan dengan deposisi klorokuin pada jaringan yang kaya akan melanin (Laksono, 2011; Soedarto, 2016).

Klorokuin berada dalam bentuk tidak bermuatan pada pH netral dan dengan demikian dengan mudah berdifusi ke dalam lisosom parasit. Pada pH lisosom yang asam, klorokuin berubah menjadi bentuk yang terprotonasi menjadi bentuk impermeable terhadap membran dan terperangkap di dalam parasit. Klorokuin bekerja dengan cara mendetoksifikasi haem parasit, mencegah pencernaan hemoglobin oleh parasit dan dengan demikian mengurangi suplai asam amino yang diperlukan untuk kehidupan parasit. Klorokuin juga menghambat polimerase haem-enzim yang mempolimerisasi haem bebas

yang toksik menjadi hemozoin-pigmen malaria (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008; Katzung *et al*, 2014).

2.4 Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Klorokuin

Sejak tahun 1973 ditemukan pertama kali kasus resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin di Kalimantan Timur. Sejak itu resisten terhadap klorokuin semakin meluas bahkan pada tahun 1990 dilaporkan telah terjadi resistensi parasit *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin di seluruh provinsi di Indonesia. Akibatnya terjadi peningkatan morbiditas dan mortalitas akibat penyakit malaria. Upaya untuk menanggulangi masalah resistensi tersebut (*multiple drug resistance*), maka pemerintah telah merekomendasikan obat pilihan pengganti klorokuin terhadap *Plasmodium falciparum* dengan terapi kombinasi artemisinin (*artemisinin combination therapy*). Hal ini sejalan dengan rekomendasi WHO (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

Resistensi obat malaria adalah kemampuan dari parasit untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standar maupun dengan dosis yang lebih tinggi yang masih bisa ditolerir oleh pemakai obat. Tekanan obat yang terus menerus menyebabkan parasit akan memasuki jalur metabolisme yang lain dan menyebabkan terjadinya mutasi. Dengan demikian parasit terhindar dari pengaruh obat (Simamora dan Fitri, 2008; Soedarto, 2016).

Klorokuin bersifat basa lemah dan aktifitasnya di dalam Plasmodium terjadi dalam vakuola makanan parasit stadium aseksual. Klorokuin yang dimakan per oral diabsorpsi melalui saluran cerna ke dalam plasma darah kemudian berdifusi ke dalam sitoplasma parasit karena adanya perbedaan tekanan dan konsentrasi. Di dalam sitoplasma parasit, klorokuin dimasukkan (*uptake*) ke dalam vakuola makanan melalui aktifitas suatu transporter yaitu transporter terkait P-glikoprotein dan *Drug Metabolite Transporter* (DMT). Transporter terkait P-glikoprotein dipresentasikan oleh gen *Pfmrp* (*Plasmodium falciparum Multidrug Resistance-Associated Protein*), dan gen *Pfmdr* (*Plasmodium falciparum Multi Drug Resistance*), sedangkan DMT dipresentasikan oleh gen *Pfcrt* (*Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*) (Ibraheem *et al.*, 2014).

P-glikoprotein transporter dapat disebut juga sebagai ABC transporter (*ATP dependant Cassete Transporter*), adalah kelompok protein pembawa yang dimediasi oleh energi yang dapat memompa bahan xenobiotik keluar dari sitosol. Terdapat empat protein ABC transporter yang telah diidentifikasi dalam *Plasmodium falciparum*, yaitu, *Pfmdr 1*, *Pfmdr 2*, *Pfmrp*, *Pfgcn20*, dan *Pfa0590w* (Ibraheem *et al.*, 2014). Tiga protein transporter yang merupakan penentu utama dalam resistensi terhadap beberapa obat antimalaria adalah *Pfcrt*, *Pfmdr1*, dan *Pfmrp*. Namun terdapat perbedaan mekanisme resistensi antara ketiga transporter tersebut (Petersen *et al.*, 2011).

Gen Pfmpr terletak di kromosom 1 dan mengkode protein asam amino 1822 yang berukuran 214 kD. Mekanisme resistensi gen Pfmpr ditimbulkan oleh dua *point mutation*, yaitu Y191H dan A437S di mana tirosin dan alanin pada kodon 191 dan 437 telah digantikan oleh histidin dan serin. Mutasi ini mempengaruhi *efflux* obat dan metabolit lain keluar dari tubuh parasit (Ibraheem *et al.*, 2014, Petersen *et al.*, 2011).

Gen Pfcrt terdiri dari 424 asam amino yang tersusun dari 10 α -*helical transmembrane domains* (TDMs). Di dalam struktur tersebut terdapat 32 kodon yang beresiko untuk menjadi *point mutations* sehingga dapat mengubah fungsi Pfcrt. Ditemukan bahwa terdapat sebelas dari total 32 kodon yang terkait dengan resisten klorokuin, seperti M74I, N75E, K76T, H97Q, A220S, Q271E, N326S, I356T, C350S, dan R371I R. Namun kodon 76 adalah yang memiliki peranan paling penting dalam kejadian resistensi terhadap klorokuin yang dibuktikan dengan metode *genetic complementation*. Mutasi pada kodon K76T mengakibatkan terjadi interaksi antara Pfcrt dengan klorokuin yang bermuatan positif (CQ +) ((Ibraheem *et al.*, 2014; Triwani, 2013; Andrea *et al.*, 2013).

Gen Pfmdr-1 merupakan sebuah *ATP-Binding cassette* (ABC) transporter pada Plasmodium yang berfungsi dalam memompa senyawa-senyawa tertentu keluar dari sel. Gen ini terletak pada kromosom 5 dalam *Plasmodium falciparum* dan mengkode protein ABC transporter dengan 1419 untai asam amino dan 162 kDa (Yusuf *et al.*, 2013). Ada beberapa *point-mutation* pada

gen *Pfmdr1* yang menyebabkan resistensi parasit *Plasmodium* terhadap obat anti malaria yaitu pada kodon N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, dan D1246Y. *Pfmdr-1* merupakan kontributor utama parasit menjadi resisten terhadap klorokuin (Jian Li *et al.*, 2014; Rajeev *et al.*, 2008; Simamora dan Fitri, 2008).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah suatu metode revolusioner yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1980. Metode PCR memungkinkan untuk mendeteksi secara spesifik dan memproduksi DNA dalam jumlah yang besar. Salah satu aplikasi medis yang paling penting dari metode PCR klasik adalah untuk mendeteksi patogen (Garibyan dan Avashia, 2013; Antunes, 2013).

Terdapat beberapa metode untuk melakukan PCR yaitu: PCR konvensional dan *Real Time-PCR* (RT-PCR). RT-PCR memungkinkan untuk mendeteksi amplifikasi sejak awal tahap reaksi sedangkan PCR konvensional menggunakan agarose gel untuk mendeteksi amplifikasi pada fase akhir dari reaksi PCR. Kedua metode ini memiliki fitur kompleksitas yang berbeda, namun keadaan suhu dan waktu reaksi ketiga PCR tersebut didirikan berdasarkan prinsip yang sama (Antunes, 2013).

Setiap PCR membutuhkan beberapa komponen, yaitu DNA template, primer, nukleotida, dan DNA polimerase. DNA template adalah sampel DNA yang di dalamnya terdapat sekuens DNA target, saat awal reaksi digunakan suhu

tinggi pada molekul DNA untai ganda yang asli untuk memisahkan untaian-untaianya. DNA polimerase adalah satu enzim yang dapat mensintesis untaian DNA baru, enzim yang dapat digunakan adalah TaqDNA dan PfuDNA polimerase. Nukleotida yang dimaksud yaitu adenin, timin, sitosin, dan guanin (A, T, C, G). Komponen yang terakhir, yaitu primer adalah unyuk menentukan produk DNA yang tepat untuk diamplifikasi. Primer adalah fragmen DNA pendek dengan urutan melengkapi DNA target yang akan dideteksi (Garibyan dan Avashia, 2013).

Terdapat tiga proses penting dalam amplifikasi DNA, yaitu denaturasi, *annealing*, dan *extension*. Pada tahap denaturasi, *double stranded* DNA original yang berisi sekuens DNA target akan dipanaskan dengan suhu 95°C-98 °C selama satu menit dengan tujuan untuk memisahkan untaian pada DNA sehingga menjadi rantai tunggal. Pada tahap kedua, yaitu *annealing*, kondisi temperatur PCR akan diturunkan menjadi 37°C-50 °C selama 60-120 detik sehingga primer yang akan ditambahkan ke dalam reaksi tersebut dapat menempel pada DNA target. Pada tahap *extension*, ditambahkan enzim DNA polimerase yang bersifat tahan terhadap panas dengan kondisi PCR pada suhu 72 °C selama 60-120 detik, enzim DNA polimerase ini akan memperpanjang ujung 3' dari DNA primer (Antunes, 2013).

2.6 Sekuensing DNA

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan nukleotida dari suatu fragmen DNA tertentu. Metode sekuensing yang telah dikembangkan terdiri atas tiga

metode, yaitu metode Maxam-Gilbert, metode Sanger, dan *automated DNA sequencing* (Campbell *et al.*, 2010).

Metode Maxam-Gilbert memiliki prinsip dasar pemotongan ujung molekul DNA berlabel dengan menggunakan agen kimiawi yang spesifik, untuk purin adalah dimetilsulfat (DMS), sedangkan untuk pirimidin adalah hidrazin (Ravi *et al.*, 2013). Metode ini didasarkan pada tiga tahapan, yaitu perubahan basa nukleotida, penggantian dari basa yang telah mengalami perubahan pada molekul gulanya, dan rantai DNA yang dipecah pada molekul gulanya. Hal ini akan menghasilkan sekumpulan fragmen bertanda radioaktif yang panjangnya tergantung pada jarak antara letak basa yang dihilangkan dengan ujung molekul bertanda radioaktif. Pembacaan fragmen tersebut melalui elektroforesis, kemudian dideteksi melalui autoradiografi (Ravi *et al.*, 2013).

Pada metode Sanger, ekstensi rantai DNA dimulai pada situs spesifik pada DNA cetakan dengan menggunakan oligonukleotida pendek yang disebut primer. Primer tersebut diperpanjang menggunakan DNA polimerase, yaitu enzim yang mereplikasi DNA. Bersama dengan primer dan DNA polimerase, diikutsertakan pula empat jenis basa deoksinukleotida (dNTP) dan nukleotida pemutus atau dalam konsentrasi rendah (ddNTP). Terminasi sintesis DNA akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA, kemudian fragmen-fragmen DNA tersebut akan dibaca melalui elektroforesis dengan mengidentifikasi jenis dideoksinukleosida yang digunakan untuk terminasi (Ravi *et al.*, 2013).

Metode *automated DNA sequencing* merupakan metode sekuensing perkembangan dari metode Sanger. Persamaan metode *automated DNA sequencing* dengan metode Sanger yaitu menggunakan prinsip terminasi replikasi, tetapi komponen reaksi yang digunakan ditempatkan dalam satu tabung yang sama. Setiap jenis dideoksiribonukleotida yang terbaca akan teridentifikasi berdasarkan pewarna fluoresens yang muncul setelah dipaparkan pada sinar laser. Masing-masing pewarna fluoresens mewakili basa-basa tertentu dan data terdeteksi menggunakan detector yang terhubung dengan computer sehingga data dapat langsung dianalisis (Ravi *et al.*, 2013).

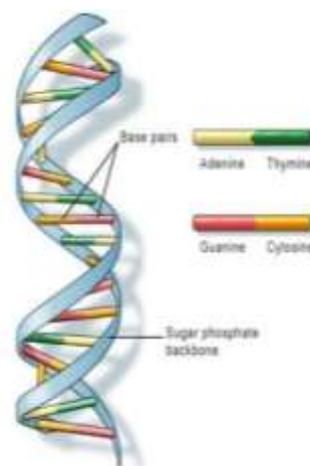
Sekuensing dengan metode *automated* dilakukan dalam proses yang disebut *cycle sequencing* terhadap hasil PCR. Proses *cycle sequencing* menggunakan prinsip yang serupa dengan proses PCR, yaitu ekstensi fragmen DNA dengan menggunakan prinsip yang serupa dengan *thermal cycler*. Proses *cycle sequencing* juga terbagi atas tahap denaturasi, perlekatan primer, dan ekstensi berulang. Namun berbeda dengan PCR, *cycle sequencing* hanya menggunakan satu jenis primer dan mengikutserakan dideoksinukleotida (ddNTP), selain deoksinukleotida (dNTP) sebagai basa komplementer (Ravi *et al.*, 2013).

Automated DNA sequencing memiliki beberapa kelebihan, yaitu berpotensi untuk mengurutkan sekuens nukleotida dan untai DNA berukuran besar sehingga memungkinkan proses sekuensing terjadi secara otomatis dengan bantuan komputer serta berpeluang memperoleh hasil urutan DNA dalam waktu relatif lebih singkat (Ravi *et al.*, 2013).

2.7 Genetika Secara Umum

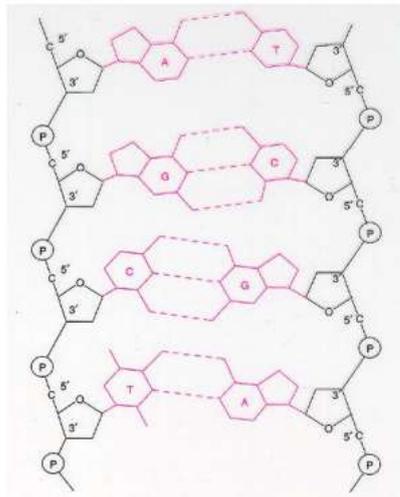
Genetika adalah suatu bidang sains yang mempelajari pewarisan sifat dan variasinya. Pewarisan sifat ini diberikan melalui informasi terkode dalam bentuk unit herediter yang disebut gen. Gen adalah wilayah DNA yang dapat diekspresikan untuk menghasilkan produk fungsional akhir yang bisa berupa polipeptida atau molekul RNA (Campbell *et al.*, 2010).

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada keturunannya. Struktur DNA seperti pada Gambar 7 terdiri dari dua untai rantai berpilin yang disusun oleh nukleotida. Tiap nukleotida terdiri dari molekul gula deoksiribosa, molekul fosfat, dan basa nitrogen. Basa nitrogen terdiri dari dua jenis yaitu: 1) Purin: Adenin (A) dan Guanin (G) 2) Pirimidin: sitosin (C) dan Timin (T) (Murray, 2014).



Gambar 7. Struktur DNA (Campbell *et al.*, 2010).

Struktur DNA “double helix” hanya dapat stabil, apabila basa adenin dari satu pita berpasangan dengan basa timin dari pita pasangannya, dan basa sitosin berpasangan dengan basa guanin. Pasangan adenin dan timin dihubungkan oleh 2 atom H, sedangkan basa sitosin dan guanin dihubungkan dengan 3 atom H. Sebuah nukleotida seperti pada Gambar 8 selalu memiliki ujung 3’ – OH dan 5’P, sehingga dalam “double helix” menurut model Watson-Crick terdapat satu buah pita dengan arah 3’→ 5’, sedangkan pita pasangannya 5’→ 3’ (Campbell *et al.*, 2010).



Gambar 8. Rumus Bangun Kimia Nukleotida (Campbell, 2010).

Berbeda dengan DNA, RNA merupakan rantai tunggal polinukleotida. Tiap nukleotida terdiri dari 3 gugus molekul, yaitu gula ribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen yang terdiri dari basa purin yang sama dengan DNA sedangkan pirimidin berbeda, yaitu sitosin dan urasil (Murray, 2014).

Gen tidak membentuk protein secara langsung, terdapat dua tahap yang dibutuhkan untuk pembentukan protein, yaitu transkripsi dan translasi.

Transkripsi adalah pembentukan mRNA dengan menyalin rantai DNA yang disebut DNA sense atau kodogen. Rantai DNA lawan yang tidak disalin disebut DNA antisense. Pembentukan mRNA ini dibantu oleh RNA polymerase sehingga terbentuk kodon (Campbell *et al.*, 2010).

Kodon (kode genetik) adalah deret nukleotida pada mRNA yang terdiri atas kombinasi tiga nukleotida berurutan yang menyandi suatu asam amino tertentu sehingga sering disebut sebagai kodon triplet seperti pada tabel 2.

		1st base					
		U	C	A	G		
2nd base	U	UUU Phenylalanine	UCU Serine	UAU Tyrosine	UGU Cysteine	U	3rd base
	UUC Phenylalanine	UCC Serine	UAC Tyrosine	UGC Cysteine	C		
	UUA Leucine	UCA Serine	UAA Stop	UGA Stop	A		
	UUG Leucine	UCG Serine	UAG Stop	UGG Tryptophan	G		
C	CUU Leucine	CCU Proline	CAU Histidine	CGU Arginine	U		
CUC Leucine	CCC Proline	CAC Histidine	CGC Arginine	C			
CUA Leucine	CCA Proline	CAA Glutamine	CGA Arginine	A			
CUG Leucine	CCG Proline	CAG Glutamine	CGG Arginine	G			
A	AUU Isoleucine	ACU Threonine	AAU Asparagine	AGU Serine	U		
AUC Isoleucine	ACC Threonine	AAC Asparagine	AGC Serine	C			
AUA Isoleucine	ACA Threonine	AAA Lysine	AGA Arginine	A			
AUG Methionine (Start)	ACG Threonine	AAG Lysine	AGG Arginine	G			
G	GUU Valine	GCU Alanine	GAU Aspartic Acid	GGU Glycine	U		
GUC Valine	GCC Alanine	GAC Aspartic Acid	GGC Glycine	C			
GUA Valine	GCA Alanine	GAA Glutamic Acid	GGA Glycine	A			
GUG Valine	GCG Alanine	GAG Glutamic Acid	GGG Glycine	G			

Nonpolar, aliphatic
 Polar, uncharged
 Aromatic
 Positively charged
 Negatively charged

Tabel 2. Kodon dan protein yang disandikan (Campbell *et al.*, 2010).

Kemudian mRNA akan keluar dari inti sel dan berikatan dengan rRNA pada ribosom. Lalu tRNA mencari start kodon (AUG) pada mRNA untuk memulai translasi dan akan berhenti menerjemahkan setelah mencapai stop kodon (UAA/UAG/UGA) (Campbell *et al.*, 2010).

2.8 Mutasi Secara Umum

Mutasi dapat disebabkan oleh adanya perubahan pada urutan basa DNA akibat kesalahan dalam proses replikasi DNA. Frekuensinya adalah sekitar satu per 10^6 pembelahan sel. Mutasi dapat menyebabkan adanya variasi genetik. Salah satu bentuk variasi materi genetik yang ditunjukkan oleh perbedaan nukleotida tunggal di dalam susunan rangkaian basa DNA disebut polimorfisme nukleotida tunggal atau *Single Nucleotide Polymorphism* (Murray, 2014).

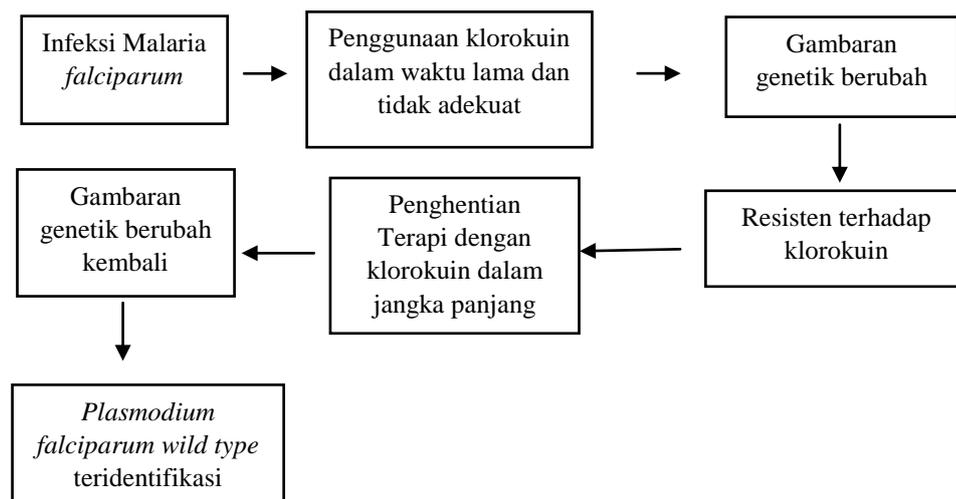
Mutasi berdasarkan bagian yang bermutasi dibagi menjadi dua, yaitu mutasi titik dan mutasi kromosom. Mutasi titik dalam suatu gen dibagi menjadi dua kategori umum, yaitu insersi atau delesi pasangan basa dan substitusi basa nukleotida. Insersi dan delesi adalah kehilangan pasangan nukleotida pada gen, sedangkan mutasi substitusi pasangan basa adalah penggantian satu nukleotida dan pasangannya dengan sepasang nukleotida lain. Mutasi substitusi basa nukleotida terdiri dari transisi dan transversi. Transisi adalah suatu pergantian basa purin dengan basa purin lain atau pergantian basa pirimidin dengan basa pirimidin lain, sedangkan transversi adalah suatu pergantian basa purin diganti dengan basa pirimidin atau sebaliknya. Mutasi ini dapat menyebabkan *silent mutation*, *missense mutation*, dan *nonsense mutation* (Campbell *et al.*, 2010).

Silent mutation atau mutasi bisu adalah mutasi yang tidak memiliki efek terhadap protein yang dikodekan akibat redundansi kode genetik. *Missense mutation* adalah mutasi yang menyebabkan satu asam amino diubah menjadi asam amino yang lain. Sedangkan *nonsense mutation* adalah mutasi yang

menyebabkan proses translasi diakhiri secara prematur karena kodon stop. Polipeptida yang dihasilkan akan lebih pendek daripada polipeptida yang dikodekan oleh gen normal, dan hampir semua *non sense mutation* menyebabkan protein-protein nonfungsional (Campbell *et al.*, 2010).

2.9 Kerangka Teori

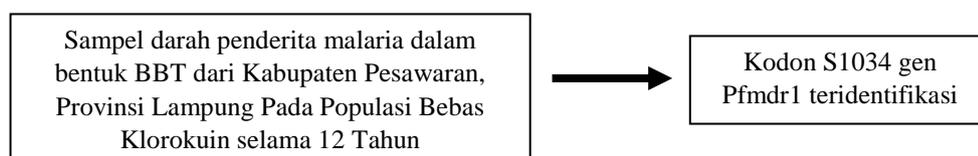
Kerangka teori pada penelitian ini dijelaskan seperti pada Gambar 9. Pada awalnya, penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* dapat diterapi dengan obat klorokuin. Adanya penggunaan klorokuin dalam waktu yang lama dan tidak adekuat menyebabkan resistensi terhadap klorokuin, sehingga diperlukan terapi dengan ACT. Terapi dengan ACT sejak 12 tahun menyebabkan adanya kemungkinan munculnya kembali *Plasmodium falciparum wild-type* yang dapat diketahui dengan adanya gambaran genetik yang berubah.



Gambar 9. Kerangka Teori

2.10 Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dijelaskan pada Gambar 10. Penelitian ini menggunakan kodon 1034 gen *Pfmdr1* yang terdapat dalam sampel darah penderita malaria *falciparum* di Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung, kodon ini akan dicari melalui metode sekuensing. Selanjutnya, hasil sekuensing akan dianalisa untuk mengetahui adanya triplet kodon yang mengkodekan serin. Jika terdapat triplet kodon yang mengkodekan serin, maka pada sampel darah tersebut telah teridentifikasi *Plasmodium falciparum* *wild-type*.



Gambar 10. Kerangka Konsep.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Survey* yang bersifat deskriptif untuk mendeteksi adanya *wild type* pada gen *Pfmdr1* kodon 1034 pada penderita malaria *falciparum* di Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan dilaksanakan pada bulan September – Desember 2018.

3.3 Populasi dan Sample Penelitian

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah warga di Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung yang positif menderita malaria *falciparum* berdasarkan pada hasil pemeriksaan mikroskopis. Untuk memudahkan dalam penentuan sampel, peneliti menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.3.1 Kriteria Inklusi:

1. Penderita malaria falciparum yang telah diperiksa secara mikroskopis
2. Jumlah volume sampel yang mencukupi sesuai dengan protokol pada kit isolasi DNA.

3.3.2 Kriteria Eksklusi:

Sampel darah yang terkontaminasi oleh bahan kimia lain, dapat diketahui melalui kemasan sampel yang rusak dan warna sampel.

3.3.3 Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah BBT yang terdapat di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang diambil pada penderita malaria falciparum di Kabupaten Pesawaran pada tahun 2016, yaitu sebanyak 22 sampel.

3.4 Definisi Operasional

Pada penelitian ini didapatkan satu variabel, yaitu gen *Plasmodium falciparum multidrug resistant* (Pfmdr-1) kodon 1034. Variabel ini yang akan dijadikan indikator dalam penentuan teridentifikasinya *Plasmodium falciparum wild type* seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Gen <i>Plasmodium falciparum Multi-Drug Resistace 1</i> (Pfmdr1) kodon 1034	Gen Pfmdr1 kodon 1034 adalah fragmen gen Pfmdr1 yang merupakan produk PCR dengan Panjang produk sebesar 864 bp	<i>Polymerase Chain Reaction</i> dan elektroforesis	Amplifikasi dan sekuensing DNA	Urutan basa DNA pada hasil sekuensing	Kategorik

Sumber: (Humphreys *et al.*, 2007).

3.5 Alat dan Bahan

Penelitian ini terdiri dari empat tahapan yaitu isolasi DNA, amplifikasi gen Pfmdr1 yang dilakukan sebanyak dua kali, dan elektroforesis. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibedakan sesuai dengan tahapan yang akan dilakukan.

Tahap isolasi DNA dilakukan untuk memisahkan materi genetik suatu makhluk hidup dari materi yang ada disekitarnya. Isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan dua cara yaitu mendapatkan bahan-bahan yang dibutuhkan dalam proses isolasi DNA secara terpisah atau dengan menggunakan bahan yang sudah ada dalam satu kemasan, yang dapat disebut *kit*. Seluruh prosedur serta bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA sudah tersedia di dalam *kit*.

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan QIAamp® DNA *Kit* (Qiagen). Bahan-bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA adalah QIAmp® DNA *Kit* yang terdiri dari; Proteinase K; *Buffer AL*; *Buffer AW1*; *Buffer AW2*; dan

Buffer AE, Etanol (100%), sampel darah, dan air murni (aquabidest). Adapun alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah *pulse-vortexing*, *spindown*, *QIAamp spin column*, *collection tube 2 ml*, *centrifuge*, *microcentrifuge tube*, makropipet berukuran 100-1000µl maupun mikropipet berukuran 10-100 µl, *blue tips*, *yellow tips*, *stopwatch*, dan *waterbath 56°C*.

Tahap amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak fragmen DNA target yang telah diisolasi. Proses amplifikasi pada penelitian ini menggunakan teknik *nested Polymerase Chain Reaction (PCR)* secara konvensional. Alat PCR yang digunakan adalah Rotor-Gene® Q (Qiagen). Penelitian ini menggunakan satu merk kit untuk dilakukan proses amplifikasi yaitu menggunakan MyFi™ DNA Polymerase (Bioline). Bahan yang dibutuhkan adalah *aqua for Injection*, DNA *template*, dan *primer DNA target (forward dan reverse primer)*, sedangkan alat yang dibutuhkan adalah rotor-Gene® Q (Qiagen), mikropipet 0,5-10 µl dan mikropipet 10-100 µl, *small tips* dan *yellow tips* ukuran 0,2 µl, *microcentrifuge tube*, nampan, rak dingin, *ice box* ataupun lemari pendingin, *vortex*, dan *spindown*. Daftar primer yang digunakan pada penelitian ini dijelaskan pada tabel 4.

Tabel 4. Daftar Primer

Nama Primer	Sequence Primer	Panjang Produk PCR (bp)
Outer Forward MDRFR2F1	5'-GTGTATTTGCTGTAAGAGCT	958
Outer Reverse MDRFR2R1	5'- GACATATTAATAACATGGGTTTC	
Nested Forward MDRFR2F2	5'- CAGATGATGAAATGTTTAAAGATC	864
Nested Reverse MDRFR2R2	5'-TAAATAACATGGGTTCTTGACT	

Sumber: (Humphreys *et al.*, 2007).

Pada tahap terakhir yaitu elektroforesis, bertujuan untuk menginterpretasikan hasil dari proses PCR. Bahan yang dibutuhkan adalah agarose gel 1% (agarose 1 gr dengan TBE 1× 100 ml), loading dye 6×, TBE 1×, *red gel*, *aquabidest*. Adapun alat yang digunakan dalam elektroforesis pada penelitian ini yaitu berupa satu set alat elektroforesis, solatip atau parafilm, tabung erlenmayer, *hot plate*, *stabillizer*, mikropipet berukuran 0,5-10 µl, *small tips*, dan uv *transluminator*.

3.6 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu isolasi DNA, amplifikasi *Pfmdr1* menggunakan PCR konvensional dan elektroforesis.

a. Isolasi DNA

1. Memasukan 20µl QIAGEN Protease (atau K Proteinase) ke dalam 1.5 ml *microcentrifuge tube*;
2. Menambahkan 200µl sampel ke *microcentrifuge tube*;
3. Menambahkan 200µl *buffer* AL ke dalam sampel, kemudian di *vortex* selama 15 detik;
4. Menginkubasi selama 10 menit dalam suhu 56°C pada *waterbath*;
5. Melakukan *spindown* 1.5 ml *microcentrifuge tube* untuk menghilangkan cairan yang terdapat pada tutup *tube*;
6. Menambahkan 200µl etanol (100%) ke dalam sampel, kemudian di *vortex* menggunakan *pulse-vortexing* selama 15 detik. Setelah itu, kembali melakukan *spindown* untuk menghilangkan cairan yang terdapat pada tutup *tube*;
7. Campuran larutan tersebut dipindahkan ke *QIAamp Spin Column* (2 ml *collection tube*) tanpa membasahi pinggiran *tube*, menutup *tube*, lalu di *centrifuge* dalam 6000 x g (8000 rpm) selama satu menit. Kemudian membuang hasil *filter* yang terdapat pada *collection tube*;
8. Menambahkan 500µl *buffer* AW1 pada *QIAamp Spin Column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam 6000

x g (8000rpm) selama satu menit. Membuang hasil *filter* yang terdapat pada *collection tube*;

9. Menambahkan 500µl *buffer* AW2 pada *QIAamp Spin Column* tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam kecepatan penuh 20000 x g (14000rpm) selama tiga menit;
10. Meletakkan *QIAamp Spin Column* kedalam 1.5ml *microcentrifuge tube* dan menyingkirkan *collection tube* yang terdapat *filter*. menambahkan 200µl *buffer* AE pada *QIAamp Spin Column*. Menginkubasi dalam suhu ruangan (15-25°C) selama satu menit, lalu melakukan *centrifuge* dalam 6000 x g (8000rpm) selama satu menit;
11. Membuang *QIAamp Spin Column* dan menutup 1,5 ml *microcentrifuge tube*, hasil ekstraksi dapat disimpan pada lemari pendingin.

b. Persiapan amflipikasi pertama *Pfmdr1* menggunakan PCR

1. Membuat campuran reaksi dengan perhitungan: 25 µL per reaksi × (total nomor reaksi + 1);
2. Menghitung jumlah setiap bahan yang dibutuhkan pada setiap reaksi, volume setiap bahan dikalikan dengan reaksi (total nomor reaksi + 1). Volume yang dibutuhkan pada setiap *kit*, berikut rincian volume pada masing-masing *kit*:
3. MyFi™ DNA Polymerase (*Bioline*) :

5X MyFi Reaction Buffer : 5 µL

20 µM Forward Primer : 0,5 µL

20 µM Reverse Primer : 0,5 µL

DNA <i>Template</i>	: 1 μ L
MyFi DNA <i>Polymerase</i>	: 1 μ L
<i>Aqua for Injection</i>	: 17 μ L;

4. Mencampurkan setiap bahan dengan volume sesuai dengan perhitungan total reaksi ke dalam *microcentrifuge tube*, kecuali DNA template. Selama pengerjaan, seluruh bahan diletakkan pada nampan dan rak dingin, untuk menjaga suhu;
5. Melakukan aliquot campuran reaksi tersebut sebanyak 24 μ L pada setiap 0,2 ml *microcentrifuge tube*;
6. Menambahkan DNA template sebanyak 1 μ L pada setiap *tube*;
7. Menempatkan *tube* ke dalam *rotor*, kemudian memasukkan *rotor* ke dalam Rotor-Gene® Q (Qiagen);
8. Menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

c. Persiapan amflifikasi kedua (*Nested*) Pfm_{dr1} menggunakan PCR

1. Melakukan kembali langkah satu sampai empat seperti pada amplifikasi pertama;
2. Menambahkan 1 μ L hasil amplifikasi pertama pada setiap *tube*;
3. Menempatkan *tube* ke dalam *rotor*, kemudian memasukkan *rotor* ke dalam Rotor-Gene® Q (Qiagen);
4. Menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

d. *Cycling parameter* pada PCR

Pada tahap ini, terdiri dari tiga proses utama yaitu denaturasi, *annealing* dan *extension* dari materi genetik sampel. Kondisi PCR pada setiap tahapan, baik pada amplifikasi pertama dan kedua mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Humsphrey pada tahun 2007 dengan optimasi dan modifikasi. Hasil kondisi PCR setelah dilakukan optimasi tercantum dalam tabel 5.

Tabel 5. Kondisi PCR pada saat Amplifikasi

No	Proses	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Amplifikasi Pertama				
1	Predenaturasi	95	5 menit	1 kali
2	Denaturasi	94	1 menit	35 kali
3	Annealing	55	1 menit	35 kali
4	Extension	72	1 menit 15 detik	35 kali
5	Final ekstension	72	5 menit	1 kali
Amplifikasi kedua				
1	Predenaturasi	95	5 menit	1 kali
2	Denaturasi	94	1 menit	35 kali
3	Annealing	55	1 menit	35 kali
4	Extension	72	1 menit 15 detik	35 kali
5	Final ekstension	72	5 menit	1 kali

Tahap denaturasi, *annealing* dan *extension* diulangi sebanyak 35 siklus pada amplifikasi pertama dan amplifikasi kedua dengan menggunakan MyFi™ DNA *Polymerase Bioline*. Setelah selesai seluruh tahapan, hasil dapat didiamkan pada suhu ruangan atau disimpan pada lemari pendingin.

e. Pembuatan Gel Agarose untuk elektroforesis

1. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 0,8%.

2. Pembuatan gel dimulai dengan mencampurkan 800 mg gel agarose dengan 100 ml TBE 1x.
3. Mendidihkan campuran tersebut dalam *microwave* selama 25 menit pada $\pm 80^{\circ}\text{C}$. Campuran dibiarkan hingga suhunya turun sampai dengan 55°C .
4. Selagi menunggu turunnya suhu agarose, dipersiapkan bilik elektroforesis dengan memasang pembatas pada setiap sisi baki sebagai pencetak agarose.
5. Setelah mencapai suhu yang sesuai, agarose dituangkan ke dalam baki tersebut dan di letakkan *comb* pada salah satu ujung sisi baki (pada kutub negatif). Agarose dibiarkan hingga mengeras menjadi gel yang padat. Setelah mengeras sempurna, *comb* lalu dicabut.
6. Kemudian pembatas baki pada setiap sisi dilepaskan dan baki diletakkan ke dalam bilik elektroforesis yang telah terisi larutan *buffer*.

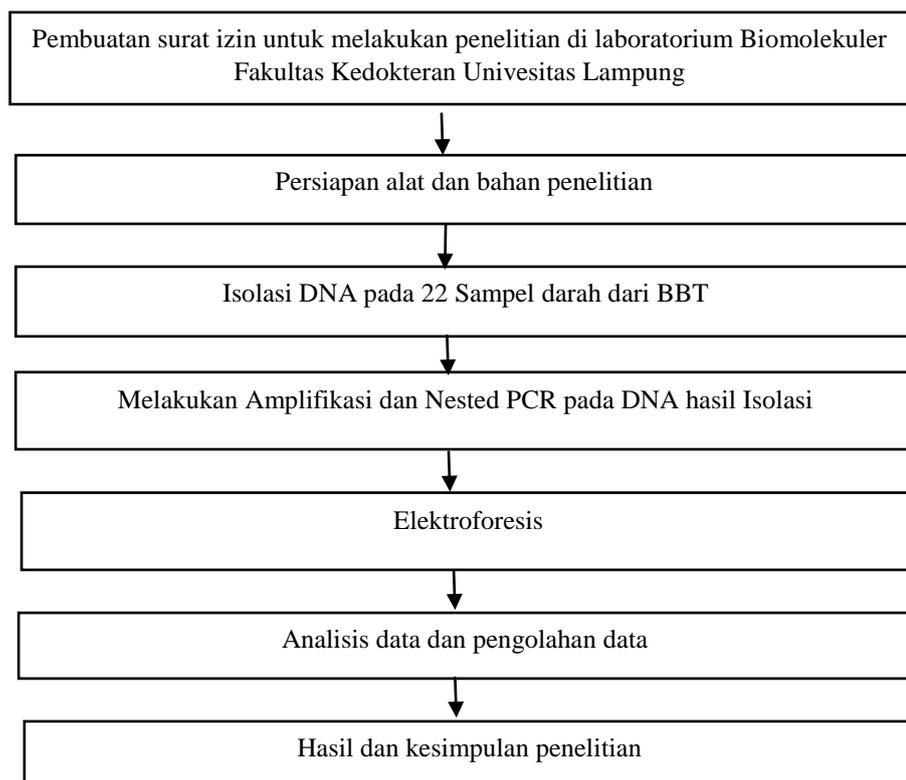
f. Elektroforesis

1. Menyiapkan kertas parafilm atau solatip pada meja;
2. Meletakkan 2 μL *loading dye* pada parafilm atau solatip;
3. Mengambil 3 μL hasil amplifikasi kedua, kemudian mencampurkannya dengan *loading dye*;
4. Mengambil 5 μL hasil campuran tersebut, kemudian memasukkannya ke dalam sumur pada *gel agarose*;

5. Menyambungkan alat elektroforesis dengan sumber listrik dengan pengaturan pada alat elektroforesis, yaitu 100 V, 50 Watt dan 250 mA selama 55 menit;
6. Setelah selesai, didiamkan beberapa saat dan mengangkat agarose dari bilik elektroforesis dan meletakkannya pada alat UV untuk divisualisasikan.

3.7 Alur Penelitian

Penelitian Penelitian ini dilakukan sesuai alur yang dijelaskan pada gambar 11.



Gambar 11. Diagram Alur Penelitian.

3.8 Analisis Data

Data DNA hasil amplifikasi akan dilanjutkan pada tahapan *sequencing* untuk melihat urutan basa nukleotida. Pengambilan urutan basa nukleotida dilakukan dengan bantuan perangkat lunak Mega 10.

3.9 Etika Penelitian

Etik penelitian ini telah disetujui oleh bagian etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat No. 3821/UN26.18/PP.05.02.00/2018. Bukti persetujuan etik terlampir pada lampiran.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah tidak terdapat *single nucleotide polymorphism* pada kodon 1034 gen *Pfmdr1* pada penderita malaria *falciparum* di Kabupaten Pesawaran, Lampung.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan terkait penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Sampel yang digunakan sebaiknya dari daerah yang berbeda-beda untuk mengetahui demografis polimorfisme nukleotida tunggal di setiap wilayah.
2. Sampel penelitian sebaiknya dilakukan fotometri agar kandungan DNA pada masing-masing sampel dapat diseragamkan
3. Penelitian ini sebaiknya dilanjutkan dengan memeriksa polimorfisme gen *Pfmdr1* pada posisi kodon 86, agar dapat meningkatkan kemungkinan untuk penggunaan klorokuin kembali sebagai obat anti malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrea E, Adele L, Jerome C. 2013. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* 28(11):504–514.
- Antunes M. 2013. Integration of polymerase chain reaction in a magneto-resistive biochip bioengineering and nanosystems. *Tesnico Lisboa*:129.
- Asih PBS, Rogers WO, Susanti AI, Rahmat A, Rozi IE, Kusumaningtyas MA, *et al.* 2009. Seasonal distribution of anti-malarial drug resistance alleles on the island of Sumba, Indonesia. *Malaria Journal.* 8: 222.
- Bannister LH, Sherman IW. 2009. Plasmodium. *Encyclopedia of Life Sciences.* Chichester: John Wiley & Sons.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2018. [Online Journal] [diakses pada 24 Agustus 2018]. Tersedia dari: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>.
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV., *et al.* 2010. *Biologi.* Edisi 8. Translated by Wulandari DT. Jakarta: Erlangga.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. Pelayanan kefarmasian untuk penyakit malaria. Jakarta: Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dinas Kesehatan Kota Bandar Lampung. 2015. Profil kesehatan Provinsi Lampung tahun 2015. Bandar Lampung: Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Lampung.
- Ferreira PE, Holmgren G, Veiga MI, Uhlén P, Kaneko A, Gil JP. 2011. PfMDR1: Mechanisms of transport modulation by functional polymorphisms. *PLoS One*. 6(9): e23875.
- Gama BE, Oliveira NKA De, Souza JM De, Santos F, Carvalho LJM De, Melo YFC, et al. 2010. Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: investigation of candidate polymorphisms for artemisinin resistance before introduction of artemisinin-based combination therapy. *Malar J*. 9(1):1–5.
- Garibyan L, Avashia N. 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (pcr). *J Invest Dermatol*. 133(3):6.
- Griffin CE, Hoke JM, Samarakoon U. 2012. Mutation in the *Plasmodium falciparum* CRT protein determines the stereospecific activity of antimalarial Cinchona alkaloids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(10):5356–5364.
- Hakim L. 2011. Epidemiologi dan diagnosis malaria. *Aspirator*. 3(2):107–116.
- Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL. 2007. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(3): 991-997.
- Ibraheem Z, Madjid RA, Noor SM, Sedik R, Basir. 2014. Role of different *pfprt* and *pfmdr-1* mutations in conferring resistance to antimalaria drugs in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Research and Treatment*. 1(1):1–17.

- Igweh JC. 2012. Biology of malaria parasites. *Malaria Parasites*. 10(5):27.
- Ikatan Dokter Anak Indonesia. 2015. Buku Ajar Infeksi & Pediatri Tropis. Edisi kedua. Edited by Soedarmo H, Garna SR, Hadinegoro, Satari I. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI.
- Ipa M, Dhewantara W. 2015. Variasi pengobatan malaria rumah tangga di enam provinsi endemis malaria di Indonesia. *Aspirator*. 7(1):13–22.
- Jalousian F, Dalimi A, Samiee SM, Ghaffarifar F, Soleymanloo F, Naghizadeh R. 2008. Mutation in *pfmdr1* gene in chloroquineresistant *Plasmodium falciparum* isolates, Southeast Iran. *International Journal of Infectious Diseases*. 12(6): 630-634.
- Katzung B, Masters B, Trevor J. 2014. *Farmakologi Dasar & Klinik*. Edisi 12. Jakarta: EGC.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. Profil kesehatan Indonesia tahun 2016. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Epidemiologi malaria di Indonesia. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*. 1(1):1–16.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. *Infodatin malaria*. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kinansi R, Mayasari R, Pratamawati D. 2017. Pengobatan malaria kombinasi artemisinin di provinsi papua barat tahun 2013. *Balaba*. 13(1):43–54.
- Laksono R. 2011. Profilaksis Malaria di perbatasan Indonesia-Timur Leste. *Cermin Dunia Kedokteran*. 38(7):503–507.
- Liwan A. 2015. *Diagnosis dan penatalaksanaan malaria tanpa komplikasi pada anak*.

CDK-229. 42(6): 425–429.

Murray RK, Bender DA, Botham KM, Jennely PJ, Rodwell VW, Weil PA. 2014. Biokimia Harper. Edisi 29. Translated by Manderia LI. Jakarta: EGC.

Mwai L, Kiara SM, Abdirahman A. 2009. Invitro activities of piperaquine, lumefantrine, and dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* isolates and polymorphisms in pfcrt and pfmdr1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(12):5069–5073.

Mwai L, Diriye A, Masseno V. 2012. Genome wide adaptations of Plasmodium falciparum in response to Lumefantrine selective drug pressure. PLoS ONE. 7(2): e31623.

Mandasari V. 2012. Karakteristik habitat potensial larva nyamuk Anopheles dan hubungannya dengan kejadian malaria di kota Pangkalpinang, Bangka Belitung. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Muti'ah R. 2012. Penyakit malaria dan mekanisme kerja obat-obat antimalaria. Alchemy. 2(1):80–91.

Nurhayati H., Hasanudin I., Anwar. 2014. Karakteristik tempat perkembangbiakan *Anopheles* sp. di wilayah kerja puskesmas bonto bahari kabupaten Bulukumba. Makassar: Universitas Hasanuddin.

Petersen I, Eastman R, Lanzer M. 2011. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. FEBS Letters. 585(11):1551–1562.

Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, et al. 2003. Resistance to antimalarials in southeast asia and genetic polymorphisms in pfmdr1. Antimicrob Agents Chemother. 47(8):2418–23.

Putra, R. 2011. Malaria dan permasalahannya. Jurnal Kedokteran Syiah Kuala.

11(2):103–114.

Rajeev K, Fryauff D, Dorsey G, Mattera G, Baird J, Kazura JW., *et al.* 2008. Discordant patterns of genetic variation at two chloroquine resistance loci in worldwide populations of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 6(52):2212–2222.

Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J. 2013. *Advances in biotechnology*. Springer: London.

Sondo P, Derra K, Nakanabo SD, Tarnagda Z. 2016. Artesunate-amodiaquine and artemether- lumefantrine therapies and selection of pfcrt and pfmdr1 alleles in nanoro, burkina faso. *PLoS One*. 11(3):1–10.

Simamora D., Fitri L. 2008. Mechanism and the role of antimalarial drug resistance. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 23(2):82–92.

Soedarto. 2016. *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran*. Edisi 2. Jakarta: Sagung Seto.

Suryaningtyas H, Ni'mah T, Mahdalena V. 2015. Ekologi habitat perkembangbiakan Anopheles di desa Simpang Empat, Kecamatan Lengkiti, Ogan Komering Ulu. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 14(4):342–349.

Suwandi JF. 2014. Polimorfisme gen pfmdr1 dan pfcrt pada isolat plasmodium dari penderita malaria falciparum di Kabupaten Pesawaran [disertasi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Syafruddin D, Asih PBS, Casey GJ, Maguire J, Baird JK, Nagesha HS, Cowman AF, Reeder JC. 2005. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(2): 174-181.

Syam AF, Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S. 2014. *Buku ajar ilmu penyakit dalam*. Edisi 6. Jakarta: Interna Publishing.

Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiquemde RT, Alessandro U, Ouedraogo JB. 2008. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfprt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. 13(2):238-40.

WHO. 2017. World malaria report 2017. Geneva: WHO.

Yusuf Y, Hartono, Syafruddin. 2013. Analisis mutasi gen Pfmdr1 1246 pada penderita malaria di Mamuju, Sulawesi Barat. *Jurnal Sainsmat*. 11(2):185–190.