

DETEKSI *P. VIVAX* SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) Y976F DARI SAMPEL MONITORING PENGOBATAN DIHIDROARTEMISININ- PIPERAKUIN DI KALIMANTAN DAN SULAWESI

Ervi Salwati,* Reni Herman,* Sarwo Handayani,* Emiliana Tjitra**

*Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Jakarta, Jl. Percetakan Negara 29, Jakarta;
Email: salwati@litbang.depkes.go.id

**Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik

P. VIVAX SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) Y976F DETECTION FROM SUBJECTS IN MONITORING DRUG DIHYDROARTEMISININ-PIPERAQUINE (DHP) IN KALIMANTAN AND SULAWESI

Abstract

*This study was a part of the activity of monitoring Dihydroartemisinin-Piperazine (DHP) treatment in subjects infected with *P.falciparum* and *P.vivax* in Kalimantan and Sulawesi. SNP Y976F had been proved as the mutation in *pvmdr1* gene which was related to *P. vivax* resistance chloroquine in Papua. Data of spreading *pvmdr1* SNP Y976F outside Papua is needed for using Dihydroartemisinin-Piperazine policy in the treatment of vivax malaria in Indonesia. Detection of SNP Y976F was done against 95 day0-samples of subjects confirmed infected with *P.vivax* or mixed infection of *P.vivax* and *P.falciparum* by PCR. The results showed that 88 (93%) of a total 95 samples were positive detected 976F mutant which were distributed in all sentinel sites of West Kalimantan (2 of 3), Central Kalimantan (6 of 8), North Sulawesi (63 of 65), and Central Sulawesi (17 of 19). In conclusion, *pvmdr1* SNP Y976F has been spreaded in all sentinel sites.*

Key words: P.vivax, pvmdr1, Single Nucleotide Polymorphism

Abstrak

Penelitian ini merupakan bagian kegiatan dari monitoring pengobatan Dihydroartemisinin-Piperakuin (DHP) pada subyek yang terinfeksi dengan *P.vivax* atau infeksi campuran *P.falciparum* dan *P. vivax* di Kalimantan dan Sulawesi. SNP Y976F merupakan mutasi pada gen *pvmdr1* yang terbukti berhubungan dengan *P. vivax* resisten klorokuin di Papua. Dalam rangka kebijakan penggunaan Dihydroartemisinin-Piperakuin untuk pengobatan malaria vivaks di seluruh Indonesia, perlu data penyebaran parasit SNP Y976F pada gen *pvmdr1* di luar Papua. Deteksi SNP Y976F dilakukan terhadap 95 sampel H0 subyek terinfeksi *P. vivax* atau infeksi campuran *P.vivax* dan *P.falciparum* yang telah dikonfirmasi dengan PCR. Hasil menunjukkan bahwa 88 dari 95 sampel (93%) terdeteksi positif galur mutan 976F yang tersebar di Kalimantan Barat (2 dari 3), Kalimantan Tengah (6 dari 8), Sulawesi Utara (63 dari 65) dan Sulawesi Tengah (17 dari 19). Kesimpulannya bahwa *P.vivax* galur Y976F sudah tersebar di setiap sentinel penelitian.

Kata kunci: *P.vivax, pvmdr1, Single Nucleotide Polymorphism.*

Submit: 2 Juli 2011, Review 1: 6 Juli 2011, Review 2: 6 Juli 2011, Eligible article: 30 Desember 2011

Pendahuluan

Malaria masih merupakan permasalahan kesehatan masyarakat terutama pada daerah tropik dan subtropik. Menurut Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization/WHO*), diperkirakan terdapat 247 juta kasus malaria diantara 3.3 milyar penduduk berisiko pada tahun 2006 dan 1,5 – 2,7 juta orang meninggal setiap tahunnya.¹ Jumlah ini meningkat setiap tahun karena muncul dan menyebarnya strain parasit resisten terhadap obat anti malaria hampir di setiap daerah malaria, termasuk Indonesia.²

Di Indonesia, *P. falciparum* telah dilaporkan resisten terhadap obat standar (klorokuin, kina, sulfadoxin-pyrimetamin) begitu juga *P. vivax* resisten terhadap klorokuin.³ Untuk mengatasi masalah ini, WHO telah merekomendasikan penggunaan *artemisinin based combination therapy* (ACT).⁴

Walaupun ACT yang merupakan kombinasi artesunat-amodiakuin (AAQ) sudah diperkenalkan dan digunakan oleh program malaria sejak tahun 2004 tetapi tidak berdasarkan hasil penelitian Indonesia. Hasil dari beberapa uji klinik AAQ menunjukkan efikasi yang beragam, sehingga dibutuhkan dan disiapkan ACT alternatif efektif yaitu Dihidroartemisinin-Piperakuin (DHP) dalam rangka eliminasi. DHP telah digunakan di Papua sejak 2006 dan hasil uji klinik menunjukkan DHP lebih baik dibandingkan dengan AAQ.⁵ Oleh karena itu diperlukan data yang lebih lengkap untuk mengevaluasi efikasi dan keamanan obat anti malaria, dan memantau penyebaran parasit yang resisten terhadap obat anti-malaria sebelum obat tersebut direkomendasikan untuk digunakan di luar Papua seperti Kalimantan dan Sulawesi.

Studi untuk memantau penyebaran parasit yang resisten pada *P. vivax* belum semaju *P. falciparum* bahkan sampai sekarang mekanisme klorokuin pada *P. vivax* belum diketahui dengan jelas. Di samping adanya fase relaps (stadium hipnozoit dorman di hati), mungkin ini disebabkan juga karena untuk mengkultur *P. vivax* (*continuous in vitro*) belum bisa berhasil seperti pada *P. falciparum*.

Adanya hubungan mutasi titik tertentu pada gen *pfmdr1* dan *pfcr1* dengan resisten klorokuin pada *P. falciparum*^{6,7,8}, kemudian pada *P. vivax*, dipelajari dengan meneliti mutasi (*Single Nucleotide Polymorphism/SNP*) yang terdapat pada gen *ortholog pfmdr1* dan *pfcr1* kemudian dicoba

mengaitkannya dengan resistensi klorokuin (*chloroquine resistance/CQR*).^{9,10,11} Ternyata CQR pada *P. vivax* tidak diperantarai oleh mutasi kodon pada *pfcr1 orthologue* (*pvcr10*) sehingga dapat dikatakan bahwa mekanisme CQR *P. vivax* berbeda dari *P. falciparum*.⁹ Hal ini juga didukung oleh Sa et.al¹¹ yang melaporkan bahwa SNPs yang terdapat pada gen *pvmdr1* tidak berhubungan dengan CQR dari isolat *P. vivax* Brazil, Papua, dan strain *Plasmodium* yang ada di monyet.¹⁰ Selanjutnya Brega et.al¹¹ melaporkan, dari beberapa daerah yang berbeda endemisitas (Thailand 9, Indonesia 3, Turkey 3, Azerbaijan 4 dan French Guyana 4), ditemukan 2 kodon gen *pvmdr1* yaitu SNP Y976F dan F1076L pada 14 dari 23 isolat *P. vivax*. Tetapi ternyata, tidak ditemukan ada pada sampel dari French Guyana dimana CQR pada *P. vivax* telah dilaporkan.¹¹

Pada tahun 2007 ada laporan bahwa isolat lapangan dari Thailand dan Timika (propinsi Papua), Indonesia memperlihatkan ada hubungan antara SNP Y976F gen *pvmdr1* dan berkurangnya sensitivitas terhadap klorokuin secara *in vitro*. Mutasi Y976F pada *pvmdr1* terdapat pada 96% (123/128) isolat Papua dan 25% (17/69) dari isolat Thai.¹² Selanjutnya Marfurt et.al,¹³ melaporkan bahwa Y976F gen *pvmdr1* bisa sebagai prediktor yang kuat untuk menilai gagal pengobatan *in vivo*. Belakangan ini, SNPs yang ditemukan pada gen *pvmdr1* telah banyak dilaporkan, namun SNP Y976F (kemudian disusul F1076L) tetap menjadi perhatian walaupun hubungannya dengan resistensi klorokuin bervariasi.^{14,15,16}

Pada penelitian ini, deteksi SNP Y976F gen *pvmdr1* dilakukan pada subyek yang terinfeksi *P. vivax* atau infeksi campuran (*P. vivax* dan *P. falciparum*) dalam rangka monitoring resistensi obat anti malaria (DHP) di daerah Kalimantan dan Sulawesi. Hal ini penting untuk mengetahui penyebaran Y976F *pvmdr1* dan data ini dapat digunakan sebagai data dasar untuk program dalam menggunakan DHP sebagai alternatif AAQ.

Bahan dan Cara Kerja

Lokasi dan pengumpulan sampel penelitian

Penelitian dilakukan antara bulan Maret 2010 sampai Januari 2011, merupakan bagian dari penelitian monitoring obat Dihidroartemisinin-Piperakuin yang dilakukan di Kalimantan dan Sulawesi. Pengumpulan sampel dilakukan pada empat propinsi yang masing-masingnya diwakili

oleh satu Kabupaten yaitu Kabupaten Pontianak (propinsi Kalimantan Barat), Katingan (propinsi Kalimantan Tengah) Minahasa Tenggara (propinsi Sulawesi Utara) dan Sigi (propinsi Sulawesi Tengah), di mana masing-masing Kabupaten terdiri dari 2 puskesmas. Lokasi studi dipilih berdasarkan tingkat endemisitas malaria dengan *Annual Malaria Incidence* (AMI) > 10/1000 penduduk ("daerah merah"). Dari "daerah merah" masing-masing provinsi dipilih 2 Puskesmas dengan kriteria: mempunyai petugas kesehatan baku (dokter, perawat atau bidan dan analis laboratorium), pemeriksaan mikroskopis dan hemoglobin, dan dapat dijangkau.

Spesimen penelitian

Penelitian ini dilakukan paralel dengan penelitian *in-vivo* mengikuti protokol WHO 2003 dengan kriteria inklusi sebagai berikut: 1) umur \geq 6 bulan. 2) laki-laki dan perempuan, 3) infeksi tunggal *P. falciparum* atau *P. vivax*, 4) parasitemia aseksual *P. falciparum* 1,000-100,000/ul atau parasitemia *P. vivax* \geq 250 /ul, 5) suhu aksila \geq 37.5 °C atau mempunyai riwayat demam 48 jam terakhir, 6) mampu menelan obat, 7) mampu dan mau mengikuti jadwal kunjungan selama penelitian berlangsung 8) menandatangani naskah persetujuan. Sedangkan kriteria eksklusi adalah: 1) penderita malaria berat atau komplikasi, 2) infeksi campuran (*P. falciparum* dan *P. vivax*), 3) malnutrisi berat atau penyakit berat, 4) hamil atau menyusui tidak mau menandatangani naskah persetujuan.

Spesimen penelitian berupa serapan darah (spot darah) pada kertas filter (Whatman 3) atau FTA dan juga *blood smear* bila spot darah tidak ada yang diambil pada hari ke-0 (H0) dan hari kambuh (HK). Spesimen darah dikeringanginkan dan dimasukkan ke dalam plastik yang berisi gel silika, dan selanjutnya disimpan pada suhu kamar sampai dilakukan ekstraksi DNA. DNA diekstraksi menggunakan Qiagen kit sesuai dengan petunjuk yang ada di brosur (QIAamp® DNA Mini Kit, Cat No. 51304) dan ekstraksi untuk *blood smear* dengan metoda fenol-kloroform. Spesimen dipilih bila dinyatakan positif *P. vivax* saja atau campuran *P. vivax* dan *P. falciparum* berdasarkan hasil cek silang yang dilakukan oleh tim mikroskopis pusat dan telah dikonfirmasi secara molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Jumlah spesimen yang diperiksa sebanyak 95 spesimen.

Konfirmasi spesies dengan teknik PCR

Pemeriksaan spesies *Plasmodium* secara

molekuler dilakukan pada semua spesimen H0 dan HK. Metode yang digunakan adalah *Multiplex PCR Method*¹⁷ dengan modifikasi dengan target amplifikasi DNA adalah gen *species-specific sequences* pada *small-subunit ribosomal RNA* (SSUrRNA). Modifikasi di sini maksudnya adalah metode multiplex yang aslinya campuran reaksi masing-masing spesies dicampur dalam satu tabung, tetapi dalam teknik ini, campuran reaksi masing-masing spesies dilakukan dalam tabung yang berbeda untuk memudahkan dalam membedakan panjang pita antara spesies *P. falciparum* atau *P. vivax* yang hampir sama panjang.¹⁷ Primer yang digunakan dengan urutan basa sebagai berikut:

Universal reverse primer (RevMal):

GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCCC

Species specific forward primers: Pf:

AAC AGA CGG GTA GTC ATG AT GAG

Pv: CGG CTT GGA AGT CCT TGT

Total volume setiap reaksi adalah 25 ul. Tiap campuran mengandung 2,5 ul DNA hasil ekstraksi sebagai cetakan (*template*) ditambahkan ke dalam 22,5 ul reaksi PCR yang terdiri dari: 2,5 ul 10x buffer PCR (tanpa MgCl₂), 0,5 ul 10 uM dNTPmix, 2,5 ul 25 mM MgCl₂, 0,3 ul 10 uM primer RevMal, 0,3 ul 10 uM primer Pf atau Pv dan 0,125 ul 5U/ul *Taq DNA polymerase*. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *min* Pre-denaturasi pada 95 °C selama 10 menit (1 siklus); 43 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C, selama 45 detik, *annealing* 62°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan ekstensi 72°C selama 5 menit. Produk PCR selanjutnya divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarose 2% dengan penambahan ethidium bromide. Elektroforesis dijalankan dengan voltase 100 V selama 35 menit. Dengan bantuan ultra violet pada *geldoc 1000 imaging system*, visualisasi pita DNA yang sudah terikat dengan ethidium bromide tersebut dapat dilihat. Produk DNA menunjukkan panjang pita 300 pasang basa (bp) untuk *P. falciparum* dan 276 bp untuk *P. vivax*.

Identifikasi SNP Y976F dengan teknik PCR (*Primer Mismatch Method*)

Adanya mutasi titik pada kodon 976 menyebabkan perubahan asam amino dari tyrosin (TAC=Y) menjadi phenilalanin (TTC=F). Deteksi SNP Y976F menggunakan 3 primer (2 *foward* dan 1 *reverse*) dan dirancang untuk mendeteksi *wild type* (tidak ada mutasi/normal). Jika sampel normal,

akan terjadi amplifikasi dengan primer internal tersebut sehingga terbentuk 2 pita berukuran 560 bp dan 400 bp. Sebaliknya, jika sampel tersebut mengalami mutasi, karena bukan komplemennya, tidak terjadi amplifikasi dengan primer internal sehingga hanya satu pita terbentuk (560 bp). Deteksi mutasi tersebut dilakukan pada mono infeksi *P. vivax* dan atau infeksi campuran *P. falciparum* dan *P. vivax* baik H0 maupun HK (pada subyek yang gagal pengobatan). Berikut ini adalah primer yang digunakan:

Primer *Pvmdr976Forward* : GGA TAG TCA
TGC CCC AGG ATT G

Primer *Pvmdr976Reverse* : CAT CAA CTT
CCC GGC GTA GC

Primer *Pvmdr976Wtinternal*: CGG CTG TAC
TGA CCG GAA CGTA

Total volume setiap reaksi adalah 25 ul. Tiap campuran yang mengandung 1 ul DNA hasil ekstraksi sebagai cetakan (*template*) ditambahkan ke dalam 24 ul reaksi PCR yang terdiri dari: 2,5 ul 10x buffer PCR (tanpa MgCl₂), 2,5 ul 10uM dNTPmix, 2,5 ul 25mM MgCl₂, 1,25 ul 10uM primer *Pvmdr976F*, 1 ul 10uM primer *Pvmdr976R*, 1 ul 10uM primer *Pvmdr976Wtinternal* dan 0,25 ul 5U/ul *AmpliTaq Gold DNA polymerase* (*Applied Biosystems*). Kondisi PCR adalah sebagai berikut: predenaturasi 95°C selama 10 menit (1 siklus) dan 40 siklus yang terdiri dari: denaturasi 94°C, selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 60 detik. Selanjutnya, ekstensi 72°C selama 2 menit dan diakhiri 72°C elektroforesis selama 5 menit. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 2% (kondisi sama dengan elektroforesis untuk spesies). Produk DNA menunjukkan adanya potongan pita pada panjang 560 bp dan 400 bp apabila sampel tidak mengalami mutasi pada gen *pvmdr1 Y976YF*. Sedangkan sampel yang

mengalami mutasi, tidak terjadi pemotongan urutan basa sehingga tampak hanya 1 pita yaitu 560 bp (Gambar).

DNA sekuensing untuk konfirmasi SNP Y976F gen *pvmdr1*

Pendekatan sekuensing dilakukan pada 12 dari 88 (7,33%) sampel, guna melihat keberadaan mutasi pada gen target (*pvmdr1*) pada posisi asam amino Y976F.

Kemudian hasil dibandingkan dengan menggunakan program *Clustal W alignment*. Primer yang digunakan adalah *forward* dan *reverse* untuk deteksi SNP Y976F dengan PCR. Total volume setiap reaksi adalah 50 ul. Tiap campuran yang mengandung 10 ul DNA (templat) ditambahkan ke dalam 40 ul reaksi PCR yang terdiri dari: 5 ul 10x buffer PCR (tanpa MgCl₂), 8 ul 10uM dNTPmix, 5 ul 25mM MgCl₂, 1,5 ul 10uM primer *Pvmdr976F*, 1,5 ul 10uM primer *Pvmdr976R*, dan 0,25 ul 5U/ul *AmpliTaq Gold DNA polymerase* (*Applied Biosystems*). Kondisi PCR adalah sebagai berikut: predenaturasi 95°C selama 10 menit (1 siklus) dan 40 siklus yang terdiri dari: denaturasi 94°C, selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit. Selanjutnya, ekstensi 72°C selama 2 menit dan diakhiri 72 °C elektroforesis selama 5 menit. Sebelum disekuensing, produk PCR harus dibebaskan dulu dari sisa-sisa primer atau nukleotida yang ada. Caranya adalah sebagai berikut: 5 ul produk PCR, ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang sudah berisi 2 ul *ExoSAP-IT*[®] (usb product numbers 78200/01/02/05/50). Selanjutnya diinkubasi pada 37 °C selama 15 menit, kemudian 80°C selama 15 menit untuk menginaktifkan *ExoSap-IT*. Produk PCR siap untuk dilakukan sekuensing dengan menambahkan 2 ul produk PCR terhadap 4 ul reaksi campuran yang mengandung:



Gambar 1. Visualisasi hasil deteksi SNP Y976F

Sumur 2-4, 6-7= mutan, sumur 5=negatif. Sumur 8-9 =kontrol (M=Mutan, WT= Wild Type)

Tabel 1. Hasil Deteksi SNP Y976F di 4 Propinsi

Propinsi	Spesiasi PCR		Total	Deteksi SNP Y976F		Total
	Pv	PfPv		Pv	PfPv	
KALBAR	2	1	3	1	1	2*
KALTEN	8	0	8	6	0	6
G						
SULUT	60	5	65	59	4	63
SULTEN	18	1	19	16	1	17
G						
Total	88	7	95	82	6	88 (92.6%)

* 1 sampel tidak ada *blood blot* H0 yang berasal dari kelompok Pv di mana secara mikroskopi negatif (untuk selanjutnya analisis hasil untuk PCR tidak ada)

1,2 ul Big Dye terminator 3.1. 1.2 ul Big Dye buffer. 0,5 ul primer dan H₂O. Kemudian

Analisis hasil

Hasil dianalisis secara deskriptif berdasarkan pemunculan pita DNA, apakah satu pita (tipe mutan) atau dua pita (tipe *wild type*).

Hasil

Identifikasi spesies (spesiasi) dengan teknik PCR

Dari 95 subyek yang teridentifikasi sebagai malaria vivaks, sebanyak 88 subyek adalah infeksi tunggal (*P.vivax*) dan 7 subyek merupakan infeksi campuran *P.vivax* dan *P.falciparum* (untuk jelasnya dapat dilihat pada tabel terlampir). Satu dari 95 subyek (Kalimantan Barat) tidak ada spot darah dan *blood smear* H0 dan secara mikroskopi juga negatif sehingga tidak ada produk PCR.

SNP Y976F gen *pvmdr1* dengan teknik PCR dan dikonfirmasi dengan DNA sekuensing

Deteksi SNP Y976F dengan teknik PCR dilakukan pada 95 subyek baik yang terinfeksi *P.vivax* maupun yang terinfeksi *P.vivax* dan *P.falciparum* yang dikoreksi dengan teknik PCR. Ternyata, 88 dari 95 subyek (92,6%) memperlihatkan hasil mutan positif (ada mutasi pada asam amino 976) sedangkan sisanya (7/95) tidak dapat diidentifikasi (hasil negatif), walau sudah dilakukan pengulangan.

Dari 12 SNP Y976F yang dikonfirmasi dengan DNA sekuensing, hasil menunjukkan bahwa asam amino pada posisi 976 mengalami perubahan dari Y menjadi F. (terjadi mutasi). Elektro-

dimasukkan ke mesin sekuensing 3130 xl *genetic analyzer* (Applied Biosystem). pherogram setiap subyek sangat baik (tanpa noisi) sehingga setiap puncak dari basa dapat dibedakan satu sama lain. Untuk mengidentifikasi SNP (ada mutasi atau tidak), fragmen yang mengandung asam amino pada posisi 976 dibandingkan dengan gen *pvmdr1* dari *genbank* (Sal-1, wild type). Hasil dianalisis menggunakan program Clustal W.

Kasus gagal pengobatan

Dalam penelitian ini, ditemukan 3 subyek yang kambuh kembali. Satu (1) di antara 3 subyek tersebut ternyata pada hari kambuh (H-21) terinfeksi *P. falciparum* sedangkan ke 2 subyek lainnya tetap terdeteksi sebagai Pv (H-35 dan H-42). Dari ke dua subyek ini, hanya satu yang terdeteksi SNP Y976F sedangkan satu lagi tidak teridentifikasi (hasil negatif).

Pembahasan

Resistensi klorokuin pada *P.vivax* telah dilaporkan sejak tahun 1989 dari Papua New Guinea (PNG)¹⁸ dan Indonesia¹⁹ 3 tahun kemudian (1991). Penyebaran geografik klorokuin telah dilaporkan pada beberapa negara bahkan sensitifitas terhadap meflokuin, amodiakuin dan artesunat juga telah dilaporkan.²⁰

Dari hasil penelitian ini, terdapat 95 subyek yang dikonfirmasi positif terinfeksi *P. vivax* dan /atau infeksi campuran (*P. falciparum* dan *P. vivax*) dengan PCR. Subyek inilah yang akan menjadi specimen untuk deteksi SNP Y976F gen *pvmdr1*. Dari 95 subyek tersebut, sebanyak 93% (88/95)

memperlihatkan ada mutasi asam amino pada posisi 976 (resisten) dengan perincian: Kalimantan Barat (2/3), Kalimantan Tengah (6/8), Sulawesi Utara (63/65) dan Sulawesi Tengah (17/19). Hasil yang 93% positif mutan tersebut hampir sama dengan penemuan Suwanurusk et. al.¹² yang menemukan 96% (123/128) mutasi Y976F pada isolat Papua dengan menurunnya sensitivitas klorokuin pada *in vitro assay*. Sebaliknya, dengan isolat Thai yang masih menggunakan klorokuin sebagai *first line therapy* ditemukan 25 % (17/69) atau sedikit lebih tinggi dari yang ditemukan Lu et al¹⁶ 17,9% (5/28). Masih dalam penelitian Lu et.al., ternyata tidak ditemukan sama sekali strain mutan dengan deteksi SNP Y976F di Republic of Korea (ROK), hal ini mungkin karena negara tersebut masih menggunakan klorokuin sebagai lini pertama untuk infeksi *P.vivax*, sementara di PNG, walaupun cuma 1 sampel yang dites, sampel tersebut positif. PNG adalah negara yang pertama kali dilaporkan ditemukan klorokuin resisten terhadap infeksi *P. Vivax*.¹⁸ Orjuela-Sanchez et.al.¹⁴ melaporkan bahwa tidak satupun *wild type* yang berhubungan dengan sensitifitas klorokuin. Penemuan ini mengisyaratkan bahwa SNP Y976F tidak dapat digunakan sebagai penanda untuk monitoring resistensi klorokuin di Brazil. Fenomena yang sama juga muncul di Madagaskar di mana tipe mutan ditemukan dengan frekuensi tinggi, namun hanya pada *P. vivax* secara *in vivo* dengan CQR prevalensi rendah¹⁵. Di samping itu mutasi Y976F tidak ditemukan pada isolat dari 3 pasien yang kambuh.¹⁵ Hal ini membuktikan bahwa gen *pvmdr1* mempunyai lokus Y976F *mdr1* yang polimorfik (beragam) pada isolat-isolat di lapangan.

Ada laporan menyebutkan bahwa deteksi SNP Y976F kurang sensitif pada keadaan parasitemia rendah¹². Dalam penelitian ini, kami dari 7 subyek yang tidak dapat dideteksi, ada 3 subyek yang memiliki densitas parasit rendah dan bahkan 1 subyek yang negatif secara mikroskopis ternyata dengan PCR positif *P. vivax*. Mungkin saja sampel yang dinyatakan negatif secara mikroskopis, sebetulnya sudah mengandung parasit malaria tetapi masih di bawah batas ambang sehingga tidak terdeteksi. Sementara pada subyek yang ke dua, secara mikroskopis diidentifikasi sebagai *P. falciparum* tetapi dengan PCR terdeteksi sebagai campuran *P. falciparum* dan *P. vivax*. Artinya mungkin karena densitas parasit *P. vivax* di bawah ambang mikroskopi, maka parasit *P. vivax* tersebut tidak terdeteksi. Pada subyek ketiga densitas parasit

60/ul dan sisanya (4 subyek), mempunyai densitas parasit yang bervariasi (1803/ul, 2212/ul, 3375/ul dan 4367/ul).

Perlu dikemukakan bahwa DNA untuk densitas parasit yang 2212/ul, 3375/ul, 4376/ul (berasal dari kerokan slide karena spot darah untuk H0 tidak ada. Seharusnya dengan densitas parasit yang demikian jumlah DNA yang didapatkan mencukupi, tetapi karena apusan darah pada slide tersebut tidak tebal (ada yang mengelupas) maka *yield* DNA yang dihasilkan kurang maksimal (pita sangat tipis dapat terlihat waktu visualisasi spesiasi). Hal ini mungkin yang menyebabkan deteksi SNP Y976F tidak berhasil. Begitu juga pada satu subyek dengan densitas parasit, 1803/ul, isolasi DNA didapatkan dari spot darah yang dikertas FTA karena spot darah yang di kertas Whatman tidak ada. DNA yang dihasilkan juga tidak maksimal (pita sangat tipis).

Selama pengumpulan sampel *in vivo* ditemukan 3 subyek yang mengalami gagal pengobatan DHP, masing masing terjadi pada H-21, H-35 dan H-42 di mana 1 di antaranya terdeteksi terinfeksi *P. falciparum* (dengan PCR), sedangkan 2 lainnya (H-35 dan H-42) terdeteksi sebagai *P. vivax* baik secara mikroskopis maupun PCR. Sayangnya, deteksi SNP Y976F untuk melihat strain resisten klorokuin hanya bisa terdeteksi pada subyek yang kambuh pada H-35 sedangkan pada subyek yang gagal pada H-42 hasil tidak dapat teridentifikasi (negatif). Hal ini, mungkin disebabkan karena densitas parasit sedikit (10 parasit/ul). Seperti telah dikemukakan di atas deteksi SNP Y976F kurang sensitif pada parasitemia rendah.

Tidak seperti *P. falciparum*, jika hasil sebelum dan sesudah gagal pengobatan menunjukkan pola pita DNA yang sama, bisa dikatakan rekrudesens (resisten), sebaliknya jika menunjukkan pola yang berbeda dikatakan terjadi infeksi baru. Tetapi pada *P. vivax*, permasalahannya adalah, belum dapat membedakan antara *true recrudescences*, relaps dan infeksi baru. Walau demikian, oleh Baird et al.²¹ berdasarkan pengalaman dengan subyek orang Indonesia untuk pengobatan yang gagal terhadap klorokuin dilaporkan bahwa: sampai hari 16 hampir selalu rekrudesens, sementara kalau kegagalan antara 17 dan 28 mungkin karena rekrudesens atau relaps. Kegagalan setelah hari 28 sepertinya karena relaps. Belum ada rekomendasi yang dapat diberikan untuk genotyping *P. vivax* pada uji klinik obat anti

malaria karena interpretasi genotyping dalam konteks relaps infeksi *P. vivax* belum jelas.

Kesimpulan

Telah dilakukan deteksi SNP Y976F gen *pvmdr1* pada *P.vivax in vivo* sampel dari Kalimantan dan Sulawesi dengan hasil 93% menunjukkan strain mutan (resisten terhadap klorokuin). Hasil ini memperkuat bahwa resistensi klorokuin telah menyebar di sentinel penelitian.

Saran

Data ini, dapat digunakan sebagai dasar informasi untuk penggunaan DHP sebagai pengganti obat program.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami tujuikan kepada Global Fund ATM Malaria Indonesia *Round 8* yang telah mendanai penelitian ini; Dr.Trihono, Kepala Badan Litbangkes Kemkes RI yang mendukung dan mengijinkan penelitian ini dilaksanakan; dr.Nadia Tirmizi Sub, Direktorat Malaria yang mempercayakan dan mendukung penelitian ini dilakukan oleh Badan Litbangkes; Drs. Ondri Dwi Sampurno M.Si.Apt. selaku koordinator penelitian ini, Dinkes Propinsi Kalimantan Barat, Kaimantan Tengah, Sulawesi Utara, dan Sulawesi Tengah; Kabupaten Pontianak, Katingan, Minahasa Tenggara dan Sigi; dan Kelompok Program Penyakit Bersumber Binatang, Puslitbang Biomedis dan Farmasi yang telah membantu kegiatan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. World Malaria Report 2008. WHO/HTM/GMP/ 2008.1. Geneva, WHO 2008.
2. Sutanto I, Endawati D, Ling LH, Laihad F, Setiabudy R, Baird JK. Evaluation Of Chloroquine Therapy For Vivax And Falciparum Malaria In Southern Sumatra, Western Indonesia. *Malaria Journal*. 2010, 9(52).
3. Tjitra E, Gunawan S, Lihad F, Marwoto H, Sulaksono S, Arjoso S, Richi TL, Manurung N, Evaluation of Antimalaria Drugs in Indonesia, 1981-1995, *Bull Hlth Studies*, 1997; 25(1): 27-58
4. World Health Organization. Antimalarial drug combination therapy. Report of WHO Informal Consultation 4-5 April 2001. Geneva: WHO, 2001.
5. Hasugian AR, Purba HLE, Kenangalem E, Wuwung RM, Ebsworth EP, Maristela R, Penttinen PMP, Laihad F, Anstey NM, Tjitra E, Price RN et.al.Dihydroartemisinin-Piperaquine versus Artesunate-Amodiaquine: Superior Efficacy and Posttreatment Prophylaxis against Multidrug-Resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:1067-74.
6. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A and Alonso PL. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001; 3:1413-6.
7. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* *P. vivax* *mdr*-Like Gene of *P.falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108:13-23.
8. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE: Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000, 6:861-871.
9. Nomura T, Carlton JM, Baird JK, del Portillo HA, Fryauff DJ, Rathore D, Fidock DA, Su X, Collins WE, McCutchan TF, Wootton JC, Wellems TE. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J. Infect. Dis*. 2001.183, 1653-1661.
10. Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, del Portillo HA. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey adapted strains. *Exp. Parasitol*.2005, 109:256-259.

-
-
11. Brega S, Meslin B, de Monbrison F, Severini C, Gradoni L, Udomsangpetch R, Sutanto I, Peyron F and Picot S. Identification of the *Plasmodium vivax* mdrlike gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis* 2005;91:272-7.
 12. Suwanarusk R, Russell B, Chavchich M, Chalfein F, Kenangalem E, Kosaisavee V, Prasetyorini B, Piera KA, Barends M, Brockman A, Lek-Uthai U, Anstey NM, Tjitra E, Nosten F, Cheng Q, and Price RN. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterization and association with molecular polymorphisms. *PLoS ONE* 2: October 2007
 13. Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Müller I, Sie A, Goroti M, Reeder JC, Beck HP, Picot S, Genton B. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvmdr1*. *Infect Dis.* 2008 Aug 1;198(3):409-17
 14. Orjuela-Sa´nchez P, de Santana Filho FS, Machado-Lima A, Chehuan YF Farias Costa MR and del Portillo HA. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* Genes of *Plasmodium vivax* among Chloroquine-Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region. *Anti microbial agents and chemotherapy*, Aug. 2009, p. 3561–3564
 15. Barnadas C, Ratsimbaoa A, Tichit M, Bouchier C, Jahevitra M, Picot S and D Menard D. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvmdr1* and *pvcrto* genes. *Antimicrob. agents Chemother.* 2008. 52:4233–4240.
 16. Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, Lee HW, Chen JH, Wang Y, Sattabongkot J., and Han ET (2011). Genetic polymorphism in *pvmdr1* and *pvcrto* genes in relation to in vitro drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Acta Tropica* vol 117 Feb;117(2):69-75
 17. Brockman A. Marfurt J. Molecular Malaria Workshop II. (NIHRD, Jakarta / May 19-30, 2008). Course Manual. Genotyping protocols for *P. falciparum* and *P. vivax*.
 18. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC 1989. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet* 1989.2, 1183–1184.
 19. Baird JK, Basri H, Purnomo, Bangs MJ, Subianto, B, Patchen LC, Hoffman SL. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991, 44, 547–552
 20. Chotivanich K, Sattabongkot J, Choi YK, Park JS, Sritabal J, Lim CS, Udomsangpetch R, White NJ, Lee WJ. Antimalarial drug susceptibility of *vivax* in the Republic of Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80, 902–904.
 21. Baird JK, Leksana B, Masbar S, Fryauff DJ, Sutanihardja MA, Suradi FS. Wignall and Hoffman SL. Diagnosis of resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax*: timing of recurrence and whole blood chloroquine levels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, 56:621–626.