

# KERAGAMAN GENETIK PETANDA *P. falciparum* DARI SPECIMEN SUBYEK PENELITIAN MONITORING DIHIDROARTEMISININ-PIPERAKUIN DI KALIMANTAN DAN SULAWESI

Sarwo Handayani,\* Ervi Salwati,\* Emiliana Tjitra\*\*

\*Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Jakarta, Jl. Percetakan Negara No. 29  
Email: sarwo@litbang.depkes.go.id

\*\*Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik, Badan Litbangkes, Jakarta

## MULTI GENOTYPE MARKER OF *P.FALCIPARUM* OF SUBJECT SPECIMEN OF DIHIDROARTEMISININ-PIPERAKUIN MONITORING RESEARCH IN KALIMANTAN AND SULAWESI

### Abstract

Treatment failure in *falciparum* malaria may be caused by parasite resistant to antimalarial drug or new infection. Polymorphism genetic marker of *P. falciparum* namely *MSP1*, *MSP2* and *GLURP* locus genes in the population should be identified as a baseline to distinguish the cause of treatment failure. A nested Polymerase Chain Reaction (PCR) method was applied to each locus gene separately. A total 121 dried blood spot specimens from subjects infected with *P. falciparum* in monitoring Dihydroartemisinin-Piperaquine treatment in Kalimantan and Sulawesi Islands were analyzed. Locus genes of *MSP1*, *MSP2* and *GLURP* were successfully identified 82.6%, 96.7% and 81.0% respectively. However, the three (*MSP1*, *MSP2* and *GLURP*) locus genes were only found in 71.9% (87 of 121) samples. All of *MSP1* locus gene had just one allele, two alleles on most of *MSP2* (67.5%) and few of *GLURP* (14.3%). Multi genotype infection was likely dominant than a single genotype infection (65.5% vs. 34.5%). Based on allele length classification, *MSP2* locus gene shows more variety of allele class (12 alleles) than *GLURP* (9 alleles) and *MSP1* (7 alleles), with an allele length mostly for *MSP1*: 440 - 479 bp, *MSP2*: 480–519 bp and *GLURP*: 580–639 bp. In this study, *falciparum* malaria cases were commonly as multi-genotype infection, and *MSP2* was a dominant and polymorphic genetic marker of *P.falciparum*.

Keywords: *P. falciparum*, PCR, *MSP1*, *MSP2*, *GLURP*, allele

### Abstrak

Gagal pengobatan pada malaria *falciparum* dapat disebabkan oleh parasit yang resisten terhadap obat antimalaria atau oleh infeksi baru. Keragaman genetik petanda *Plasmodium falciparum* yaitu lokus gen *MSP1*, *MSP2* dan *GLURP* dalam suatu populasi perlu diidentifikasi sebagai dasar untuk membedakan penyebab gagal pengobatan. Metode pemeriksaan yang digunakan adalah *nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap masing-masing lokus gen secara terpisah. Telah dianalisis 121 spesimen resapan darah kering pada kertas filter dari subyek terinfeksi *P.falciparum* pada studi monitoring pengobatan dengan Dihydroartemisinin-Piperaquin di Kalimantan dan Sulawesi. Masing-masing lokus gen *MSP1*, *MSP2* dan *GLURP* yang dapat diidentifikasi sebanyak 82,6%, 96,7% and 81,0%. Sedangkan ketiga lokus gen tersebut ditemukan hanya pada 71,9% (87/121) sampel. Lokus gen *MSP1* semuanya mempunyai 1 alel, sedangkan dua alel ditemukan pada sebagian besar *MSP2* (67,5%) dan sebagian kecil *GLURP* (14,3%). Infeksi multi-genotip oleh dua atau lebih genotip *P.falciparum* ditemukan pada 65,5%

---

---

sampel dan infeksi tunggal hanya 34,5% sampel. Keragaman klas alel paling banyak ditemukan pada lokus gen MSP2 sebanyak 12 klas alel, GLURP sebanyak 9 klas alel, dan MSP1 sebanyak 7 klas alel. Alel pada lokus gen MSP1 sebagian besar pada kisaran 440 - 479 bp, MSP2: 480 - 519 bp, dan GLURP: 580-639 bp. Pada penelitian ini kasus malaria falsiparum umumnya merupakan infeksi multi-geotip, dan MSP2 merupakan petanda gen *P.falciparum* yang dominan dan beragam.

Kata kunci : *P. falciparum*, PCR, MSP1, MSP2, GLURP, alel

Submit: 5 Juli 2011, Review 1: 6 Juli 2011, Review 2: 6 Juli 2011, Eligible article: 28 Desember 2011

## Pendahuluan

Resistensi obat masih menjadi masalah dalam pengendalian malaria di Indonesia terutama malaria falsiparum dan vivaks.<sup>1</sup> Untuk mengatasi masalah tersebut WHO merekomendasikan menggunakan *artemisinin-based combination Therapy* (ACT). Di Indonesia, ACT yang merupakan kombinasi artesunat-amodiakuin telah digunakan sejak tahun 2004 namun baru tahun 2008 digunakan untuk semua jenis malaria.<sup>2</sup> Beberapa penelitian menunjukkan bahwa efikasi ACT ternyata bervariasi bahkan di Papua hanya 67% untuk malaria falsiparum dan 96,5% untuk malaria vivaks.<sup>3</sup> Alternatif ACT lain adalah *Dihydroartemisinin-piperaquine* (DHP) dan ternyata hasil uji klinik di Papua menunjukkan bahwa DHP lebih baik dibandingkan dengan ACT program.<sup>4</sup> DHP telah digunakan di Papua sejak tahun 2006, dan direncanakan akan digunakan di daerah endemis malaria lainnya di luar Papua seperti Kalimantan dan Sulawesi.

Efikasi yang rendah dan gagal pengobatan pada malaria falsiparum dapat disebabkan oleh parasit yang resisten terhadap obat antimalaria atau infeksi baru. Untuk membedakan penyebab gagal pengobatan digunakan petanda genetik *Plasmodium falciparum* yaitu lokus gen *Merozoit Surface Protein 1* dan 2 (MSP1 - MSP2) dan *Glutamate Rich Protein* (GLURP). Ketiga lokus gen tersebut digunakan karena mempunyai keragaman genotip yang banyak pada populasi, terutama lokus gen MSP2.<sup>5-8</sup> MSP1 dan MSP2 juga merupakan protein yang dapat menimbulkan respon imun pada manusia dan merupakan kandidat yang penting dalam pengembangan vaksin malaria pada stadium eritrosit.<sup>9</sup> Berdasarkan analisis gen, MSP1 dibagi menjadi 17 blok yang terdiri dari 7 blok dengan variabilitas tinggi yang diapit oleh lima daerah *conserved* dan *semi-conserved*. Blok 2 dari MSP1

bersifat polimorfik yang memiliki tiga famili alel yang berbeda yaitu MAD 20 dengan panjang basa 100 bp - 250 bp, K1 dengan panjang basa 150 bp - 250 bp dan RO33 dengan panjang basa 160 bp. MSP2 memiliki dua famili alel yaitu IC dengan panjang basa 400-750 bp dan FC27 dengan panjang basa 250-450 bp. GLURP dengan panjang basa 600 bp - 1,2 kbp merupakan protein yang kaya asam glutamat dan juga bersifat imunogenik. Protein GLURP tersebut akan diekspresikan pada hati dan juga pada parasit stadium aseksual maupun seksual.<sup>8-10</sup> Famili alel dari ketiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP tersebut telah banyak ditemukan di beberapa daerah endemis malaria di berbagai Negara.<sup>8,11</sup>

Penggunaan lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP selain bermanfaat untuk mengetahui epidemiologi molekuler *P. falciparum*, juga dapat digunakan untuk menilai tingkat transmisi malaria dan hubungan faktor-faktor tersebut dengan respon imun. Dengan mengetahui alel pada masing-masing lokus gen tersebut maka dapat diidentifikasi adanya infeksi poliklonal yaitu infeksi yang disebabkan oleh beberapa klon parasit.<sup>9,12,13</sup> Pada studi monitoring obat, identifikasi ketiga lokus gen *P. falciparum* tersebut digunakan untuk mengetahui penyebab kasus gagal karena infeksi baru atau karena kambuh (rekrudesen), dengan membandingkan alel ketiga lokus gen tersebut sebelum dan sesudah mendapat pengobatan.<sup>7,14-18</sup> Alel yang berbeda sama sekali antara sebelum dan sesudah pengobatan menunjukkan bahwa gagal pengobatan disebabkan oleh infeksi baru.

Sampai saat ini data tentang keragaman genotip *P. falciparum* di Indonesia sebagai dasar untuk membedakan antara kasus gagal pengobatan pada *P. falciparum* karena parasit resisten atau infeksi baru masih terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi alel terutama pada lokus gen

---

---

MSP1, MSP2 dan GLURP. Penelitian molekuler ini merupakan bagian dari studi monitoring penggunaan obat DHP di Kalimantan dan Sulawesi yang dilakukan pada tahun 2010. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi keragaman alel *P. falciparum* pada lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP dari penderita malaria sebelum mendapat pengobatan DHP.

## Bahan dan Cara

### Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain potong lintang, dan merupakan bagian dari penelitian monitoring obat Dihidroartemisinin-Piperakuin yang dilakukan di Kalimantan dan Sulawesi pada tahun 2010. Penelitian dilakukan di empat Kabupaten yaitu Pontianak, Katingan, Minahasa Tenggara dan Sigi, yang masing-masing terdiri dari 2 Puskesmas. Daerah tersebut dipilih karena merupakan daerah endemis malaria dan mempunyai fasilitas serta kemampuan untuk melakukan penelitian monitoring obat malaria.

### Pengumpulan Sampel

Sampel penelitian adalah penderita malaria yang memenuhi kriteria inklusi/eksklusi penelitian monitoring obat Dihidroartemisinin-Piperakuin. Kriteria inklusi meliputi laki-laki dan perempuan, infeksi oleh *P. falciparum* dengan jumlah parasit aseksual 1,000-100,000/ul, suhu  $\geq 37.5$  °C atau mempunyai riwayat demam 48 jam sebelumnya, mampu menelan obat, dapat mengikuti protokol penelitian selama waktu yang ditentukan dan menandatangani persetujuan mengikuti penelitian. Adapun kriteria eksklusi adalah malaria berat, adanya infeksi campuran, malnutrisi atau penyakit berat lainnya, panas yang disebabkan oleh penyakit selain malaria, minum obat malaria dalam 4 minggu terakhir sebelum penelitian, mempunyai riwayat hipersensitifitas obat dan sedang hamil atau menyusui.

Spesimen berupa resapan darah (spot darah) pada kertas filter Whatman 3 M atau FTA yang dikumpulkan pada saat rekrutmen subyek atau pada hari ke nol (H0). Darah diambil secara aseptis dari ujung jari tangan, dan diteteskan pada kertas filter sebanyak  $\pm 200$   $\mu$ l. Darah dikeringanginkan dan dimasukkan ke dalam plastik yang mengandung gel silika, dan selanjutnya disimpan pada suhu kamar sampai dilakukan ekstraksi DNA. Spesimen dipilih bila dinyatakan positif *P. falciparum* berdasarkan pemeriksaan mikroskopis dan telah dikonfirmasi

secara molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Jumlah spesimen yang diperiksa sebanyak 121 spesimen.

### Pemeriksaan Spesimen

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode sentrifugasi kolom (Qiamp mini kit, Qiagen) sesuai petunjuk di dalam kit. Jumlah tetesan darah kering yang digunakan sebanyak 5 potongan bulat (*punch* diameter 3 mm). DNA yang telah diekstraksi digunakan untuk pemeriksaan konfirmasi spesies dengan metode *multiplex single round PCR* dan pemeriksaan petanda genetik *P. falciparum* lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP dengan metode *nested (second round PCR)*.<sup>10</sup> dengan sedikit modifikasi pada volume primer dan DNA yang digunakan.

Identifikasi genotip terhadap ketiga lokus gen dilakukan secara terpisah untuk masing-masing lokus gen. Primer yang digunakan untuk ketiga lokus gen terdiri dari primer untuk PCR pertama (P) dan PCR nested (N). Urutan basa primer untuk masing-masing lokus gen adalah MSP1 (P1: 5'CAC ATG AAA GTT ATC AAG AAC TTG TC3', P2: 3'GTA CGT CTA ATT CAT TTG CAC G5'; N1: 5'GCA GTA TTG ACA GGT TAT GG3', N2: 3'GAT TGA AAG GTA TTT GAC5'); MSP2 (P1: 5'GAA GTT AAT TAA AAC ATT GTC3', P2: 3'GAG GGA TGT TGC TGC TCC ACA G5', N1: 5'CTA GAA CCA TGC ATA TGT CC3', N2: 3'GAG TAT AAG GAG AAG TAT G5') dan GLURP (P1: 5'ACA TGC AAG TGT TGA TCC3', P2: 3'GAT GGT TTG GGA GTA ACG5', N1: 5'TGA ATT CGA AGA TGT TCA CAC TGA AC3', N2: 3'TGT AGG TAC CAC GGG TTC TTG TGG5'). Urutan basa primer MSP1 dan MSP2 disusun oleh L Ranford-Cartwright. Primer MSP1 akan menghibridisasi daerah *conserved* pada blok 1 dan 3 yang mengapit daerah *repeat* dan *dimorphic*. Primer MSP2 menghibridisasi daerah *conserved* pada blok 1 dan 4 yang juga mengapit daerah *repeat* dan *dimorphic*. Sedangkan primer GLURP akan menghibridisasi daerah *conserved* yang mengapit daerah R2 *repeat*.<sup>10</sup> Komposisi dan konsentrasi masing-masing reagen untuk reaksi PCR pertama dan nested adalah: PCR buffer tanpa MgCl<sub>2</sub> 1x, dNTP mix 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Applied Biosystem), Primer 100 nM dan Tag polymerase 0,70 U (Invitrogen) dengan volume akhir reaksi 25  $\mu$ l. Volume sampel DNA untuk ketiga lokus gen sama pada reaksi pertama yaitu 2,5  $\mu$ l, sedangkan untuk reaksi kedua

adalah 1 µl untuk MSP1 dan MSP2, dan 0,5 µl untuk GLURP. Pada reaksi PCR yang pertama sampel DNA yang digunakan telah diencerkan terlebih dahulu (5 kali peng-enceran). Program PCR pada tahap pertama dan kedua adalah sama, yaitu untuk MSP1 dan MSP2 dengan program predenaturasi 95°C – 5 menit; 30 siklus untuk denaturasi, *annealing* dan ekstensi masing-masing adalah 95°C – 30 detik, 50°C – 30 detik, 72°C – 1 menit dan terakhir 72°C – 5 menit. Sedangkan untuk GLURP, predenaturasi 95°C – 3 menit, 30 siklus untuk denaturasi, *annealing* dan ekstensi masing-masing adalah 95°C – 25 detik, 50°C – 1 menit, 72°C – 2 menit dan terakhir 72°C – 5 menit.

Setelah amplifikasi kedua produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose (2%) yang mengandung etidium bromide (3%) dan dengan voltase 100 Volt selama 35 menit. Pada setiap kali elektroforesis selalu disertakan petanda DNA interval 100 bp untuk mempermudah analisa. Produk DNA selanjutnya divisualisasikan dan didokumentasikan dengan mesin Geldoc 100.

Apabila tidak terjadi amplifikasi DNA pada masing-masing lokus gen maka dilakukan pengulangan, dan jika hasil ulangan tetap menunjukkan hasil negatif, maka dianggap lokus gen tersebut tidak dapat diidentifikasi.

#### Analisis hasil

Hasil dianalisis secara deskriptif dengan menghitung persentase munculnya pita DNA pada

masing-masing lokus gen. Panjang basa masing-masing lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP dihitung secara manual dengan menggunakan alat pengukur (mistar). Tahapan analisis meliputi: 1. menghitung jarak pita marker DNA (dalam mm) pada masing-masing panjang basa yang sudah diketahui, misalnya 100 bp, 200 bp, 300 bp dan seterusnya; 2. membuat persamaan garis regresi linier antara jarak pita terhadap log panjang basa petanda DNA (misalnya  $y = -0.031x + 3,896$ ); 3. memasukkan jarak pita DNA sampel ke dalam persamaan garis regresi tersebut sehingga diperoleh panjang basa DNA sampel dalam bentuk log; 4. menghitung antilog untuk mendapatkan panjang basa sampel yang sebenarnya. Selanjutnya panjang basa di-klasifikasikan dalam kode alel menurut Brockman dkk.<sup>13</sup> Pembagian lokus gen MSP1 dan MSP2 adalah dengan interval 40 bp, sedangkan GLURP dengan interval 60 bp (Tabel 1).

#### Hasil

##### Identifikasi Lokus Gen MSP1, MSP2 dan GLURP

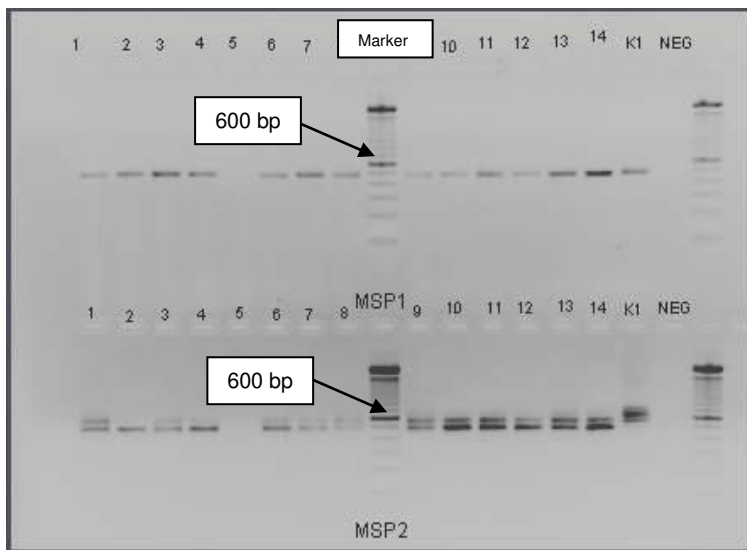
Dari 121 spesimen malaria falsiparum, tidak semuanya berhasil diidentifikasi terhadap ketiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP. Keberhasilan identifikasi paling banyak ditemukan pada lokus gen MSP2 sebanyak 96,69% (117/121), MSP1 sebanyak 82,64% (100/121) dan GLURP sebanyak 80,99% (98/121) seperti tampak pada Tabel 2. Masih ditemukan hasil yang negatif atau tidak teridentifikasi adanya lokus gen terutama pada

**Tabel 1. Klasifikasi kode alel lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP pada *P. falciparum* (Brockman A dkk, 1999)**

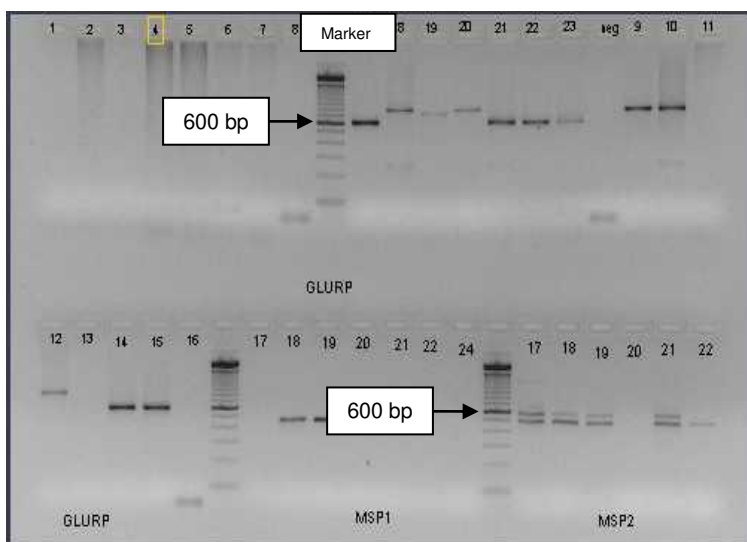
Kode/klas alel	MSP1 (bp)	MSP2 (bp)	GLURP (bp)
1	400 – 439	400 – 439	
2	440 – 479	440 – 479	
3	480 – 519	480 – 519	
4	520 – 559	520 – 559	580 – 639
5	560 – 599	560 – 599	640 – 699
6	600 – 639	600 – 639	700 – 759
7	640 – 679	640 – 679	760 – 819
8	680 – 719	680 – 719	820 – 879
9	720 – 759	720 – 759	880 – 939
10	760 – 799	760 – 799	940 – 999
11	800 – 839	800 – 839	1000 – 1059
12	840 – 880	840 – 880	1060 – 1119

**Tabel 2. Identifikasi *P. falciparum* lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP pada penderita malaria di Kalimantan dan Sulawesi**

Lokus gen	Jumlah yang diidentifikasi	Keberhasilan (%)
MSP1	100	82.64
MSP2	117	96.69
GLURP	98	80.99
Jumlah sampel	121	



**Gambar 1. Hasil amplifikasi *P. falciparum* lokus gen MSP1 dari MSP2 pada penderita malaria di Kalimantan dan Sulawesi**



**Gambar 2. Hasil Amplifikasi *P. falciparum* Lokus Gen GLURP pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi**

GLURP dan MSP1. Gambaran hasil amplifikasi terhadap ketiga lokus gen tersebut tampak pada Gambar 1 dan Gambar 2. Terlihat bahwa pada lokus gen MSP1 dan GLURP, sebagian besar terdiri dari 1 macam pita DNA atau alel, masing-masing sebanyak 100% (100/100) dan 85,71% (84/98), sedangkan pada lokus gen MSP2 adalah sebaliknya karena sebagian besar (67,52% atau 79/117) memiliki 2 macam alel (Tabel 3).

Ketiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP ditemukan pada 71,90% (87/121) sampel, dua lokus gen pada 23,14% (28/121) sampel dan satu lokus

gen pada 4,96% (6/121) sampel (Tabel 4). Karena jumlah alel pada masing masing lokus gen ada yang lebih dari satu alel maka berdasarkan ketiga lokus gen (MSP1, MSP2 dan GLURP) yang berhasil diidentifikasi, dibedakan antara infeksi multi genotip dan infeksi satu genotip. Infeksi multi genotip yaitu infeksi yang disebabkan oleh dua atau lebih alel dari ketiga lokus gen *P. falciparum*. Infeksi satu genotip ditemukan pada 34,48% (30/87) sampel sedangkan infeksi multi genotip ditemukan lebih banyak yaitu 65,52% (57/87) sampel (Tabel 5).

**Tabel 3. Jumlah alel *P. falciparum* Lokus Gen MSP1, MSP2 dan GLURP pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi**

Lokus gen	n	Jumlah alel			
		1 alel	%	2 alel	%
MSP1	100	100	100	0	0
MSP2	117	38	32.48	79	67.52
GLURP	98	84	85.71	14	14.29
Jumlah sampel	121				

**Tabel 4. Kombinasi *P. falciparum* Lokus Gen MSP1, MSP2 dan GLURP pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi**

kombinasi lokus gen	Jml sampel diidentifikasi	%
3 lokus	87	71.90
2 lokus	28	23.14
1 lokus	6	4.96
Total	121	100

**Tabel 5. Infeksi satu dan multi genotip *P. falciparum* berdasarkan tiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP pada penderita malaria di Kalimantan dan Sulawesi**

Jenis infeksi	n	%
Satu genotip	30	34.48
Multi (lebih dari 1 genotip)	57	65.52
Total	87	100

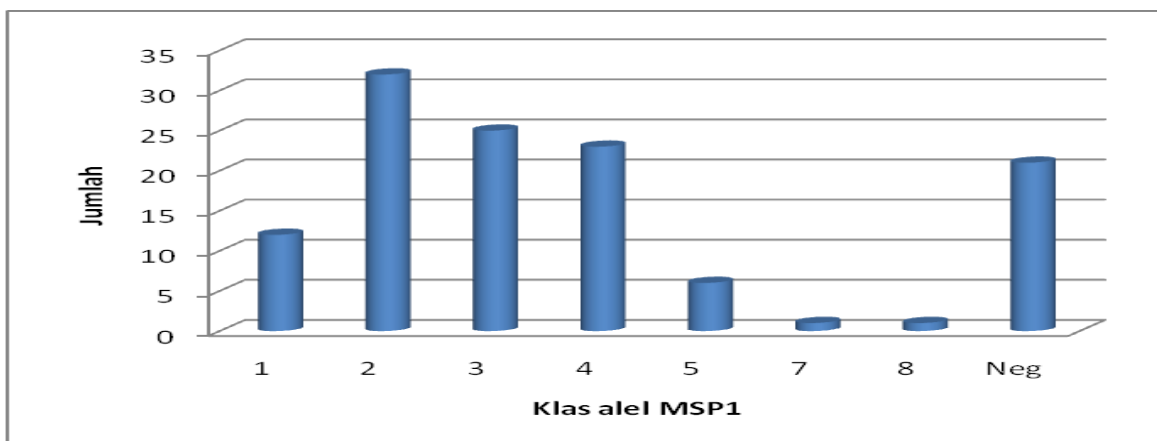
### Identifikasi Klas Alel MSP1, MSP2 dan GLURP

Klas alel masing-masing lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP diklasifikasikan berdasarkan kode alel menurut Brockman dkk, 1999 (Tabel 1). Interval klas alel pada lokus gen MSP1 dan MSP2 adalah 40 bp sedangkan GLURP adalah 60 bp. Pada lokus gen MSP1 panjang alel yang ditemukan bervariasi, dan setelah diklasifikasikan dapat dibedakan menjadi 7 klas alel (nomor 1 – 8). Alel yang banyak dijumpai termasuk dalam klas alel nomor 2 diikuti 3 dan 4 dengan panjang antara 440 – 559 bp. Tidak ditemukan klas alel nomor 6 dengan panjang 600- 639 bp (Grafik 1).

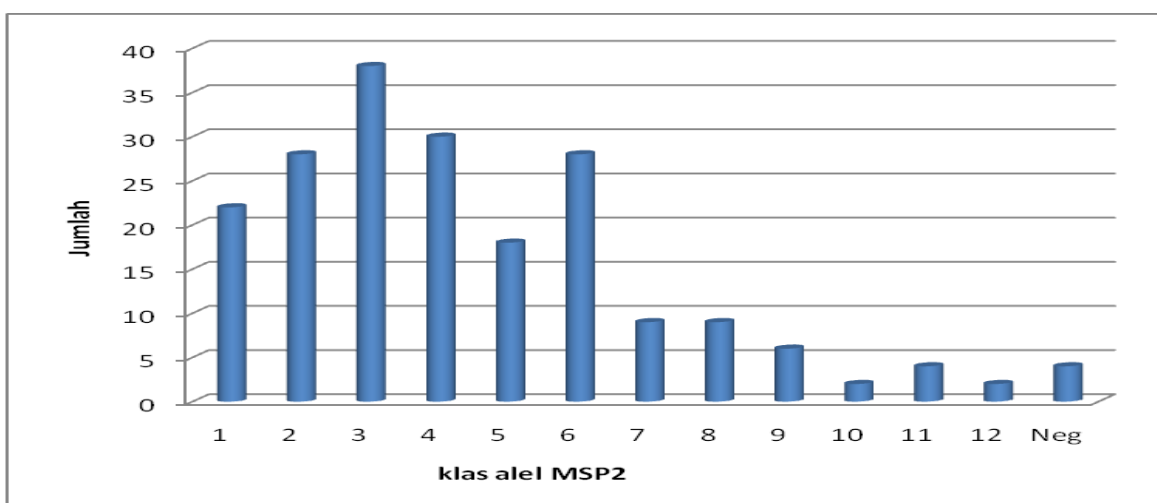
Lokus gen MSP2 mempunyai keragaman klas alel lebih banyak dibandingkan lokus gen lainnya. Secara keseluruhan jumlah alel lokus gen MSP2 yang teridentifikasi sebanyak 196 alel yang

terdiri dari 117 alel ditambah 79 yang merupakan alel ganda. Setelah diklasifikasikan, alel pada lokus gen MSP2 mempunyai 12 klas alel (nomor 1-12). Persentase terbanyak ditemukan pada klas alel nomor 3 diikuti nomor 4 dan nomor 2 atau 6 dengan panjang 480 - 519 bp, 520 – 559 bp dan 440 – 479 bp atau 600 639 bp (Grafik 2).

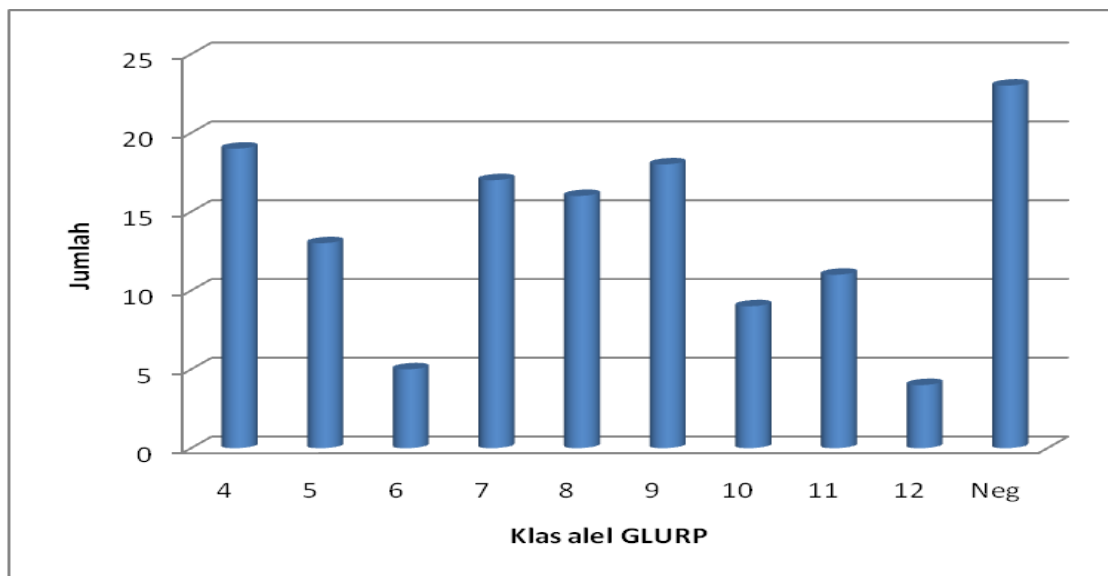
Pada lokus gen GLURP diidentifikasi 9 klas alel dari keseluruhan 112 alel yang terdiri dari 98 alel ditambah 14 yang merupakan alel ganda. Klas alel yang ditemukan adalah nomor 4 - 12 dengan kisaran panjang alel 520 – 1119 bp. Tiga klas alel terbanyak adalah nomor 4 diikuti nomor 9 dan 7 dengan panjang 580 – 639 bp, 880 – 939 bp dan 760 – 819 bp. Tidak ditemukan alel dengan panjang kurang dari 520 bp (Grafik 3).



Grafik 1. Keragaman Klas Alel *P. falciparum* Lokus Gen MSP1 pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi (n = 121)



Grafik 2. Keragaman Klas Alel *P. falciparum* Lokus Gen MSP2 pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi (n = 196)



**Grafik 3. Keragaman Alel *P. falciparum* Lokus Gen GLURP pada Penderita Malaria di Kalimantan dan Sulawesi (n = 112)**

### Pembahasan

Identifikasi genotip berdasarkan lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP banyak digunakan untuk mengetahui keragaman genetik *P. falciparum* dalam populasi, karena ketiga lokus gen tersebut mempunyai variasi alel yang cukup banyak.<sup>5-9</sup> Selain itu ketiga gen tersebut juga merupakan kandidat vaksin yang potensial sehingga banyak dipelajari untuk pengembangan vaksin di masa mendatang. Dalam studi monitoring obat, identifikasi alel lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP digunakan untuk membedakan kasus gagal obat karena infeksi yang lama kambuh kembali atau karena infeksi baru.<sup>7-12</sup> Dari 116 uji klinik yang dilakukan selama tahun 1997- 2007 ditunjukkan bahwa 97% menggunakan lokus gen MSP2, 78% MSP1, 53% GLURP dan 53% dengan ketiga lokus gen tersebut.<sup>17</sup> Diantara ketiga lokus gen tersebut, MSP2 merupakan lokus gen yang paling akurat untuk membedakan penyebab kasus gagal obat.<sup>18</sup> Walaupun demikian penggunaan lebih dari satu marker genetik memang disarankan karena dapat mengurangi kesalahan dalam klasifikasi penyebab gagal obat, terutama di daerah dengan transmisi malaria tinggi dimana variasi genotip sangat banyak.<sup>12,16</sup>

Pada penelitian ini identifikasi genotip *P. falciparum* terhadap ketiga lokus gen (MSP1, MSP2 dan GLURP) belum menunjukkan hasil yang diharapkan karena hanya 71,90% sampel yang menunjukkan adanya ketiga lokus gen tersebut.

Meskipun telah dilakukan pengulangan namun ternyata masih ditemukan hasil yang negatif, terutama lokus gen MSP1 dan GLURP. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh konsentrasi DNA dan atau jumlah parasit. Konsentrasi DNA dipengaruhi oleh kualitas spesimen, volume spesimen dan jenis spesimen (spot darah kering atau darah vena). Batas minimal parasit untuk identifikasi ketiga lokus gen tersebut adalah 50 – 100 parasit per reaksi PCR, terutama untuk spesimen yang berasal dari lapangan.<sup>17</sup> Jumlah parasit pada penelitian ini sangat bervariasi antara 20-122.413 parasit/ $\mu$ l darah sehingga memerlukan pengenceran yang sesuai, meskipun pada pemeriksaan sebelumnya dengan menggunakan sampel lain menunjukkan bahwa pengenceran sampel DNA 5 kali ternyata memberikan hasil yang cukup baik.

Brockman, dkk<sup>14</sup> menyatakan bahwa sensitifitas amplifikasi PCR terhadap ketiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP dapat mencapai 3 parasit/ml darah atau setara dengan 0,04 IRBC/500 leukosit. Meskipun demikian hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP berhasil diidentifikasi pada masing-masing sampel. Penelitian serupa yang dilakukan di Uganda menunjukkan keberhasilan identifikasi genotip yang cukup baik mencapai 99%, 96% dan 98% untuk lokus MSP1, MSP2 dan GLURP.<sup>18</sup>



Jumlah alel pada masing-masing lokus gen ternyata bervariasi, terutama pada MSP2 dan GLURP dimana ditemukan dua alel, sedangkan untuk MSP1 hanya ditemukan satu alel. Hasil ini sedikit berbeda dengan parasit *P. falciparum* yang ditemukan di Thailand dimana jumlah alel ketiga lokus gen tersebut lebih dari satu alel, bahkan untuk MSP2 ditemukan sebanyak tiga alel.<sup>14</sup> Beberapa penelitian serupa menunjukkan bahwa MSP2 merupakan lokus gen yang sangat polimorfik dengan banyak variasi alel sehingga baik digunakan untuk petanda adanya infeksi multi genotip dan untuk membedakan alel secara individual.<sup>5,6</sup>

Analisis jumlah alel pada ketiga lokus gen MSP1, MSP2 dan GLURP menunjukkan bahwa persentase infeksi multi genotip ternyata lebih besar daripada infeksi satu genotip yaitu sebesar 65.52% dan 34.48%. Hal ini menunjukkan bahwa genotip *P. falciparum* yang terdapat pada populasi di lokasi penelitian cukup banyak dan bervariasi. Hal serupa dijumpai di Gabon dimana ditemukan 21,4% dari 42 anak penderita malaria disebabkan oleh infeksi satu genotip *P. falciparum* (SGI/ *Single Genotype Infection*) dan 78,6% karena infeksi multi genotip (MGI/*Multiple Genotype Infection*).<sup>19</sup> Namun hasil tersebut berbeda dengan penelitian di Thailand yang menunjukkan bahwa infeksi satu genotip ternyata lebih dominan (70%) dibandingkan dengan infeksi multi genotip (30%).<sup>14</sup> Penelitian di Iran juga menyatakan bahwa hanya 30% infeksi disebabkan oleh dua atau lebih genotip *P. Falciparum*.<sup>11</sup>

Meskipun persentase multi infeksi di beberapa negara cukup tinggi, namun berdasarkan penelitian di Gabon yang menghubungkan antara multi infeksi dengan *cytoadherence* (perlekatan eritrosit yang terinfeksi parasit) menunjukkan bahwa multi infeksi ternyata tidak berpengaruh secara bermakna terhadap *cytoadherence* atau keparahan penyakit malaria.<sup>19</sup> Keparahan penyakit malaria juga tidak dipengaruhi oleh jenis genotip tertentu dan banyaknya genotip *P. falciparum* yang menginfeksi.<sup>19</sup> Akan tetapi penelitian Amodu<sup>21</sup> di Nigeria pada 223 anak dengan gejala klinis malaria yang berbeda menunjukkan bahwa, karakteristik genotip *P. falciparum* terutama pada lokus gen MSP1, ternyata mempunyai peranan terhadap keparahan penyakit malaria. Adanya alel K1 dan MAD20 pada lokus gen MSP1 berpengaruh secara bermakna terhadap malaria asimtomatis sehingga menurunkan risiko pada

malaria simptomatis. Demikian juga pada lokus gen MSP2, infeksi multi genotip pada anak penderita malaria ternyata mempunyai risiko yang lebih kecil

untuk menjadi malaria berat bila dibandingkan dengan mono infeksi, terutama dengan adanya alel FC27 pada lokus gen MSP2.<sup>22</sup>

Alel yang ditemukan dengan panjang bervariasi yaitu 400 – 719 bp (MSP1), 400 – 880 bp (MSP2) dan 580 – 1119 bp (GLURP). Dengan pengelompokan alel menurut Brockman dkk,<sup>14</sup> ditemukan cukup banyak variasi panjang basa alel pada masing-masing lokus gen. Variasi terbanyak ditemukan pada lokus gen MSP2 sebanyak 12 alel, GLURP 9 alel dan MSP1 7 alel. Hasil serupa ditemukan juga di Iran,<sup>11</sup> Thailand<sup>14</sup> dan Afrika<sup>16</sup>. Di Tanzania dari 4 studi yang serupa telah ditemukan 82 alel pada lokus gen MSP2<sup>5</sup> atau 116 alel dari beberapa studi di negara sub Sahara Afrika.<sup>8</sup> Meskipun demikian masing-masing penelitian ternyata menggunakan metode atau pengelompokan panjang alel yang kemungkinan tidak sama.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa identifikasi ketiga lokus gen *P. falciparum* yaitu MSP1, MSP2 dan GLURP ditemukan pada 71,90% sampel. Lokus gen MSP2 sebagian besar mempunyai 2 alel lebih banyak dibandingkan GLURP dan MSP1. Infeksi multi genotip *P. falciparum* lebih dominan (65,52%) dibandingkan infeksi satu genotip. Variasi alel MSP2 lebih banyak dibandingkan MSP1 dan GLURP. Sebagian besar alel pada lokus gen MSP1 mempunyai panjang; 440 - 479 bp, MSP2: 480 – 519 bp dan GLURP: 580 – 639 bp.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kepala Global Fund yang telah memberikan dana untuk terlaksananya penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Dinkes Propinsi Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah, Kalimantan Tengah dan Kalimantan Barat; Dinkes Kabupaten Minahasa Tenggara, Sigi, Katingan dan Pontianak beserta seluruh staf Puskesmas yang terkait dalam penelitian ini, atas semua dukungan dan kerjasama yang baik selama penelitian ini dilaksanakan.

### Daftar Pustaka

1. Tjitra E, Gunawan S, Laihad F, Marwoto H, Sulaksono S, Arjoso S, Richie TL, Manurung N. Evaluation of Antimalaria Drugs in

- Indonesia, 1981-1995. Bull Health Studies.1997;25(1):27-58.
2. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. 2008
  3. Tjitra E dkk. Community based chemotherapeutic study to improve of the management of drug drug resistant malaria in Timika, Papua. Progress report. National Institute of Health Research and Development, Ministry of Health, Republic of Indonesia, Jakarta, Indonesia. Oktober, 2005b
  4. Hasugian AR, Purba HLE, Kenangalem E, Wuwung RM, Ebsworth EP, Maristela R, Penttinen PMP, Laihad F, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. CID.2007; 44:1067-74.
  5. Felger I, Irion A, Steiger S, Beck HP. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999 Feb; 93 Suppl 1:3-9. (abstrak)
  6. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L, Mercereau-Puijalon O, Ranford-Cartwright LC, Rubio JM, Snounou G, Walliker D, Zwetyenga J, do Rosario VE. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 Mar-Apr; 95(2):225-32. (abstrak)
  7. World Health Organization. Methods Surveillance of Antimalarial Drug Efficacy. France. 2009
  8. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, Felger I, Iliario P and Mugittu K. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. Malaria Journal. 2011;10:79
  9. Kiwanuka, G. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997–2007. J Vector Borne Dis. 2009;46:1-12
  10. Marfurt J and Brockman Al. Genotyping Protocols for *P falciparum* ad *P vivax*. Materi Workshop Molekuler yang disampaikan tanggal 19 – 30 May 2008 di Badan Litbangkes
  11. Heidari A, Keshavaraz H, Rokni M B and Jelinek T. Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of *Plasmodium falciparum* in a major endemic region of Iran. Korean Journal of Parasitology. 2007;45 (1): 59-63
  12. Ohrt C, Mirabelli-Primdahl L, Karnasuta C, Chantakulkij S and Kain K, Distinguish *Plasmodium falciparum* Treatment Failure from Reinfections by Restriction Fragment Length Polymorfism and Polymerase Chain Reaction. Am J Trop Med Hyg. 1997.57(4)
  13. Schoepfli S, ValsangiacomoF, Lin E, Kiniboro B, Mueller I and Felger I. Comparison of *Plasmodium falciparum* allelic frequency distribution in different endemic settings by high-resolution genotyping. Malaria Journal. 2009, 8:250
  14. Brockman A, Paul R E L, Anderson T J T Hackford I, Phaihun L, Looareesuwan , Nosten F and Day. K P. Application of Genetic Markers to the Identification of Recrudescens *Plasmodium falciparum* infections on the Northwestern Border of Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 60(1):14–21
  15. Muggitu K. Adjuik M, Snounou G, Ntouni F, Taylor W, Mshinda H, Olliaro P and Beck HP. Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of *Plasmodium falciparum* malaria conducted in Sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. Tropical Medicine and International Health. 2006;11(9):1350–1359
  16. Greenhouse B, Dokomajilar C, Hubbard A, Rosenthal P and Dorsey G. Impact of Transmission Intensity on the Accuracy of Genotyping To Distinguish Recrudescence from New Infection in Antimalarial Clinical Trials. American Society for Microbiology. 2007;51(9):3096 - 3103
  17. WHO. Genotyping to Identify Parasite Populations. WHO meeting, Amsterdam 29-31 May 2008
  18. Cattamanchi, A, Kyabayinze D, Hubbarad A, Rosenthal PJ and Dorsey G. Distinguishing

- 
- 
- Recrudescence From Reinfection in a Lungitudinal Antimalarial Drug Efficacy Study: Comparison of Result Based on Genotyping of MSP1, MSP2 and GLURP. *Am J Trop Med. Hyg.* 2003; 68(2): 133-139
19. Fousseyni S, Touré, Odile Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, Jérôme Mezui-Me-Ndong, Guy Roger Ndong-Atome,Ulrick Bisvigou, Dominique Mazier, and Sylvie Bisser. Cytoadherence and Genotype of *Plasmodium falciparum* Strains from Symptomatic Children in Franceville, Southeastern Gabon. *Clinical Medicine & Research.* 2007;5 (2):106-113
20. Durant R, Arie F, Cojean S, Fontanet A, Ranaivo L, Ranarivelo LA, Vonimpaisomihanta JA, Menard D, Pietra V, Le Bras J, Modiano D and Randrianarivejosia M. Analysis of circulating populations of *Plasmodium falciparum* in mild and severe malaria in two different epidemiological patterns in Madagascar. *Tropical Medicine and International Health.* 2008;13 (11): 1392 - 1399
21. Amodu, O. K, Odeyemo AA, Ayoola OO et al. Genetic diversity of the msp-1 locus and symptomatic malaria in south-west Nigeria. *Acta Trop.* 2005;95:226-32 (abstrak)
22. Amodu O, K.Oyedeki S. INtouni F et al. Complexity of the msp2 locus and the severity of childhood malaria, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.*2008;102:95-102 (abstrak)