



PLA 1

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Polimorfisme Human Leucocyte Antigen Penderita Malaria dengan Gejala Klinis Berbeda di Daerah Endemis Malaria di Kalimantan (tahap 1)

Disusun oleh :

Dra. Sarwo Handayani, MSc dkk

Puslitbang Bioemedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Badan Litbang Kesehatan

Jakarta 2010

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

PERPUSTAKAAN

Tanggal : 18 - 3 - 2013

No. Induk : _____

No. Klass : 65
BmF

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan Yang maha Esa, atas segala rahmat dan karunia yang telah Dia limpahkan sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman Human Leucocyte Antigen penderita malaria dengan gejala klinis berbeda di daerah endemis malaria di Kalimantan. Penelitian direncanakan 3 tahun, dan pada tahap pertama ini kegiatan yang dilakukan adalah pengumpulan sampel malaria dari rumah sakit dan melalui survei darah masal, pemeriksaan molekuler malaria dan optimasi teknik pemeriksaan HLA.

Selama ini pemeriksaan HLA masih sedikit dilakukan, dengan penelitian awal ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang teknik pemeriksaan HLA secara molekuler, sehingga nantinya dapat digunakan untuk mengidentifikasi keragaman HLA yang ada di Indonesia.

Masukan dan saran sangat diharapkan demi perbaikan laporan dan penelitian kami.

Terima kasih,

Penyusun

ABSTRAK

Tipe Human Leucocyte Antigen (HLA) merupakan faktor genetik manusia yang dapat mempengaruhi tingkat kesakitan malaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman HLA penderita malaria dengan gejala klinis yang berbeda di daerah endemis malaria di Kalimantan. Tujuan pada tahun 1 adalah pengumpulan sampel malaria dengan gejala klinis malaria yang berbeda, mengidentifikasi karakteristik penderita malaria, konfirmasi pemeriksaan parasit secara molekuler dan melakukan optimasi teknik pemeriksaan HLA.

Sampel malaria dikumpulkan dari pasien malaria yang berobat ke RSUD Doris Sylvanus Palangkaraya pada bulan Juni – Desember 2010 dan dari kegiatan Mass Blood Survey (MBS) di Kabupaten Katingan dan Kapuas.

Hasil penelitian menunjukkan 8.0% dari 87 pasien malaria di RS adalah malaria berat berdasarkan data rekam medik. Dari kegiatan MBS ditemukan 16 penderita malaria dari 843 penduduk yang diperiksa. Sebagian besar penderita malaria adalah laki-laki dan kisaran umur penderita malaria adalah 8 bulan – 70 tahun. Gejala Klinis yang banyak dijumpai adalah demam, mual, menggigil dan muntah dan sebanyak 43% penderita malaria dari MBS menyatakan tidak merasakan gejala malaria.

Hasil pemeriksaan mikroskopis dan molekuler menunjukkan bahwa *Plasmodium falciparum* (>60%) lebih dominan daripada *P vivax*. Mutasi gen *Y976F Pvmdr1* yang berkaitan dengan resistensi *P vivax* terhadap klorokuin pada sampel Papua ditemukan sebanyak 34%. Optimasi pemeriksaan HLA dengan kit oneLambda pada 40 sampel mendapatkan 97.5% belum menunjukkan hasil yang positif pada lokus HLA-B. Alel homozigot ditemukan sebanyak 20% pada lokus HLA-DQA1 (DQA1*01:02), 7.5% pada lokus HLA-DQB1 (HLA-DQB1*02:02, HLA-DQB1*05:02 dan HLA-DQB1*06:01) dan 2.5% pada HLA-DRB1 (HLA-DRB1*15:01). Alel yang dominan adalah HLA-DQA1*01 (52.5%), HLA-DQB1*03 (23.75%) dan HLA-DRB1*15 (43.75%).

Polidormisme HLA belum dapat disimpulkan karena sampel yang diperiksa terbatas dan masih dalam tahap optimasi. Pemeriksaan lanjutan disarankan menggunakan Kit HLA/metode yang lebih simpel dan spesifik untuk orang Asia sehingga alel HLA dapat terdeteksi. Penambahan jumlah sampel untuk tahap selanjutnya diperlukan untuk memperoleh data keragaman HLA yang lebih lengkap.

RINGKASAN EKSEKUTIF

Malaria masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama di Indonesia, walaupun upaya pengendaliannya telah dilakukan dengan baik. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa selain faktor dari luar, tampaknya ada faktor genetik manusia yang juga berpengaruh terhadap kejadian malaria dan kemungkinan berkembangnya malaria menjadi berat.

Human Leucocyte Antigen (HLA) merupakan HLA marker informasi genetik, terletak pada bagian lengan pendek kromosom 6 yang mengandung gen pengatur ekspresi antigen, gen pengatur respon imun dan gen penentu kepekaan terhadap kelainan imunologik. Molekul HLA membantu mempresentasikan antigen asing oleh *Antigen Presenting Cells* (APC) sehingga dikenali oleh sel limfosit T yang berperan dalam respon imun. HLA terdiri dari HLA kelas 1 dan kelas 2 yang masing-masing terbagi menjadi tipe HLA yang lebih spesifik.

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi tipe HLA penduduk di daerah endemis malaria di Kalimantan dan juga penderita malaria hubungannya dengan tingkat keparahan penyakit dan respon imun. Kegiatan pada tahap 1 adalah pengumpulan sampel malaria dengan gejala klinis malaria yang berbeda, mengidentifikasi karakteristik penderita malaria dan gejala klinis serta melakukan optimasi teknik pemeriksaan HLA dan respon imun.

Sampel malaria dikumpulkan dari pasien malaria yang berobat ke RSUD Doris Sylvanus, Palangkaraya pada bulan Juni – Desember 2010 dan dari survei darah masal (MBS) di wilayah Propinsi Kalimantan Tengah. Jumlah sampel positif malaria dari rumah sakit sebanyak 119 sampel, namun rekam medik yang dapat ditemukan hanya 87 pasien yang selanjutnya digunakan untuk analisa. Sampel MBS sebanyak 843 penduduk, namun hanya 16 sampel yang ditemukan positif malaria. Sebagian besar penderita malaria adalah laki-laki dan kisaran umur penderita malaria adalah 8 bulan – 70 tahun. Gejala klinis yang banyak dijumpai adalah demam, mual, menggigil dan muntah dan sebanyak 43% penderita malaria dari MBS menyatakan tidak merasakan gejala malaria.

Hasil pemeriksaan mikroskopis dan molekuler menunjukkan bahwa spesies parasit yang dominan adalah *Plasmodium falciparum* (>60%). Ditemukan 8.0% pasien RS dengan malaria berat. Mutasi gen Y976F *Pvmdr1* yang berkaitan dengan resistensi *P vivax* terhadap klorokuin pada sampel Papua, ditemukan sebanyak 34% dari sampel vivax di RS. Optimasi pemeriksaan HLA (kit HLA onelambda) pada 40 sampel dengan kriteria klinis malaria yang berbeda menunjukkan 97.5% lokus HLA-B belum terdeteksi karena menunjukkan hasil negatif. Pemeriksaan pada lokus lain belum menunjukkan hasil yang spesifik karena ditemukan variasi alel lebih dari satu sehingga diperlukan pemeriksaan lanjutan. Meskipun demikian ditemukan Alel homozigot pada lokus HLA-DQA1 sebanyak 8/40 (20%) yaitu alel DQA1*01:02, sedangkan pada lokus DQB1 sebanyak 3/40 (7.5%) yaitu alel HLA-DQB1*02:02, HLA-

DQB1*05:02 dan HLA-DQB1*06:01. Ditemukan 1/40 (2.5%) alel homzigot HLA-DRB1 yaitu HLA-DRB1*15:01. Alel HLA-DQA1 dominan adalah HLA-DQA1*01 (52.5%) dan HLA-DQA1*06:01 (20%). Sedangkan alel HLA-DQB1 yang dominan adalah HLA-DQB1*03 (23.75%). Untuk alel HLA-DRB1 dominan adalah HLA-DRB1*15 (43.75%).

Polimorfisme alel HLA belum dapat disimpulkan karena selain masih tahap optimasi teknik pemeriksaan HLA, jumlah sampel masing-masing kelompok malaria sangat kecil (7-11 sampel). Disarankan untuk pemeriksaan HLA selanjutnya menggunakan Kit HLA atau metode yang lebih simpel dan spesifik untuk alel HLA orang Asia sehingga alel HLA dapat terdeteksi. Penambahan jumlah sampel untuk tahap selanjutnya diperlukan untuk memperoleh data keragaman HLA yang lebih lengkap.

DAFTAR ISI

	hal
Halaman Judul	
Kata Pengantar	1
Abstrak	2
Ringkasan eksekutif	3
Daftar isi	5
Daftar table	6
Daftar grafik	7
Daftar gambar	8
Pendahuluan	9
Tujuan	11
Metodologi	12
Hasil dan Pembahasan	20
Kesimpulan dan Saran	32
Ucapan Terima Kasih	33
Daftar Pustaka	34
Lampiran	35
Daftar tim peneliti	
Pengesahan oleh PPI	
Persetujuan etik penelitian	
Ijin penelitian dari Kemendagri RI	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakteristik penderita malaria di Rumah Sakit	21
Tabel 2. Batas normal parameter hematologi (RS)	22
Tabel 3. Karakteristik umur sampel MBS	22
Tabel 4. Karakteristik penderita malaria sampel MBS	24
Tabel 5. Jenis malaria pasien RS menurut diagnosa dokter	24
Tabel 6. Persentase penderita malaria sampel MBS per desa	24
Tabel 7. Manifestasi gejala klinis penderita malaria di RS dan MBS	25
Tabel 8. Konfirmasi pemeriksaan spesies dengan PCR	26
Tabel 9. Deteksi gen Y976F Pvm _{dr1}	27
Tabel 10. Persentase alel homozigot lokus HLA B, DQA1, DQB1 dan DRB1 (n=40)	29
Tabel 11. Frekuensi alel HLA lokus B, DQA1, DQB1 dan DRB1 (2n=80)	31

DAFTAR GRAFIK

Grafik 1. Hasil pemeriksaan hematologi penderita malaria di Rumah Sakit	21
Grafik 2. Karakteristik jenis kelamin sampel MBS	23
Grafik 3. Karakteristik suku sampel MBS	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Spesiasi <i>P. falciparum</i> dan <i>P. vivax</i>	26
Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA pada lokus HLA- B	28
Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA pada lokus HLA-DQ, HLA-DR dan HLA-B	28

PENDAHULUAN

I. LATAR BELAKANG.

Sampai saat ini malaria masih merupakan salah satu isu kesehatan global. Diperkirakan 500 juta kasus malaria terjadi setiap tahun dengan kematian 1.5 - 2.7 juta (1). Daerah-daerah endemis malaria banyak terdapat di negara-negara miskin, terutama di daerah *remote*. Di Indonesia, beberapa daerah endemis malaria ditemukan tersebar terutama di luar Pulau Jawa.

Program pengendalian malaria di Indonesia dilakukan melalui deteksi dini, pengobatan kasus malaria yang cepat dan efektif, surveilan yang baik dan pengendalian vektor malaria (2). Meskipun upaya ini sudah dilakukan cukup baik, namun kasus malaria masih banyak ditemukan demikian juga dengan kasus malaria berat. Kemungkinan hal ini disebabkan karena faktor lain yang tidak bisa dikendalikan melalui program pengendalian malaria, seperti faktor internal individu misalnya faktor genetik dan respon imun.

Di daerah endemis malaria, infeksi yang terjadi berulang kali akan menimbulkan respon imun pada penderita yang kemungkinan dapat menurunkan angka kesakitan dan kematian akibat malaria (3). Respon imun terhadap malaria dipengaruhi oleh faktor individu dan lingkungan. Respon imun yang didapat meliputi respon imun seluler dan humoral. Respon imun seluler oleh sel limfosit T *Cluster of Differentiation* (CD) 4+ dan CD8+ mempunyai peranan penting dalam memberikan perlindungan (proteksi) terhadap penyakit malaria. Limfosit T ini akan mengenal antigen asing apabila antigen tersebut dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cells* (APC) bersamaan dengan molekul *Human Leukocyte Antigen* (HLA) (4,5).

HLA atau sering disebut juga *Major Histocompatibility Complex* (MHC) merupakan marker informasi genetik yang terletak pada bagian lengan pendek kromosom 6, yang mengandung gen pengatur ekspresi antigen, gen pengatur respon imun dan gen penentu kepekaan terhadap kelainan imunologik. Kelompok protein HLA terdapat pada permukaan sel berinti yaitu sel darah putih dan sel lain yang berperan dalam respon imun. Sebanyak 7 lokus genetik telah diketahui, yaitu HLA-A, HLA-B dan HLA-C yang termasuk HLA kelas 1 dan HLA-D, HLA-DR, HLA-DQ dan HLA-DP yang termasuk HLA kelas 2. HLA kelas 1 berperan dalam penolakan jaringan transplantasi dan sitolisis sel yang terinfeksi virus, sedangkan HLA kelas 2 berperan terhadap timbulnya respon imun. Pada setiap lokus genetik tersebut dijumpai satu atau lebih bentuk alternatif antigen yang disebut alel. Setiap alel akan menentukan produk HLA yang terdapat pada permukaan sel dan membawakan suatu ciri antigen. Adanya polimorfisme HLA baik kelas 1 maupun kelas 2 akan mempengaruhi respon imun yang ditimbulkan (5).

Beberapa penyakit diduga ada kaitannya dengan HLA, namun penyebab fenomena tersebut belum diketahui dengan pasti (6). Pada penyakit malaria, variasi gen HLA kelas 1 terutama HLA-B dapat membantu respon sistem imun menjadi lebih efektif terhadap parasit. Individu dengan HLA-B53 ternyata lebih tahan terhadap infeksi malaria sehingga mencegah terjadinya malaria berat. Individu dengan HLA-B53 banyak dijumpai pada etnis tertentu di Afrika Barat (5,7).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa HLA kelas 2 juga berkaitan dengan respon imun terhadap malaria. HLA-DRB1 dan HLA-DQB1 yang ditemukan pada penderita malaria ternyata berhubungan dengan kerentanan individu tersebut terhadap malaria berat (7,8).

Kalimantan merupakan daerah yang strategis dan spesifik yang berbatasan dengan Malaysia. Selain penduduknya yang heterogen dengan adanya pertambangan, perkebunan dan perkayuan, Kalimantan juga merupakan daerah endemis malaria dan fokus penelitian malaria dari Global Fund. Adanya heterogenitas penduduk yang berkaitan dengan sifat genetik, memungkinkan tingkat imunitas dan manifestasi klinis yang berbeda apabila terinfeksi malaria.

Untuk mengetahui keanekaragaman HLA pada populasi di daerah endemis malaria di Kalimantan dan hubungannya dengan respon imun maka akan dilakukan penelitian awal pada kelompok penderita malaria yang tinggal di daerah tersebut. Penelitian ini meliputi lima aspek penelitian yaitu aspek karakteristik demografi penderita malaria, manifestasi klinis, diagnosis parasit malaria dengan teknik konvensional dan molekuler, polimorfisme HLA dan aspek respon imun penderita malaria. Penelitian dibagi dalam 3 tahap yaitu tahap pertama adalah pengumpulan spesimen, mengetahui gambaran umum penderita malaria baik demografis maupun klinis, diagnosis parasit secara konvensional dan molekuler dan pemantapan (establish) teknik pemeriksaan HLA. Tahap kedua adalah pengumpulan spesimen (japabila target sampel pada tahap pertama belum tercapai), pemeriksaan HLA dan respon imun, analisa dan kesimpulan untuk menghasilkan suatu rekomendasi, dan tahap ketiga adalah validasi dan kemungkinan aplikasi untuk daerah lain.

II. MANFAAT

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan data tentang keragaman HLA dan respon imun pada penderita malaria. Diketuinya keanekaragaman tipe HLA pada penderita malaria di daerah endemis dan hubungannya dengan tingkat keparahan penyakit dan gambaran respon imun, diharapkan akan dapat lebih memahami pengetahuan tentang patogenesis malaria dari aspek *host* dan *agent*. Selain itu kemungkinan HLA bisa dijadikan sebagai faktor prediktor manifestasi klinis malaria.

TUJUAN

Tujuan Umum

Menentukan tipe HLA penduduk daerah endemis malaria di Indonesia dan penderita malaria hubungannya dengan tingkat keparahan penyakit dan respon imun

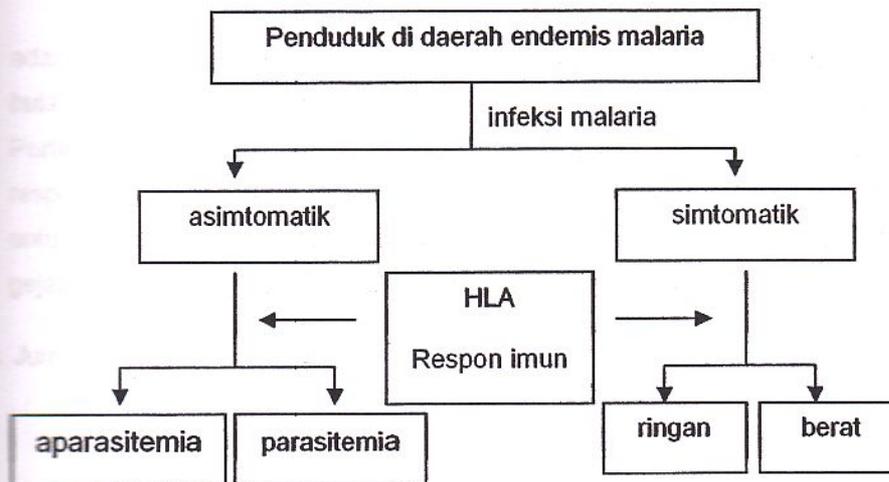
Tujuan Khusus :

Tahap 1:

- Mengidentifikasi karakteristik demografi penderita malaria
- menghitung proporsi kesakitan malaria dan jenis parasit
- mengidentifikasi manifestasi klinis penderita malaria
- Mengidentifikasi spesies parasit malaria secara molekuler
- memantapkan teknik-teknik pemeriksaan tipe HLA

METODOLOGI

1. Kerangka Konsep



2. Desain dan jenis penelitian

- a. Desain penelitian : potong lintang dengan survei
- b. Jenis penelitian : observasi klinis dan laboratoris

3. Tempat dan waktu :

Penelitian dilakukan di Propinsi Kalimantan Tengah dengan pertimbangan bahwa penduduknya heterogen dan merupakan daerah endemis malaria dengan *Annual Malaria Incidence (AMI)* tahun 2006 sebesar 16.35 ‰ dan *Annual Parasite Incidence (API)* sebesar 3.35 ‰ (PPM PLP). Lokasi penelitian adalah RSUD Doris Sylvanus Palangkaraya yang merupakan rumah sakit rujukan dimana kasus malaria dengan tingkat keparahan yang berbeda kemungkinan ditemukan dan juga melalui survey darah masal (MBS). MBS dilakukan di Kabupaten Kasongan dan Kapuas berdasarkan laporan kasus malaria di kabupaten tersebut cukup banyak dan daerahnya dapat dijangkau. Di kabupaten Kasongan, MBS dilakukan di desa Tumbang Kalemei wilayah Puskesmas Tumbang Samba. Sedangkan di Kabupaten Kapuas, MBS dilakukan di tiga desa yaitu Lungkoh Layang, Danau Pantau dan Timpah, masuk wilayah Puskesmas Timpah.

Pemeriksaan sampel mikroskopis dilakukan di lapangan, pemeriksaan molekuler parasit malaria, tipe HLA dilakukan di Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Badan Litbang Kesehatan Jakarta.

Penelitian dilakukan selama 10 bulan pada tahun 2010

4. Sampel penelitian :

a Populasi adalah semua penduduk yang tinggal di daerah terpilih (daerah *High Case incidence* atau *Medium Case Incidence*)

b. Sampel untuk *Mass Blood Survey* (MBS)

adalah penduduk laki-laki dan perempuan, usia > 5 tahun, tinggal di daerah endemis malaria ≥ 6 bulan, bersedia berpartisipasi dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*. Pertimbangan sampel adalah penduduk diatas usia 5 tahun karena secara umum pada usia tersebut respon imun telah terbentuk sempurna (humoral dan seluler) dan secara etis lebih memungkinkan untuk pengambilan sampel darah pada sampel. Pada sampel MBS juga dilakukan wawancara tentang gejala klinis malaria yang saat itu sedang dialami (bila ada).

c. Jumlah sampel MBS dihitung dengan rumus dari Lemeshow dkk., 1990 (9).

$$N = \frac{(Z)^2 \times (p \times q)}{d^2}$$

Diasumsikan prevalensi malaria adalah (p) = 10%, maka dengan tingkat kepercayaan 95% dan persisi sebesar 5%, dan *confidence interval* = 95%, nilai Z = 1,96, perhitungan jumlah sampel sebagai berikut :

$$N = \frac{(3,8416) \times (0,1 \times 0,9)}{0,0025} = 200 \text{ sampel}$$

Jumlah sampel MBS sebanyak 200 /desa dan diperkirakan daerah yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 5 desa sehingga besar sampel untuk MBS adalah $5 \times 200 = 1000$ penduduk

d. Sampel untuk peneliti

Dipilih dari sampel MBS dan Rumah Sakit

Kriteria inklusi sampel :

1. Penderita malaria dengan gejala klinis (simtomatis) Pf atau Pv (berdasarkan hasil mikroskop di lapangan)
2. Penderita malaria berat Pf atau Pv
3. Penderita malaria tanpa gejala klinis (asimptomatis) Pf atau Pv

4. Individu tanpa gejala klinis dan negatif malaria mikroskopis (sehat)
5. Umur 5 tahun atau lebih
6. Menandatangani informed consent

Kriteria eksklusi sampel :

Tidak bersedia menandatangani informed consent

5. Cara pengumpulan data dan sampel

- a. Sampel MBS dilakukan melalui survei di masyarakat berupa wawancara dan pengambilan darah tepi sebanyak 100 ul untuk pemeriksaan mikroskopis malaria. Selanjutnya sampel yang terpilih sesuai kriteria inklusi akan diambil darah venanya sekali sebanyak 3 cc yang dilakukan secara aseptis. Spesimen darah tersebut akan digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis ulangan, pemeriksaan molekuler parasit dan tipe HLA (*dried blood spot* dan whole blood: 1 ml), dan pemeriksaan respon imun (plasma: 2 ml).

Pada kegiatan MBS pemeriksaan mikroskopis dilakukan di lapangan. Pengumpulan sampel *dried blood spot* untuk pemeriksaan molekuler dan tipe HLA dilakukan dengan cara meneteskan 15 µl darah pada kertas filter yang dilakukan secara duplikat. Sampel diberi nomor/kode penderita dan dikeringkan di udara / suhu kamar kemudian dimasukkan dalam kantong plastik bersilika gel. Kertas disimpan pada suhu kamar, untuk penyimpanan yang lama dilakukan pada -20°C sampai proses selanjutnya.

Spesimen whole blood digunakan sebagai alternatif jika spesimen *dried blood spot* kurang mencukupi. Plasma darah dipisahkan secara sentrifugasi dalam tabung yang mengandung EDTA/lithium heparin dan dilakukan di Rumah Sakit atau laboratorium terdekat. Penderita malaria positif mikroskopis akan diberikan pengobatan malaria sesuai program pengobatan standar.

Penderita malaria positif mikroskopis yang ditemukan diberikan pengobatan malaria sesuai program pengobatan standar yang digunakan.

- b. Sampel dari Rumah Sakit merupakan pasien malaria berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis laboratorium yang berobat ke RSUD Doris Sylvanus, baik rawat inap maupun rawat jalan. Jumlah sampel diperkirakan 150 sampel yang terdiri dari pasien malaria falciparum, vivax maupun campuran dengan gejala klinis malaria yang beragam mulai dari ringan sampai berat. Proporsi malaria falciparum, vivax dan campuran dipilih secara purposif yaitu 50 Pf, 50 Pv, 20 campuran dan 30 malaria berat. Spesimen yang dikumpulkan berupa spot darah kering dan plasma.

6. Jenis pemeriksaan laboratorium

- Pemeriksaan parasit malaria dilakukan secara mikroskopis yang merupakan standar baku pemeriksaan malaria.
- Pemeriksaan molekuler parasit dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) digunakan untuk konfirmasi pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan PCR untuk mengetahui spesies parasit dengan metode *multiplex single round Polymerase Chain Reaction* yang telah digunakan oleh *Menzies School of Health Research (MSHR)* dan dimodifikasi. Target amplifikasi DNA adalah gen *species-specific sequences* pada *small- subunit ribosomal RNA (SSUrRNA)*. Meskipun dengan metode multiplex, namun reaksi untuk masing-masing spesies dilakukan pada tabung yang berbeda karena sulit untuk membedakan spesies *P.falciparum* atau *P. vivax* dengan panjang pita yang hampir sama.

Primer yang digunakan untuk pemeriksaan spesiasi dengan urutan basa sebagai berikut:

Jenis Primer	Arah primer	Urutan basa	Jml basa
Universal (<i>revmal</i>)	<i>reverse</i>	GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCCC	22
<i>P. falciparum</i>	<i>forward</i>	AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG	24
<i>P.vivax</i>	<i>forward</i>	CGG CTT GGA AGT CCT TGT	18

Komposisi reagen PCR yang digunakan

Reagent	1 reaksi	Kons akhir
H ² O	32.55 µl	
10 x PCR buffer (without MgCl ₂)	5 µl	1x
dNTP mix (10 mM)	1 µl	200 µM
MgCl ₂ (25mM)	5 µl	3.0 mM
Rev Mal primer (10 µM each)	0.6 µl	6 pmol
Primer PF/PV (10 µM each)	0.6 µl	6 pmol
Tag DNA polymerase 5 U/µl	0.25 µl	1.25 U
Volume akhir (master mix)	45 µl	
Sampel DNA	5 ul	

Program PCR yang digunakan

Tahap PCR	Suhu dan lama inkubasi	Jml siklus
1	95 ° C – 10 menit	1
2	95 ° C – 45 detik	
	62 ° C – 90 detik	43
	72 ° C – 5 menit	

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 2% dengan voltase 100V selama 35 menit, dengan mengikutsertakan standar/ marker DNA yang sudah diketahui panjang basanya/ base pair (100 bp). Hasil elektroforesis produk DNA sampel akan menunjukkan panjang pita 300 bp untuk *P. falciparum* dan 276 bp untuk *P. vivax*

c. Deteksi strain mutan *P. vivax* Y976F pvmdr

P. vivax resisten terhadap klorokuin dapat dideteksi dengan adanya mutasi pada kodon 976 gen pvmdr yang menunjukkan perubahan asam amino tirosin (TAC=Y) menjadi fenilalanin (TTC=F). Metode yang digunakan adalah *single round primer mismatch* PCR menggunakan 3 primer yang dirancang untuk mendeteksi *wild type* (tipe normal). Salah satu primer adalah primer internal dengan basa "A" pada titik mutasi kodon 976 sehingga pada *P. vivax* yang *wild type* akan terjadi amplifikasi dengan primer internal dan terbentuk 2 pita dengan panjang 560 bp dan 400 bp. Sedangkan pada *P. vivax* tipe mutan karena tidak terjadi amplifikasi oleh primer internal maka hanya terbentuk 1 pita saja dengan panjang basa 560 bp.

Primer yang digunakan dengan urutan basa sebagai berikut.

<i>Pvmdr976Forward</i>	GGA TAG TCA TGC CCC AGG ATT G
<i>Pvmdr976Reverse</i>	CAT CAA CTT CCC GGC GTA GC
<i>Pvmdr976Wtinternal</i>	CGG CTG TAC TGA CCG GAA CGTA

Sedangkan komposisi reaksi PCR yang digunakan adalah

Reagent	1 reaksi	Kons akhir
H ₂ O	29.50 µl	
10 x PCR buffer (tanpa MgCl ₂)	5 µl	1x
dNTP mix (2 mM)	5 µl	200 µM
MgCl ₂ (25mM)	5 µl	2.5 mM
<i>Pvmdr976F</i> primer (10 µM)	1.25 µl	125 nM
<i>Pvmdr976R</i> primer (10 µM)	1.0 µl	100 nM
<i>PvmdrWTint</i> primer (10 µM)	1.0 µl	100 nM
Tag DNA polymerase 5 U/µl (AmpliTag Gold)	0.25 µl	1.25 U
Volume akhir master mix	48 µl	
DNA template	2.0 µl	
Volume akhir reaction	50 µl	

Program PCR yang digunakan:

Tahap PCR	Suhu dan lama inkubasi	Jml siklus
1	95 ° C – 10 menit	1
2	94 ° C – 40 detik	
	55 ° C – 60 detik	43
	72 ° C – 2 menit	
3	72 ° C – 5 menit	1

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 2% dengan penambahan etidium bromide, pada 100V selama 35 menit. Hasil visualisasi menunjukkan panjang pita 560 bp dan 400 bp untuk *P. vivax* yang tidak mengalami mutasi. Sedangkan *P. vivax* yang mengalami mutasi hanya terlihat 1 pita yaitu 560 bp.

d. Optimasi pemeriksaan tipe HLA dengan teknik PCR-Luminex.

Merupakan pemeriksaan DNA dengan teknik PCR berdasarkan *sequence-specific oligonucleotides* (SSO) yang dilanjutkan dengan deteksi *bead* mikro (butiran kecil) dan fluoresen dengan teknologi *Luminex XMAP*. Teknik ini cukup cepat dan dapat diandalkan karena selain mampu mendeteksi beberapa macam tipe HLA dalam sekali pemeriksaan, volume sampel yang diperlukan juga relatif lebih sedikit (10). Pemeriksaan HLA menggunakan kit PCR komersial untuk mengidentifikasi HLA kelas I (HLA B) dan HLA kelas II (HLA DQB1 dan atau HLA DRB1). Kedua HLA kelas II tersebut tersebut dipilih karena erat hubungannya dengan ras Asia dan sifat resistensi terhadap kejadian malaria berat (7,8). Pada tahap optimasi pemeriksaan tipe HLA hanya dilakukan pada sebagian spesimen yang telah dikumpulkan.

Kit HLA komersial yang digunakan adalah LabType SSO typing test (oneLambda Inc). Kit ini dipilih karena mempunyai luaran yang cukup lengkap dan volume DNA yang digunakan sedikit sehingga dapat diperoleh dari spesimen spot darah. Tahapan kerja pemeriksaan sesuai dengan petunjuk yang tersedia dalam kit yang meliputi amplifikasi DNA, netralisasi dan hibridisasi. Pada tahap amplifikasi, sampel DNA diperbanyak dengan 1 set primer yang sesuai dengan lokus HLA yang diperiksa kemudian dimasukkan pada mesin PCR dengan program sbb:

Step	suhu (C) dan waktu inkubasi (dt)	Ramp speed (mnt)	Jml siklus
1	96 C- 03.00		1
2	96 C- 00.20	3.00	5
	60C- 00.30	3.00	
	72C- 00.30	3.00	
3	96C- 00.10	3.00	30
	60C- 00.25	3.00	
	72C- 00.30	3.00	
4	72C- 10.00		1
5	4C- forever		1

Selanjutnya ditambahkan buffer denaturasi dan netralisasi (tersedia dalam kit). Tahap hibridisasi dengan menambahkan *bead/microsphere* yang telah dilapisi dengan probe (biotin) kemudian ditambahkan R-picoeritrin yang dikonjugasikan dengan streptavidin (SAPE). Hasil dapat dideteksi setelah dilakukan pembacaan dengan mesin luminex yang menunjukkan besarnya Mean Fluorescence Intensity (MFI). Hasil dianalisa dengan menggunakan program HLA Fusion 2 (One Lambda). Berdasarkan cutoff kontrol positif maka diketahui variasi alel pada masing-masing lokus HLA dari sampel.

7. Pertimbangan Etik penelitian

Persetujuan etik penelitian dimintakan dari Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan dan sampel penelitian diminta menandatangani informed consent sebagai bukti keikutsertaannya dalam penelitian.

8. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini meliputi jumlah sampel, pengisian kuesioner dan jenis spesimen yang dikumpulkan dari Rumah Sakit. Sampel malaria dari Rumah Sakit tergantung pada jumlah kasus tiap bulan dan jangka waktu pengambilan sampel yang terbatas sehingga menungkinan jumlah sampel tidak sesuai yang diharapkan. Pengisian kuesioner tidak dapat dilakukan oleh dokter setempat karena kesibukan dan jumlah dokter yang sangat terbatas. Oleh karena itu untuk melengkapi kuesioner, diperoleh dari data rekam medik pasien malaria. Keterbatasan lain adalah dalam hal pengambilan spesimen darah, karena tenaga kesehatan yang dapat membantu kegiataan ini sangat terbatas. Spesimen darah diperoleh dari kelebihan pemeriksaan hematologi darah yang tidak dipergunakan lagi, sehingga volume darah sangat terbatas dan sebagian besar plasma darah tidak dapat dikumpulkan. Oleh karena itu dalam kegiatan MBS, spesimen yang dikumpulkan hanya sediaan darah tebal dan spot darah kering saja. Optimasi pemeriksaan respon imun tahap kedua akan dipertimbangkan dengan penggunaan serum yang diekstrak dari spot darah kering tersebut.

9. Definisi operasional

Penderita malaria adalah penduduk yang pada pemeriksaan mikroskopis ditemukan *Plasmodium sp.* di dalam darahnya.

Penderita malaria tanpa gejala (asimtomatis) adalah penderita malaria positif secara mikroskopis namun tidak menunjukkan gejala klinis (demam periodik, anemi dan pembesaran limpa).

Penderita malaria dengan gejala (simtomatis) adalah penderita malaria positif secara mikroskopis dan menunjukkan gejala klinis.

Penderita malaria tanpa komplikasi adalah penderita malaria positif secara mikroskopis dan klinis namun tidak menunjukkan tanda-tanda malaria berat atau komplikasi.

Penderita malaria berat adalah penderita malaria yang disertai satu atau lebih komplikasi seperti hiperparasitemia, malaria otak, anemia berat, ikterus, gangguan asam basa dan elektrolit, gagal ginjal, hipertermia, komplikasi infeksi lain, oedema paru, hipoglikemia, muntah-muntah pada terapi per oral dsb.

Penderita negatif malaria adalah tersangka penderita malaria yang di dalam sediaan darah tidak ditemukan plasmodium.

Etnis adalah penduduk asli suatu daerah

Gejala klinis malaria : demam ($\geq 37^{\circ}$ C) disertai salah satu atau lebih gejala berikut menggigil, pucat, mual, muntah, pegal linu, berkeringat, sakit kepala.

HCI (High Case Incidence) daerah endemis malaria dengan angka API $\geq 5\%$.

MCI (Medium Case Incidence) daerah endemis malaria dengan angka API 1 – 5%.

10. Analisa data

Analisis data akan dilakukan dengan menggunakan paket program SPSS PC versi 15.0, dengan secara deskriptif dan analitik:

- a. Analisa univariat untuk mendapatkan proporsi kasus malaria asimtomatik, simptomatik tanpa komplikasi dan malaria berat.
- b. Analisa deskriptif untuk mengetahui alel HLA dominan pada masing-masing lokus gen.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pasien malaria yang berhasil dikumpulkan dari Rumah Sakit sebanyak 119 sampel, lebih sedikit dari jumlah sampel yang ditargetkan yaitu 150. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena pasien malaria yang memenuhi kriteria inklusi dan yang berobat ke Rumah Sakit RSUD Doris Sylvanus tidak banyak dan waktu pengumpulan sampel yang terbatas. Selain itu karena keterbatasan penelitian tidak semua sampel penelitian tersebut memiliki data yang lengkap karena pengisian kuesioner hanya berdasarkan catatan dalam rekam medik yang ada sebanyak 87 pasien. Jenis spesimen yang dikumpulkan juga tidak sesuai yang diharapkan yaitu sediaan apus darah, spot darah dan plasma. Karena keterbatasan volume darah maka sebagian besar plasma darah tidak dapat dikumpulkan sehingga untuk pemeriksaan respon imun pada tahap selanjutnya perlu modifikasi dengan melakukan ekstraksi serum dari spot darah tersebut.

Pengumpulan sampel malaria melalui kegiatan MBS berhasil melakukan pemeriksaan darah pada 843 penduduk yang tinggal di daerah endemis malaria dan ditemukan 16 malaria positif mikroskopis. Jumlah penduduk yang diperiksa juga lebih sedikit dari target yang diharapkan yaitu 1000 penduduk. Hal ini disebabkan karena sebagian besar penduduk terutama laki-laki dewasa tidak berada di tempat (bekerja) pada saat MBS dilaksanakan dan daerah/desa yang banyak dilaporkan kasus malaria ternyata sulit dijangkau dengan kendaraan darat, karena letaknya terpencil (daerah bantaran sungai) dan lokasinya menyebar. Penduduk yang mengikuti MBS tidak terbatas pada kelompok umur 5 tahun atau lebih, sesuai dengan kriteria inklusi yang telah ditetapkan, karena ada sebagian orangtua yang menginginkan anaknya dibawah umur 5 tahun ikut serta dalam kegiatan MBS tersebut sebanyak 142 anak (16.8%).

1. Karakteristik demografi sampel

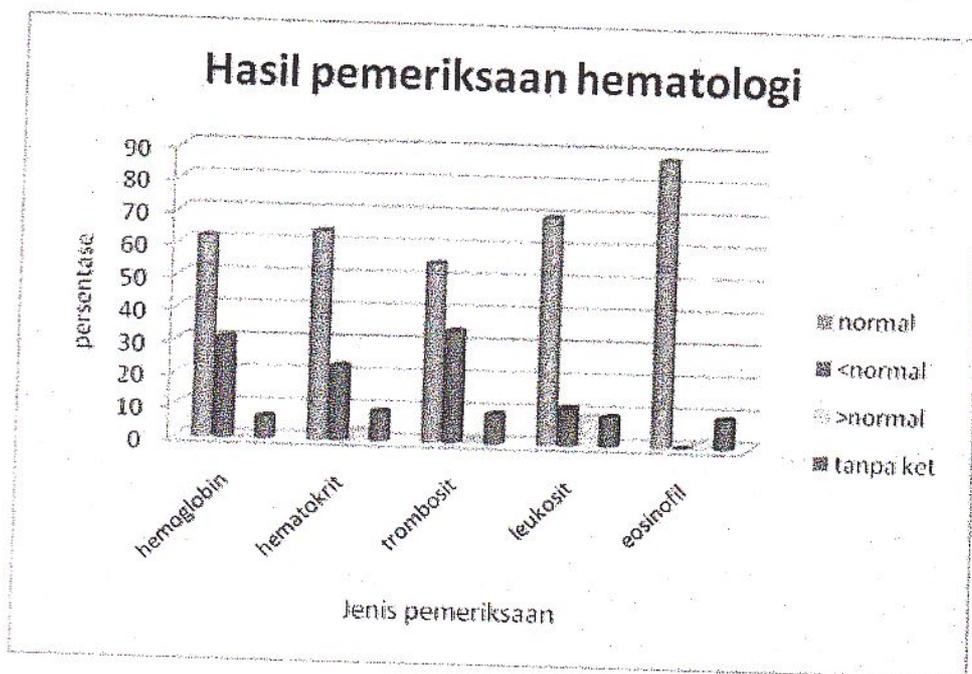
Meskipun sampel malaria yang berhasil dikumpulkan dari Rumah Sakit sebanyak 119 pasien namun hanya 87 pasien yang dapat diperoleh data rekam mediknya. Berdasarkan 87 kuesioner yang datanya diperoleh dari rekam medik menunjukkan bahwa sebagian besar pasien malaria adalah laki-laki (71.1%) dan umur rata-rata adalah 29.3 tahun. Umur termuda pasien malaria adalah 8 bulan dan tertua 70 tahun. Karakteristik pasien malaria dari Rumah Sakit tampak pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik penderita malaria di Rumah Sakit (n= 87)

Karakteristik		
Jenis kelamin (%)	laki	71.3
	perempuan	28.7
Umur (th)	mean	29.1
	min	0.7
	max	70
	SD	16.13

Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan lebih dari 55% pasien malaria mempunyai hasil hematologi darah yang normal untuk parameter hemoglobin, hematokrit, trombosit, leukosit dan eosinofil. Beberapa pasien tidak memiliki hasil pemeriksaan hematologi atau kurang lengkap (grafik 1). Batas normal masing-masing parameter hematologi tampak pada tabel 2

Grafik 1. Hasil pemeriksaan hematologi penderita malaria di Rumah Sakit (n= 87)



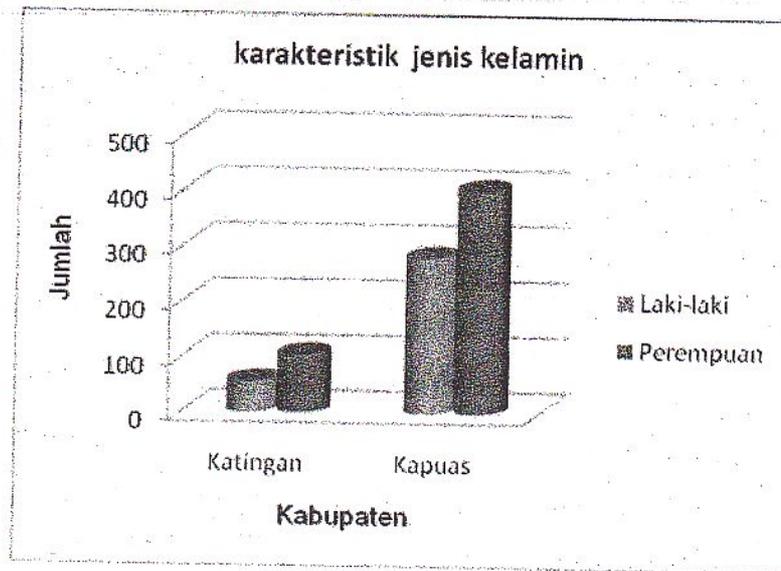
Tabel 2. Batas normal parameter hematologi (digunakan RS)

Parameter hematologi	Batas normal	
	Laki-laki	Perempuan
Hemoglobin	13.5-18.0 gr%	11.5 – 16.0 gr%
Hematokrit	37 - 48%	
Trombosit	150.000 – 400.000/mm ³	
Leukosit	4500 – 11.000 /mm ³	
eosinofil	1 - 4%	

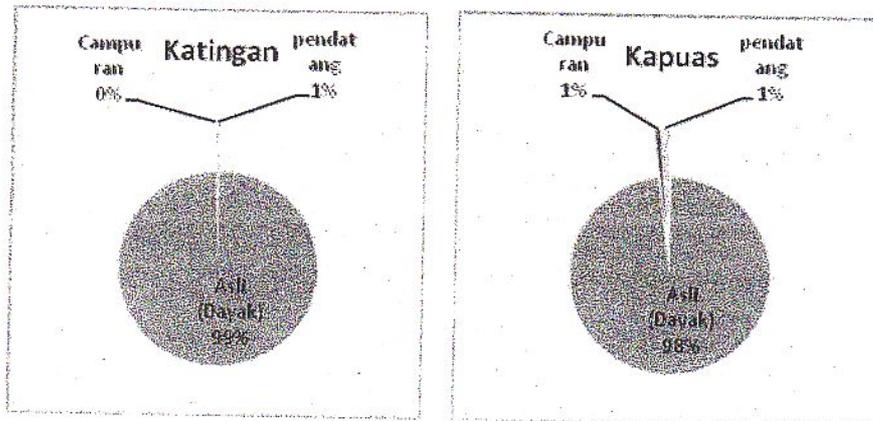
Selain sampel malaria dari Rumah Sakit yang dipilih berdasarkan hasil pemeriksaan mikroskopis, sampel malaria juga diperoleh dari kegiatan MBS di Kabupaten Katingan dan Kapuas. Karakteristik penduduk yang ikut serta dalam kegiatan MBS di 2 Kabupaten yaitu Katingan dan Kapuas dapat dilihat pada table 4. Jumlah sampel MBS di Kabupaten Katingan lebih sedikit daripada Kabupaten Kapuas karena di Kabupaten Katingan, MBS hanya dilaksanakan di satu desa yaitu Tumbang Kalemei. Hal ini disebabkan kondisi medan yang cukup jauh dan sulit untuk dijangkau. Sedangkan di Kabupaten Kapuas, MBS dilakukan di 3 desa yaitu Lungkoh Layang, Danau Pantau dan Timpah. Jumlah laki-laki di kedua kabupaten lebih sedikit daripada perempuan dan umur rata-rata hampir sama yaitu 25 tahun (table 3). Di Kabupaten Katingan, pekerjaan penduduk sebagian besar adalah pelajar dan petani sedangkan di Kabupaten Kapuas sebagian besar tidak bekerja. Suku asli (dayak) dominan pada kedua Kabupaten tersebut (>97%) (grafik 2 dan 3)

Tabel 3. Karakteristik umur sampel MBS

Karakteristik		Kab katingan (n= 160)	Kab Kapuas (n=683)	Jumlah (n=843)
Umur (th)	mean	25.3	25.0	25.1
	min	0.6	0.3	0.3
	Max	90	86	90
	SD	22.36	19.54	20.09



Grafik 2. Karakteristik jenis kelamin sampel MBS



Grafik 3. Karakteristik suku sampel MBS

Dari hasil MBS di keempat desa ditemukan penderita malaria sebanyak 16 (1.9%) dengan karakteristik seperti tampak pada tabel 4. Jumlah laki-laki dan perempuan sama, umur termuda 2 tahun, tertua 61 tahun dan umur rata-rata 22 tahun.

Tabel 4. Karakteristik penderita malaria sampel MBS (n=16)

Karakteristik		n	%
Laki-laki		7	46
Perempuan		9	54
Umur (th)	Mean	22.0	
	Min	2.0	
	max	61.0	
	SD	17.39	

2. Proporsi penderita malaria dan jenis parasit

Berdasarkan catatan rekam medik pasien rumah sakit, malaria falsiparum tanpa komplikasi ditemukan lebih banyak daripada malaria vivaks (67.8% dan 20.7%), dan tidak ditemukan infeksi campuran keduanya. Malaria berat berdasarkan diagnosis dokter ditemukan pada 8.0% pasien malaria. Hal ini mengingat RSUD Doris Sylvanus Palangkaraya merupakan rumah sakit rujukan untuk Propinsi Kalimantan Tengah (tabel 5).

Tabel 5. Jenis malaria pasien RS menurut diagnosa dokter

Jenis malaria	n	%
Falsiparum tanpa komplikasi	59	67.8
Vivaks tanpa komplikasi	18	20.7
Malaria berat	7	8.0
Tanpa keterangan	3	3.4
Jumlah	87	100

Persentase penderita malaria pada sampel MBS paling tinggi ditemukan di desa Tb Kalemei sebesar 4.4% dan didominasi oleh spesies *P falciparum*. Tidak ditemukan penderita malaria di desa Danau Pantau seperti tampak pada tabel 6.

Tabel 6. Persentase penderita malaria sampel MBS per desa

Kabupaten	Desa	N	Malaria positif			
			n	%	falsiparum	Vivaks
Katingan	Tb Kalemei	160	7	4.4	6	1
Kapuas	Lungkoh layang	138	3	2.2	-	3
	Danau pantau	104	-	-	-	-
	Timpah	441	6	1.4	4	2
Jumlah		843	16	7.8	10	6

3. Gejala klinis penderita malaria

Gejala klinis penderita malaria di RS sebagian besar adalah demam (96.6%) , mual (47.1%), menggigil (39.1%) dan anemia /hemoglobin < normal) (30.7%). Hal yang sama juga dijumpai pada penderita malaria dari kegiatan MBS yaitu demam (43.75%), menggigil (37.5%) dan sakit kepala (37.5%). Gejala klinis lain seperti batuk, pusing, sakit ulu hati dan ikterus tidak dijumpai pada penderita malaria dari kegiatan MBS. Karena pada kegiatan MBS tidak dilakukan pemeriksaan HB maka tidak bisa dipastikan adanya gejala anemia pada penderita malaria tersebut. Sebanyak 43.75% penderita malaria dari kegiatan MBS tidak menunjukkan adanya gejala klinis (malaria asimtomatis). Gejala klinis yang dijumpai pada penderita malaria di RS dan MBS tampak pada tabel 7.

Tabel 7. Gejala klinis penderita malaria di RS dan MBS

No	Gejala Klinis	Sampel RS (n=87)	Sampel MBS (n=16)
1	Demam	96.6%	43.75%
2	Mual	47.1%	18.75
3	Menggigil	39.1%	37.5%
4	anemia	30.7%	
5	Muntah	27.6%	25%
6	Sakit kepala	20.7%	37.5%
7	batuk	9.2%	
8	Pusing	6.9%	
9	Sakit ulu hati	5.7%	
10	ikterus	3.4%	
11	Tidak ada gejala	-	43.75%

4. Konfirmasi spesies malaria positif secara molekuler

Hasil konfirmasi parasit dengan pemeriksaan PCR dilakukan terhadap sampel malaria positif secara mikroskopis baik dari sampel Rumah Sakit maupun MBS. Hasil menunjukkan bahwa sebagian besar pasien malaria di Rumah Sakit disebabkan oleh infeksi *P. falciparum* (67.8%) dan *P. vivax* (29.9%) dan hanya sebagian kecil yang disebabkan oleh infeksi campuran *P.falciparum* dan *P.vivax* (1.1%). Sebanyak 2.3% ternyata hasilnya negatif berdasarkan pemeriksaan PCR (tabel 8). Konfirmasi spesies pada sampel MBS menunjukkan hasil yang serupa yaitu sebagian

besar disebabkan oleh infeksi *P.falciparum* (56.25%). Sebanyak 12.5% disebabkan oleh infeksi campuran *P.falciparum* dan *P.vivax*.

Tabel 8. Konfirmasi pemeriksaan spesies dengan PCR

Sampel malaria	n	Spesiasi PCR			
		PF	PV	Pf-Pv	Negatif
Rumah Sakit	87	59 (67.8%)	26 (29.9%)	1 (1.1%)	2 (2.3%)
MBS	16	9(56.25%)	4(25%)	2 (12.5%)	1 (6.25%)
Jumlah	103	68 (66%)	30 (29.1%)	3 (2.9%)	3 (2.9%)

Hasil amplifikasi PCR untuk *P. falciparum* akan menunjukkan panjang pita DNA 300 bp, sedangkan *P. vivax* menunjukkan panjang pita DNA 276 bp. Pasien terinfeksi oleh campuran *P. falciparum* dan *P. vivax* apabila dalam pemeriksaan spesiasi PCR menunjukkan adanya kedua pita DNA tersebut (gambar 1)



Gambar 1. Spesiasi *P. falciparum* dan *P. vivax*

Deteksi gen resisten klorokuin sampel vivax malaria

Resistensi terhadap klorokuin pada *P. vivax* berkaitan dengan adanya mutasi gen *pvm-dr1* pada kodon 976, dimana terjadi perubahan asam amino dari Tirosin (Y) menjadi fenil alanin (F). Hasil

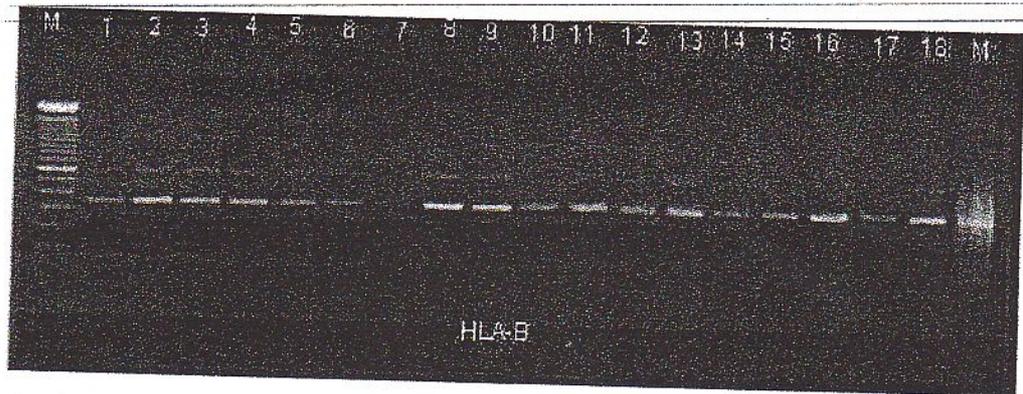
pemeriksaan sampel vivax dari RS dengan *Single Nukleotide Polymorphism (SNP)* menunjukkan bahwa 34% *P vivax* telah mengalami mutasi dan 3.8% merupakan *P vivax* tipe *wild* / liar. Penelitian sebelumnya di Papua menunjukkan bahwa mutasi Y976F gen *pvmr1* pada *P. vivax* sebesar lebih dari 90% dan hal ini berhubungan dengan menurunnya sensitivitas terhadap klorokuin pada studi invitro (Suwanarusk, R, 2007). Sebanyak 62.3% masih belum ditemukan/ hasil negatif sehingga perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut, meskipun dilaporkan bahwa deteksi SNP Y976F ini ternyata kurang sensitif terhadap infeksi *P vivax* dengan densitas parasit yang rendah (Suwanarusk, R, 2007) . Hasil deteksi gen Y976F *Pvmr1* tampak pada tabel 9.

Tabel 9. Deteksi gen Y976F *Pvmr1*

Asal sampel Pv	n	ditest	mutan	wild	Negatif/ blm diketahui
Rumah Sakit	53	53	18 (34%)	2 (3.8%)	22 (62.3%)
MBS	4	-	-	-	-

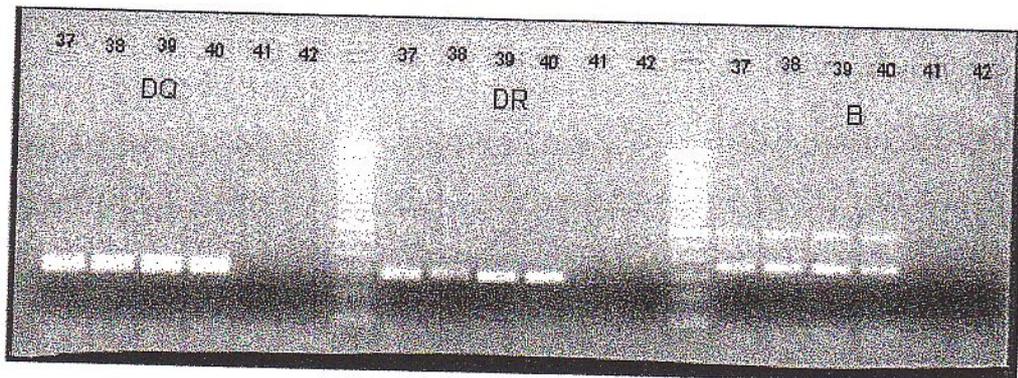
5. Optimasi pemeriksaan HLA

Optimasi pemeriksaan HLA lokus B, DRB1 dan DQB1 (kit one lambda Inc) dilakukan pada 40 sampel yang mewakili sampel malaria falsiparum, vivaks, malaria berat dan kontrol sehat yang tinggal di daerah endemis malaria. Optimasi teknik mengacu pada prosedur yang terdapat pada brosur kit. Sampel DNA untuk pemeriksaan HLA adalah sama dengan sampel untuk pemeriksaan molekuler parasit. Pada awal pemeriksaan terhadap 10 sampel, ternyata konsentrasi DNA sampel sangat rendah dibandingkan konsentrasi DNA yang dibutuhkan yaitu 20 ng/ul sehingga hasil PCR kurang baik karena pita DNA terlihat tipis (gambar 2). Tahap selanjutnya dilakukan kembali ekstraksi DNA dengan mengurangi jumlah pelarut akhir pada tahap ekstraksi yaitu dari 150 ul (sesuai prosedur) menjadi 30 ul. Konsentrasi DNA yang diperoleh meningkat meskipun tidak semua mencapai 20 ng/ul. Rendahnya konsentrasi DNA kemungkinan disebabkan karena sumber DNA berasal dari spot darah yang volumenya lebih sedikit bila dibandingkan dengan sumber DNA lain misalnya whole blood atau sel limfosit, meskipun metode ekstraksi menggunakan kit komersial (Qiagen) yang menghasilkan DNA cukup murni.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA pada lokus HLA- B

Hasil amplifikasi pada sampel DNA yang diekstraksi ulang menunjukkan pita DNA yang lebih jelas meskipun konsentrasi DNA tidak semua mencapai 20 ng/ul. Sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi >300 ng/ul (sampel lain no 41 dan 42) ternyata tidak menunjukkan amplifikasi sehingga perlu dilakukan pengenceran sesuai yang disarankan seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA pada lokus HLA-DQ, HLA-DR dan HLA-B

HLA-B terdiri dari 2 exon yaitu exon 2 dan 3 yang bila dilakukan elektroforesis pada agarose akan menunjukkan 2 pita DNA. Sedangkan pada lokus lain yaitu DQ dan DRB1 hanya terdiri dari 1 exon yaitu exon 2. Pada lokus B jenis bead yang digunakan untuk pemeriksaan alel lebih banyak dibandingkan lokus lain yaitu sebanyak 170 jenis, sedangkan lokus DRB1 dan DQ sebanyak 70 dan 99 jenis.

Hasil pembacaan dengan mesin luminex, selanjutnya dianalisa dengan program HLA fusion 2 untuk menentukan kemungkinan alel pada masing-masing lokus gen. Alel pada setiap lokus gen terdiri dari 1 pasangan alel yang berasal dari ayah dan ibu. HLA pada lokus B ternyata hanya 3/40 (7.5%) yang menunjukkan kode alel, sedangkan 97.2% tidak menunjukkan hasil. Hal ini

disebabkan oleh rendahnya nilai *Mean Fluoresen Intensity* (MFI) dan jumlah bead yang terlalu sedikit. Selain itu karena lokus B terdiri dari 2 exon dan jumlah bead yang digunakan lebih banyak sehingga kemungkinan pemeriksaan menjadi lebih sulit dan harus lebih hati-hati dibandingkan dengan lokus lain. Namun ada 1 sampel yang meskipun kontrol positif dan jumlah bead cukup tetapi tidak memberikan hasil dengan sebab yang belum diketahui. Setelah dilakukan konsultasi dengan produsen kit yang digunakan, diketahui bahwa rendahnya nilai MFI dan jumlah bead kemungkinan disebabkan oleh tahap pencucian yang belum benar/sepurna. Proses pencucian pada penelitian ini dilakukan secara manual dengan menggunakan mikropipet sehingga terdapat kemungkinan bahwa larutan pencuci masih tersisa dalam tabung yang dapat mempengaruhi hasil bacaan, atau adanya bead yang terambil selama proses pencucian sehingga jumlah bead menjadi berkurang. Disarankan untuk menggunakan aspirator pada proses pencucian tersebut.

Pada lokus HLA-B karena sebagian besar sampel tidak menunjukkan hasil, maka alel homozigot hanya ditemukan pada 1 sampel yaitu HLA-B*15 (2 digit). Lokus HLA-DQ terdiri dari 2 bagian yaitu HLA-DQA1 dan HLA-DQB1. Pada lokus HLA-DQA1 ditemukan alel homozigot sebanyak 8/40 (20%) yaitu alel DQA1*01:02, sedangkan pada lokus DQB1 sebanyak 3/40 (7.5%) yaitu alel HLA-DQB1*02:02, HLA-DQB1*05:02 dan HLA-DQB1*06:01. Sebagian besar lokus DRB1 menunjukkan kemungkinan alel spesifik yang lebih dari 1 sehingga interpretasi harus dilakukan dengan hati-hati. Ditemukan 1/40 (2.5%) alel homozigot DRB1 yaitu HLA-DRB1*15:01. namun bila menggunakan 2 digit maka ditemukan alel homozigot sebanyak 11/40 (27.5%) (tabel 10)

Tabel 10. Persentase alel homozigot lokus HLA B, DQA1, DQB1 dan DRB1 (n=40)

No	Lokus HLA	Alel yang muncul (%)	Homozigot (%)	
			2 digit	4 digit
1	B	7.5	2.5	-
2	DQA1	90	32.5	20
3	DQB1	77.5	17.5	7.5
4	DRB1	87.5	27.5	2.5

Meskipun tidak banyak terdeteksi alelnya, HLA lokus B ternyata mempunyai alel yang paling polimorfik terutama pada populasi di Jawa Barat seperti juga pada populasi lainnya. Pada penelitian ini sebagian besar sampel berasal dari suku dayak dan hanya ditemukan 3 macam alel pada 3 sampel yaitu HLA-B*15, HLA-B*18 dan HLA-B*52. Jika dibandingkan dengan populasi di Jawa Barat (Sunda, campuran Sunda-Jawa) ternyata ketiga alel tersebut mempunyai persentase

cukup tinggi terutama alel HLA-B1*15:02 (11.6%) dan alel HLA-B1*15:13(11.2%) (Yuliwulandari, et al, 2008).

Pada lokus HLA-DQ ditemukan 5 variasi alel HLA-DQA1, dan 5 variasi alel HLA-DQB1. Masih terdapat sampel yang belum terdeteksi alelnya karena nilai positif kontrol yang rendah atau jumlah bead yang tidak terpenuhi. Alel HLA-DQA1 yang paling dominan adalah HLA-DQA1*01 (hanya diambil 2 digit karena variasi alel dari HLA-DQA1*01 yang mungkin pada masing-masing sampel cukup banyak) dan HLA-DQA1*06:01 dengan frekuensi masing-masing sebanyak 52.5% dan 20%. Sedangkan alel HLA-DQB1 yang paling banyak ditemukan adalah HLA-DQB1*03, HLA-DQB1*05 dan HLA-DQB1*06:01 dengan prosentase sebanyak 23.75%, 22.5% dan 20%. Hasil pemeriksaan lokus gen HLA-DRB1 menunjukkan 10 variasi alel. Sebagian besar sampel mempunyai variasi alel yang lebih dari 1 sehingga sulit untuk diidentifikasi karena mempunyai pola yang sama, sehingga hanya diambil 2 digit pertama. Alel HLA-DRB1 yang dominan adalah HLA-DRB1*15 sebanyak 43.73% dan HLA-DRB1*12 sebanyak 21.25% (table 11)

Meskipun telah menggunakan kit pemeriksaan dengan resolusi yang tinggi yang dapat mendeteksi 4 bahkan 6 digit alel, ternyata kit tersebut masih mempunyai keterbatasan yaitu bila ditemukan kemungkinan variasi alel lebih dari 1. Oleh karena itu disarankan untuk melakukan pemeriksaan lebih lanjut yaitu dengan metode SSP DR tray, menggunakan kit SSO HLA-DR dengan resolusi yang lebih tinggi atau dengan melakukan sekuens pada sampel tersebut. Namun pada penelitian ini pemeriksaan lanjutan tersebut tidak dilakukan karena keterbatasan dana dan memang tidak direncanakan pada awal penelitian.

Untuk optimasi pemeriksaan HLA digunakan sampel dengan berbagai macam karakteristik penderita malaria (falsiparum, vivaks, malaria berat dan kontrol sehat), namun belum dapat dibedakan variasi alel HLA pada masing-masing kelompok sampel tersebut. Hal ini disebabkan karena jumlah sampel yang diperiksa pada masing-masing kelompok sangat kecil (7-11 sampel) dan pada beberapa pemeriksaan lokus HLA terutama HLA-B masih terdapat banyak hasil yang negatif. Pada pemeriksaan HLA-DR juga terdapat variasi alel lebih dari 1, sehingga memerlukan pemeriksaan lebih lanjut. Peningkatan ketrampilan, perlakuan yang lebih teliti dan hati-hati serta penggunaan konsentrasi DNA lebih tinggi diharapkan dapat memberikan hasil pemeriksaan HLA yang lebih baik. Perlu dipertimbangkan pemilihan kit HLA/ metode yang sesuai terutama untuk mendeteksi alel HLA orang Asia, mengingat kit yang digunakan sekarang lebih kompleks meskipun mempunyai resolusi yang tinggi, volume sampel yang digunakan sedikit dan dapat mendeteksi semua alel HLA.

Tabel 11. Frekuensi alel HLA lokus B, DQA1, DQB1 dan DRB1 (2n=80)

No	alel	frekuensi	%
HLA-B			
1	HLA-B*15	4	5.00
2	HLA-B*18	1	1.25
3	HLA-B*52	1	1.25
4	Tidak terdeteksi	74	92.50
Total		80	100
HLA-DQA1			
1	HLA-DQA1*01	42	52.50
2	HLA- DQA1*02:01	5	6.25
3	HLA- DQA1*03	7	8.75
4	HLA- DQA1*05	2	2.50
5	HLA- DQA1*06:01	16	20.00
6	Tidak terdeteksi	8	10.00
Total		80	100
HLA-DQB1			
1	HLA-DQB1*02	6	7.50
2	HLA-DQB1*03	19	23.75
3	HLA-DQB1*04:02	3	3.75
4	HLA-DQB1*05	18	22.50
5	HLA-DQB1*06:01	16	20.00
6	Tidak terdeteksi	18	22.50
Total		80	100
HLA-DRB1			
1	HLA-DRB1*01	1	1.25
2	HLA-DRB1*03	1	1.25
3	HLA-DRB1*04	5	6.25
4	HLA-DRB1*07	5	6.25
5	HLA-DRB1*09	1	1.25
6	HLA-DRB1*11	1	1.25
7	HLA-DRB1*12	17	21.25
8	HLA-DRB1*13	2	2.50
9	HLA-DRB1*14	1	1.25
10	HLA-DRB1*15	35	43.75
11	Tidak terdeteksi	10	12.50
Total		80	100

KESIMPULAN

Penelitian belum dapat disimpulkan secara lengkap karena merupakan tahap awal pengumpulan sampel dan optimasi teknik pemeriksaan HLA dengan teknik SSO. Hasil pengumpulan sampel malaria menunjukkan bahwa:

1. Sebagian besar penderita malaria disebabkan oleh *P. Falciparum*
2. Kebanyakan pasien malaria di RSUD Doris Sylvanus adalah malaria tanpa komplikasi namun ditemukan juga pasien malaria berat (8%)
3. Hasil pemeriksaan spesies secara molekuler ditemukan adanya infeksi campuran (Pf dan Pv) pada pasien malaria di Rumah Sakit
4. Telah ditemukan pasien malaria vivaks di RSUD Doris Sylvanus yang resisten terhadap klorokuin
5. Optimasi pemeriksaan HLA masih perlu dilakukan karena ditemukan hasil alel yang negatif terutama untuk HLA- B
6. Alel HLA-DQA1 dan DQB1 dominan adalah HLA-DQA1*01 (52.50%) dan HLA-DQB1*03 (23.75%), sedangkan HLA-DRB1 dominan adalah HLA-DRB1*15 (43.75%)

SARAN

1. Pemilihan kit HLA/ metode yang lebih spesifik terutama untuk mendeteksi alel HLA orang Asia perlu dipertimbangkan untuk memperoleh hasil yang lebih baik
2. Untuk penelitian selanjutnya perlu penambahan jumlah sampel malaria sehingga keragaman alel HLA terutama dengan gejala klinis malaria yang berbeda dapat ditemukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang tidak terhingga kami sampaikan atas segala bantuan, masukan dan saran selama penelitian berlangsung dan selama penulisan laporan penelitian, terutama kepada:

1. Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan ijin dan dukungan dana melalui DIPA sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
2. Kepala Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Tengah dan staf yang telah memberikan ijin dan membantu koordinasi untuk pengumpulan sampel penelitian
3. Direktur RSUD Doris Sylvanus, Kepala Instalasi laboratorium dan Kepala Bagian Rekam Medik yang telah memberikan ijin dan membantu kelancaran pengumpulan sampel penelitian di Rumah Sakit.
4. Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Katingan dan Kabupaten Kapuas beserta staf atas bantuan koordinasi dan persiapan survey darah masal
5. Kepala Puskesmas Tumbang Samba dan Puskesmas Timpah beserta staf yang membantu pelaksanaan MBS
6. Teman-teman di laboratorium Parasitologi, Badan Litbangkes atas bantuan dan kerjasamanya selama persiapan dan pelaksanaan penelitian serta pembuatan laporan

LAMPIRAN

TIM PENELITIAN

No	Nama	Instansi
1	Dra. Sarwo Handayani, MSc	Badan Litbangkes
2	dr. Emiliana Tjitra, PhD	Badan Litbangkes
3	dr. Hajar Siswantoro, MSc	Badan Litbangkes
4	Drh. Rita Marleta Dewi, Mkes	Badan Litbangkes
5	Dra. Ervi Salwati, MBIomed	Badan Litbangkes
6	Dr. Enny Rohmawati, SpPK	RSUD Doris Sylvanus, palangkaraya
7	Dr. Suyanto, Sp PD	RSUD Doris Sylvanus, palangkaraya
8	Budi Prasetyorini, SKM	Badan Litbangkes
9	Endah Ariyanti Yusnita	Badan Litbangkes
10	Riyanti Ekowatiningsih	Badan Litbangkes
11	Siti Aisyah	Badan Litbangkes
12	Rita Juliawaty, SKM, MSi	Dinkes Provinsi Kalimantan Tengah
13	Arrung M Pasolang, SKM	RSUD Doris Sylvanus, palangkaraya
14	Mahmudin	Badan Litbangkes

LEMBAR PENGESAHAN

Jakarta,

Mengetahui

Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar kesehatan

Ketua PPI Puslitbang BMF

Drs.Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt

NIP. 196211191988031001

DR. Drg. Magdarina Destri Agtini, MSc

NIP. 195012061984022001

Ketua Pelaksana

Dra. Sarwo Handayani, MSc

NIP. 196606251991032001



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

No. : LB.03.02/KE/1498/2010

9 April 2010

PERSETUJUAN AMANDEMEN PROTOKOL

Ref : Protokol Penelitian No. 01.0905.029 tanggal 6 Mei 2009

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan telah melakukan telaah dan menyetujui amandemen protokol yang berjudul :

"Polimorfisme Human Leucocyte Antigen (HLA) pada penderita malaria dengan gejala klinis berbeda di daerah endemis malaria di Kalimantan (Tahap I)"

dengan Ketua Pelaksana : **Dra. Sarwo Handayani, M.Sc.**

Perubahan protokol dari versi 1 ke versi 2 tertanggal 6 April 2010. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 9 April 2010

Ketua

Komis Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI

Cetakan Negara No. 29 Jakarta 10560
Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 4244375, 4259860, 4244693
Fax (021) 4245386, 4244693

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI
NOMOR: HK.03.05/III/1223/2010

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2010

KEPALA PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI

MENIMBANG

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi (Puslitbang Biomedis dan Farmasi), perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 sejumlah 7 (tujuh) penelitian;

MENGINGAT

- 1. Undang-Undang Nomor 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia tahun 1992 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3495);
- 2. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran negara Republik Indonesia Nomor 4130);
- 3. Peraturan Pemerintah RI No. 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Ncmor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
- 4. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Tehnologi Kekayaan Intelektual serta hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara Tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
- 5. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 6. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
- 7. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Kesehatan sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 439/Menkes/Per/VI/2010 tentang Perubahan Kedua Atas Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Kesehatan;
- 8. Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.

MEMPERHATIKAN

- 1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Puslitbang Biomedis dan Farmasi tahun 2010 dengan No.0057/024-11.1/-/2010, tanggal 31 Desember 2019.
- 2. Perjanjian Pelaksanaan Penelitian pada Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Nomor HK.03.05/III/11951/2010 sampai dengan Nomor: HK.03.05/III/1201 2010 Tanggal 1 Maret 2010.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI

Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560
Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 4244375, 4259860, 4244693
Fax (021) 4245386, 4244693

MEMUTUSKAN

- MENETAPKAN** :
- PERTAMA** : Membentuk Tim Pelaksana Penelitian bidang biomedis dan farmasi Tahun 2010 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
- KEDUA** : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 mempunyai tugas sebagai berikut:
- 1) Melaksanakan kegiatan Penelitian pada Puslitbang Biomedis dan Farmasi Tahun 2010, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
 - 2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi.
- KETIGA** : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;
- KEEMPAT** : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2010 dibebankan pada anggaran DIPA Puslitbang Biomedis Tahun 2010;
- KELIMA** : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Maret sampai dengan Desember 2010 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 2 Maret 2010



Tembusan Yth:

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
2. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
3. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
4. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
5. Inspektur Jenderal Kemenkes RI;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Kepala Biro Keuangan dan Perlengkapan Setjen Kemenkes RI;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Puslitbang Biomedis dan Farmasi;
10. Kepala Bidang Program dan Kerja Sama Puslitbang Biomedis dan Farmasi;
11. Kepala Bidang Pelayanan Penelitian Puslitbang Biomedis dan Farmasi;
12. Bendaharawan Pengeluaran Puslitbang Biomedis dan Farmasi;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN FARMASI**

Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560
Korpos Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 4244375, 4259860, 4244693
Fax (021) 4245386, 4244693

Lampiran IV

Keputusan Kepala Puslitbang Biomedis dan Farmasi

Nomor : HK.03.05/III/1223/2010
Tanggal : 2 Maret 2010

SUSUNAN TIM PELAKSANAAN PENELITIAN TAHUN 2010

**POLIMORFISME HUMAN LEUKOSIT ANTIGEN (HLA) PENDERITA MALARIA
DENGAN GEJALA KLINIS BERBEDA DI DAERAH ENDEMIS MALARIA
DI KALIMANTAN (TAHAP I)**

- | | | |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. | Dra. Sarwo Handayani, M.Sc | : Peneliti Muda / Ketua Pelaksana |
| 2. | dr. Emiliana Tjitra, Ph.D | : Peneliti Utama |
| 3. | drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes | : Peneliti Madya |
| 4. | dr. Hajar Siswanto, M.Sc | : Peneliti Pertama |
| 5. | Dra. Ervi Salwati, M.Biomed | : Peneliti Pertama |
| 6. | dr. Enny Rohmawati, SpPK | : Peneliti Daerah |
| 7. | dr. Suryanto, Sp PD | : Peneliti Daerah |
| 8. | Budi Setyorini, SKM | : Pembantu Peneliti |
| 9. | Endah Ariyanti Yusnita | : Pembantu Peneliti |
| 10. | Riyanti Ekowatiningsih | : Pembantu Peneliti |
| 11. | Siti Aisyah | : Pembantu Peneliti |
| 12. | Rita Juliwaty, SKM., M.Si | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 13. | Arrung M Pasolang, SKM | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 14. | Mahmudin | : Sekretariat Penelitian |

Kepala,

Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt
NIP 19621119 198803 100 1

KEMENTERIAN DALAM NEGERI
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTORAT JENDERAL KESATUAN BANGSA DAN POLITIK
Jalan Medan Merdeka Utara No.7 Telp. 3450038 Jakarta 10110

SURAT PEMBERITAHUAN PENELITIAN
(S P P)

NOMOR : 440.02/462.D.I.....

- MEMBACA** : Surat dari Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Departemen Kesehatan RI, Nomor KS.01.01/III/1872/2010, Tanggal 31 Maret 2010, Perihal Permohonan Ijin Penelitian.
- MENGINGAT** : 1. Keputusan Menteri Dalam Negeri Nomor : 130 Tahun 2003 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Dalam Negeri.
2. Surat Keputusan Menteri Dalam Negeri Nomor : SD.6/2/12 Tanggal 5 Juli 1972 tentang Kegiatan Riset dan Survei diwajibkan melapor diri kepada Gubernur Kepala Daerah atau Pejabat yang ditunjuk.
3. Keputusan Direktur Jenderal Sosial Politik Nomor : 14 Tahun 1981 tentang Surat Pemberitahuan Penelitian (SPP).
- MEMPERHATIKAN** : Proposal Penelitian Ybs.
- MEMBERITAHUKAN BAHWA :**
- NAMA** : Dra. Sarwo Handayani, MSc
- ALAMAT** : Jl. Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560
- PEKERJAAN** : Peneliti
- KEBANGSAAN** : Indonesia
- JUDUL PENELITIAN** : Polimorfisme Human Leucocyte Antigen (HLA) Penderita Malaria dengan Gejala Klinis Berbeda di Daerah Endemis Malaria di Kalimantan
- BIDANG** : Kesehatan
- DAERAH** : Provinsi Kalimantan Tengah
- LAMA PENELITIAN/KEGIATAN** : Maret s/d Desember 2010
- PENGIKUT PESERTA** : Teriampir
- PENANGGUNG JAWAB** : Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, APt
- SPONSOR** : -
- MAKSUD DAN TUJUAN** : Untuk menentukan tipe HLA penduduk daerah endemis malaria di Indonesia dan penderita malaria hubungannya dengan tingkat keparahan penyakit dan respon imun.

AKAN MELAKUKAN PENELITIAN DENGAN KETENTUAN SEBAGAI BERIKUT :

1. Sebelum melakukan kegiatan Penelitian harus melaporkan kedatangannya kepada Gubernur Cq Kaban Kesatuan Bangsa dan Perlindungan Masyarakat/ Badan Informasi, Komunikasi dan Kesbang setempat dengan menunjukkan surat pemberitahuan ini.
2. Tidak dibenarkan melakukan Penelitian yang tidak sesuai/tidak ada kaitannya dengan judul penelitian dimaksud.
3. Harus mentaati ketentuan perundang-undangan yang berlaku serta mengindahkan adat istiadat setempat.
4. Apabila masa berlaku Surat Pemberitahuan ini sudah berakhir, sedangkan pelaksanaan penelitian belum selesai, perpanjangan penelitian harus diajukan kembali kepada instansi pemohon.
5. Hasil kajian agar diserahkan 1 (satu) eksemplar kepada Ditjen Kesbang dan Politik Up. Direktorat Pengembangan Nilai-Nilai Kebangsaan.
6. Surat Pemberitahuan ini akan dicabut kembali dan dinyatakan tidak berlaku, apabila ternyata pemegang Surat Pemberitahuan ini tidak mentaati/mengindahkan ketentuan-ketentuan seperti tersebut diatas.

Dikeluarkan di Jakarta

Pada tanggal, 7 April 2010

a.n. MENTERI DALAM NEGERI
DIREKTUR JENDERAL
KESATUAN BANGSA DAN POLITIK
Ub.
SEKRETARIS,



IE SUWARNO PUTRA RAHARJO, M.Si
Pembina Utama Madya
NIP. 19580416 198503 1 001

Tembusan :

1. Yth. Gubernur Kalimantan Tengah.
Up. Kaban Kesbang dan Linmas Prov.
2. Yth. Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Departemen Kesehatan RI di Jakarta.