

**PSI
53**

Jakarta

LAPORAN PENELITIAN

**Pengembangan Metoda *Nested PCR* untuk Identifikasi
Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Gen *pvmdr1* Terkait Kegagalan
Pengobatan ACT pada Penderita Malaria vivaks
(tahun I)**

HK.03.05/III/750/2012



Dra. Ervi Salwati M.Biomed

**Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan ,
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan RI
2012**

Badan Penyelenggara Ilmu Persepsi Kesehatan
PERPUSTAKAAN
Tanggal : 18-6-2013
No. induk : _____
No. Kelas : PS 1
53

LAPORAN PENELITIAN

**Pengembangan Metoda *Nested PCR* untuk Identifikasi
Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Gen *pvmdr1* Terkait Kegagalan
Pengobatan ACT pada Penderita Malaria vivaks
(tahun I)**

HK.03.05/III/750/2012



Dra. Ervi Salwati M.Biomed

**Pusat Biomedis Dan Teknologi Dasar Kesehatan ,
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan RI
2012**

SUSUNAN TIM PENELITIAN

No.	N A M A	KEDUDUKAN DALAM TIM
1	Dra. Ervi Salwati M.Biomed	Peneliti Muda/Ketua Pelaksana
2	Dr. Emiliana Tjitra, PhD	Peneliti Utama/Koordinator peneliti
3	Drh. Rita Marleta D.M.Kes	Peneliti Madya
4	Dra. Sarwo Handayani MSc.	Peneliti Madya
5	Drh. Rabea Pangerti Yekti M.Kes	Peneliti Muda
6	Nita Prihartini SKM	Peneliti Pertama
7	Drh. Retno Triastuti	Peneliti non fungsional
8	Aulia Rizki S.Si	Peneliti non fungsional
9	Ni Wayan Ariani S.Si	Peneliti non fungsional
10	Riyanti Ekowati Ningsih AMAK	Pembantu Peneliti
11	Endah Ariyanti Yusnita AMAK	Pembantu Peneliti
12	Budi Prasetyo Rini SKM	Pembantu Peneliti
13	Siti Aisyah AMAK	Pembantu Peneliti
14	dr. Diana S. Taroreh	Peneliti non fungsional
15	dr. Yuliana Monigoei	Peneliti non fungsional
16	Nia I. Pouluaan	Pembantu Peneliti Daerah
17	Gustaf R Manengal	Pembantu Peneliti Daerah
18	Jessika Batubuaya	Pembantu Peneliti Daerah
19	Martje Menteng	Pembantu Peneliti Daerah
20	Siti Rahayu, AMD	Sekretariat Penelitian



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

KEPUTUSAN

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

NOMOR: HK.03.05/III/750/2012

TENTANG

PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

KEPALA PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

MENIMBANG

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, perlu ditunjuk Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan huruf a tersebut diatas, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 sejumlah tujuh belas penelitian;

MENINGAT

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 Nomor 37, 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/VI/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;
Peraturan Presiden Nomor 47 Tahun 2009 tentang Pembentukan dan Organisasi Kementerian Negara.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 1144/Menkes/Per/VIII/2010 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.HK.03.05/4/11675/2011 tanggal 30 Desember 2011 tentang Penetapan Kuasa Pengguna Anggaran, Pejabat Pembuat Komitmen, Pejabat Penguji dan Penandatanganan SPM, Bendahara Pengeluaran dan Bendahara Penerimaan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan di Jakarta tahun anggaran 2012;

MEMPERHATIKAN

1. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2012 dengan No.0683/024-11.1.01/00/2012, tanggal 9 Desember 2011;



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

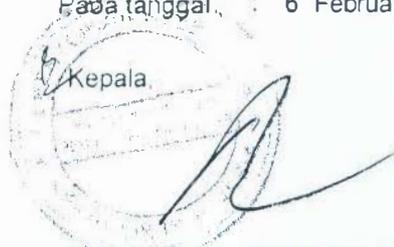
Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

- KESATU** : 1) Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012 sebagaimana tercantum dalam lampiran keputusan ini;
2) Kepada Tim Pelaksana Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Tahun Anggaran 2012, dapat diberikan honorarium sebagaimana tersebut dalam lampiran 2 Keputusan ini;
- KEDUA** : Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 mempunyai tugas sebagai berikut:
1) Melaksanakan Penelitian pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012, dengan susunan Tim seperti pada lampiran surat keputusan ini;
2) Menyerahkan Laporan Kemajuan Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian dan Laporan Akhir Penelitian kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
- KETIGA** : Dalam melaksanakan tugasnya, Tim bertanggungjawab kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan serta wajib menyampaikan laporan akhir penelitian sebagai pertanggungjawaban kegiatan;
- KEEMPAT** : Biaya pelaksanaan kegiatan serta honor Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dibebankan pada anggaran DIPA Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Tahun 2012;
- KELIMA** : Keputusan ini mulai berlaku sejak bulan Januari sampai dengan Desember 2012 dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini akan diadakan perbaikan dan perubahan sebagaimana mestinya.

Ditetapkan di : Jakarta
Pada tanggal : 6 Februari 2012



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

Tembusan Yth:

1. Sekretaris Jenderal Kemenkes RI;
2. Inspektur Jenderal Kemenkes RI
3. Ketua Badan Pemeriksa Keuangan;
4. Kepala Badan Pengawasan Keuangan dan Pembangunan;
5. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
6. Sekretaris Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
7. Kanwil Ditjen Anggaran Kemenkeu RI DKI Jakarta;
8. Para Kepala Pusat di Lingkungan Badan Litbang Kesehatan;
9. Kepala Bagian Tata Usaha Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
10. Kepala Bidang Biomedis, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
11. Kepala Bidang Teknologi Dasar Kesehatan, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.
12. Bendaharawan Pengeluaran Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan;
13. Masing-masing yang bersangkutan untuk dilaksanakan.



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 1
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

PENGEMBANGAN TEKNIK NESTED PCR UNTUK MENGIDENTIFIKASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISME (SNP) GEN PVMDR1* TERKAIT DENGAN KEGAGALAN PENGOBATAN ACT PADA PENDERITA MALARIA VIVAKS (TAHUN I)

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1. Dra. Ervi Salwati, M. Biomed | : Peneliti Muda/Ketua Pelaksana |
| 2. Dr. Emiliana Tjitra, PhD | : Peneliti Utama / Koordinator Peneliti |
| 3. drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes | : Peneliti Madya |
| 4. Dra. Sarwo Handayani, M.Sc | : Peneliti Madya |
| 5. drh. Rabea Pangerti Yekti, M.Kes | : Peneliti Muda |
| 6. Nita Prihartini, SKM | : Peneliti Pertama |
| 7. drh. Retno Triastuti | : Peneliti Non Fungsional |
| 8. Aulia Rizki, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 9. Ni Wayan Ariani, S.Si | : Peneliti Non Fungsional |
| 10. Riyanti Ekowati Ningsih, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 11. Endah Ariyanti Yusnita, AMD | : Pembantu Peneliti |
| 12. Budi Prasetyo Rini, SKM | : Pembantu Peneliti |
| 13. Siti Aisyah, AMAK | : Pembantu Peneliti |
| 14. dr. Diana S. Taroreh | : Peneliti Non Fungsional |
| 15. dr. Yuliana Monigoei | : Peneliti Non Fungsional |
| 16. Nia I, Poluan | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 17. Gustaf R. Manengal | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 18. Jesika Babubuaya | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 19. Martje Menteng | : Pembantu Peneliti Daerah |
| 20. Siti Rahayu, AMD | : Sekretariat Penelitian |

Kepala
KEMENTERIAN KESEHATAN RI

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



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

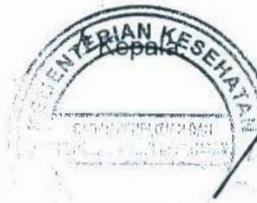
Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745
Fax (021) 42881754

Lampiran 2
Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi
Dasar Kesehatan
Nomor : HK.03.05/III/750/2012
Tanggal : 6 Februari 2012

**JUDUL PENELITIAN : PENGEMBANGAN TEKNIK NESTED PCR UNTUK
MENGIDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISME
(SNP) GEN PVMDR1 TERKAIT DENGAN KEGAGALAN
PENGOBATAN ACT PADA KEGAGALAN ACT PADA MALARIA**

JUMLAH HONOR TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012

1. Koordinator Peneliti	: Jumlah honor yang diterima per-bulan	=Rp.	420.000
2. Peneliti Muda	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	40.000
3. Peneliti Madya	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	50.000
4. Peneliti Pertama	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	35.000
5. Peneliti Non Fungsional	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	30.000
6. Pembantu Peneliti	: Jumlah honor yang diterima per-jam, per-minggu sebesar	=Rp.	20.000
7. Sekretariat Penelitian	: Jumlah honor yang diterima setiap bulan sebesar	=Rp.	300.000



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

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT karena berkat kasih sayang dan kekuatannya, Laporan Akhir Penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik. Semoga laporan penelitian ini, berguna dan dapat menjadi dasar untuk pengembangan teknik resistensi parasit khususnya *Plasmodium vivax* terhadap obat anti malaria (OAM). Diharapkan kedepannya ditemukan penanda molekular untuk *P.vivax* terkait kegagalan pengobatan terhadap OAM.

Kami mengakui, laporan kami ini masih jauh dari sempurna, banyak kekurangan di mana-mana. Oleh karena itu, kami berharap dapat masukan dan saran dari yang membaca laporan ini.

Kepada seluruh anggota tim penelitian yang telah bekerja bersungguh-sungguh, baik itu sewaktu pengumpulan sampel di lapangan, pemeriksaan mikroskopis, pengerjaan sampel di laboratorium dan pengolahan data, kami ucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan memberi petunjuk serta kekuatan kepada kita semua dalam melaksanakan penelitian dan pengembangan kesehatan.

Jakarta, Februari 2013

Ketua Pelaksana Penelitian,

(Dra. Ervi Salwati M.Biomed)

RINGKASAN EKSEKUTIF

Terdapat 80-300 juta kasus klinis malaria *vivax* setiap tahunnya. Upaya pemberantasan malaria mengalami kendala antara lain oleh adanya resistensi parasit terhadap obat anti malaria.(OAM). Obat standar yang biasa digunakan seperti klorokuin, kina, sulfadoxin pyrimetamin telah dilaporkan mengalami resistensi terhadap *P. falciparum*, demikian juga halnya *P. vivax* dilaporkan telah resistensi terhadap klorokuin. *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) telah direkomendasikan oleh WHO untuk mengatasi hal tersebut. Sayangnya, pada *P.vivax* tidak seperti *P.falciparum* yang telah mempunyai penanda molekular yang direkomendasi WHO, dalam menentukan status parasit apakah resisten atau adanya infeksi baru. Kesulitan dalam menemukan penanda resistensi parasit terhadap OAM pada *P.vivax* antara lain disebabkan adanya fase relaps (stadium hipnozoit dorman di hati) dan kultur *P. vivax* (*continous in vitro*) yang belum berhasil seperti halnya pada *P. falciparum*. Oleh karena itu, pendekatan dengan mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang terdapat pada gen yang berpotensi terlibat dengan resistensi parasit terhadap obat antimalaria merupakan hal yang sangat penting.. Pada penelitian ini, pencapaian pengumpulan sampel hampir 100% (99/100). Hasil rekrutmen di lapangan terkumpul 99 subyek yang berasal dari puskesmas Touluaan (76) dan puskesmas Tombatu (23),

Pada penelitian ini, untuk keberhasilan dalam mengidentifikasi SNP dilakukan pengembangan teknik yaitu dengan nested PCR. Pada penelitian ini, pencapaian pengumpulan sampel hampir 100% (99/100). Hasil rekrutmen di lapangan terkumpul 99 subyek yang berasal dari puskesmas Touluaan (76) dan puskesmas Tombatu (23). Kemudian, oleh tenaga mikroskopis pusat dilakukan pengecekan ulang dan dikoreksi lagi dengan teknik PCR. Dari hasil konfirmasi spesies dengan teknik PCR, didapatkan hasil bahwa dari 99 yang direkrut, ternyata hanya 84% (83 dari 99) subjek yang dapat dideteksi SNPnya yaitu yang terinfeksi *P. vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*). Sisa, 16 orang (16 %)

tidak dapat dianalisa lebih lanjut untuk deteksi SNP karena parasit adalah *P.falciparum* (9/16, 60%) dan 40% tanpa parasit (negatif).

Secara statistik faktor umur dan jenis kelamin tidak berpengaruh terhadap nilai densitas parasit malaria, begitu juga pemeriksaan mikroskopi maupun PCR tidak berpengaruh terhadap nilai densitas parasit malaria.

Langkah pertama kali yang dilakukan untuk mengidentifikasi SNP adalah: mengamplifikasi 5 fragmen gen *pvmdr1*. dan melakukan sekuensing. Dengan program Bioedit, hasil sekuensing dari kelima fragmen disambungkan (*line up*) dan kemudian disejajarkan (alignment) dengan membandingkannya sama referensi (*PvSal-1 mdr1* gene). Kalau ada basa yang tidak sama, dianggap ada mutasi (SNP).

Analisa sekuens dari subjek malaria vivaks menampakkan SNP pada lokus-lokus tertentu gen *pvmdr1*. Terdapat mutasi yang mengakibatkan perubahan asam amino pada Y976F, S1358, S513R, K997R, K1393N dan L1076F. Diantara mutasi synonymous, polimorfisme posisi 529 (T529) terdapat pada beberapa isolat sementara dan lainnya pada posisi 1233 (E1233). Semua subjek yang sukses membawa mutasi alel Y976F alel dan F1076L

ABSTRAK

Resistensi parasit terhadap obat anti malaria merupakan salah satu kendala untuk eliminasi malaria. Pada *P.vivax*, penanda untuk membedakan antara parasit resisten dengan infeksi baru masih belum ada. Pendekatan biologi molekular seperti *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) memberikan potensi ke arah itu. Telah dilakukan Pengembangan metoda nested PCR untuk mengidentifikasi SNP gen *pvmdr1* penderita malaria vivax dari 2 puskesmas (Touluaan dan Tombatu), Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara, di mana secara keseluruhan terkumpul 99 subjek dengan rentang umur 3-66 tahun.

Dari hasil konfirmasi spesies dengan teknik PCR, didapatkan hasil bahwa dari 99 yang direkrut, ternyata hanya 84% (83 dari 99) subjek yang dapat dideteksi SNPnya yaitu yang terinfeksi *P.vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*). Sisa, 16 orang (16 %) tidak dapat dianalisa lebih lanjut untuk deteksi SNP karena parasit adalah *P.falciparum* (9/16, 60%) dan 40% tanpa parasit (negatif).

Secara statistik faktor umur dan jenis kelamin tidak berpengaruh terhadap nilai densitas parasit malaria, begitu juga pemeriksaan mikroskopi maupun PCR tidak berpengaruh terhadap nilai densitas parasit malaria.

Analisa sekuens dari subjek malaria vivaks menampakkan SNP pada lokus-lokus tertentu gen *pvmdr1*. Terdapat mutasi yang mengakibatkan perubahan asam amino pada Y976F, S1358, S513R, K997R, K1393N dan L1076F. Diantara mutasi synonymous, polimorfisme posisi 529 (T529) terdapat pada beberapa isolat sementara dan lainnya pada posisi 1233 (E1233). Semua subjek yang sukses membawa mutasi alel Y976F alel dan F1076L

Kata kunci: Plasmodium vivax, Single Nucleotide Polymorphism, gen *pvmdr1*

DAFTAR ISI

1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	1
3. TUJUAN DAN MANFAAT	3
4. METODE	4
5. HASIL PENELITIAN	15
6. PEMBAHASAN	20
7. KESIMPULAN DAN SARAN	21
8. UCAPAN TERIMA KASIH	22
9. KEPUSTAKAAN	23
10. LAMPIRAN	26
11. LEMBARAN PENGESAHAN	30

DAFTAR SINGKATAN

SNP = Single Nucleotide Polymorphism

Pv mdr1 = Plasmodium vivax multidrug resistant1

P.f= Plasmodim falciparum

Pv, = Plasmodim vivax

ACT =Artemisinin Combine Therapy

CQR = Chloroquine Resistance

WB = Whole blood

PCR = Polymerase Chain Reaction

DNA= Deoxyribo Nucleotide Acid

DAFTAR TABEL.

1. Karakteristik subjek penelitian pada 2 puskesmas
2. Hasil cek silang oleh mikroskopis pusat
3. Hasil konfirmasi spesies dengan teknik PCR
4. Hubungan pemeriksaan mikroskopi dan PCR dengan densitas parasit

DAFTAR GAMBAR

1. Visualisasi pita DNA dari parasit malaria melalui elektroforesis
2. Visualisasi amplifikasi fragmen gen pvmdr1
4. Visualisasi deteksi SNP Y976F dengan nested PCR

DAFTAR LAMPIRAN

1. Informed consent
2. Kuesioner identifikasi SNP
3. Ethical clearance
4. Posisi primer pada gen pvmdr1

PENDAHULUAN

Salah satu tantangan yang dihadapi dalam upaya eliminasi malaria di Indonesia adalah adanya penyebaran parasit resisten terhadap obat antimalaria. Obat standar yang biasa digunakan seperti klorokuin, kina, sulfadoxin pyrimetamin telah dilaporkan mengalami resistensi terhadap *P. falciparum*, demikian juga halnya pada *P. vivax* dilaporkan telah resisten terhadap klorokuin¹. Untuk mengatasi masalah ini, WHO telah merekomendasikan menggunakan *artemisinin based combination therapy* (ACT) untuk pengobatan malaria falsiparum resisten beberapa macam obat malaria² dan juga malaria vivaks resisten klorokuin³.

Pada *P. vivax*, studi untuk memantau penyebaran parasit yang resisten belum semaju *P. falciparum*. Jangankan untuk memantau resistensi terhadap ACT, mekanisme klorokuin saja pada *P. vivax* belum diketahui dengan jelas. Mungkin ini disebabkan oleh adanya fase relaps (stadium hipnozoit dorman di hati) dan kultur *P. vivax* (*continuous in vitro*) yang belum bisa berhasil seperti pada *P. falciparum*.

Oleh karena itu, mengidentifikasi dan mempelajari gen-gen yang berpotensi terlibat dengan resistensi parasit terhadap obat antimalaria merupakan hal yang sangat penting.

TINJAUAN PUSTAKA

Pendekatan dengan mengidentifikasi gen *pvmdr1* (*P. vivax multidrug resistance 1*) yang merupakan *ortholog* dari gen *pfmdr1* yang telah menunjukkan hubungannya dengan resistensi klorokuin (CQR/chloroquine resistance) pada *P. falciparum* telah banyak dilakukan^{4,5,6,7}. Adanya mutasi titik (*Single Nucleotide Polymorphism*/SNP pada gen *pvmdr1* telah menarik perhatian peneliti untuk melihat potensi keterlibatannya dengan resistensi klorokuin^{8,9,10}. Pada tahun 2007 ada laporan bahwa isolat lapangan dari Thailand dan Timika (propinsi Papua) memperlihatkan ada hubungan antara SNP Y976F pada gen *pvmdr1* dan berkurangnya sensitivitas terhadap klorokuin *in vitro*¹¹. Dengan menggunakan Sal1 sebagai referensi strain,

analisa sekuens dari 32 isolat inti menampakkan SNP pada 5 lokus *pvm**dr1*, 2 mutasi *non-synonymous* yang mengakibatkan perubahan asam amino pada Y976F dan L1076F dan 3 *synonmuos* (pada kodon 493, 908 dan 1396). Pada isolat inti ini, mutasi Y976F secara bermakna lebih prevalen pada isolat Indonesia (96%, 24/25) dibandingkan dengan isolat Thailand (43%, 3/7). Selanjutnya Marfurt et.al¹², melaporkan bahwa SNP Y976F gen *pvm**dr1* bisa sebagai prediktor yang kuat untuk menilai gagal pengobatan *in vivo*. Sebaliknya yang terjadi pada sampel di Madagaskar¹³ dimana klorokuin sudah digantikan dengan ACT (artesunat amodiakuin), pada penelitian *in vivo*, SNP Y976F tidak berguna untuk memonitoring resisten klorokuin. Beberapa SNP yang diteliti pada gen *pvm**dr1* dan *pv**crt-o* dari isolat *P.vivax* SNP Y976F menunjukkan frekuensi cukup tinggi (97.8%-100%,) namun tidak memperlihatkan adanya hubungan dengan CQR, begitu juga yang dilaporkan oleh Orjuelau- Sanchez et al.¹⁴ di daerah Amazon di mana CQR sudah bersirkulasi tetapi analisa SNP pada sekuens koding dan non koding gen *pvm**dr1* dan *pv**crt-o* menunjukkan tidak ada hubungan dengan CQR. Baru baru ini Lu et. al¹⁵ (2011) melaporkan bahwa mutasi pada posisi Y976F secara bermakna lebih prevalen pada isolat Thailand dan Myanmar dibandingkan dengan isolat Korea dan dikatakan bahwa isolat Korea mempunyai sensitivitas terhadap klorokuin walau jumlah sampel terbatas.

Uraian di atas, umumnya melihat hubungan klorokuin dengan SNP. Dalam penelitian ini, ingin diketahui kemungkinan SNP-SNP yang terdeteksi pada sampel dengan gagal pengobatan ACT secara *in vivo*. Permasalahannya adalah spesimen yang akan diteliti tersimpan dalam bentuk spot darah, di mana DNA untuk mengamplifikasi fragmen gen *pvm**dr1* yang mempunyai sekuens panjang (> 1kb), yieldnya terbatas. Oleh sebab itu, perlu tahap di mana fragmen yang diamplifikasi harus lebih pendek. Oleh karena itu, untuk tahap ini, perlu dirancang primer untuk mendeteksi daerah (SNPs) yang dijadikan target sehingga primer tersebut mengamplifikasi daerah (region) yang spesifik dan pendek (nested). Oleh sebab itu, dalam penelitian

ini, telah dilakukan pengembangan metoda nested PCR untuk mengidentifikasi SNP *gen pvmdr1* penderita malaria vivax.

TUJUAN DAN MANFAAT

Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengembangkan teknik *nested PCR* dalam mengidentifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *gen pvmdr1* terkait kegagalan pengobatan ACT pada penderita malaria vivaks

Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini pada :

Tahun I adalah untuk:

- a. Mengidentifikasi SNPs pada *gen pvmdr1* dengan sumber DNA *whole blood*
- b. Mengidentifikasi SNP Y976F dengan nested PCR dan teknik sekuensing
- c. Menentukan SNP yang dominan pada sampel *whole blood* penderita malaria vivaks (di luar Y976F)
- d. Menentukan SNPs yang akan diuji untuk dirancang primernya
- e. Melakukan uji coba identifikasi SNP yang telah ditentukan dengan *nested PCR* pada sampel spot darah

Tahun II yang akan dilakukan sebagai berikut:

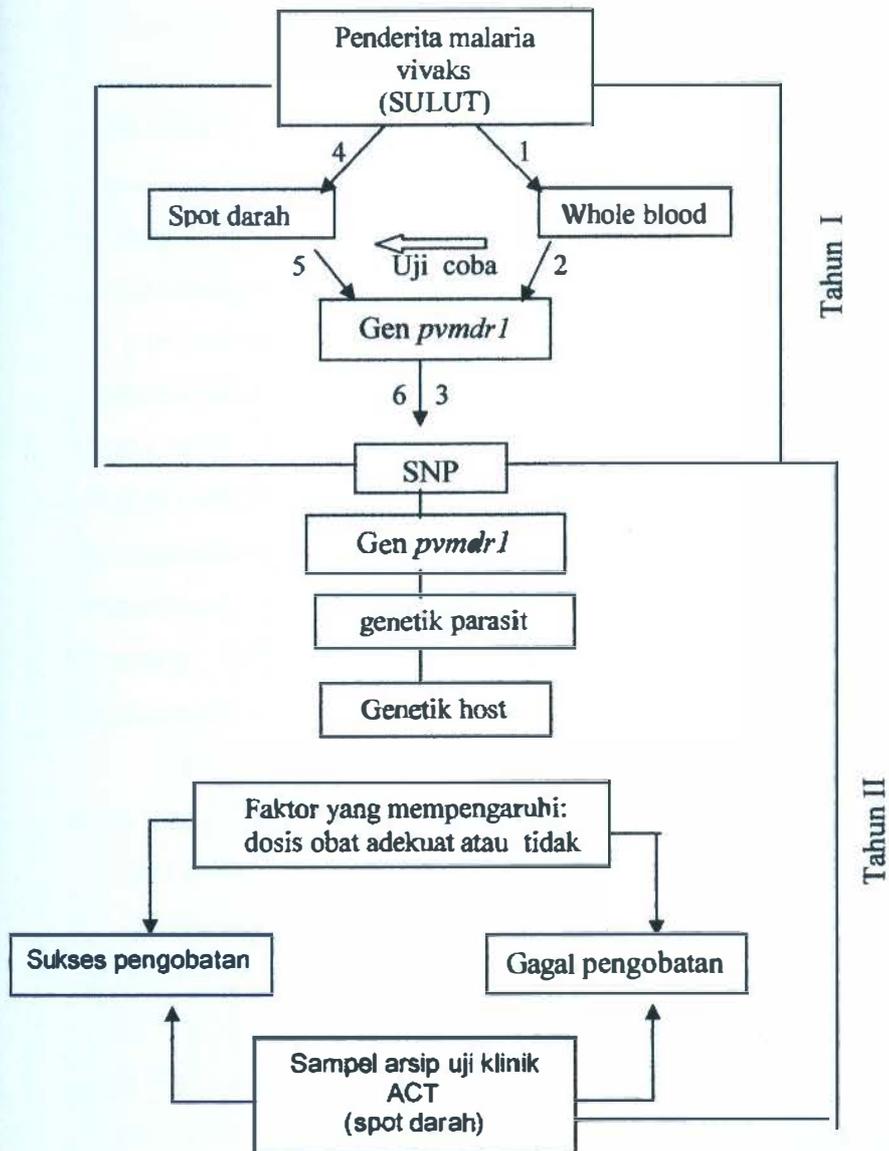
- a. Mengidentifikasi SNPs yang telah ditentukan pada tahun 1 pada sampel arsip (gagal dan sukses pengobatan ACT) dengan nested PCR
- b. Membandingkan hasil antara kelompok yang gagal dan sukses pengobatan

Manfaat:

Menemukan SNPs yang dapat dijadikan sebagai data dasar untuk pengembangan lebih lanjut terkait kegagalan pengobatan ACT.

METODE

1. Kerangka Pikir



2. Tempat dan Waktu Penelitian:

Tempat : 2 Puskesmas, di Kabupaten Minahasa Tenggara (SULUT).

Sulawesi Utara dipilih dengan pertimbangan karena merupakan daerah endemis malaria. Data AMI Sulawesi Utara tahun 2009 adalah 12,62 per mil; walaupun demikian dalam 5 tahun terakhir AMI terus menurun. Namun dalam pemeriksaan mikroskopis didapatkan angka SPR Sulawesi Utara tahun 2009 adalah 60,5 %. Kabupaten Mitra dipilih karena merupakan salah satu wilayah dengan kasus malaria klinis tertinggi. Wilayah Kabupaten Mitra dikelilingi oleh hutan, rawa dan pegunungan. Data kesehatan kabupaten menunjukkan malaria merupakan salah satu penyakit yang menonjol dengan angka AMI 32,8 per mil dan API 9,5 per mil.¹⁶ Berdasarkan penilaian lokasi tempat penelitian yang dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa pengobatan malaria dengan obat AAq (Artesunate amodiakuine, ACT di Indonesia) dilakukan walaupun distribusinya masih belum maksimal sehingga AAq tidak secara berkesinambungan diberikan kepada pasien malaria. Hal ini terjadi karena ketersediaan obat yang sangat terbatas. Pengobatan antimalaria di Kabupaten Mitra masih banyak menggunakan obat klorokuin, kuinin dan sulfadoxin-pirimitamine.

Dalam penelitian ini, dipilih 2 Puskesmas yang mempunyai kasus paling tinggi. Kedua Puskesmas tersebut adalah Touluaan dan Tombatu. Rencana awal, masing-masing Puskesmas diharapkan dapat mengumpulkan 50 subjek yang terinfeksi *P.vivax* atau campuran *P.vivax* dan *P.falciparum*. Tetapi dalam perjalanan waktu, di Puskesmas Tombatu kasus malaria vivaks agak jarang, yang banyak adalah malaria falciparum. Oleh sebab itu, karena takut tidak mencapai target kami putuskan pengambilan sampel berikutnya dipindahkan ke Puskesmas Touluaan. Dengan demikian kami berhasil mengumpulkan 99 subjek dimana 76 subjek berasal dari Puskesmas Touluaan dan sisa sebanyak 23 subjek dari Puskesmas Tombatu. Waktu Penelitian : April-November 2012 (tahap I)

3. Desain:

Desain penelitian adalah potong lintang karena sampel dikoleksi dari pasien yang oleh mikroskopis di puskesmas telah dikonfirmasi sebagai penderita positif malaria (*P.vivax* saja atau campuran *P.vivax/P.falciparum*) pada satu saat (periode).

4. Jenis Penelitian:

Penelitian ini terdiri dari dua tahap: 1) penelitian lapangan, yang terdiri dari pengumpulan sampel darah (spot darah dan *whole blood*), pembuatan apusan darah tebal dan tipis. 2). Penelitian laboratorium, yang terdiri dari konfirmasi spesies dengan teknik PCR, sekuensing gen *pvmdr1* dengan mengamplifikasi 5 fragmen dan deteksi SNP Y976F dengan *nested PCR*.

5. Kriteria inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi adalah subyek berumur ≥ 2 tahun dan terinfeksi *P. vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*) dan bersedia untuk diambil darahnya.

Kriteria Eksklusi adalah subyek dengan malaria berat, < 2 tahun, terinfeksi selain *P. vivax* dan tidak bersedia diambil darahnya.

6. Populasi dan sampel penelitian

Populasi penelitian: penderita tersangka malaria yang datang ke Puskesmas untuk memeriksakan diri.

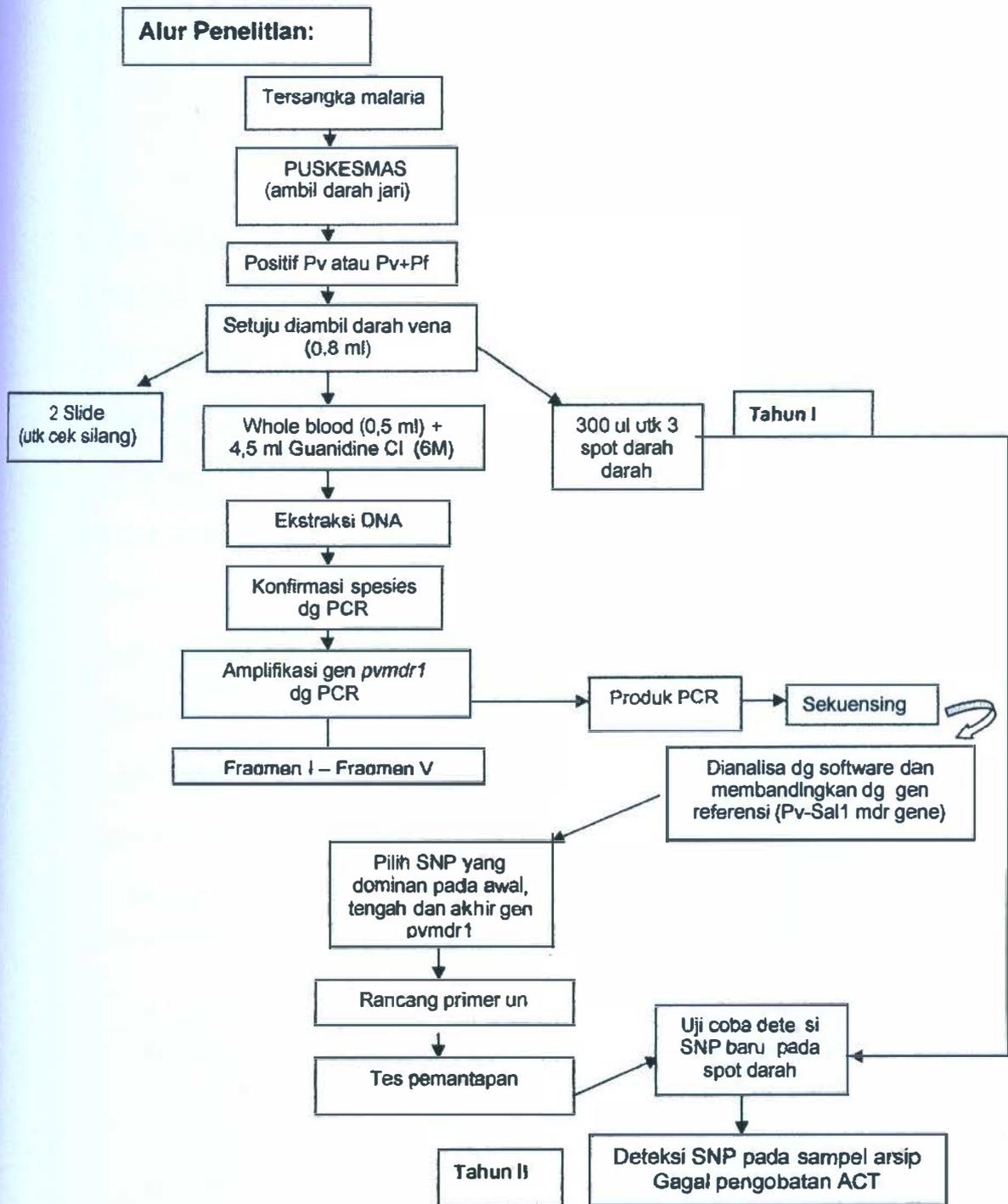
Sampel penelitian: penderita tersangka malaria yang dikonfirmasi positif malaria secara mikroskopis serta memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

Besar sampel

Diasumsikan prevalensi malaria vivax adalah $(P) = 50\%$ ¹⁷, dengan tingkat kepercayaan 95% sehingga nilai $Z = 1,96$ dan ketepatan relatif yang diinginkan (d) 10%, maka perhitungan besar sampel yang akan diambil (n) digunakan rumus berikut:

$$n = \frac{z_{1-\alpha/2}^2 P(1-P)}{d^2}$$

$n = 97$ Sampel digenapkan menjadi 100 subjek.



7. Pengumpulan sampel darah dan pembuatan sediaan darah.

Pengumpulan sampel dilakukan melalui *passive case detection* (PCD) yaitu menunggu pasien datang. Sampel di sini adalah sampel umum di daerah endemis malaria yaitu mereka yang datang berobat ke puskesmas. Pasien yang tersangka malaria dengan menunjukkan gejala (seperti demam, menggigil dll) dilakukan pemeriksaan rutin yaitu dengan mengambil darah ujung jari kemudian diperiksa secara mikroskopis (mengikuti metoda yang ada di puskesmas). Apabila dalam darah pasien tersebut mengandung parasit *P.vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*) dan bersedia untuk diambil darahnya, maka pasien tersebut dapat dimasukkan dalam penelitian. Jadi di sini sampel tidak dapat diklasifikasikan sebagai golongan resisten atau sensitif terhadap ACT. Sampel yang akan dikoleksi sebanyak 100 sampel. Adapun sampel arsip yang terdiri dari kelompok gagal (resisten ACT) dan sukses (sensitif ACT) masing-masing berjumlah 17 dan 20 pasien akan digunakan pada tahun ke dua.

Setelah pasien menanda tangani *informed consent* dilakukan pengambilan darah vena sebanyak 1.3 ml dengan perincian sebagai berikut:

- a. Sediaan apus darah tebal dan tipis (duplikat),
- b. 0,5 ml darah dimasukkan ke tabung corning 10 ml. Kemudian ditambahkan Guanidin HCl (6M) sebanyak 4.5 ml (1 darah : 9 Guanidin HCl) dan digoyang-goyang supaya homogen.
- c. Sisanya \pm 200 μ l untuk pembuatan spot darah (dibuat 3 spot) pada kertas Whatman no.1 yang dikumpulkan pada saat rekrutmen subyek. Sampel darah dikeringanginkan dan dimasukkan ke dalam plastik dengan gel silika, di bawa ke Jakarta, disimpan pada suhu kamar sampai dilakukan ekstraksi DNA.

8. Pemeriksaan mikroskopis.

Sediaan darah apus darah tebal dan tipis (slide) yang dibawa dari lapangan, dicek ulang oleh mikroskopis Pusat, laboratorium Litbangkes Jakarta.

Densitas parasit dihitung melalui penghitungan jumlah parasit aseksual terhadap 200 atau 300 jumlah leukosit pada sediaan darah tebal. Jika lebih dari 500 parasit yang ditemukan sebelum mencapai 200 leukosit, penghitungan bisa dihentikan setelah bacaan pada lapangan pandang terakhir diselesaikan. Densitas parasit diekspresikan sebagai jumlah parasit aseksual per ul darah dihitung dengan membagi jumlah parasit aseksual dengan jumlah leukosit dan kemudian dikalikan dengan densitas leukosit yang diperkirakan (5000 leukosit/ul)

$$\text{Densitas /ul} = \frac{\text{jumlah parasit yang dihitung}}{\text{Jumlah leukosit yang dihitung}} \times 5000$$

9. Pemeriksaan laboratorium :

Konfirmasi spesies dg teknik PCR.

Terdiri dari 3 tahap:

a. Isolasi DNA.

DNA diisolasi dari *whole blood* menggunakan Qiagen kit sesuai dengan petunjuk yang ada di brosur (QIAamp® DNA Mini Kit).

b. Amplifikasi DNA.

Target amplifikasi DNA adalah gen *species-specific sequences* pada *small- subunit ribosomal RNA (SSUrRNA)*.

Primer yang digunakan mempunyai urutan basa sebagai berikut:

Universal reverse primer (RevMal): GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCCC

Species specific forward primers: Pf AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT
GAG dan Pv. CGG CTT GGA AGT CCT TGT

Komposisi reagen PCR yang digunakan:

Reagen	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	

Kondisi PCR yang digunakan : predenaturasi : 95°C-10 menit dilanjutkan 43 siklus yang terdiri dari denaturasi 95°C, selama 45 detik, *annealing* 62°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan ekstensi 72 °C selama 5 menit.

c. Visualisasi produk PCR.

Produk PCR selanjutnya divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarose 2% dengan voltase 100V selama 35 menit. Hasil elektroforesis produk PCR akan menunjukkan panjang pita 300 pasang basa (bp) untuk *P. falciparum* dan 276 bp untuk *P. vivax*

Sekuensing gen *pvmdr1*. Terdiri dari 4 tahap:

a. Amplifikasi fragmen-fragmen dari gen *pvmdr1*

Untuk mengetahui SNPs yang ada pada gen *pvmdr1*, gen tersebut dibagi menjadi fragmen-fragmen (5 fragmen) di mana setiap fragmen tersebut akan diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer (forward dan reverse) yang tumpang tindih satu sama lain. Ke 5 pasang primer tersebut mempunyai urutan basa sebagai berikut:

Pvmdr1-1Fb 5'-CTT TTA TGC CTC TCC CCC
 Pvmdr1-1R 5'-GCG TAA GAT GCT AAA ATG AACCC
 Pvmdr1-2F 5'-ATT TAA CCT TTC AGA AAA GCT GT
 Pvmdr1-2R 5'-CCA CCT GAC AAC TTA GAT GC
 Pvmdr1-3F 5'-CTG ATA CAA GTG AGG AAG AAC TAC
 Pvmdr1-3R 5'-ACT ATC CTG GTC AAA AAA GC
 Pvmdr1-4F 5'-CCC TCT ACA TCT TAG TCA TCG
 Pvmdr1-4R 5'-TGG TCT GGA CAA GTA TCT AAAAA
 Pvmdr1-5F 5'-GGA AGT TGA TGT CCC TAA AGG
 Pvmdr1-5R 5'-CCT GGC GCG TCT ACT TAG

Komposisi reagen PCR yang digunakan:

Reagen	1 reaksi
H ₂ O	18.75 µl
10 x PCR buffer (without MgCl ₂)	5 µl
dNTP mix (1,25 mM)	8 µl
MgCl ₂ (25mM)	5 µl
Primer F (1F,2F,3F,4F,5F), masing-masing 10 µM	1.5 µl
Primer R (1R,2R,3R,4R,5R), masing-masing 10 µM	1.5 µl
Tag DNA polymerase 5 U/µl	0.25 µl
Volume akhir (master mix)	40 µl
Sampel DNA	10 ul

Kondisi PCR yang digunakan : predenaturasi : 95°C-10 menit dilanjutkan 40siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C, selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan ekstensi 72 °C selama 2 menit.

b. Visualisasi produk PCR

Produk PCR selanjutnya divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarose 2% dengan voltase 100V selama 35 menit

c. Pemurnian produk PCR

Sebelum di sekuensing, produk PCR harus dimurnikan lebih dahulu untuk membersihkan produk dari sisa-sisa primer dan nukleotida sehingga hasil lebih baik. Caranya adalah sebagai berikut:

- 5 ul produk PCR dicampur dengan 2 ul ExoSAP-IT
- Diinkubasi pada 37°C selama 15 menit untuk menghancurkan sisa primer dan nukleotida
- Diinkubasi lagi pada 80°C selama 15 menit untuk menginaktifkan ExoSAP-IT
- Produk sekarang siap untuk disekuensing.

d. Sekuensing DNA

- Reaksi sekuensing disiapkan dan komponennya sebagai berikut:

Reagen	1 reaksi
H ₂ O	1.1 µl
Big Dye buffer	1.2 µl
Big Dye Terminator 3.1	1.2 ul
Primer F or R	0.5 ul
Templet DNA	2 ul
Volume akhir	6 ul

- Masukkan ke mesin sekuensing
- Hasil dianalisa dengan melakukan penjajaran (alignment) fragmen-fragmen dengan gen referensi (PvSal-1 mdr1 gene) dan mengidentifikasi SNPs yang ditemukan dengan menggunakan *software (Clustal W alignment program)*.

Deteksi SNP Y976F dengan *nested PCR*.

Prinsip kerja : *primer-mismatch method* , menggunakan 3 primer. di mana satu diantaranya adalah internal primer yang salah satu basanya "A" adalah titik mutasi pada kodon 976, dirancang untuk mendeteksi *wild type* (tidak ada mutasi/normal). Jika sampel normal akan terjadi amplifikasi dengan primer internal tersebut, sehingga

terbentuk 2 pita berukuran 560 bp dan 400 bp. Sebaliknya, jika sampel tersebut mengalami mutasi, karena bukan komplemennya tidak terjadi amplifikasi dengan primer internal sehingga hanya satu pita terbentuk (560 bp).

Ke 3 primer mempunyai susunan basa sebagai berikut:

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

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

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

Cara kerjanya adalah sbb:

- a. Mengamplifikasi fragmen di mana aa 976 berada (fragmen ke 4) dan hasil amplifikasi dijadikan sebagai templat (lihat cara amplifikasi fragmen-fragmen)
- b. Membuat reaksi PCR mengikuti metoda *primer-mismatch*
Komposisi reaksi PCR yang digunakan

Reagen	1 reaksi
H ₂ O	29.50 µl
10 x PCR buffer (tanpa MgCl ₂)	5 µl
dNTP mix (2 mM)	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	5 µl
<i>Pvmdr976F</i> primer (10 µM)	1.25 µl
<i>Pvmdr976R</i> primer (10 µM)	1.0 µl
<i>PvmdrWTint</i> primer (10 µM)	1.0 µl
Tag DNA polymerase 5 U/µl (AmpliTag Gold)	0.25 µl
Volume akhir master mix	48 µl
DNA template (produk PCR dari frgmen 4)	2.0 µl
Volume akhir reaction	50 µl

Kondisi PCR yang digunakan : predenaturasi : 95°C-10 menit dilanjutkan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C, selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan ekstensi 72 °C selama 2 menit 72 ° C / 5 menit

- c. Produk PCR selanjutnya divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarose 2% dengan voltase 100V selama 35 menit

10. Definisi operasional

Penderita positif malaria adalah tersangka penderita malaria yang didalam sediaan darah ditemukan plasmodium.

Penderita negatif malaria adalah tersangka penderita malaria yang didalam sediaan darah tidak ditemukan plasmodium

11. Analisa data

Untuk mengetahui ada SNPs dianalisa menggunakan software (*Clustal W alignment program*) dan membandingkannya dengan gen referensi (PvSal-1 *mdr1* gene).

HASIL PENELITIAN

Karakteristik subjek penelitian di Minahasa Tenggara (Sulut)

Jumlah penderita malaria vivaks yang dapat dikumpulkan dari 2 puskesmas (Touluaan dan Tombatu) sebanyak 99 subjek (99%). Dari puskesmas Touluaan terkumpul 76 dan Tombatu 23 subjek. Kurangnya 1 subjek dari jumlah yang ditargetkan karena sampai saat terakhir pengumpulan sampel tidak ada yang positif *P.vivax* atau campuran *P.vivax/ P.falciparum*. Rentang umur dari 99 subjek berkisar antara 3-66 tahun (Tabel 1).

Dari 99 subjek tersebut, hanya 84 subjek (85%) yang dapat dimasukkan ke dalam penelitian yaitu yang terinfeksi *P.vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*). Sisa, 15 orang (15 %) tidak dapat dianalisa lebih lanjut karena terdeteksi sebagai *P.falciparum* (9/15, 60%) dan 40% (6/15) tanpa parasit (negatif), dapat dilihat pada Tabel 2. Densitas parasit aseksual *P.vivax* dari 83 subjek berkisar antara 50-69,320 parasit/ul darah

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian pada 2 puskesmas (Touluaan dan Tombatu, Minahasa Tenggara)

Faktor Demografi	Densitas parasit./ul <100.000		Densitas parasit/ul >100.000		Haz.Ratio	95% CI	p
	n=19	%	n=80	%			
Umur pasien							
3-14 tahun	8	16,67	40	83,33	1,00	Rujukan	
15-24 tahun	3	20,00	12	80,00	0,96	0,50-1,83	0,901
25-66 tahun	8	22,22	28	77,78	0,93	0,57-1,51	0,779
Jenis kelamin							
perempuan	10	21,74	36	78,26	1,00	Rujukan	
laki-laki	9	16,98	44	83,02	1,06	0,68-1,65	0,793

Cek silang (pemeriksaan mikroskopis)

Pengecekan ulang (cek silang) terhadap hasil pemeriksaan mikroskopi di lapangan, dilakukan oleh tim mikroskopi pusat yang telah memiliki sertifikat dan banyak pengalaman. Sebaran ke 99 subyek dengan cek silang yang dilakukan tim pusat dapat dilihat pada Tabel 2.

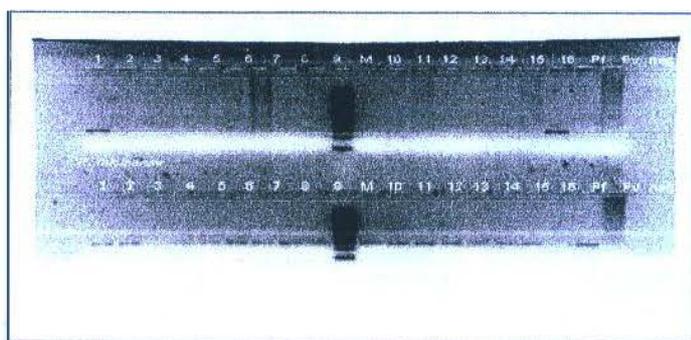
Tabel 2. Hasil cek silang oleh mikroskopis pusat

Puskesmas	Hasil cek silang oleh mikroskopis pusat				
	Pv	Pv+Pf	Pf	Neg	Total
Touluaan	56	9	5	5	76
Tombatu	17	1	4	1	23
Total	74	10	9	6	99

Dari tabel 2, hasil menunjukkan bahwa setelah di cek silang, ternyata 6 subyek (6 %) yang dianggap positif oleh petugas puskesmas ternyata pada apusan darah mereka tidak ditemukan parasit oleh mikroskopi pusat. Di samping itu, ditemukan juga 9 subyek (9 %) yang terinfeksi *P.falciparum*.

Konfirmasi spesies dengan teknik PCR

Walau sampai sekarang mikroskopi masih sebagai baku emas, tetapi mempunyai keterbatasan antara lain tidak dapat mendeteksi parasit yang berada dibawah batas ambang penglihatan. WHO telah merekomendasikan untuk menggunakan teknik PCR dalam mengidentifikasi spesies. Berikut ini adalah gambar hasil spesiasi dengan teknik PCR (Gambar 1) dan ketidaksesuaian antara pemeriksaan mikroskopi dan teknik PCR baik dengan menggunakan *whole blood* dan spot darah dapat dilihat pada Tabel 3(a dan b)



Gambar 1. Visualisasi pita DNA dari parasit malaria melalui elektroforesis

Lane 1-16 adalah sampel (lane 1 dan 16 bagian atas menunjukkan *P.falciparum*, sisa menunjukkan *P.vivax*), M= marker, Pf = kontrol positif *P.falciparum*, Pv= kontrol positif *P.vivax* dan 'neg'=kontrol negatif .

Tabel 3. Hasil konfirmasi spesies dengan teknik PCR

Puskesmas	a. Hasil PCR untuk konfirmasi spesies (<i>whole blood</i>)				
	Pv	Pv+Pf	Pf	Neg	Total
Touluaan	62	5	4	5	76
Tombatu	17	0	5	1	23
Total	79	5	9	6	99

Puskesmas	b. Hasil PCR untuk konfirmasi spesies (<i>spot darah</i>)				
	Pv	Pv+Pf	Pf	Neg	Total
Touluaan	60	5	5	6	76
Tombatu	16	0	5	2	23
Total	76	5	10	8	99

Dengan konfirmasi spesies dengan teknik PCR, didapatkan hasil 5 tambahan *P.vivax* yang berasal dari infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*). Seharusnya hasil antra *whole blood* dan *spot darah* hasilnya sama karena berasal dari sumber darah yang sama. tetapi kenyataannya tidak. Terdapat 7 subjek yang menunjukkan hasil yang berbeda dimana 2 diantaranya negatif tetapi dengan *whole blood* terdeteksi sebagai *P.vivax* atau campuran *P.vivax* dan *P.falciparum*.

Hubungan pemeriksaan mikroskopi dan PCR dengan densitas malaria dapat dilihat pada Tabel 4

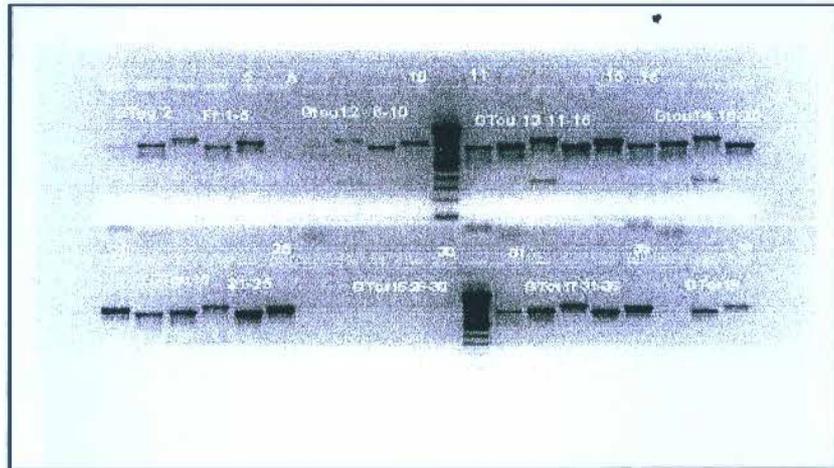
Tabel 4. Hubungan pemeriksaan mikroskopi dan PCR dengan densitas parasit

Jenis pemeriksaan	Densitas parasit./ul <100.000		Densitas parasit./ul >100.000		Haz.Ratio	95% CI	p
	n=19	%	n=80	%			
Mikroskopis							
Negatif (Pf dan neg)	7	43,75	9	56,25	1,00	Rujukan	
Positif (Pv dan PvPf)	12	14,46	71	85,54	1,52	0,76-3,04	0,236
PCR_ whole blood							
Negatif (Pf dan neg)	7	46,67	8	53,33	1,00	Rujukan	
Positif (Pv dan PvPf)	12	14,29	72	85,71	1,61	0,77-3,34	0,203
PCR_ blood spot							
Negatif (Pf dan neg)	6	37,50	10	62,50	1,00	Rujukan	
Positif (Pv dan PvPf)	13	15,68	70	84,34	1,35	0,69-2,62	0,375

Dibandingkan dengan kelompok rujukan, pada pemeriksaan mikroskopis positif, cenderung meningkatkan risiko densitas parasit tinggi (> 1000 parasit/ μ l) sebesar 52%, sedangkan pada pemeriksaan PCR whole blood, cenderung meningkatkan risiko densitas parasit tinggi (> 1000 parasit/ μ l) sebesar 61%

Amplifikasi 5 fragmen gen pvmdr1

Hanya 83 subjek yang dapat dilakukan amplifikasi fragmen pvmdr1 yaitu yang dikonfirmasi positif *P.vivax* saja atau campuran *P.vivax* dan *P.falciparum*. Berikut ini adalah visualisasi fragmen DNA yang sudah diamplifikasi. Terdapat 5% subjek yang sudah diamplifikasi fragmen tetapi hasil tidak menunjukkan terjadinya amplifikasi.



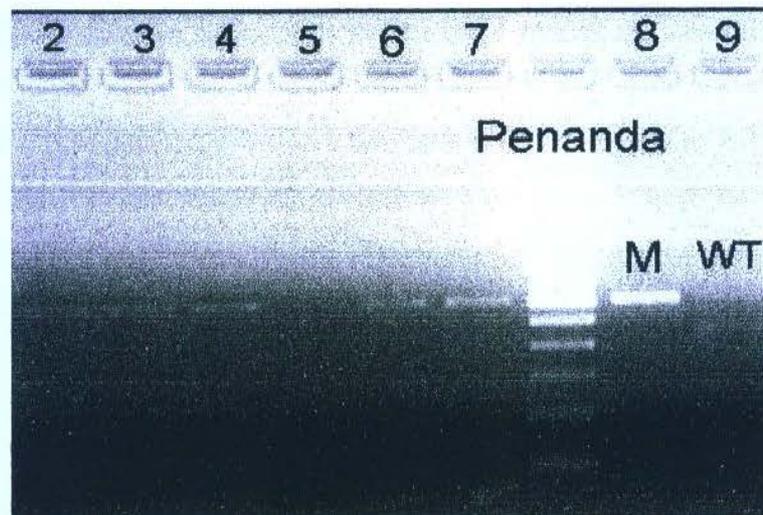
Gambar 2. Visualisasi amplifikasi fragmen gen pvmdr1
 Keterangan gambar: Lane 1-5= sampel GTou-2 berturut-turut fragmen 1, 2,3, 4 dan 5; Lane 6-10= sampel GTou-2 berturut-turut fragmen 1, 2,3, 4 dan 5 begitu seterusnya

Sekuensing 5 fragmen gen pvmdr1-deteksi SNP

Gen pvmdr1 disekuensing dengan mengamplifikasi 5 fragmen dengan primer forward/reverse yang tumpang tindih. Dengan menggunakan program Bioedit ke 5 fragmen di line up sehingga gen secara utuh dapat dibaca. Untuk mengetahui ada SNPs dianalisa menggunakan software (*Clustal W alignment program*) dan membandingkannya dengan gen referensi (*PvSal-1 mdr1 gene*).

Deteksi SNP Y976F dengan nested PCR

Fragmen yang mengandung aa976 (fragmen 4) disekuens untuk mengidentifikasi kodon ke 976 apakah biasanya A atau T. Jika A berarti tidak terjadi mutasi, tetapi jika T, artinya terjadi mutasi atau ada SNP. Di samping itu, dengan nested PCR juga dilakukan deteksi SNPY976F dengan fragmen 4 sebagai template untuk PCR pertama dan PCR ke dua (nested) menggunakan prinsip mismatch-primer Berikut ini adalah visualisasi nested PCR untuk SNPY976F



Gambar 3. Visualisasi hasil deteksi SNP Y976F dengan nested PCR
Sumur 2-4, 6-7= mutan, sumur 5=negatif. Sumur 8-9 =kontrol (M=Mutan, WT= Wild Type)

PEMBAHASAN

Pada awalnya, untuk rekrut pasien di puskesmas Touluaan dan Tombatu, ditargetkan masing-masing sebanyak 50 subjek. Tetapi dengan perjalanan waktu, ternyata di puskesmas Tombatu, pasien yang positif *P. vivax* dan atau *P. vivax* dan *P. falciparum* sangat susah. Akhirnya diputuskan untuk mengalihkan perekrutan sampel ke puskesmas Touluaan.

Dua (2) diantara 6 yang memberikan hasil negatif dengan mikroskopis dan PCR (dari *whole blood*) dengan spot darah terdeteksi sebagai *P. vivax* walau satu diantaranya sangat tipis. Untuk 2 yang positif ini, akan dilakukan pengulangan untuk memastikan apakah memang positif *P. vivax*. Seandainya memang positif, kemungkinan ada *human error* karena darah yang diteteskan pada kertas *whatman* dalam pembuatan spot darah berasal dari *whole blood*. Sebaliknya, ada 2 subjek yang terdeteksi negatif dengan menggunakan spot darah tetapi dengan mikroskopis maupun PCR menunjukkan hasil positif *P. vivax* dan campuran *P. vivax/P. falciparum*. Untuk ke dua kasus ini, kemungkinan terjadi *human error* karena jika diperhatikan densitas dari ke

dua subjek, yang satu cukup tinggi yaitu 4381 parasit/ul sedangkan satu lagi, walau agak rendah (75 parasit/ul) seharusnya masih bisa terdeteksi dengan teknik PCR (dapat mendeteksi 5 parasit/ul).

Terdeteksinya 9 subjek (9%) sebagai *P.falciparum* dengan mikroskopis dan diperkuat dengan teknik PCR, menandakan kualitas tenaga mikroskopis di puskesmas belum begitu baik. Seperti sudah disebutkan di kriteria inklusi bahwa yang masuk dalam penelitian ini hanya subjek yang terinfeksi dengan *P. vivax* atau campuran *P. vivax* dan *P.falciparum*

Amplifikasi fragmen memperlihatkan 10% tidak terjadi amplifikasi pada fragmen-fragmen tertentu kemungkinan karena ada mutasi pada daerah primer sehingga tidak terjadi amplifikasi. Mutasi (SNP) yang ditemukan sangat beragam.

Gen *pvmdr1* secara umum sukses disekuens. Pada subjek yang tidak memperlihatkan amplifikasi fragmen, ada beberapa yang masih menghasilkan sekuens. Dengan menggunakan (PvSal-1 *mdr1* gene). sebagai referensi strain, analisa sekuens dari subjek malaria vivaks menampakkan SNP pada lokus-lokus tertentu gen *pvmdr1*. Terdapat mutasi yang mengakibatkan perubahan asam amino pada Y976F, S1358, S513R, K997R, K1393N dan L1076F. Diantara mutasi synonymous, polimorfisme posisi 529 (T529) terdapat pada beberapa isolat sementara dan lainnya pada posisi 1233 (E1233). Semua subjek yang sukses membawa mutasi alel Y976F alel dan F1076L

KESIMPULAN DAN SARAN

- Beraneka ragam SNP terdeteksi pada gen *pvmdr1*, tetapi yang dominan adalah Y976F alel dan F1076L.
- Metoda nested PCR memberikan hasil yang lebih spesifik untuk deteksi SNPY976F
- Preservatif guanidine chlorida memberikan yield yang baik untuk amplifikasi gen *pvmdr1*

- Perlu deteksi SNP dari daerah endemik malaria lain dan mengikutsertakan juga daerah Papua (walau sudah pernah diteliti sebelumnya) untuk dijadikan sebagai pembandingan karena di daerah tersebut pertama kali dilaporkan terjadinya resistensi parasit terhadap klorokuin.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan pada DIPA-Badan Litbangkes selaku penyandang dana untuk penelitian ini. Ucapan terima kasih juga kami tujukan pada : Kepala Puskesmas dan staf baik di Touluaan maupun Tombatu; tim peneliti Balitbangkes yang telah banyak membantu dalam penelitian ini; tenaga mikroskopis dalam mengecek ulang hasil pemeriksaan mikroskopi di la[angan. Tak lupa kami ucapkan terima kasih kepada peneliti senior kami Prof.dr.Emiliana Tjitra PhD, atas bantuan dan masukannya.

KEPUSTAKAAN

1. Tjitra E, Gunawan S, Lihad F, Marwoto H, Sulaksono S, Arjoso S, Richi TL, Manurung N, Evaluation of Antimalaria Drugs in Indonesia, 1981-1995, *Bull Hlth Studies*, 1997; 25(1): 27-58
2. World Health Organization. Antimalarial drug combination therapy. Report of WHO Informal Consultation 4-5 April 2001. Geneva: WHO, 2001.
3. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. In: 2006 WHM, ed. Geneva: WHO, 2006.
4. Baird JK, Basri H, Purnomo, Bangs MJ, Subianto B, et al. (1991) Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 44: 547-552.
5. Nomura, T., Carlton, J.M., Baird, J.K., del Portillo, H.A., Fryauff, D.J., Rathore, D., Fidock, D.A., Su, X., Collins, W.E., McCutchan, T.F., Wootton, J.C., Wellems, T.E., 2001. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J. Infect. Dis.* 183, 1653-1661.
6. Sa, J. M., T. Nomura, J. Neves, J. K. Baird, T. E. Wellems, H. A. del Portillo. 2005. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey adapted strains. *Exp. Parasitol.* 109:256-259.
7. Brega S, Meslin B, de Monbrison F et al. Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis* 2005; 191:272-
8. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, et al. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001; 3:1413-6.
9. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium*

- falciparum* *P. vivax* *mdr*-Like Gene of *P. falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108:13–23.
10. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE: Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000, 6:861-871
 11. Suwanarusk, R., B. Russell, M. Chavchich, F. Chalfein, E. Kenangalem, V. Kosaisavee, B. Prasetyorini, K. A. Piera, M. Barends, A. Brockman, U. Lek-Uthai, N. M. Anstey, E. Tjitra, F. Nosten, Q. Cheng, and R. N. Price. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterization and association with molecular polymorphisms. *PLoS ONE* 2: October 2007
 12. Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbollat L, Müller I, Sie A, Goroti M, Reeder JC, Beck HP, Picot S, Genton B. Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvmdr1*. *Infect Dis.* 2008 Aug 1;198(3):409-17
 13. Bamadas, C., A. Ratsimbaoa, M. Tichit, C. Bouchier, M. Jahevitra, S. Picot, and D. Menard. 2008. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvmdr1* and *pvcr1*-ogenes. *Antimicrob. agents Chemother.* 52:4233–4240.
 14. Orjuela-Sánchez P, de Santana Filho FS Machado-Lima A et al. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* Genes of *Plasmodium vivax* among Chloroquine-Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region. 3561–3564 *Anti microbial agents and chemotherapy*, Aug. 2009, p. 3561–3564
 15. Lu F, Lim CS., Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, Lee HW, Chen JH, Wang Y, Sattabongkot J., and Han ET (2011). Genetic polymorphism in *pvmdr1* and *pvcr1-o* genes in relation to in vitro drug susceptibility of

Plasmodium vivax isolates from malaria-endemic countries. Acta Tropica vol 117 Feb;117(2):69-75

16. Profile Sulawesi Utara 2009

17. Elyazar I.R.F, Hay S.I. , and Baird J. K (2011). Malaria Distribution, Prevalence, Drug Resistance and Control in Indonesia. Adv Parasitol. 2011 ; 74: 41–175

Lampiran 1.

INFORMED CONSENT

Pengembangan Metoda *Nested* PCR untuk Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Gen *pvm-dr1* Terkait Kegagalan Pengobatan ACT pada Penderita Malaria vivaks

Tim peneliti didampingi Pelaksana Program Pengendalian Malaria Dinas Kesehatan Kabupaten Minahasa Tenggara (Mitra), akan melakukan penelitian malaria untuk mengidentifikasi gen (sifat bawaan) yang terdapat pada parasit yang menginfeksi Bapak/Ibu apakah parasit tersebut masih sensitif atau sudah resisten (kebal) terhadap obat antimalaria (OAM) yang diberikan. Informasi ini diperlukan sebagai dasar penentuan pengobatan yang tepat dalam mengobati penderita malaria. Bila tidak mendapatkan pengobatan yang optimal akan menimbulkan keadaan serius, bahkan bila terlambat dapat menyebabkan kematian.

Sehubungan dengan hal tersebut, kami memerlukan darah sebanyak 1,3 cc yang akan digunakan untuk pemeriksaan gen tersebut secara biologi molekular di laboratorium kami. Sebelum pengambilan darah, kami akan memeriksa fisik Bapak/Ibu. Apabila dalam pemeriksaan fisik maupun mikroskopis ternyata Bapak/Ibu menderita malaria maka kami akan memberikan pengobatan sesuai program pengendalian malaria.

Tidak ada paksaan dalam hal ini. Untuk semua kegiatan, Bapak/Ibu tidak dikenakan biaya (secara cuma-cuma). Kerahasiaan hasil pemeriksaan akan dijaga dan data merupakan milik Badan Litbangkes sepenuhnya.

Jika ada pertanyaan tentang kegiatan ini, Bapak/Ibu dapat menghubungi dokter Puskesmas di Puskesmas ini dengan alamat dan nomor telepon.....

Bila masih memerlukan jawaban, Bapak/Ibu dapat menghubungi Dra. Ervi Salwati M.Biomed sebagai ketua pelaksana atau Drh Rita Marleta Dewi, MKes dengan alamat Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan dengan nomor telepon 021-4261088 Ps 305, dapat pula anda menghubungi Seksi Pengelola Program Pengendalian Malaria. Sub Din P2M, Din Kes setempat, dengan nomor telepon

Saya menyetujui untuk ikut serta dalam kegiatan ini:

Nama penderita/orang tua/wali :

Tanda tangan :

Tanggal :

Lampiran 2.

KUESIONER IDENTIFIKASI SNP

Tanggal : ___/___/___ No: _____
Kabupaten : _____
Desa : _____
Alamat : _____
Nama : _____
Tanggal kelahiran : ___/___/___ atau umur :
Jenis kelamin : 1. Pria 2. Wanita
Pekerjaan : _____
Asal : _____
Lama tinggal : ___ tahun
Suku : _____/
Campuran _____ dan _____

Gejala klinis malaria (bila ada): dalam 2 hari terakhir

Demam ($\geq 37^{\circ}\text{C}$) : 1. ya 2. tidak
Menggigil : 1. ya 2. tidak
Pucat : 1. ya 2. tidak
Mual : 1. ya 2. tidak
Muntah : 1. ya 2. tidak
Pegal linu : 1. ya 2. tidak
Berkeringat : 1. ya 2. tidak
Sakit kepala : 1. ya 2. Tidak

Apakah sedang minum obat?

Sebutkan: _____



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>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE.01.05/EC/ 93 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Pengembangan Metode Nested PCR untuk Identifikasi Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Gen pvmdr1 Terkait Kegagalan Pengobatan ACT pada Penderita Malaria vivaks (tahun I)"

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Dra. Ervi Salwati, M.Biomed.

dapat disetujui pelaksanaannya. 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, 30 Mei 2012

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



IFB -263 ~ -245

1 ATGAAAAAGGATCAAAGGCAACCCAGGGACAATAGCAACAGCAGTACACCTGAGCATT
61 AAAGATGAAGTGGAAAAGGAATTGAACAAGAAGGGGACGTTTGAATTGTATAAGAAGATA
121 AAGACCCAGAAGATTCCCTTCTTTCTCCCGTTTATATGTTCCCGTCCGTATAGGATAG
181 CTGTTGGGGGTGTCCTTCGTGTGCGCCACCATATCAGGTGGCACCTTGCCCTTCTTTCGTA
241 TCCGTTTTTGGGGTCAATTATGAAGAATATGAACCTGGGAGAAAATGTAAATGATATTATA
301 TTTTCGCTAGTCCCTCATCGGAATATTCCAGTTCATTCTGTCTTTCATTTCGAGCTTCTGC
361 ATGGATGTGGTGACCACCAAATTTTGAAGACGCTCAAGATAGAATTTTTAAAAAGTGTA
421 TTTTATCAAGATGGCCAAATTCATGATAACAATCCCGGCTCAAATTTGACGTTCCGATTTG
481 GATTTTTACTTAGAACAGGTGAATGCAGGAA FTGGCACCAAATTTATTACCATATTTACG
541 TACGCAAGTGCATTTTTGGGTCTATACATATGGTTCGCTATTTAAGAACGCTAGACTCACC
601 CTCTGCATCACGTGTGTATTCCCCTTGATTTACATCTGCGGTGTATTGCAACAAGAAG
661 GTGAAGATTAATAAGAAGACGTCTCTCCTGTATAATAACAACACCATGTCCATCATCGAA
721 GAAGCGTTGGTAGGCATCCGAACCGTCGTCAGCTACTGTGGTGAATAACTATTTTGAAA
781 AA TTTAACCTTTTCAGAAAAGCTGTACAGTAAGTACACGCTGAAGGCCAAACTTAATGGAG
841 TCTTTACACATTGGTATGATTAACG GTTCATTTTAGCATCTTACGG GTTTGGTTTTTTGG
901 TACGGAACGAGAATCATCATCTCAGATTTGAGCAACCAGCAACCAAACAATGACTTCCAC
961 GGAGGCTCAGTCATCTCCATCTTCTAGGAGTACTCATCAGTATGTTTCATGCTGACCATC
1021 ATTTTGCCAAACATAACAGAGTATATGAAATCGTTGGAAGCTACGAATAACCTGTACGAG
1081 ATTATCAACAGAAAAGCCCCTAGTCGAGAAATAACCAGGACGGGAAGAAATTTAAAAGATATA
1141 AAAAAAATACAGTTTAAGAATGTGCGTTTTTCACTATGATACTAGAAAGGATGTAGAAAT
1201 TACAAGGACCTCAATTTTACCCTCACGGAAGGAAAAACATACGCATTTGTTGGTGAATCT
1261 GGTGTGGAAAAATCCACCATTTTGAAGTTAATAGAAAGGTTGTA TGACCCACCGAGGGGA
1321 GATGTCATCATCAACGATTTCGCATAATTTGAAAGATGTAAATCTCAAATGGTGGAGATCC
1381 AAAATTGGAGTCGTCAAGTCAAGACCCACTTCTCTTTAGCAACTCCATAAAGAACAACATC
1441 AAGTATAGTTGTACAGCCTGAAAGATTTAGAAGCCTTATCGGAGGAGTCGAACGAAGAT
1501 GGTTTTTCTTCTCAAAGTGATTCCAACAGCCGCAACAGTTGTAGGGCTAAATGTGCTGGT
1561 GATCTAAACGACATGATC CAAACGACAGATTGACTGAA CTGATACAAGTGAGGAAGAA 3F
1621 TACGAAACGATTGAAGATTCCGAAGTTGTTAGTGTTCGAAGAAGGTGCTGATCCACGAT
1681 TTTGTATCTGCTCTCCAGATAAGTACGAAACGCTGGTGGGTTCTAATGCATCTAAGTTG 2R
1741 TCAGGTGGACAGAAGCAGAGAATCTCCATCGCTAGAGCCATTATFAGAAACCCAAAAT
1801 TTGATTCTCGATGAAGCCA CCTCATCTTTAGACAACAATCGGAGTACCTGGTGCAGAAG
1861 ACGATCAATAATTTGAAGGGCAACGAAAACAGAATTACGATCATCATCGCCACAGGCTG
1921 AGCACCATCAGGTACGCCAACAC CATTTTGTGCTGTCCAACCGGAAAACGGTTCCTACT
1981 GTGGACGTGGATGTGCTGGGCGAGGACCC CACTAATAAATATGATGATGATGACATGAC
2041 CATGATAAGCAGGAGAAGGGCGGAAAAAATAGCAGCGCGAACCAAAAAATTGGCAACGCG
2101 GGAAGCTACATCATCGAGCAGGGCACGCACGACGCGCTCATGAAGAACAAAACGG TC
2161 TACTACACCATGATTAACAACCAAAAGGTGTGCTCCAAAAGCTCCAGCAACAACGATAAT
2221 GACAAAGACTCAGATATGAAGAGCAGCATTATAAAGGACTCCGAACGGGGCTACGACCCA
2281 GACGAAGCGAACGGCAATGCGAAAAATGAAAGTGCATCCGCCAAAAGAGCGAAAAAATG
2341 AGTGACGCCAAAGCAAGTAA CACCAATGCAGGAGGAAGGTTAGCCTTTTTGAGAAACCTC
2401 TTTAAGAGGAAAACCCAAAGCGCCAAACAACCTCCGCGTTGTGTACAGAGAAATCTTT
2461 TACAAAAGGACATCGCCATTATAGCCCTGAGCATTATGGTFCGCCGAGGGTTGTACCCC
2521 CTGTTTGCCTCCTCTATGCTAAGTACGTGGGCACCCTATTTCGATTTTGCAAACCTGGAG
2581 GCGAACTCGAATAAGTA CTCCCTCTACATCTTAGTCA TCGGATTGCCATGTTCAATTTCT 4F
2641 GAGACGCTGAAAAATATTACAACAATGTGATAGGAGAGAAAAGTAGAGAAGACCATGAAA
2701 CTTAGACTGTTTCGAAAAATATTATGTACCAAGAAATTA CTTTTTGACCAAGATAGTCAT 3R
976F 2761 → GCCCCAGGATTG CTGTCAGCACATATTAACAGAGATGTTTCATTTGTTAAAAACCGGTTTA
2821 GTAAATAACATTGTCATTTTTACTCACTTATAGTGCTCTTCTTGTGAGTACGGTCATG
2881 TCATTTTATTTCTGCCCTATCGTGGCGGCTGTACTGACCGGAACCTAGTTTCAATTTTATG 49
2941 AGAGTGTTTGCCATCAGAGCAGGATAGCAGCCAACAAGGATGTAGAGAAGAAGCGAGTC
3001 AACCAACCAGGCACAGCATTGTCTACAACAGTGATGATGAAATATTTAAAGACCCAAGT
3061 TTCCTAATTCAGGAGGCATTTTACAATATGAACACGGTCATTATTTACGGGCTGGAGGAT
3121 TACTTCTGCACACTGATTGAGAAGGCTATTGATTATTGCAATAAAGGACAAAAGAGAAAAG
3181 ACGCTAATAAATTCGATGCTCTGGGGGTT CAGTCAGAGTGCCCAATTTTCATTAACAGT 40
3241 TTTGCCTACTGGTTGGTTCCCTTCTAATFAGAAGAGGTACAATAAAGTGGATGACTTT
976R 3301 ← ATGAAATCCCTTACCTTTTTATTACGGGA GCTACGCCGCAAGTTGATGCCCTA 5F
3361 AAGGAGACTCAGAAAATGCAAAGCTGTCTTCGAAAGGTACTACCCACTGATCACGAGG
3421 AAGTCCCTCATCGAC CGATATT

Lembar Pengesahan

Jakarta, Februari 2013

Kepala Bidang
Teknologi Dasar Kesehatan

Ketua Pelaksana,

DR. Dra. Vivi Lisdawati Apt,
NIP 196811181996032001

Dra. Ervi Salwati M.Biomed
NIP. 1960062819890322001

DISETUJUI

Ketua Panitia Pembina Ilmiah P1,

Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar
Kesehatan Kemkes RI

DR. drg. Magdarina Destri Agtini
NIP. 195807011987012001



Drs. Ondri Dwi Sampurno M.Si, Apt
NIP. 19621119 198803 1001