

Tesis

**HUBUNGAN MUTASI ALEL PfATP6 DAN PfMDR1 PADA
PENDERITA MALARIA FALSI PARUM YANG RESISTEN
TERHADAP KOMBINASI ARTESUNAT AMODIAKUIN DI
BEBERAPA RUMAH SAKIT DI SUMATERA BARAT**



HADIANTI

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
BAGIAN ILMU PENYAKIT DALAM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS
RS Dr. M. DJAMIL PADANG**

2011

**HUBUNGAN MUTASI ALEL PfATP6 DAN PfMDR1 PADA
PENDERITA MALARIA FALSI PARUM YANG RESISTEN TERHADAP
KOMBINASI ARTESUNAT AMODIAKUIN DI BEBERAPA RUMAH
SAKIT DI SUMATERA BARAT**

Oleh

HADIANTI

**Tesis ini untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar Spesialis
Ilmu Penyakit Dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis I**

Disetujui oleh



Dr.H. Armen Ahmad, SpPD-KPTI
Pembimbing

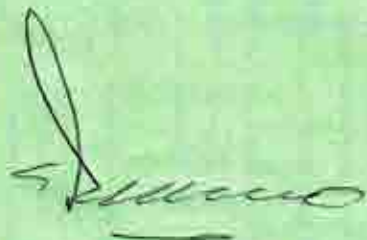


Prof.dr. H. Nuzirwan Acang,DTM&H,SpPD-KHOM,FINASIM
Pembimbing

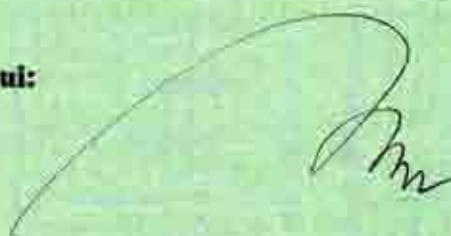


dr.H.Yertzal Karani,SpPD,SpJP,FIHA
Pembimbing

Menyetujui:



Prof.Dr.dr.H. Asman Manaf,SpPD-KEMD
KPS PPDS Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Andalas



dr. H.Akmal Mufriadi Hanif, SpPD, MARS
Ketua Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
BLU RS Dr.M.Djamil Padang

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan hidayahNYA jumlah penulis akhirnya dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan makalah akhir yang berjudul “ Hubungan Mutasi Alel PfATP6 Dan PfMDR1 Pada Penderita Malaria Falsiparum Yang Resisten Terhadap Kombinasi Artesunat Amodiaquin Di Beberapa Rumah Sakit Di Sumatera Barat ”

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tulus dan sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak dr. H. Armen Ahmad SpPD-KPTI, Bapak Prof. dr. H. Nuzirwan Acang DTM&H, SpPD-KHOM, FINASIM, Bapak dr. H. Yerizal Karani SpPD, SpJP, FIHA sebagai pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan baik selama persiapan, pelaksanaan hingga penyusunan tugas akhir ini.
2. Bapak Prof. Dr. dr. H. Asman Manaf, SpPD-KEMD, selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis (KPS PPDS) Ilmu Penyakit Dalam FK-UNAND, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan dorongan moril dalam menyelesaikan pendidikan ini.
3. Bapak dr. H. Eva Decroli, SpPD-KEMD, FINASIM selaku Sekretaris Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis (SPS PPDS) Ilmu Penyakit Dalam FK-UNAND, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan dan dorongan moril dalam menyelesaikan pendidikan ini.
4. Bapak dr. Akmal M. Hanif, SpPD, MARS selaku Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK-UNAND/RS Dr. M. Djamil Padang yang baru dan Bapak Prof. Dr. dr. H. Nasrul Zubir, SpPD-KGEH, FINASIM selaku kepala bagian lama yang telah

- memberikan kesempatan dan dorongan moril pada penulis dalam menyelesaikan pendidikan ini.
5. Bapak Prof. dr. H. Hanif, SpPD-KHOM yang telah banyak memberikan nasehat serta dorongan moral selama penulis mengikuti pendidikan, baik selama dalam institusi maupun diluar institusi pendidikan.
 6. Ibu Prof. Dr. dr. Rizanda Machmud, MKes, yang telah banyak membantu dalam melakukan analisis statistik data penelitian ini.
 7. Bapak dr. Andani Eka Putra, MSc yang telah banyak membantu dalam pemeriksaan laboratorium biologi molekuler, Ibu Dr. dr. Nuzulia I. dalam pemeriksaan parasitologi dan dr. PN Harijanto, SpPD-KPTI yang telah memberi pandangan berharga pada penelitian ini.
 8. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dan Ibu direktur RS. Dr. M. Djamil Padang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan pada PPDS Ilmu Penyakit Dalam.
 9. Seluruh staf pengajar Ilmu Penyakit Dalam yaitu: Bapak Prof. dr. H. Julius, SpPD-KGEH, Bapak Prof. dr. H. Saharman Leman, DTM&H, SpPD-KKV, FINASIM, Bapak Prof. dr. H. Syafril Syahbuddin, SpPD-KEMD, FINASIM, Bapak Prof. dr. H. Zulkarnain Arsyad, SpPD-KP, Bapak (Alm) dr. H. Djusman Jafar, SpPD-KGH, Dr. dr. Syaiful Azmi, SpPD-KGH, dr. Irza Wahid, SpPD-KHOM, dr. Najirman, SpPD-KR, dr. Arnelis, SpPD-KGEH, dr. H. Raveinal, SpPD, dr. Hj. Rose Dinda Martini, SpPD, dr. Hj. Arina Widya Murni, SpPD-KPsi, dr. Iskandar SpPD, dr. Saptino Miro, SpPD, dr. Roza Kurniati, SpPD yang telah banyak membimbing penulis selama mengikuti pendidikan serta membagi pengalaman dan nasehat yang sangat berguna bagi penulis.

10. Teman-teman sejawat residen dan senior residen yang telah tamat di Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK Unand/RS dr. M. Djamil atas bantuan dan kerjasama yang telah di bina selama ini, kepada perawat dan karyawan di bagian penyakit dalam, petugas laboratorium parasitologi, serta petugas di beberapa instansi kesehatan di wilayah Sumatera Barat yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

Semoga semua bantuan bapak, ibu dan sejawat sekalian mendapat imbalan di sisi Allah SWT.

Secara khusus, terima kasih dan rasa hormat yang teramat dalam serta ribuan terimakasih penulis sampaikan kepada Ayahanda Brigjend (purn). H. A. Nazri Adlani. dan Ibunda Hj. Aniarti tercinta yang senantiasa memberikan doa, bantuan dan dorongan semangat, demikian juga kepada Bapak dan Ibu mertua serta adik-adik yaitu: M. Umar, SE dan DR. Muniaty Aisyah, ST, MM yang selama ini selalu memberikan perhatian dan dorongan sehingga penulis tetap bersemangat menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada suami tercinta Ir. Kemas Achmad Riza Pahlevi, MBA dan anakku tersayang Syaifa Zahrani Kariza, terima kasih atas pengorbanan, kesabaran dan pengertiannya, serta semangat dan doa yang telah diberikan dengan ikhlas dalam mendampingi penulis selama menjalani pendidikan ini.

Penulis menyadari penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu saran dan kritik untuk kesempurnaan karya tulis ini sangat diharapkan. Semoga hasil penelitian ini dapat memberi kontribusi yang bermanfaat bagi pengembangan Ilmu Penyakit Dalam dan dunia kedokteran umumnya serta dirasakan manfaatnya oleh masyarakat.

Padang, April 2011

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
BAB I : PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Identifikasi Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Hipotesis Penelitian	7
1.5. Manfaat Penelitian	7
1.6. Kerangka Konseptual	8
BAB II : TINJAUAN KEPUSTAKAAN	10
2.1. Situasi Malaria di Dunia dan Indonesia	10
2.2. Mekanisme Resistensi dan Faktor - Faktor yang Mempengaruhinya	15
2.3. Resistensi Plasmodium Falciparum Terhadap Artesunat Amodiaquin..	29

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Angka Kegagalan Parasitologis Satu tahun Pertama Diuji Dengan PCR	30
Tabel 2.2	Golongan Obat Anti Malaria, Kelas, Penggunaan, Target dan Gen Resistensi	33
Tabel 3.1	Jadwal Kegiatan	35
Tabel 3.2	Derajat Resistensi Parasit Aseksual <i>P.falsiparum</i> Terhadap Terapi	45
Tabel 4.1	Karakteristik Dasar Penelitian	46
Tabel 4.2	Karakteristik Dasar Berdasarkan Analisis Tingkat Resistensi <i>Invivo</i>	47
Tabel 4.3	Distribusi Pola Resistensi Terhadap Artesunat Amodiaquin	49
Tabel 4.4	Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Jenis Kelamin	49
Tabel 4.5	Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Endemisitas Asal Daerah	50
Tabel 4.6	Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Densitas Parasit	52
Tabel 4.7	Primer Yang Digunakan Sebagai Identifikasi Kodon 263 PfATP6 dan 86 PfMDR1	52
Tabel 4.8	Hubungan Mutasi PfATP6,263 Berdasarkan Tingkat Resistensi Artesunat Amodiaquin	56
Tabel 4.9	Hubungan Mutasi PfMDR1 N86Y Berdasarkan Resistensi Artesunat Amodiaquin	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Kerangka Konseptual	8
Gambar 2.1	API dan AMI Indonesia tahun 2007	11
Gambar 2.2	Area Transmisi Malaria dan Distribusi Laporan Resistensi atau Gagal Pengobatan Antimalaria	13
Gambar 2.3	Distribusi Penyebaran Resistensi Klorokuin di Dunia	14
Gambar 2.4	Target Obat Berdasarkan Golongan Antimalaria Pada <i>P. Falciparum</i>	15
Gambar 2.5	Mekanisme Pembukaan atau Pemutusan Ikatan Peroksida Dari Artemisinin	17
Gambar 2.6	Skema Diagram Mekanisme Aksi Kerja Artemisinin Dan Antimalaria	19
Gambar 2.7	Mekanisme Target dan Faktor- Faktor Resistensi Artemisinin Pada <i>P. Falciparum</i>	22
Gambar 2.8	Peta Gen PfMDR1 dan Alel-Alel Mutannya	25
Gambar 2.9	Selektifitas Alel-Alel PfMDR1 Sebelum dan Sesudah Terapi AAQ	32
Gambar 3.1	Kerangka Penelitian	44
Gambar 3.2	Interprestasi Hasil Uji 7 Hari yang Disederhanakan	45
Gambar 4.1	Distribusi Proporsi Resistensi Artesunat Amodiakuin	48
Gambar 4.2	Hasil Amplifikasi Gen PfATP6	53
Gambar 4.3	Hasil Amplifikasi Gen PfMDR1	53
Gambar 4.4	Urutan Nukleotida dari 721 – 840	54
Gambar 4.5	Urutan Nukleotida Dari 61 – 301 atau kodon 20 – 120	54
Gambar 4.6	Distribusi Resistensi Berdasarkan Mutasi Gen	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Data Dasar Penelitian

**Lampiran 2: Laporan Kumulatif Penemuan dan Pengobatan Malaria
Propinsi Sumatera Barat 2010**

**Lampiran 3: Endemisitas Malaria Berdasarkan Spleen Rate
Propinsi Sumatera Barat**

Lampiran 4: Formulir Penjelasan Untuk Pasien

Lampiran 5: Persetujuan Ikut Serta

Lampiran 6: Status Pasien Penelitian

Lampiran 7: Struktur Organisasi Penelitian

Lampiran 8: Curriculum Vitae

DAFTAR SINGKATAN

WHO	World Health Organisation
OAM	Obat Antimalaria
MDR	Multiple Drug Resistance
ACT	Artemisinin Combination Therapy
ART	Artemisinin
SP	Sulfadoksin-pirimetamin
AM	Artemeter-meflokuin
AAQ	Artesunat-amodiakuin
AL	Artemeter-lumefantrin
DHP	Dihidroartemisinin-piperakuin
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
API	Annual Parasite Incidence
AMI	Annual Malaria Incidence
MIA	Moderate Incidence Area
LIA	Low Incidence Area
PfMSP1	<i>P. falciparum</i> Merozoite Surface Protein1
PfMSP2	<i>P. falciparum</i> Merozoite Surface Protein2
PfGLURP	<i>P. falciparum</i> Glutamate Rich Protein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
PfCRT	<i>P. falciparum</i> Chloroquine Resistance Transporter
PfMDR1	<i>P. falciparum</i> Multidrug Resistance 1
Pgh1	P-glycoprotein homologue 1
PfATP6	<i>P. falciparum</i> AdeninTri Phosphatase 6
FPIX	Ferriprotoporphyrin IX
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
PfHRPII	<i>P. falciparum</i> Histidin Rich Protein II
SERCA	Sarcoendoplasmik Retikulum Calcium-ATPase
HDT	Hapusan Darah Tepi

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat diberbagai belahan dunia, terutama di negara-negara berkembang yang beriklim tropis seperti di Indonesia. Diperkirakan 60 % penduduk Indonesia tinggal di daerah endemis malaria yang tingkat endemisitasnya beragam. Strategi global eradikasi malaria pernah berhasil menurunkan insiden malaria, akan tetapi WHO menyatakan bahwa kasus malaria dikarenakan berbagai sebab kembali meningkat.¹

Departemen kesehatan (Depkes) menempatkan malaria sebagai salah satu penyakit infeksi yang menjadi permasalahan, sebab sangat mempengaruhi angka kematian bayi, anak balita, dan ibu melahirkan serta mampu menurunkan produktivitas kerja. Pada dasarnya malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh sporozoa genus plasmodium yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina. Berdasarkan hasil penelitian Depkes tahun 1990, lebih dari 95 % kasus malaria disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* dan *P. vivax*.²

Penanggulangan penyakit ini telah dilakukan sejak lama melalui berbagai upaya, misalnya penanggulangan vektor malaria, pengobatan penderita dan perbaikan lingkungan. Program pemberantasan meliputi diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, surveilan dan pengendalian vektor yang semuanya ditujukan memutus mata rantai penularan malaria.³

Pada tahun 1973 ditemukan pertama kali kasus resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di Kalimantan Timur. Sejak itu kasus resistensi terhadap klorokuin yang dilaporkan semakin meluas. Tahun 1990 dilaporkan telah terjadi resistensi parasit *P. falciparum* terhadap klorokuin di seluruh provinsi di Indonesia. Selain itu dilaporkan juga adanya resistensi plasmodium terhadap sulfadoksin pirimetamin (SP) di beberapa wilayah di Indonesia, sementara penggunaan amodiakuin walaupun belum atau tidak digunakan, 4 dari 5 provinsi (Kalimantan Timur, Timor Timur, Sulawesi Selatan dan Irian Jaya) yang diteliti melaporkan adanya resistensi invitro.

Penelitian di kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat (Sumbar) tahun 2004 menunjukkan kegagalan terapi klorokuin yaitu 78,43% dan SP mencapai 80,77% pada malaria falsiparum tanpa komplikasi.^{4,5} Evanita (2002) mendapatkan tingkat resistensi klorokuin yang tinggi yaitu 72,2% dengan proporsi terbanyak pada resisten II (RII) 36,6% dan resisten III (RIII) 51,9% sehingga klorokuin tidak efektif lagi digunakan sebagai obat anti malaria (OAM) di Padang, dengan demikian pada sebagian besar wilayah Sumbar resistensi klorokuin telah terjadi.⁶

Masalah resistensi parasit terhadap OAM merupakan tantangan besar dengan implikasi penyebaran malaria ke daerah baru atau munculnya kembali malaria di daerah yang telah diberantas. Keadaan ini dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas akibat malaria. Oleh sebab itu untuk menanggulangi adanya *Multiple Drug Resistance* (MDR), pemerintah telah merekomendasikan

obat pilihan pengganti dengan terapi kombinasi artemisinin (*Artemisinin Combination Therapy / ACT*). Konsep pengobatan yang digunakan di Indonesia saat ini adalah kombinasi yang secara umum dikelompokkan menjadi kombinasi terapi artemisinin (ART) dan non ART.¹

Terapi kombinasi ART umumnya merupakan regimen pengobatan 3 hari. Pengobatan ini untuk malaria falsiparum memberikan hasil yang cepat, dapat dipercaya, aman, mencegah resistensi, dan mengurangi penularan. Thailand adalah negara pertama yang memperkenalkan penggunaan ACT tahun 1994, kombinasi artemeter-meflokuin (AM) saat ini digunakan secara luas di beberapa negara di Asia Tenggara, sementara artesunat-amodiakuin (AAQ) dan artemeter-lumefantrin (AL) merupakan ACT terbanyak yang digunakan di Afrika.¹

Terapi kombinasi ART yang digunakan di Indonesia berdasarkan rekomendasi WHO 2001 dan pedoman penatalaksanaan malaria Depkes 2007 adalah kombinasi AAQ dengan dosis tunggal harian selama 3 hari dan dilaporkan cukup ditoleransi dengan baik, efek cepat, mencegah terbentuknya gametosit, dan efektif untuk parasit MDR. Kombinasi ini diketahui pada penelitian Adjuik dkk (1999) di Gabon, Kenya dan Senegal merupakan kombinasi yang efektif dan ditoleransi dengan baik, angka kesembuhan parasit selama 14 hari pemberian kombinasi mencapai lebih dari 90% pada semua tempat penelitian.^{7,8}

Resistensi terhadap ACT di dunia terutama kombinasi AAQ yang banyak digunakan di Afrika, maupun kombinasi ART lainnya belum banyak dilaporkan. Sejak tahun 1995 Thailand telah menggunakan kombinasi AM selama 2 hari

ditambah primakuin dosis tunggal di beberapa propinsinya, telah melaporkan adanya resistensi terhadap meflokuin begitu pula dengan Kamboja yang sejak tahun 2000 menggunakan AM selama 3 hari telah melaporkan perkembangan kegagalan terapi dengan regimen yang baru tersebut.⁹

Di Indonesia sendiri penggunaan ACT dalam penatalaksanaan malaria terutama AAQ dimulai sejak tahun 2004 dan terus dilaksanakan sesuai pedoman Depkes 2007, begitu pula regimen kombinasi ini telah digunakan di Sumbar khususnya di Padang, namun penelitian mengenai efektifitas dan didukung oleh adanya resistensi molekuler akibat mutasi gen terhadap kombinasi ini belum ada.

Penelitian Setyaningrum dkk (2004) pada 54 pasien malaria falsiparum tanpa komplikasi di Lampung dengan pemberian kombinasi AAQ selama 3 hari menunjukkan kegagalan terapi sampai 24,15% pada observasi sampai hari ke 28 walaupun kombinasi ini jauh lebih efektif daripada klorokuin (kegagalan terapi 80%).^{Kutip 4} Dengan adanya penelitian tersebut dan berdasarkan kebijakan WHO 2006 yaitu analisis dan perubahan kebijakan terapi antimalaria di suatu daerah seharusnya dimulai ketika angka kesembuhan dengan rekomendasi terapi OAM saat ini mengalami penurunan dibawah 90% (sesuai dengan uji pengawasan efikasi terapi), maka sebaiknya sudah mulai dipikirkan kebijakan penggunaan AAQ di Sumbar secara luas.¹⁰

Sebagai baku emas uji efikasi dalam penentuan tingkat kegagalan terapi dan penentuan kebijakan pengobatan, WHO masih menggunakan uji resistensi *in vivo* sebagai baku emas dan telah mengalami berbagai perubahan serta

modifikasi dalam interpretasi hasilnya. Berbagai faktor dapat mempengaruhi hasilnya terutama imunitas penderita sehingga seringkali tidak menggambarkan resistensi obat secara murni. Pemeriksaan lain yang lebih menggambarkan resistensi obat murni adalah uji invitro dan molekuler.⁷

Pemeriksaan molekuler saat ini yang banyak diteliti terutama mutasi ditingkat gen, yaitu mutasi gen protein transpor obat seperti PfCRT dan PfMDR pada resistensi klorokuin, mutasi gen DHFR dan DHPS pada resistensi SP serta mutasi gen PfMDR yang mempengaruhi sensitivitas berbagai OAM seperti amodiakuin, meflokuin, kina, halofantrin, dan kemungkinan ART. Penelitian lainnya yang sedang dikembangkan adalah mutasi gen spesifik pada ART yaitu pada gen protein spesifik PfATP6.¹¹

Penelitian molekuler terbanyak yang ditemukan adalah mengenai dasar molekuler resistensi *P. falciparum* terhadap golongan kuinolin, bukti yang ada menunjukkan bahwa resistensi tersebut bersifat multigen. Di Indonesia, Syafruddin dkk (2005) yang meneliti hubungan polimorfisme gen terhadap resistensi klorokuin dan SP di 4 wilayah Indonesia bagian barat (Nias, Hauru, Kokap dan Kutai) yang endemis malaria mendapatkan dari 85 sampel, 100% membawa gen polimorfisme PfCRT,76T dan 116 sampel adalah 100% PfMDR1,86Y, mutasi tidak ditemukan pada kodon 1034, 1042, dan 1246 yang juga menimbulkan resistensi klorokuin di wilayah lain. Sementara di 4 wilayah Indonesia timur ditemukan mutasi PfMDR1,86Y lebih rendah dan ditemukan mutasi cukup tinggi pada PfMDR1, 1042D¹²

Penelitian ini mencoba menggambarkan efektivitas dan kemungkinan adanya resistensi malaria falsiparum terhadap AAQ melalui dua metode pemeriksaan yaitu tes standar 7 hari WHO yang disederhanakan dan *polymerase chain reaction restriction fragment lenght polymorphisms* (PCR-RLFP) sebagai pemeriksaan standar untuk mendeteksi resistensi obat akibat mutasi genetik atau penanda molekuler kegagalan pengobatan dan sekaligus menganalisis faktor-faktor yang diduga mempengaruhi tingkat resistensi *P. falciparum* terhadap AAQ.

1.2 Identifikasi Masalah

1. Berapa besar resistensi *P. falciparum* terhadap kombinasi artesunat amodiakuin secara *invivo*?
2. Apakah ada hubungan mutasi alel gen PfATP6 dan PfMDR1 dengan resistensi terhadap kombinasi artesunat amodiakuin ?
3. Apakah ada hubungan faktor-faktor jenis kelamin, endemisitas asal daerah, dan densitas parasit dengan resistensi terhadap kombinasi ini ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui hubungan mutasi alel gen PfATP6 dan PfMDR1 dengan resistensi malaria falsiparum terhadap kombinasi artesunat amodiakuin serta faktor-faktor yang diduga mempengaruhinya

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan resistensi malaria falsiparum terhadap kombinasi artesunat amodiakuin dengan tes *invivo* standar 7 hari yang disederhanakan WHO
2. Menilai proporsi mutasi alel PfATP6 dan PfMDR1 pada malaria falsiparum
3. Menilai hubungan mutasi alel gen PfATP6 dan PfMDR1 dengan resistensi malaria falsiparum terhadap kombinasi artesunat amodiakuin
4. Melihat hubungan jenis kelamin, endemisitas asal daerah, dan densitas parasit terhadap resistensi

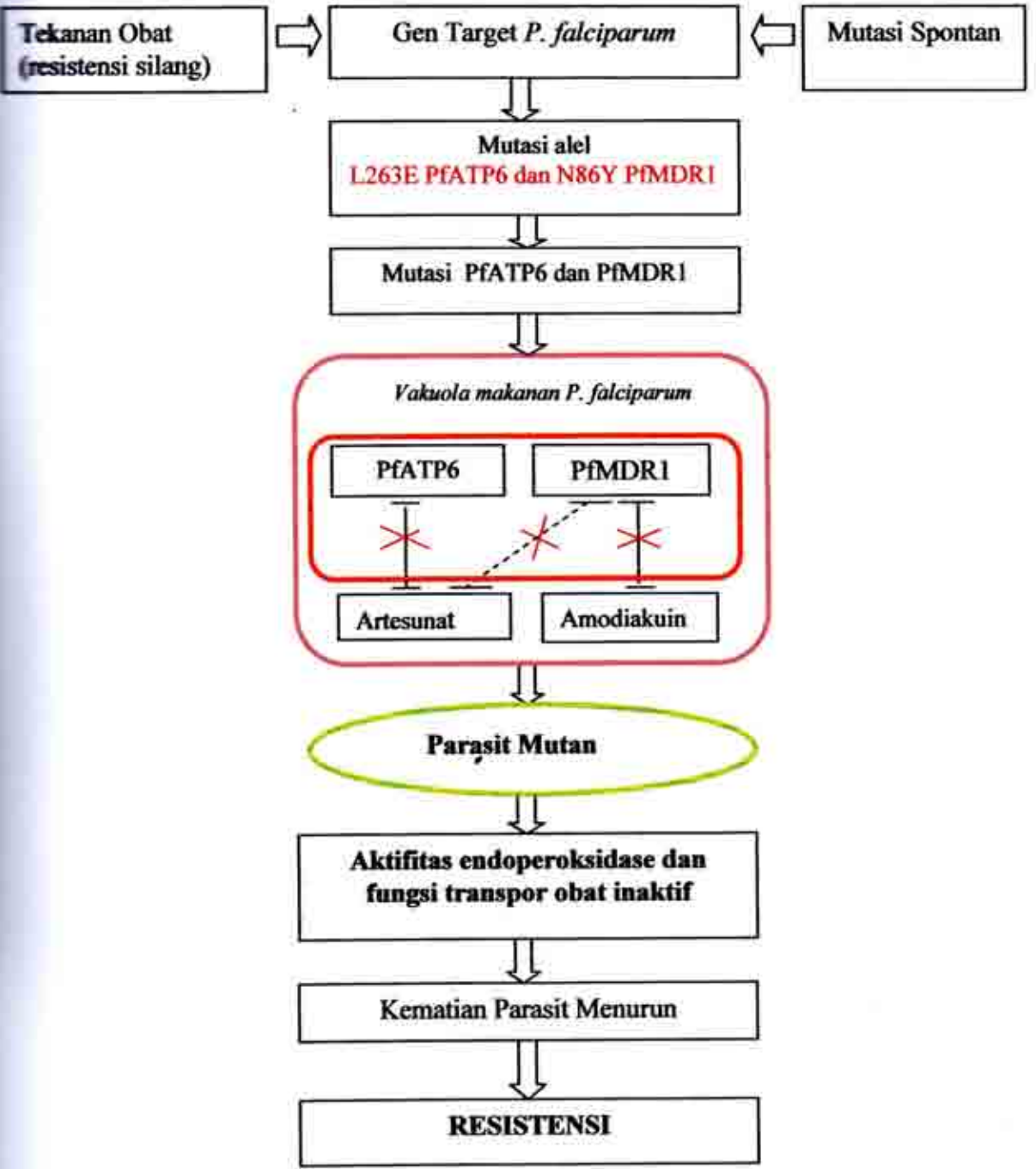
1.4. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat hubungan mutasi alel gen PfATP6 dan PfMDR1 dengan resistensi malaria falsiparum terhadap kombinasi artesunat amodiakuin
2. Terdapat hubungan jenis kelamin, endemisitas asal daerah, dan densitas parasit dengan resistensi malaria falsiparum terhadap kombinasi artesunat amodiakuin

1.5. Manfaat Penelitian

1. Dengan menentukan resistensi ini maka dapat diketahui apakah kombinasi artesunat amodiakuin masih efektif digunakan sebagai terapi standar anti malaria di Sumatera Barat.
2. Dengan diketahui mutasi alel maka dapat dijadikan penanda dalam mendeteksi resistensi molekuler parasit terhadap kegagalan terapi kombinasi artesunat amodiakuin sehingga dapat dipertimbangkan kombinasi antimalaria lainnya

1.6. Kerangka Konseptual



Gambar 1.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan gambar:

Adanya mutasi spontan parasit atau pengaruh tekanan obat melalui resistensi silang obat yang segolongan yang terus menerus pada populasi menyebabkan mutasi pada tingkat gen yaitu kodon N86Y PfMDR1 dan L263E PfATP6 yang menyebabkan perubahan asam amino dari protein yang mengatur mekanisme kerja obat dalam vakuola makanan *P. falciparum*, sehingga ikatan obat dan protein transpornya yaitu PfMDR1 dengan amodiakuin atau mungkin ART serta protein spesifik yang mengatur mekanisme kerja OAM endoperoksidase dengan derivat ART akan terhambat. Selanjutnya akan menimbulkan parasit-parasit mutan pada populasi, akibatnya aktifitas fungsi endoperoksidase dan transpor obat berubah (inaktif), ditandai dengan kematian parasit yang menurun sebagai akibat penurunan efektifitas kerja obat (seleksi obat). Hal ini dapat dinilai dengan adanya resistensi atau kegagalan terapi parasit malaria secara *invivo* dan molekuler

BAB II

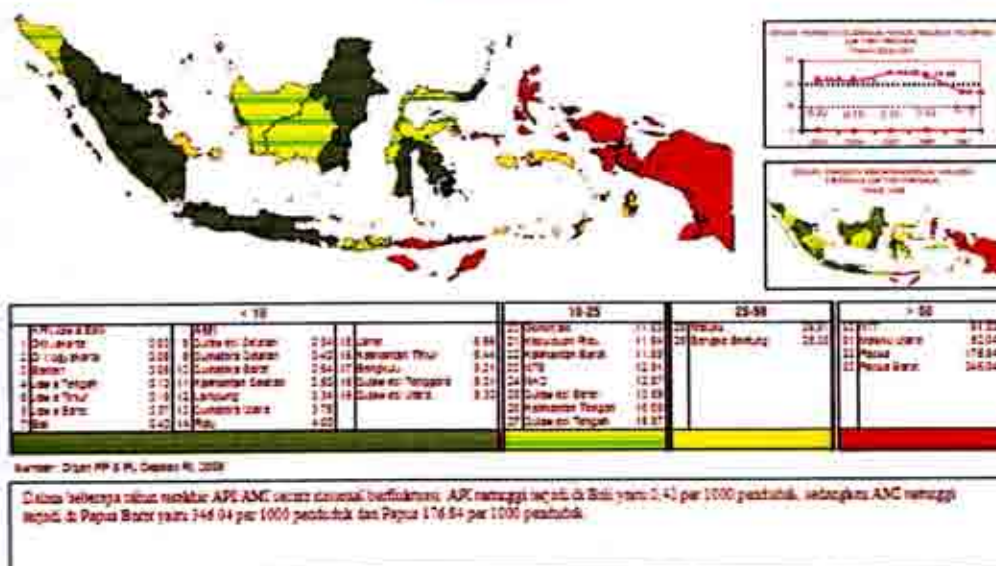
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Situasi Malaria Dan Resistensi Obat Anti Malaria Di Dunia Dan Indonesia

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di lebih dari 100 negara yaitu dengan perkiraan 40% dari total penduduk dunia. Prevalensi penyakit ini diperkirakan sekitar 300-500 juta kasus klinis setiap tahun. Di Indonesia didapati jumlah kabupaten/kota endemik pada tahun 2004 sebanyak 424 dari 579 kabupaten/kota, dengan persentase penduduk yang berisiko penularan sebesar 42,42% terpusat pada wilayah Indonesia bagian Timur.¹³

Di Jawa-Bali angka kasus malaria yang sudah dikonfirmasi perseribu penduduk atau *Annual Parasite Incidence* (API) selama tahun 2006 adalah 0,19% sementara diluar Jawa-bali didapati angka klinis malaria perseribu penduduk atau *Annual Malaria Incidence* (AMI) selama tahun 2006 sebesar 23,98% atau secara umum cenderung menurun dibanding tahun 2000-2006 namun meningkat jika dibanding selama tahun 2002-2004. Sementara untuk tahun 2007, API dan AMI di Indonesia terlihat pada gambar dibawah ini^{13, 14}

**ANNUAL PARASITE INCIDENCE (API)/
ANNUAL MALARIA INCIDENCE (AMI) (per 1000 Penduduk)
TAHUN 2007**



Gambar 2.1 API dan AMI Indonesia tahun 2007 ¹⁴

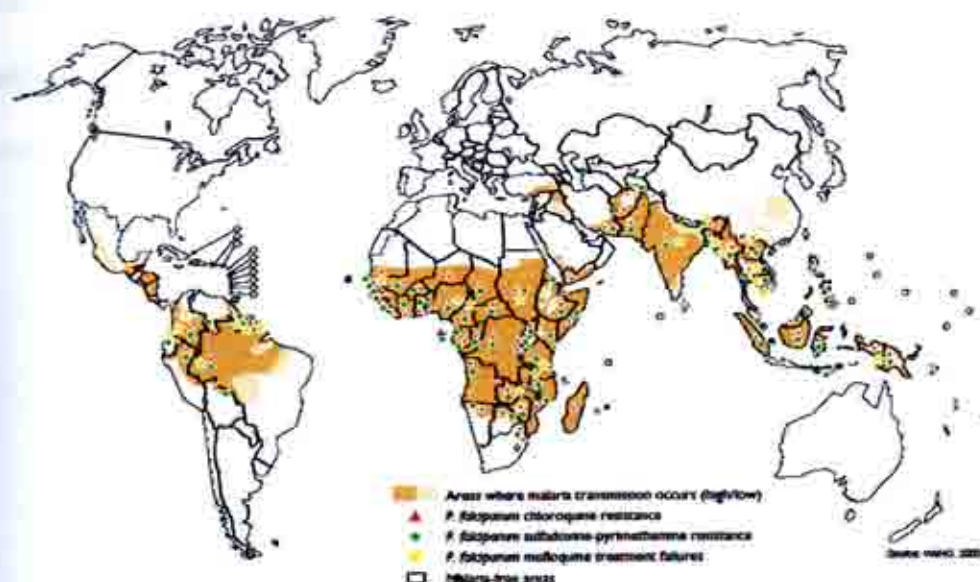
Proporsi kematian berdasarkan survei kesehatan rumah tangga tahun 2001 sebesar 2% dan dalam periode ini, kejadian luar biasa (KLB) terjadi di 23 propinsi, 51 kabupaten/kota, meliputi 108 desa dengan jumlah penderita 11.597 dan kematian 298 jiwa. Mortalitas tahun 2005 sebesar 0,92% dan tahun 2007 0,2% ^{3, 13}

Di Indonesia terdapat berbagai suku bangsa dengan ragam kebiasaan dan perilaku yang merupakan faktor berpengaruh dalam menunjang keberhasilan partisipasi masyarakat dalam program pengendalian malaria. Beberapa perilaku yang tidak menunjang adalah kebiasaan masyarakat yang terbiasa mencari pengobatan sendiri dengan membeli obat ke warung dan menggunakan obat dengan dosis tidak adekuat yang dapat mempengaruhi timbulnya resistensi obat. ¹⁴

Menurut laporan WHO 2006 resistensi penggunaan seluruh golongan OAM terus meningkat kecuali derivat ART. Hal ini meningkatkan suatu serangan malaria global dan penanganan yang utama dalam melakukan kontrol malaria. Adanya penyebaran dan mendiskriminasi penggunaan suatu golongan antimalaria, menyebabkan tekanan terhadap kekuatan yang bersifat selektif pada parasit untuk berkembang menjadi situasi dengan tingkat resistensi yang tinggi. Resistensi dapat dicegah atau onsetnya diperlambat dengan mengkombinasikan golongan OAM yang memiliki mekanisme aksi obat berbeda dan kepastian angka kesembuhan yang sangat tinggi untuk memperbaiki regimen dosis.¹⁰

Pada awalnya, pemberian antimalaria yang tidak adekuat menyebabkan resistensi dengan tingkat yang rendah serta prevalensi malaria juga rendah namun hal ini ternyata membahayakan. Pada pengobatan ini pasien merasa lebih baik selama beberapa minggu, kemudian gejala muncul kembali umumnya lebih dari dua minggu ditandai dengan anemia yang memburuk serta menjadi suatu pembawa gametosit (yang membawa gen resistensi) sumber penularan malaria. Selanjutnya para ahli kesehatan mengartikan keadaan ini sebagai suatu perluasan infeksi yang baru (reinfeksi). Pada saat itu jika percobaan obat klinis dilakukan, adanya resistensi tidak bisa dikenali. Selama perburukan gejala ini timbullah resistensi yang berlangsung antara infeksi primer dan rekrudensi, sehingga penanda diagnostik yang pasti dari resistensi akan gagal memperbaiki pemberian terapi pilihan selanjutnya.^{15,16}

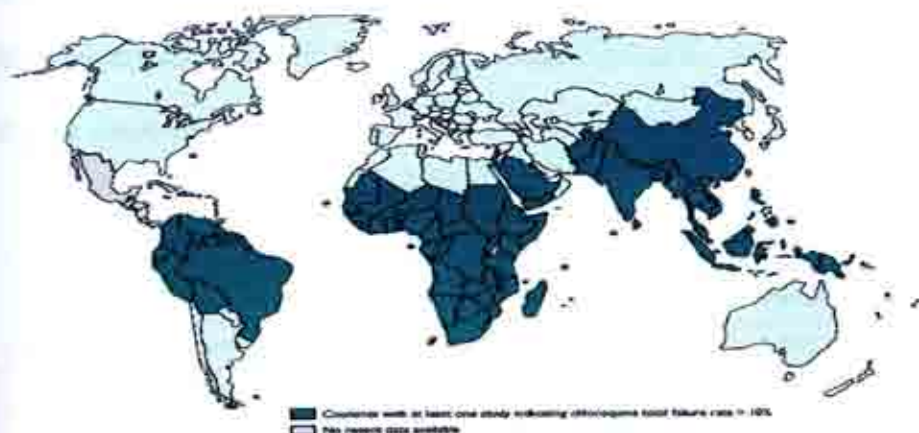
Resistensi terhadap OAM menjadi permasalahan di dunia terutama pada *P. falciparum* yang mengalami penyebaran secara luas terhadap penggunaan klorokuin, SP dan meflokuin, hal ini sudah diobservasi seperti terlihat pada gambar peta penyebaran resistensi dibawah ini. Di Indonesia resistensi terhadap ketiga golongan antimalaria tersebut juga terjadi.¹⁰



Gambar 2.2 Area Transmisi Malaria dan Distribusi Laporan Resistensi Atau Gagal Pengobatan Dengan Antimalaria Tertentu (resistensi meflokuin Afrika masih dalam bentuk review)¹⁰

Resistensi yang paling luas terjadi pada penggunaan antimalaria klorokuin. Hal ini dilaporkan pertama kali di Thailand dan Colombia pada tahun 1950 setelah 12 tahun obat ini diperkenalkan. Tahun 1980 diseluruh area endemis di Amerika Selatan dan tahun 1989 di Asia dan Oceania terjadi resistensi klorokuin. Di Afrika resistensi klorokuin menimbulkan keadaan darurat di Utara

Afrika dan menyebar secara gradual mencapai selatan Afrika sepanjang tahun 1980. Saat ini di Amerika Serikat resistensi terdokumentasi di seluruh area endemis malaria falsiparum kecuali Amerika Tengah dan Karibia. Hal ini mendasari penelitian molekular yang menitik beratkan adanya resistensi klorokuin pada kasus-kasus malaria di Afrika yang berasal dari utara Asia. Resistensi klorokuin telah menimbulkan situasi darurat lebih kurang 10 kali pada 50 tahun terakhir. Distribusi penyebaran resistensi klorokuin di dunia dapat dilihat pada gambar dibawah ini: ¹⁰



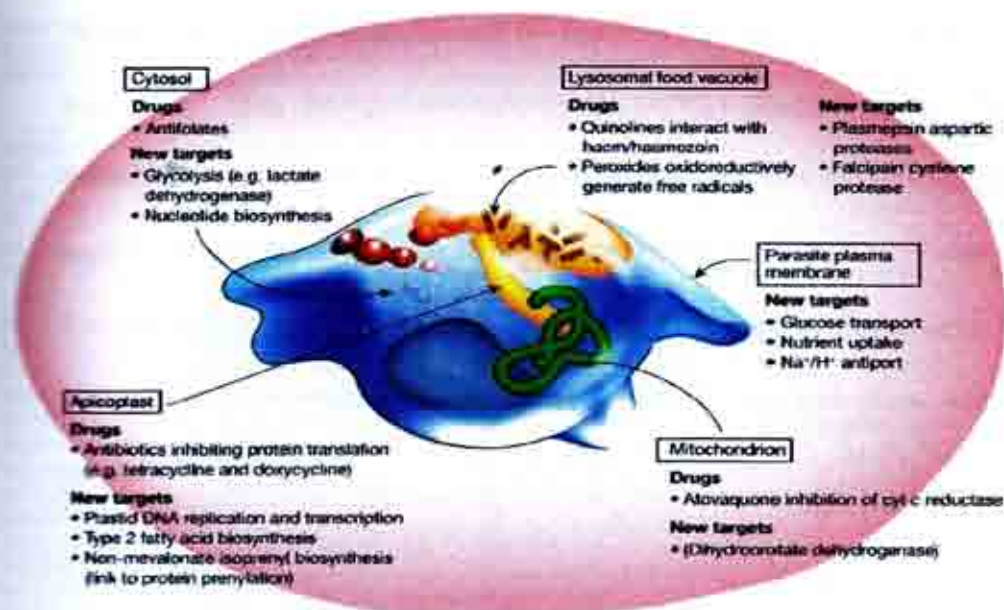
Gambar 2.3 Distribusi Penyebaran Resistensi Klorokuin Di Dunia ¹⁰

Seperti halnya klorokuin pada penggunaan AAQ dijumpai angka yang lebih tinggi pada angka kegagalan klinis dan parasitologis kombinasi ini setelah pemantauan 28 hari dengan pemeriksaan PCR. Dilaporkan adanya adanya reinfeksi setelah penggunaan AAQ di Afrika bervariasi yaitu 1,2% di Angola

3,5% di Senegal, 4% di Uganda, 6,8% di Kongo, 9,2% di Zanzibar, 7,2% di Sudan dan 19,5% di Rwanda ¹⁵

2.2 Mekanisme Kerja, Resistensi Dan Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Resistensi Artesunat Amodiaquin

Obat-obat antimalaria yang ada saat ini dapat dikelompokkan pada beberapa golongan, beberapa obat baru telah dipakai dalam 20 tahun terakhir namun kegagalan pengobatan masih sering dilaporkan khususnya jika obat-obat tersebut diberikan secara tunggal. Pada gambar dibawah ini memperlihatkan penggolongan obat antimalaria dan targetnya pada organela utama trofozoit *P. falciparum* didalam eritrosit baik yang sedang digunakan saat ini maupun obat baru yang masih dalam penelitian :



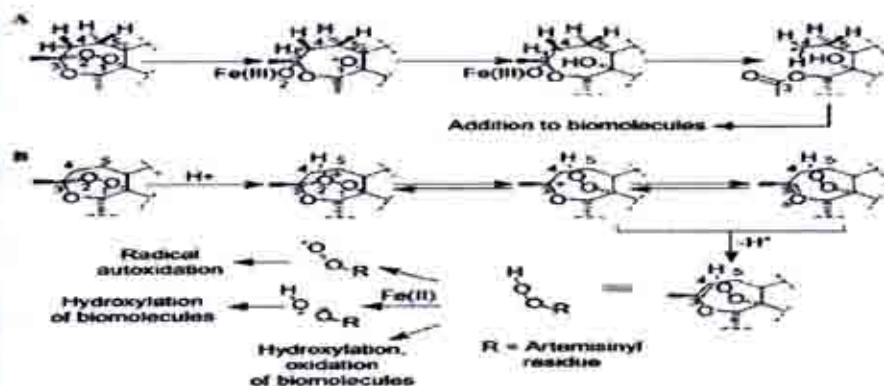
Gambar 2.4 Target Obat Berdasarkan Golongan Antimalaria Pada Organela

P. Falciparum Kutip 17

Setelah dilakukan berbagai upaya pemberantasan tetapi prevalensi malaria masih tetap tinggi. Hal ini disebabkan berbagai hambatan antara lain resistensi vektor terhadap insektisida dan resistensi parasit terhadap obat antimalaria terutama klorokuin, begitu pula AAQ yang efikasi dan efektifitasnya belum banyak diteliti.

Beberapa teori dikembangkan untuk menjelaskan mekanisme kerja ART dan turunannya yaitu berkaitan dengan adanya struktur rantai 1,2,4 trioksan (ikatan endoperoksida), bila terjadi resistensi akibat mutasi gen dapat menghambat mekanisme kerja dibawah ini: ^{18, 19, 20}

- a. Teori pertama menjelaskan bahwa ART bekerja dengan cara membentuk radikal bebas yang berinti karbon (*C-centered free radical*) dengan bantuan logam Fe^{2+} atau *Ferriprotoporphyrin IX* (FPIX). Radikal bebas tersebut kemudian akan mengikat dan menghambat kerja beberapa biomolekul parasit seperti *translationally controlled tumor protein* (TCTP), *P. Falciparum histidin rich protein II* (PfHRP II), dan hemoglobin. Terhambatnya kerja biomolekul-biomolekul tersebut pada akhirnya menimbulkan kematian parasit.



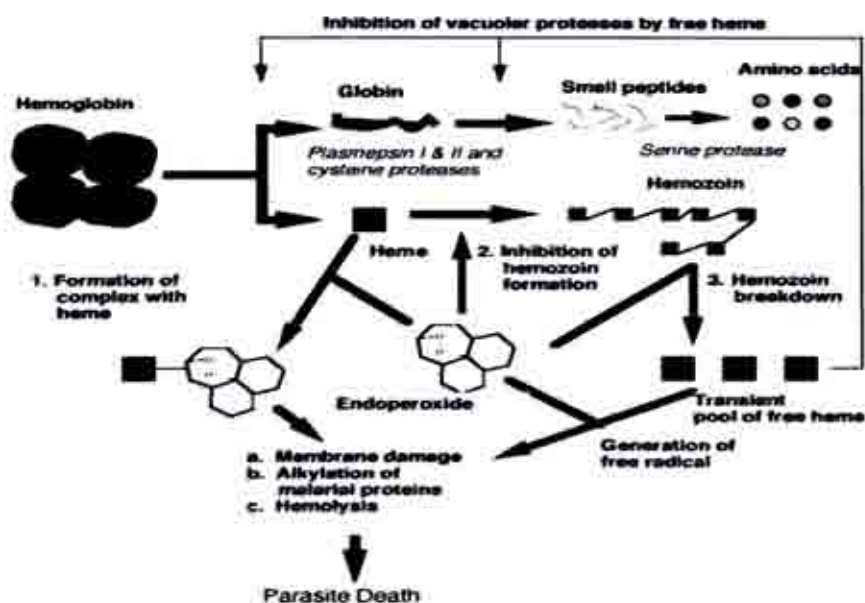
Gambar 2.5 Mekanisme Pembukaan atau Pemutusan Ikatan Peroksida dari Artemisin. (A) Pemutusan secara reduksi dari ikatan peroksida dan pembentukan *C-centered radical*. (B) Pembukaan Rantai dari ikatan peroksida untuk membentuk hidropersida dan jalur dekomposisi subsekuen.²⁰

Teori Kedua yaitu ART bekerja secara spesifik pada protein kalsium ATPase tipe *Sarcoendoplasmik Retikulum calcium-ATPase* (SERCA) yang dikenal sebagai PfATP6. PfATP6 adalah protein yang masuk dalam kelompok SERCA dan berfungsi mengatur regulasi ion kalsium dalam sitoplasma sel mamalia dimana, kalsium ini pada membran parasit berperan pada metabolisme sel, pembelahan dan diferensiasi sel termasuk motilitas dan invasi ke dalam sel dari inang. Kalsium juga penting untuk diferensiasi gametosit plasmodium dan sinkronisasi siklus hidup parasit dalam respon terhadap produksi melatonin dari sel inang^{20, 21}

Pada parasit malaria, protein tersebut dihambat secara spesifik oleh ART meski penanda molekul dari selektivitas tersebut belum jelas. Diduga ART bekerja pada ranah berikatan thapsigargin berdasarkan kesamaan struktur thapsigargin.

Berdasarkan kesamaan struktur molekul antara ART dengan thapsigargin, suatu inhibitor spesifik dari ATP6 muncul dugaan bahwa ART mungkin berinteraksi dengan ATP6 pada ranah perikatan thapsigargin. ART berefek pada *C-centered free radical* yang dibangun melalui reaksi antara ikatan peroksida dan ion Fe (bersifat Fe dependent) dari spesies sebagai mekanisme aksi biologis dari ART.^{20, 21}

Disamping itu kerja lain dari ART adalah menghambat nutrisi masuk kedalam vakuola makanan sehingga terjadi defisiensi asam amino disertai pembentukan vakuola *autophagic* yang selanjutnya menimbulkan kematian parasit karena kehilangan sitoplasma, menghambat hemoglobinase, menghambat detoksifikasi oleh feroheme, alkilasi DNA, pembentukan radikal bebas, oksidasi dan alkilasi protein, serta menghambat peroksidasi lipid seperti terlihat pada gambar dibawah ini:²²



Gambar 2.6 Skema Diagram Mekanisme Aksi Kerja Artemisinin dan Antimalaria Endoperoksida ²¹

Menurut Jung dkk (2005) adanya interaksi hidrofobik ART dengan protein PfATP6 dan terputusnya ikatan endoperoksida oleh ion besi untuk membentuk *C-centered radical* yang menimbulkan inaktivasi enzim dan kematian parasit. Bentuk ikatan tersebut merupakan interaksi hidrofobik antara rantai luar derivat ART dengan residu hidrofobik dari asam amino PfATP6 seperti LEU263, ILE272, PHE273 dan merupakan bentuk yang konsisten, sehingga dikatakan bahwa residu 263 terlibat pada pengikatan ART pada PfATP6. Penelitian ini juga menyatakan bahwa ikatan ART pada PfATP6 mendahului aktivasi ikatan peroksida oleh Fe spesies. ²³

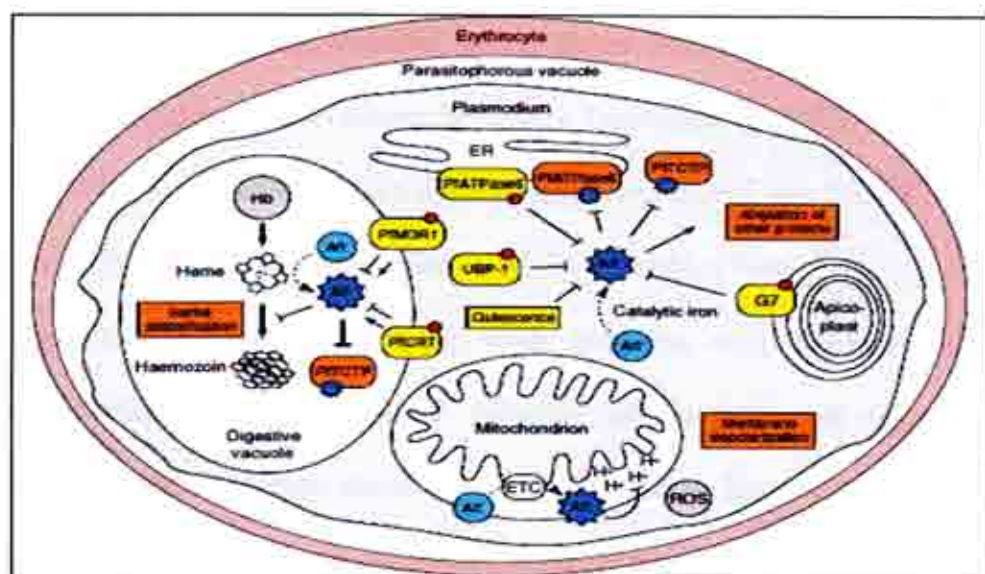
Hubungan struktur dan fungsi SERCA disimpulkan bahwa residu asam amino L263 berperan pada sensitivitas terhadap ART. Perubahan leusin menjadi asam glutamat (mutasi residu) merupakan residu pada daerah yang sama di SERCA mamalia menyebabkan resistensi relatif pada mamalia dan penurunan terhadap efek inhibisi ART. Saat ini polimorfisme DNA pada gen PfATP6 telah dilaporkan pada isolat *P. falciparum* di lapangan maupun laboratorium, seperti S769N pada artemether, E431K, A623E, dan lain-lain namun kaitannya dengan resistensi terhadap ART masih belum jelas. ^{23, 24, 25}

- Teori ketiga yaitu efek ART diperantarai kerusakan potensial membran mitokondria karena perekatannya dengan rantai transfer elektron yang menyebabkan rusaknya fungsi mitokondria. Selain itu hilangnya potensial membran mitokondria menyebabkan gangguan jalur sintesis pirimidin yang pada akhirnya menyebabkan kematian parasit. Disamping itu delesi gen NDE1 yang menyandi NADH dehidrogenase yang merupakan salah satu subunit pada rantai respirasi kompleks I di mitokondria, juga berhubungan dengan resistensi terhadap ART, sedangkan overekspresi dari gen ini berhubungan dengan peningkatan sensitivitasnya. ¹⁸

Menurut Cowman (1991) pada umumnya bila terjadi resistensi pada OAM akan diikuti resistensi terhadap OAM lain, karena itu diduga mekanisme resistensi klorokuin sama dengan OAM lainnya. Resistensi gen karena mutasi gen dapat terjadi akibat tekanan obat yang terus menerus. Akibat mutasi, parasit dapat tetap hidup dengan mengambil jalur metabolisme lain sehingga terhindar dari pengaruh

obat. Aktivitas malaria terjadi dalam vakuola makanan, molekul yang bertanggung jawab atas keluar masuknya obat ke dalam vakuola makanan adalah glikoprotein P (*P-glycoprotein homologue 1/Pgh1*) yang disandi oleh gen *P. falciparum Multidrug Resistance 1* (PfMDR1) dalam vakuola. Obat yang masuk dalam vakuola terperangkap dan tidak bisa keluar lagi sehingga dapat membunuh parasit. Bila terjadi mutasi akan terjadi amplifikasi dan overekspresi gen yang mengatur glikoprotein-P sehingga fungsinya berubah dan memodulasi resistensi. Hal ini menyebabkan obat dapat keluar lagi (efluks) dan masuk kedalam sitoplasma dan dinaktifkan sehingga parasit tidak terbunuh.^{26, 27}

Secara lebih jelas mekanisme dan target kerja serta faktor-faktor resistensi yang diduga dari derivat ART dapat dilihat pada gambar dibawah ini dimana target kerja ART dan resistensinya pada protein PfATP6 dan PfTCTP sementara mekanisme resistensi yang masih diduga yaitu pada selain pada protein PfATP6 juga pada PfCRT, PfMDR1, UBP-1 dan G7:



Gambar 2.7 Mekanisme Target dan Faktor-Faktor Resistensi ART Pada *P. falciparum*. Protein yang mengalami mutasi (titik merah) menunjukkan peningkatan (panah) atau penurunan (garis hambatan) sensitivitas secara invitro dari ART, warna oranye adalah target atau mekanisme yang diduga dan warna kuning adalah faktor-faktor resistensi yang diduga)²⁸

Dilain pihak telah diketahui mekanisme kerja amodiakuin terhadap mutasi PfMDR1, dimana efektifitas amodiakuin lebih potensial dibanding klorokuin berhubungan dengan peningkatan akumulasi obat atau metabolitnya dalam vakuola makanan. Dengan demikian bila terjadi mutasi pada gen PfMDR1 dapat mempercepat pengeluaran amodiakuin.^{23, 29}

Mekanisme resistensi yang diketahui yang berbasis molekular ini memang lebih jelas ditemukan pada penggunaan amodiakuin dibanding ART tetapi belum

sepenuhnya dikenal, tetapi bukti *invivo* dan *invitro* memperlihatkan bahwa resistensi terhadap amodiakuin berkaitan dengan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada *P. falciparum Chloroquine Resistance Transporter* (PfCRT) T76 dan PfMDR1. Laporan mengenai prevalensi yang tinggi dari mutasi gen PfCRT T76 ditemukan di Ghana dan Sudan sedangkan PfMDR1 di Burkina Faso.^{30,31}

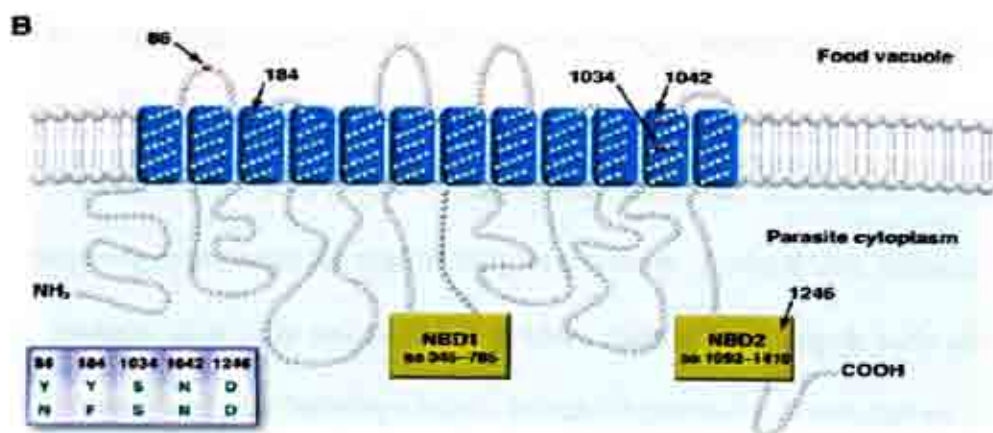
Walaupun amodiakuin diketahui lebih potensial daripada klorokuin, ternyata efektifitas kerjanya menurun di daerah dimana resistensi terhadap klorokuin tinggi disebut sebagai resistensi silang dikarenakan keduanya termasuk golongan OAM yang sama yaitu 4-aminokuinolin. Laporan mengenai hal ini di daerah Sudan Selatan diketahui adanya hubungan gen PfCRT dan PfMDR1, yaitu dua gen penanda resistensi klorokuin dengan penelitian secara *invivo* pada klorokuin dan amodiakuin, data menunjukkan hubungan yang kuat mengenai resistensi silang akibat mutasi kedua gen tersebut. Dokomajilar dkk (2006) mendapatkan bahwa mutasi PfMDR1 memainkan peranan yang lebih penting dalam memediasi respon terhadap amodiakuin dibandingkan klorokuin dan mutasi alel 86Y adalah prediktor kuat kegagalan terapi amodiakuin ($p < 0,002$)^{29,31,32}

Mengenai artemisinin, Afonso dkk (2006) meneliti kaitan resistensi klorokuin dengan ART dan mendapatkan adanya tendensi interaksi fungsional yang sama antara jalur yang mendasari resistensi klorokuin dan ART dimana pemindahan alel *wild type* (normal) dari gen (mendasari resistensi ART) dengan alel mutan dapat menurunkan sensitivitas ART hanya pada klon resisten klorokuin.

Hal ini menandakan bahwa penggunaan yang lama suatu obat di wilayah yang resisten terhadap OAM lainnya (dengan klorokuin khususnya) telah merata.²⁵

Riset biologi molekuler dengan menggunakan teknik komplementasi genetik atau uji pertukaran alel, menunjukkan bahwa alel-alel mutan PfMDR1 yang menyebabkan tingkat resistensi lebih tinggi terhadap klorokuin juga mempengaruhi sensitivitas terhadap OAM lain seperti kina, meflokuin, dan ART, sementara transmisi mutasi alel 86Y gen PfMDR1 telah diketahui tersebar luas di Asia dan Afrika.^{24, 29} Pickard dkk (2003) meneliti genetik polimorfisme pada PfMDR1 di Asia Tenggara dan mendapatkan prevalensi polimorfisme 86Y pada sepertiga (37%) isolat atau sampel yang diteliti pada penggunaan meflokuin, artesunat dan ART.³³

Penelitian mengenai resistensi terhadap ART dan derivatnya tidak banyak dilakukan. Polimorfisme gen PfMDR1 telah dihubungkan dengan peningkatan sensitivitas terhadap ART yaitu N86Y, S1034C, N1042D, dan 1246 Y. Mekanisme lainnya melalui mutasi gen terhadap PfATP6 pada kodon L263E pada derivat ART dan S769N pada artemeter (gangguan inhibisi membran sarkoendoplasmik Ca^{2+}) dapat dilihat pada gambar dibawah ini:^{25, 31, 34}



Gambar 2.8 Peta Gen PfMDR1 dan Alel-Alel Mutannya ³³

Definisi resistensi parasit malaria terhadap suatu obat adalah kemampuan parasit untuk dapat hidup dan berkembang biak setelah diberi obat dalam dosis optimal atau lebih tinggi, tetapi masih dalam toleransi penderita. Resistensi suatu parasit terhadap OAM terjadi akibat adanya mutasi-mutasi gen yang terjadi secara spontan yang mempengaruhi struktur dan aktivitas sasaran obat pada tingkat molekul atau mempengaruhi akses obat terhadap targetnya pada parasit. Parasit-parasit mutan akan tetap hidup walaupun OAM cukup untuk menghambat pertumbuhan parasit normal namun tidak adekuat untuk membunuh parasit mutan, fenomena ini dikenal sebagai seleksi obat. ^{31, 35}

White (2005) menyatakan bahwa mekanisme genetik dari resistensi OAM yang menopang kelangsungan hidup parasit timbul secara spontan, jarang dan diduga tidak tergantung pada penggunaan obat. Terdapat mutasi atau perubahan pada sejumlah salinan gen yang mengkode atau berhubungan dengan target kerja

obat atau memompa keluar masuknya obat yang mempengaruhi kadarnya intraparasit.³⁶

Hasting dan Watkins (2005) menyatakan intensitas penyebaran malaria tidak langsung mempengaruhi perkembangan resistensi. Terdapat dua mekanisme utama resistensi obat yaitu mutasi secara random spontan yang terjadi pada siklus hidup dan menyebabkan timbulnya infeksi. Ini adalah tipe mutasi berdasarkan teori genetika populasi standar yang bertanggung jawab pada tingkat resistensi yang rendah berhubungan dengan penyebaran obat. Yang kedua adalah melalui obat yang menjembatani proses seleksi mutasi secara spontan pada subpopulasi parasit, yaitu bila penderita diobati, maka obat tersebut akan mengeliminasi bentuk yang tidak mutan sementara mutan yang resisten akan lolos, berkembang dan disebarkan (seleksi obat).³⁷

Berkaitan dengan kerja obat Afonso dkk (2006) menyatakan satu dari yang terbanyak dasar genetika dari resistensi obat adalah seleksi melalui tekanan obat, dimana parasit yang sensitif obat atau resisten, secara genetika identik (isogenik) kecuali beberapa mutasi terlibat. Dari hasil observasi disimpulkan bahwa parasit malaria tidak hanya secara genetika atau biologi mampu menghasilkan parasit yang stabil resistensinya terhadap ART atau klorokuin, tetapi juga dapat melewati tekanan obat.²⁵

Sementara itu intensitas penyebaran malaria ternyata tidak langsung mempengaruhi perkembangan dari resistensi itu sendiri yang dipengaruhi tiga mediator klinis/epidemiologis (klonal yang beragam, pengobatan infeksi, dan

tingkat imunitas manusia) yang menentukan dinamika resistensi melalui lima variabel efektor yang mempengaruhi tinggi rendahnya intensitas penyebaran resistensi obat (rekombinasi seksual, dinamika di dalam tubuh inangnya, obat yang digunakan, proporsi infeksi yang diobati, dan jumlah parasit di tubuh inangnya) ³⁷

Resistensi terhadap OAM biasanya meningkat akibat salah satu dari dua mekanisme yang mungkin yaitu perubahan pada disposisi obat (biasanya selalu karena peningkatan pengeluaran obat dari parasit) dan perubahan pada pencapaian kerja dari target obat. Pengawasan penanda genotipe dari resistensi obat dapat diaplikasikan pada kedua target disposisi tersebut. Selain itu telah teridentifikasi dua mekanisme utama yang berperan pada proses resistensi yaitu perubahan transpor obat yang dapat dilihat pada resistensi parasit terhadap obat misalnya golongan kuinolin dan mungkin ART serta perubahan afinitas perikatan enzim yang terlihat pada golongan misalnya antifolat, sulfa dan analog koenzim Q. ^{38, 39}

Untuk melakukan penelitian mengenai resistensi terhadap antimalaria, WHO merekomendasikan beberapa metode uji standar secara *invivo*. Saat ini rekomendasi WHO yaitu dengan melakukan durasi pemantauan selama ≥ 28 hari atau minimal 14 hari, pada area dengan intensitas transmisi rendah hingga menengah. Hal ini dilatarbelakangi dengan pertimbangan adanya kegagalan terapi yang bermakna yang muncul sebelum 14 hari, dimana periode observasi yang lebih pendek menjadi masalah pada uji obat. ^{9, 13}

Hal ini menjadi permasalahan pada wilayah dengan tingkat resistensi yang rendah disertai angka kegagalan yang rendah. Penelitian dengan durasi > 28 hari

tersebut juga mempunyai risiko hilangnya pemantauan atau drop out, sebaiknya didampingi dengan pemeriksaan molekuler seperti *PCR genotyping* yang dapat membedakan rekrudensi dari reinfeksi. Jika surveilan tidak mempunyai jalur untuk melakukan tehnik molekuler tersebut, penelitian dengan durasi 14 hari tanpa PCR masih dapat memberikan informasi tentang gagal pengobatan. PCR dapat membandingkan gen polimorfik pada parasit terutama yang mengkode beberapa variasi blokade seperti *Plasmodium falciparum Merozoite protein2* (PfMSP2) juga PfMSP1 dan *Plasmodium falciparum Glutamate Rich Protein* (PfGLURP) pada seluruh komponen darah sebagai sampel selama infeksi akut dan rekuren.^{13, 40}

Faktor-faktor yang telah diteliti mempengaruhi penyebaran resistensi *P. falciparum* terhadap OAM yaitu faktor umur dan jenis kelamin dimana setiap orang dapat terinfeksi malaria, perbedaan prevalensi menurut umur dan jenis kelamin berkaitan pula dengan derajat kekebalan karena variasi terpapar gigitan nyamuk, sementara bayi di daerah endemis dikatakan mendapat perlindungan antibodi maternal yang diperoleh secara transplasental. Perempuan mempunyai respon imun lebih kuat dibanding laki-laki namun kehamilan dapat menambah risiko malaria.⁴¹

Faktor lainnya yaitu faktor imunitas dimana selama penderita tidak imun atau imunitasnya sangat rendah, gejala klinis akan semakin berat bila derajat resistensi semakin tinggi dan sebaliknya semakin tinggi imunitas penderita gejala klinis relatif akan semakin ringan meskipun parasitnya semakin resisten, hal ini

akan mempengaruhi respon terhadap terapi secara tidak langsung. Respon terapi dilihat dari keadaan hilangnya parasit dan secara klinis dari hilangnya demam.^{17, 41}

Tingkat imunitas berhubungan dengan endemisitas suatu daerah. Imunitas terhadap malaria timbul lambat dan tidak menetap, hingga baru didapat setelah dewasa dan setelah terinfeksi berulang-ulang, karena itu hanya didapat pada penduduk di daerah endemis yang tiap hari terpapar dengan parasit. Untuk penduduk yang tinggal di daerah non-endemis dimana derajat penularannya rendah, jarang atau musiman maka mekanisme perlindungan seperti di daerah endemis tidak terjadi. Umumnya akan timbul gejala klinis yang berat jika terinfeksi.⁴¹

Disamping itu faktor densitas parasit dari beberapa penelitian juga mempengaruhi tingkat resistensi yaitu adanya hubungan antara parasitemia yang tinggi pada saat pemeriksaan dengan peningkatan risiko kegagalan terapi. Penderita dengan derajat parasitemia lebih tinggi pada awal terapi akan mengandung strain parasit yang resisten atau mutan resisten secara spontan.⁴¹

2.3. Resistensi *P. Falciparum* Terhadap Artesunat Amodiakuin

Mekanisme resistensi plasmodium terhadap AAQ belum banyak diteliti, bahkan penelitian mengenai efikasi kombinasi obat ini belum banyak dilakukan. Penelitian yang ada lebih banyak pada anak-anak terutama di negara-negara bagian Afrika. Telah dilaporkan adanya efikasi yang rendah di Rwanda, Afganistan dan pada penelitian di Kailahun, Sierra Leone dilaporkan efikasi kombinasi ini pada H14 adalah 98,2 % menjadi 84,5 % pada H28 dan 49,1% mengalami reinfeksi. Di

Ghana dilaporkan adanya insiden potensial yang tinggi pada parasit yang resisten amodiakuin dimana ditemukan penurunan efikasi monoterapi amodiakuin dengan angka kesembuhan dibawah 50%, sehingga menimbulkan pertanyaan mengenai efektifitas amodiakuin sebagai kombinasi terapi dengan ACT.⁴³

Penelitian Mutabingwa dkk (2005) terhadap empat empat macam obat yaitu amodiakuin tunggal, Amodiakuin+ SP, AAQ, dan AL pada anak-anak di Tanzania mendapati sudah terjadi tingkat resistensi yang tinggi pada SP dan amodiakuin, AL merupakan kombinasi yang paling efektif. Penelitian ini memperlihatkan bahwa didaerah dimana klorokuin, amodiakuin dan SP terjadi kegagalan terapi, penggunaan salah satu obat tersebut dalam kombinasi tidak bekerja dengan baik, terlihat pada tabel dibawah ini:⁴⁴

Tabel 2.1 Angka Kegagalan Parasitologis Satu tahun Pertama Diuji Dengan PCR⁴⁴

	<i>Amodiaquine</i>	<i>Amodiaquine+alphadoxine-pyrimethamine</i>	<i>Amodiaquine-artesunate</i>	<i>Artemether-lumefantrine</i>
Number of parasitological failures/number followed up to day 14	101/252 (40%)	52/269 (19%)	24/251 (10%)	4/275 (2%)
Number of recrudescences/ number of PCR-positive pairs by day 14	52/70 (76%)	23/35 (66%)	3/20 (15%)	3/2 (50%)
Estimated recrudescence rate by day 14	30-3%	12-7%	1-4%	0-7%
Number of parasitological failures/number followed up to day 28	182/239 (76%)	156/254 (61%)	102/235 (43%)	52/256 (20%)
Number of recrudescences/ number of PCR-positive pairs by day 28	77/121 (64%)	55/97 (57%)	20/72 (28%)	5/37 (14%)
Estimated reinfection rate by day 28	20%	27%	31%	18%
Estimated recrudescence rate by day 28	48-5%	34-8%	12-1%	2-7%

Pada Penelitian Dondorp dkk (2009) di perbatasan Kamboja Barat dan Tailand terjadi penurunan respon terapi secara invivo dari artesunat tunggal 7 hari

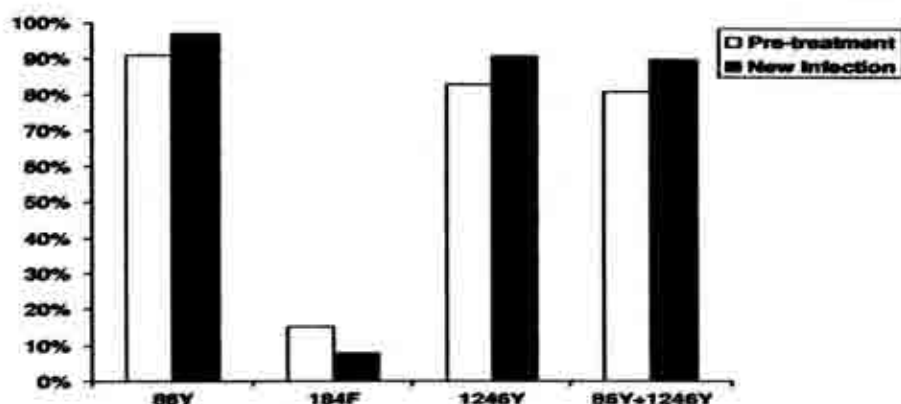
dan artesunat ditambah meflokuin selama 3 hari, hal ini berkaitan dengan peningkatan sejumlah salinan PfMDR1 dan mutasi pada PfATP6 tetapi tidak dapat dijelaskan mutasi dari meflokuin atau artesunat.⁴⁵

Indikasi menurunnya efikasi AAQ di Indonesia telah ditemukan di Papua (Timika) oleh badan Litbangkes yang melakukan uji coba membandingkan AAQ dan dihidroartemisinin-piperakuin (DHP), pada 334 pasien dengan malaria. Hasil penelitian menunjukkan insiden infeksi rekuren pada hari ke 42 lebih rendah setelah terapi DHP dibanding yang mendapat terapi AAQ (2,8% vs 13% , $p=0.01$). DHP ternyata lebih ampuh daripada AAQ dan lebih sedikit efek sampingnya, selain itu juga efektif untuk *P. falciparum* dan *P. vivax*, tersedianya obat ini dalam *ko-formulasi fixed dose* akan meningkatkan kepatuhan minum obat, sehingga akan dicapai angka kesembuhan lebih tinggi. Depkes memutuskan pemakaian DHP di Papua sejak akhir tahun 2007 atau awal 2008.^{10, 46, 47}

Sementara itu penelitian yang mendukung mengenai resistensi AAQ yang dimediasi oleh mutasi genetik yang dilakukan oleh Nsoba dkk (2007) mendapatkan pada pemakaian kombinasi AAQ di Uganda adanya polimorfisme pada PfCRT pada seluruh isolat dan polimorfisme PfMDR1 86Y (90,5%) dan 1246Y yang mendasari dan prevalensinya meningkat secara signifikan pada isolat baru yang diteliti sesudah terapi. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi seleksi mutasi terapi yang berhubungan dengan penurunan respon dari amodiakuin.

⁴⁸ Pada penelitian sebelumnya oleh Holmgren dkk (2006) mendapati adanya

hubungan seleksi mutasi PfCRT,76T dan PfMDR1,86Y pada penggunaan amodiakuin monoterapi.⁴⁹



Gambar 2.9 Selektifitas Alel-Alel PfMDR1 Sebelum dan Sesudah Terapi AAQ⁴⁸

Penelitian Lim dkk (2009) menemukan hubungan adanya sejumlah salinan gen PfMDR1 sebagai penanda molekuler terhadap kegagalan terapi artesunat meflokuin sebagai terapi malaria falsiparum diperbatasan kamboja dan Thailand, berkaitan dengan pemakaian artesunat.⁵⁰ Witkowski dkk (2008) melakukan analisis resistensi terhadap komposisi berbagai OAM dan gen resistensi yang mempengaruhinya, seperti terlihat pada tabel dibawah ini:⁵¹

Tabel 2.2 Golongan Anti Malaria, Kelas, Penggunaan, Target dan Gen Resistensi⁵¹

antimalarial class	Molecule	Use ^a	Target	Frequency of resistance ^b	Resistance gene	Reference
Quinolines	Lysosomotropic agents					
	Chloroquine	+++ ^a	H ₂ synth ^c	++++ ^d	<i>pfcrt/pfmdr1</i>	Fidock et al. (2000) and Sidhu et al. (2002)
	Quinine	+++	H ₂ synth	++	<i>pfmdr1/other</i>	Pickard et al. (2003) and Price et al. (1999)
	Mefloquine	+++	H ₂ synth	+++	<i>pfmdr1/other</i>	Peel et al. (1994) and Price et al. (2004)
	Amodiaquine	+++	H ₂ synth	+++	<i>pfmdr1/pfprt</i>	Echeverry et al. (2007)
	Halofantrine	++	H ₂ synth	++	<i>pfmdr1/other</i>	Peel et al. (1994)
Natural endoperoxide compounds and semi-synthetic derivative	Lumefantrine	+++	H ₂ synth	++	<i>pfmdr1</i>	Sidhu et al. (2006)
	Artemisinin	+	Heme and	-/+	<i>pfmdr1/other</i>	Price et al. (1999)
	Artesunate	++	proteins ^e in	-/+	<i>pfmdr1/other</i>	Price et al. (1999)
	Artemether	++	food vacuole	-/+	<i>pfprmtet/other</i>	Jambou et al. (2005)
Antimetabolites	Non-lysosomotropic agents					
	Sulfadoxine	+++	DHPS	++++	<i>pfalps</i>	Wang et al. (1997)
	Pyrimethamine	+++	DHFR	++++	<i>pfalfr</i>	Peterson et al. (1990)
	Proguanil	+++	DHFR	++	<i>pfalfr</i>	Peterson et al. (1990)
Other	Atovaquone ^f	++	Cyts	+	<i>pfcytb</i>	Kinsacsky et al. (2000)

^a WHO (2001) and Bkaland (2001).^b Drug use.^c Hemozoin synthesis in food vacuole (Egan et al., 1994).^d Resistance frequency: (+) presence of resistance; (-) absence of resistance.^e Robert et al. (2005) and Asawamahakada et al. (1994).^f Ubiquinone antagonist, always associated with proguanil in treatment regimen.

Artesunat (Artesunate atau Artesunic Acid)

Obat ini tersedia dalam bentuk tablet untuk pemberian peroral, dan bentuk serbuk kering dalam ampul dengan pelarut 5% NaHCO₃ untuk pemberian parenteral (IV atau IM). Satu tablet mengandung 50 mg artesunat dan 60 mg dalam 1 ampul. Konsentrasi puncak artesunat oral dalam plasma dicapai dalam 1 jam dan waktu paruhnya adalah 4-8 jam sedangkan parenteral sangat cepat diperkirakan 48 menit. Dosis pengobatan malaria falsiparum tanpa komplikasi yang MDR per oral adalah dosis harian tunggal 4mg/kgbb selama 3 hari.⁵²

Amodiaquin

Termasuk senyawa 4 aminokuinolin merupakan obat antimalaria dimana struktur dan aktivitasnya mirip dengan klorokuin. Mempunyai efek antipiretik dan

antiradang seperti klorokuin. Penyerapan melalui usus cepat dan sempurna, segera diubah dihati menjadi metabolit aktif disetilamodiakuin. Konsentrasi puncak tercapai dalam 8 jam sedangkan waktu paruh sangat panjang mencapai 18 hari. Dosis amodiakuin basa dengan dosis harian tunggal 10 mg/kgbb selama 3 hari ⁵²

Kombinasi artesunat amodiakuin

Sesuai komponen kombinasi obat ini, spektrum aktivitas obat ini luas yaitu skizontosida darah terhadap semua jenis plasmodium manusia terutama untuk *P. falciparum* resisten klorokuin, gametosida darah terhadap semua jenis plasmodium manusia kecuali gametosit matang *P. falciparum*. Kombinasi ini dipilih dalam program Depkes RI sejak 2003 yang menetapkan AAQ sebagai pengganti klorokuin untuk pengobatan malaria falsiparum tanpa komplikasi resisten klorokuin. Dosis terdiri dari 200 mg artesunat dan 600 mg amodiakuin untuk dewasa. ⁵

Efek samping yang sering timbul yaitu mual, muntah dan sakit kepala. Efek samping lain yaitu peningkatan kadar SGPT dan BUN, sinus bradikardi, ikterik, oliguria, hipoglikemia, edema pulmonal, hipotensi, henti jantung paru, perdarahan saluran cerna, agranulositosis dan hemoglobinuria. Efek samping berat adalah pruritus, abnormalitas kardiovaskular, diskinesia, gangguan saraf dan pendengaran. Hati- hati penggunaannya pada ibu hamil dan menyusui, sebaiknya tidak diberikan pada kehamilan trimester pertama. ^{5, 52}

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Disain Penelitian

Penelitian Deskriptif analitik dengan disain potong lintang dimana variabel yang diukur dilakukan pada satu saat.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada penderita yang secara parasitologi positif menderita malaria yang dirawat inap di bangsal Penyakit Dalam RS Dr. M. Djamil dan RS daerah (Pasaman Barat, Pesisir Selatan, dan Kabupaten Solok) di Sumbar selama 6 bulan

Tabel 3.1 Jadwal Kegiatan

KEGIATAN	BULAN KE					
	1	2	3	4	5	6
Persiapan	X					
PengumpulanData	X	X	X	X	X	X
Analisis Data						X
Penulisan Hasil						X

3.3. Kriteria Inklusi:

Penderita yang secara klinis diduga menderita malaria dan pada pemeriksaan parasitologis ditemukan *P. falciparum* stadium aseksual pada hapusan darah tepi

3.4. Kriteria Eksklusi :

- 1. Penderita berusia < 12 tahun
- 2. Malaria berat atau dengan komplikasi
- 3. Kehamilan dan menyusui
- 4. Adanya penyakit berat atau malnutrisi
- 5. Infeksi campuran atau parasit lain (*P. vivaks, ovale, malariae*)

3.5. Sampel Penelitian

Penderita yang diduga kuat secara klinis menderita malaria yang dirawat inap di bangsal Penyakit Dalam RS Dr. M. Djamil Padang dan RS daerah (Pasaman Barat, Pesisir Selatan, Kabupaten Solok) di Sumbar dengan besar sampel:

$$n = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2} \rightarrow \frac{(1,96)^2 \times 0,2 \times 0,8}{0,1^2}$$

n = Besar sampel

Zα = Tingkat Kemaknaan, α = 0,05

P = Proporsi penyakit (dari pustaka) sebesar 0,2

$$Q = 1-P$$

d = Tingkat ketepatan absolut yang dikehendaki, ditetapkan sebesar 10%

Berdasarkan rumus diatas didapatkan jumlah sampel 60 orang. Sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak terdapat kriteria eksklusi diambil sebagai sampel dengan cara pemilihan *consecutive random sampling*.

3.6. Bahan Dan Cara

Semua penderita yang memenuhi syarat dimasukkan dalam penelitian ini dan diminta persetujuannya. Dicatat data demografi, keluhan dan temuan klinis pada pemeriksaan fisik sesuai dengan daftar yang telah disusun sebelumnya.

Pemeriksaan laboratorium

Pada penerita yang positif malaria dilakukan pemeriksaan kadar hemoglobin, jumlah eritrosit, leukosit dan trombosit, hematokrit dengan menggunakan alat Cell-Dynn 1.400 dengan teknik spektrofotometri. Pemeriksaan faal hati secara fotometer dengan *Reagen Boehringer Mannheim*, bilirubin dan pemeriksaan gula darah dengan fotometer

Uji Resistensi Malaria Terhadap Artesunat Amodiaquin

- Uji Resistensi Invivo

Pemeriksaan resistensi terhadap AAQ secara invivo menurut standar WHO. Pemeriksaan ini untuk mengetahui apakah plasmodium sensitif, dengan

menggunakan test standar 7 hari yang disederhanakan. Pada saat masuk dari setiap penderita dibuat 4 sediaan Hapusan Darah Tepi (HDT), yaitu 2 sediaan hapusan darah tebal dan 2 sediaan hapusan darah tipis yang diwarnai dengan larutan Giemsa 5 %. Pada pembuatan sediaan darah tebal sampel darah diwarnai 20 menit, sedangkan untuk darah tipis sampel sebelumnya difiksasi dengan metil alkohol selama 5 menit dan kemudian diwarnai selama 20 menit, dibilas dengan air bersih dan dikeringkan diudara. Pemeriksaan pendahuluan oleh peneliti dan tenaga laboratorium. Sediaan diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan objektif 100 dengan menggunakan minyak imersi. Hasilnya dinyatakan negatif, apabila tidak ditemukan parasit malaria pada pemeriksaan 200 lapangan pandang. Pada sediaan yang positif terlihat nukleus berwarna merah dan sitoplasma biru keunguan dengan pigmen coklat kehitaman.

Penderita dengan sediaan darah yang positif diperiksa darah lengkap dan kimia klinik dan diberikan terapi AAQ selama 3 hari berturut-turut, yaitu : artesunat 200 mg dan amodiakuin 600 mg. Penilaian akhir dilakukan oleh 2 orang konsultan ahli dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas mengenai ada tidaknya parasit malaria, spesies dan stadium parasit. Untuk menilai tingkat resistensi parasit dihitung jumlah parasit pada H0, H2 dan H7. Dihitung jumlah parasit dalam 200 leukosit dan hasilnya dikonversi menjadi jumlah parasit permikroliter darah (parasit/ul), kemudian dinilai tingkat resistensinya apakah Sensitif, RI, RII, dan RIII. Untuk membedakan S dan RI juga dilakukan pemeriksaan parasit pada H28

Uji PCR-RFLP

Pada pasien yang sama dilakukan pemeriksaan metode PCR dengan RFLP dengan cara:

Pengambilan sampel darah

Pengambilan darah pada lipat lengan sebanyak 1 ml dilakukan 1 kali. Prosedur ini dilakukan oleh petugas laboratorium yang terlatih. Tahapan kerja adalah dengan menggunakan jarum suntik ukuran 2.5 ml, diinjeksikan pada pembuluh darah lipat lengan secara perlahan secara aseptik dan antiseptik. Selanjutnya darah disedot hingga volume 1 ml. Pengambilan darah dilakukan pada pasien setelah mendapat penjelasan dan menyetujui prosedur pengambilan sesuai dengan *inform consent*. Etik penelitian telah dievaluasi dan disetujui oleh komite etik RSUP Dr. M. Djamil Padang.

Disain Primer

Primer didesain terhadap 18S rDNA yang bersifat universal terhadap genus plasmodium. Produk PCR diamplifikasi terhadap gen PfATP6 dan PfMDR yang menyandi protein calcium-transporting ATPase. Sekuens gen PfATP6 dan PfMDR didapatkan dari Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Mengingat gen ini cukup besar, antara 2900 – 3000 bp, maka pada penelitian ini primer didesain untuk 1500 – 3000 bp (kodon 500 – 1000), yang merupakan daerah mutasi terbanyak.⁵

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan prosedur yang dikembangkan oleh Foley dkk. 10 ul darah dicampur dengan 500 ul sodium phosphate buffer PH (8.0) 5 mM dalam bentuk es. Divortex dan dilanjutkan dengan sentrifus pada 14.000 RPM selama 2 menit. Supernatan dibuang, dan prosedur pencucian diulangi 2 kali lagi. 50 ul distilled water ditambahkan pada pellet dan dipanaskan dalam waterbath pada suhu 100°C selama 10 menit. Sampel disentrifus 14.000 RPM selama 10 menit. Supernatan yang mengandung DNA siap dipergunakan.⁵³

Amplifikasi DNA

Amplifikasi dilakukan pada volume total tiap sampel adalah 40 ul, yang terdiri dari 400 ng DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20 dan masing-masing 20 mM dNTP, 20 pmol tiap primer dan 2 U Taq Polimerase. Tahapan amplifikasi adalah :Denaturasi awal : 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan amplifikasi untuk 35 siklus yang terdiri dari 94°C selama 40 detik denaturasi, anealing 55°C selama 60 detik dan ekstensi 72°C selama 60 detik. Final ekstensi pada 72°C selama 4 menit. Hasil amplifikasi dapat disimpan pada 4°C selama 48 jam atau pada -20°C selama 1 minggu⁵⁴

Deteksi produk PCR

Produk PCR berupa urutan nukleotida yang dipotong dengan enzim restriksi endonuklease, kemudian dielektroforesis pada 1.5% agarose (Sigma Aldrich, Inc. USA) yang dilarutkan dalam 1.0X TAE (Tris-asetat-EDTA), mengandung etidium bromide (0.5 µg/ml) dan divisualisasi pada panjang gelombang 260 nm

UV, sedangkan transilluminator (Chromato-Vue San Gabriel CA, USA Model TM36) dilengkapi dengan Foto/Analyst Mini Visionary Fotodyne Inc., Hardland WI, USA Model No. 69 dan Mitsubishi Video copy processor P67UA. Polimorfisme akan muncul sebagai pita DNA tambahan atau terjadinya pergeseran pita⁵⁵

3.7. Identifikasi Variabel

Variabel yang diteliti meliputi resistensi *P. falsiparum* terhadap mutasi kedua alel, jenis kelamin, endemisitas asal daerah, dan densitas parasit.

3.8. Analisis Data

Dilakukan analisis deskriptif terhadap data dasar yang meliputi karakteristik penderita, keluhan dan temun klinis pada pemeriksaan fisik dan temuan laboratorium serta pemeriksaan parasitologi. Perbedaan dua variabel kualitatif dianalisis dengan menggunakan uji *chi square*, dan untuk membandingkan perbedaan nilai rata-rata dua variabel kontinyu digunakan *student's t-test* dengan batas kemaknaan $p < 0,05$. Data diolah menggunakan program SPSS 16.0 for windows.

3.9. Definisi Operasional

Penderita diduga malaria klinis adalah bila secara klinis ditemukan dengan atau tanpa demam, menggigil dan berkeingat secara intermiten dengan atau tanpa anemia dan atau splenomegali

Densitas parasit adalah jumlah parasit dalam 200 leukosit dikali jumlah leukosit/mm³

Tingkat endemisitas adalah derajat suatu daerah berdasarkan AMI yaitu *Low IA* (<10%), *Moderate IA* (10%-50%) dan *High IA* (>50%) atau berdasarkan *Spleen Rate*

Respon terapi adalah keberhasilan suatu terapi yang diukur berdasarkan hilangnya gejala klinis demam dan hilangnya parasitemia dari hapusan darah tepi

Uji resistensi invivo adalah membandingkan kepadatan parasit aseksual (densitas) dalam darah pasien sebelum minum kombinasi artesunat dengan dosis 200 mg dan amodiakuin 600 mg perhari selama 3 hari kemudian diperiksa kembali densitas parasit pada H2 dan H7 kemudian hasilnya dinilai berdasarkan standar kategori tingkat resistensi.

PCR-RFLP adalah pemeriksaan parasit dalam darah manusia secara molekuler dengan melakukan pemotongan daerah mutasi oleh enzim restriksi endonuklease

Mutasi alel adalah apabila pada pemeriksaan PCR-RLFP ditemukan mutasi positif yang menyebabkan perubahan asam amino pada kodon L263E PfATP6 dan atau N86Y PfMDR1

Tingkat resistensi adalah derajat resistensi parasit aseksual *P. falciparum* terhadap terapi yang dikategorikan menjadi sensitif (S) dan resisten (R) dimana resisten dibagi menjadi RI, RII, RIII berdasarkan kriteria WHO

Sensitif (S) adalah apabila parasitemia menghilang dari darah perifer dalam waktu 7 hari tanpa adanya rekrudensi dalam 28 hari

Resisten (R) adalah apabila masih ditemukan parasitemia dalam darah perifer yang dibagi menjadi RI yaitu sama dengan S tetapi ada kemungkinan rekrudensi dalam waktu 28 hari, RII yaitu penurunan densitas parasit $>75\%$ tetapi tidak pernah hilang sama sekali pada H7 dan RIII bila tidak ada perubahan yang berarti (kurang dari 75%) atau parasitemia $H2 > H0$

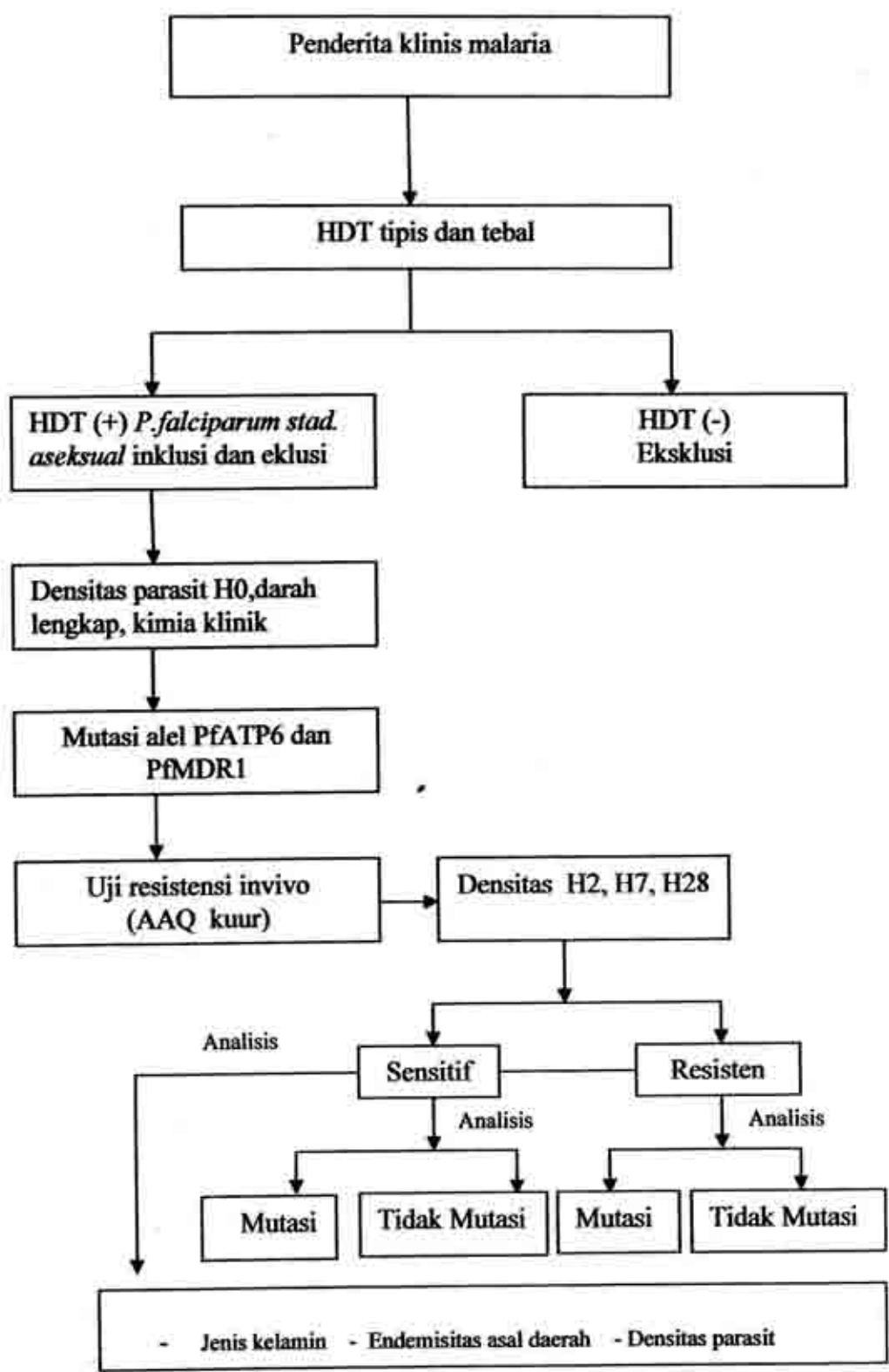
Malaria berat adalah Malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum* dengan disertai satu atau lebih kelainan berikut yaitu malaria serebral dengan penurunan kesadaran, anemia berat, dehidrasi, asidosis metabolik, hipoglikemia, gagal ginjal akut, edema paru akut, kegagalan sirkulasi atau syok, kecenderungan perdarahan, hiperpireksia, hemoglobinuria, ikterus, dan hiperparasitemia berdasarkan kriteria WHO 1997

Malnutrisi dinyatakan berdasarkan indeks massa tubuh (BMI) $< 18,5$

Penyakit berat yang dimaksud adalah secara klinis menderita gagal jantung, penyakit hati yang berat, penyakit paru yang berat dan gangguan metabolik berat

Infeksi campuran atau parasit lain yaitu secara klinis atau parasitologis ditemukan adanya *P. falciparum* dengan *P. malariae*, *vivax*, *ovale* atau parasit lain

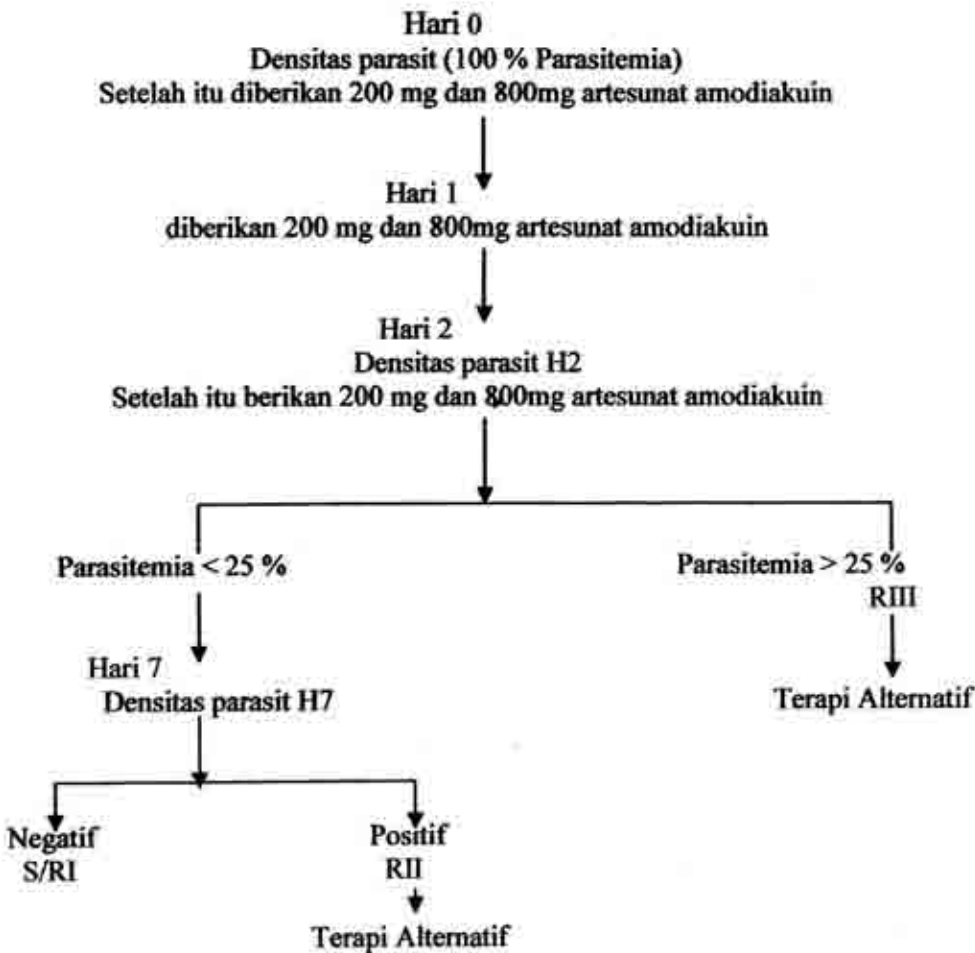
3.10. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian

Tabel 3.2 Derajat Resistensi Parasit Aseksual *P.falciparum* Terhadap Terapi ⁶

Respon pengobatan	Derajat resistensi	Keterangan
Sensitif	S	Hilangnya semua parasit aseksual dari darah perifer dalam waktu 7 (tujuh) hari dihitung setelah hari pertama minum obat, tanpa ada resistensi
Resisten	R I	Hilangnya semua parasit aseksual dari darah perifer seperti halnya pada S, tetapi selalu ada rekrudesensi dalam waktu 28 – 42 hari
	R II	Penurunan yang jelas (75 % atau lebih) dari jumlah parasit aseksual dalam darah perifer tetapi tidak pernah hilang sama sekali
	R III	Tidak ada perubahan yang berarti (kurang dari 75 %) atau lebih bertambah dari jumlah parasit aseksual dalam darah perifer



Gambar 3.2 Interpretasi Hasil Uji 7 hari yang disederhanakan (sediaan darah tebal)

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Karakteristik Dasar

Penelitian dilakukan terhadap 65 orang sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, namun karena hasil analisis molekuler hanya mendeteksi 60 isolat, maka 5 sampel dikeluarkan, sehingga total sampel yang diteliti adalah 60 orang. Pada mulanya penelitian ini bertujuan melihat hubungan tingkat resistensi berdasarkan pada 4 kategori, tetapi pada perjalanannya hasil yang didapat nilainya tidak memenuhi syarat untuk dilakukan analisis statistik sehingga dijadikan dua kategori atau kelompok yaitu sensitif dan resisten.

Tabel 4.1 Karakteristik Dasar Penelitian

No	Karakteristik	Jumlah (%)	Mean $\pm$ SD
1	Umur (tahun)		32,97 $\pm$ 15,88
2	Jenis Kelamin		
	Pria	32 (53,3)	
	Wanita	28 (46,7)	
3	Endemisitas Daerah		
	Moderate IA	38 (63,3)	
	Low IA	22 (36,7)	
4	Densitas parasit (parasit/ μ l)		2002 $\pm$ 6134

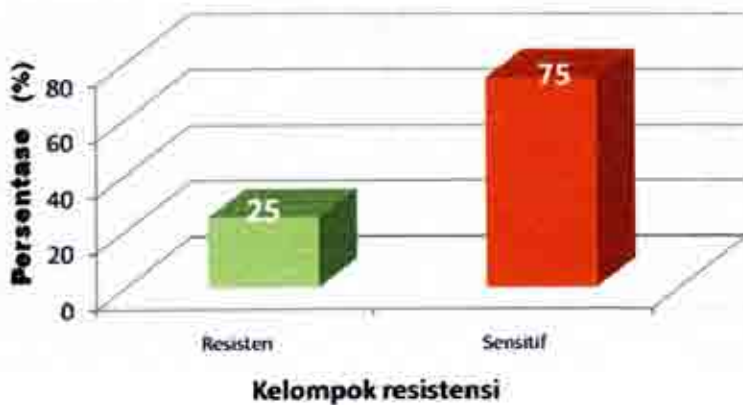
Sementara karakteristik dasar penderita berdasarkan analisis invivo dengan *independent t test* didapatkan hasil seperti pada tabel dibawah ini:

Tabel 4.2 Karakteristik Dasar Berdasarkan Analisis Resistensi Invivo

No	Karakteristik	Sensitif (n=45) Mean $\pm$ SD	Resisten (n=15) Mean $\pm$ SD	p
1	Umur (tahun)	32.89 $\pm$ 16.6	33.20 $\pm$ 13.9	0.948
2	Kadar Hb (g/dl)	12.45 $\pm$ 1.7	11.58 $\pm$ 2.7	0.254
3	Leukosit (1000sel/ml)	8.84 $\pm$ 3.13	7.18 $\pm$ 2.52	0.069
4	Trombosit (1000sel/ml)	219 $\pm$ 55	201 $\pm$ 54	0.267
5	Hematokrit (%)	37.76 $\pm$ 4.8	32.67 $\pm$ 6.1	*0.002
6	GDR (mg%)	111.5 $\pm$ 25.9	93.3 $\pm$ 25.1	*0.021
7	SGOT (U/l)	36.22 $\pm$ 17.6	43.8 $\pm$ 13.5	0.134
8	SGPT (U/l)	27.87 $\pm$ 12.8	28.7 $\pm$ 10.4	0.914
9	Ureum (mg%)	32.82 $\pm$ 14.1	36.6 $\pm$ 12.5	0.360
10	Kreatinin (mg%)	0.91 $\pm$ 0.39	0.91 $\pm$ 0.21	0.984

4.2. Resistensi Artesunat Amodiaquin

Analisis resistensi AAQ dilakukan secara invivo dengan mendeteksi adanya *P. falciparum* pada sediaan darah tepi setelah sampel mendapat pengobatan. Pemeriksaan dilakukan pada H0 (hari sebelum pemberian obat), H2, H7 dan H28. Hasil penelitian memperlihatkan resistensi ditemukan pada 15 (25.0%) penderita, sedangkan sisanya 45 (75.0%) penderita sensitif.



Gambar 4.1 Distribusi Proporsi Resistensi Artesunat Amodiakuin

Berdasarkan kategorinya, resistensi terhadap AAQ dibagi atas tiga kategori yaitu RI, RII dan RIII. Kategori RI menunjukkan *P. falciparum* menghilang pada H2 dan H7 tetapi positif kembali pada H28, RII menunjukkan densitas *P. falciparum* menurun $> 75\%$ pada H2 dan tetap positif pada H7, sedangkan RIII berarti densitas *P. falciparum* menurun $< 75\%$ atau meningkat pada H2 sesudah pengobatan. Pada penelitian ini didapatkan proporsi terbesar pada kategori RI dan RIII, masing-masing 6 sampel (40.0%) sedangkan RII ditemukan pada 3 (20.0%) sampel, koreksi PCR tidak dilakukan pada H28.

Tabel 4.3 Distribusi Pola Tingkat Resistensi Terhadap Artesunat Amodiaquin

No	Kategori	Jumlah	%
1	RI	6	40.0
2	RII	3	20.0
3	RIII	6	40.0
Jumlah		15	100.00

4.2.1 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Jenis Kelamin

Pada penelitian ini ditemukan pria lebih banyak dari wanita, dimana AAQ sensitif lebih banyak ditemukan pada pria yaitu 25 (78,13%) kasus, sedangkan resisten lebih sedikit yaitu 7 (21,87%) kasus. Bila dibandingkan wanita, maka pada resisten pria lebih sedikit sedangkan sensitif lebih banyak. Secara statistik tidak ada perbedaan bermakna atau hubungan resistensi berdasarkan jenis kelamin ($p = 0.550$, $p > 0.05$).

Tabel 4.4 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Jenis Kelamin

Jenis kelamin	Resistensi Invivo Artesunat Amodiaquin		p
	Resisten (%)	Sensitif (%)	
Laki-laki	7 (21,87)	25 (78,13)	0.550
Wanita	8 (28,57)	20 (71,43)	
Jumlah	15	45	60

4.2.2 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Endemisitas Asal Daerah

Endemisitas daerah didasarkan pada data insiden malaria perkabupaten/kota yang didapatkan dari Litbang Dinkes tingkat I Sumbar 2010. Daerah dengan High IA (HIA) adalah Mentawai, Moderate IA (MIA) adalah Pesisir Selatan, Pasaman, Sawahlunto Sijunjung, Solok Selatan dan Low IA (LIA) di wilayah lainnya termasuk Padang dan Kab. Solok. Penelitian ini hanya menemukan 2 kategori daerah, yaitu MIA dan LIA. Kabupaten dan Kota dengan MIA adalah Pesisir Selatan dan Pasaman Barat, sedangkan LIA adalah Padang dan kab. Solok dimana penderita yang berasal dari kab. Solok adalah yang pernah berkunjung ke daerah tersebut 2 orang dan Kerinci 1 orang.

Data penelitian memperlihatkan kelompok resisten AAQ ditemukan pada 9 (23,7%) kasus di daerah MIA dan LIA 6 (27,3%) kasus secara proporsi resisten lebih tinggi di LIA. Sebaliknya pada kelompok sensitif sebagian besar ditemukan pada MIA, yaitu 29 (76,3%) kasus dan ditemukan 16 (72,7%) kasus sensitif pada daerah LIA dan secara proporsi sensitif lebih tinggi di MIA. Analisis menggunakan *chi square* tidak memperlihatkan adanya perbedaan bermakna resistensi berdasarkan endemisitas asal daerah ($p = 0.757$, $p > 0.05$).

Tabel 4.5 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Endemisitas Asal Daerah

Endemisitas Daerah	Resistensi Invivo Artesunat Amodiaquin		p
	Resisten (%)	Sensitif (%)	
Moderate IA	9 (23,7)	29 (76,3)	0.757
Low IA	6 (27,3)	16 (72,7)	
Jumlah	15	45	60

4.2.3 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Densitas Parasit

Hasil penelitian memperlihatkan variasi yang lebar dari densitas parasit.

Pada kelompok resisten, variasi ditemukan antara 100 – 30.000 parasit/ μ l pada kelompok sensitif dan 240 – 25.000 parasit/ μ l pada kelompok resisten. Rata-rata densitas parasit kelompok resisten AAQ invivo adalah 1930.89 ± 6142.8 parasit/ μ l, sedangkan kelompok sensitif adalah 2216 ± 6317.6 parasit/ μ l. Analisis dengan *independent t test* tidak memperlihatkan adanya perbedaan bermakna atau hubungan densitas parasit pada kedua kelompok dengan resistensi ($p = 0.757, p > 0.05$).

Tabel 4.6 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Densitas Parasit

Uji Resistensi Invivo	Densitas Parasit (parasit/ μ l)	p
Resisten	1930.89 $\pm$ 6142.8	0.878
Sensitif	2216. 0 $\pm$ 6317.6	

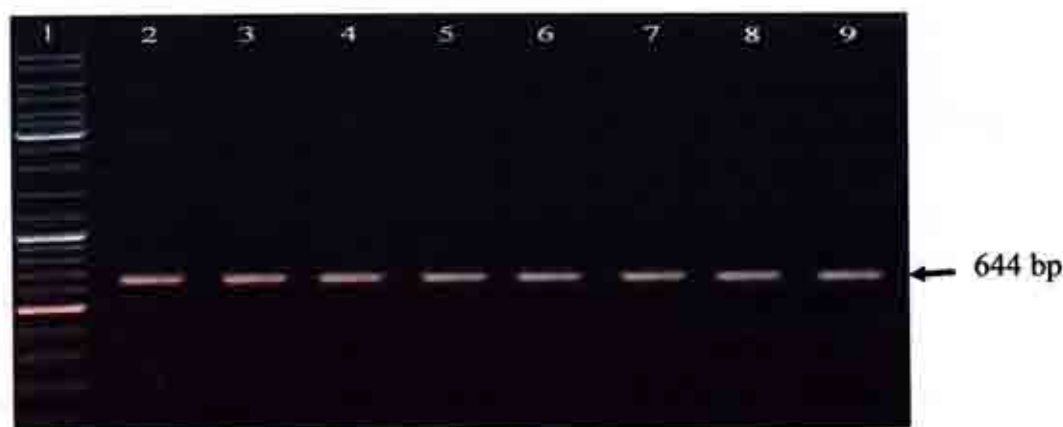
4.3 Identifikasi PfATP6 dan PfMDR1 *Plasmodium Falciparum*

Identifikasi PfATP6 dan PfMDR1 menggunakan *thermal cycler* (*Applied Biosystem*). Primer terhadap PfATP6 dan analisis spesifisitasnya didisain menggunakan *open source software* dari NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer PfATP6 berasal dari *genebank accession number* AB501733.1. Primer mencakup daerah 321 – 964 (644 bp), sehingga kodon 263 dapat dianalisis. Primer untuk PfMDR1 berasal dari Dorsey dkk (2001) yang mencakup daerah sebesar 610 bp.

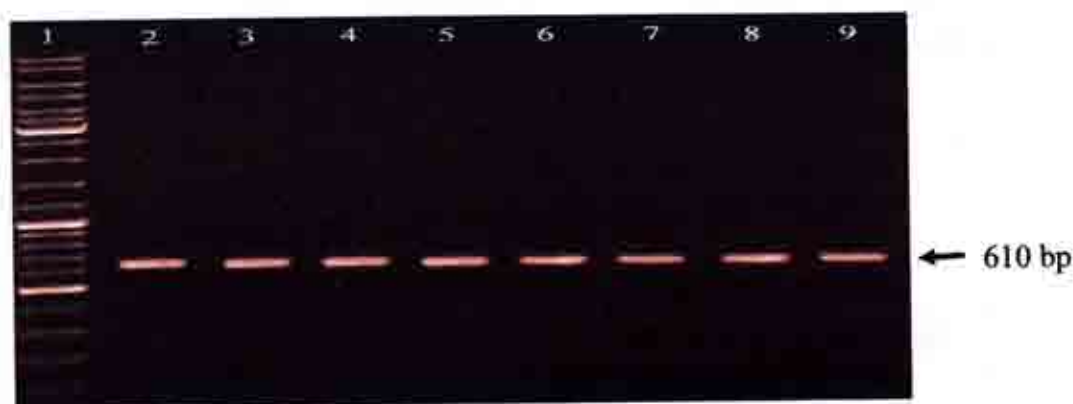
Tabel 4.7 Primer Yang Digunakan Sebagai Identifikasi Kodon 263 PfATP6 dan 86 PfMDR1

No	Gen	Sekuens	Produk
1	PfATP6, forward	5' TGCTGCCGTAGGTGTATGGCA 3'	644 bp
	PfATP6, reverse	5' TGA CTGCTGGCAATCCTTCTGGT 3'	
2	PfMDR1, forward	5'AGAGAAAAAAGATGGTAACCTCAG3'	610 bp
	PfMDR1, reverse	5'ACCACAAACATAAATTAACGG3'	

Hasil amplifikasi dianalisis dengan gel agarose 2% dan diwarnai dengan ethidium bromida seperti terlihat pada kedua gambar dibawah ini:



Gambar 4.2 Hasil Amplifikasi Gen PfATP6. Line 1 adalah DNA ladder, line 2 – 9 sampel



Gambar 4.3 Hasil Amplifikasi Gen PfMDR1. Line 1 adalah DNA ladder, line 2 – 9 sampel

Hasil penelitian memperlihatkan mutasi PfATP6 pada kodon 263 hanya ditemukan pada 2 sampel, (11.76%) yaitu L263E. Perubahan ini terjadi dalam

bentuk pergantian urutan asam amino TTA (Leusin, L) menjadi GAA (Asam Glutamat, E). Analisis terhadap uji resistensi memperlihatkan L263E ditemukan 1 sampel pada kelompok AAQ resisten dan 1 sampel lagi pada kelompok sensitif. Kodon 263 ditunjukkan oleh basa antara 787 – 789.

721 caaacacctt tacaaataaa aatcgattta ttggtcaac aattatcaaa aatcatttt gtaatagaag
taactgtatggattattaat tttaaacatt tctcagatcc aattcatggt 840

Gambar 4.4 Urutan Nukleotida dari 721 – 840. Terlihat perubahan pada basa antara 787–789.

Mutasi PfMDR1 ditujukan terhadap kodon 86, yaitu perubahan Asparagin (N) menjadi Tirosin, (Y). Perubahan ini hanya menyangkut 1 nukleotida, yaitu dari AAT (N) menjadi TAT (Y).

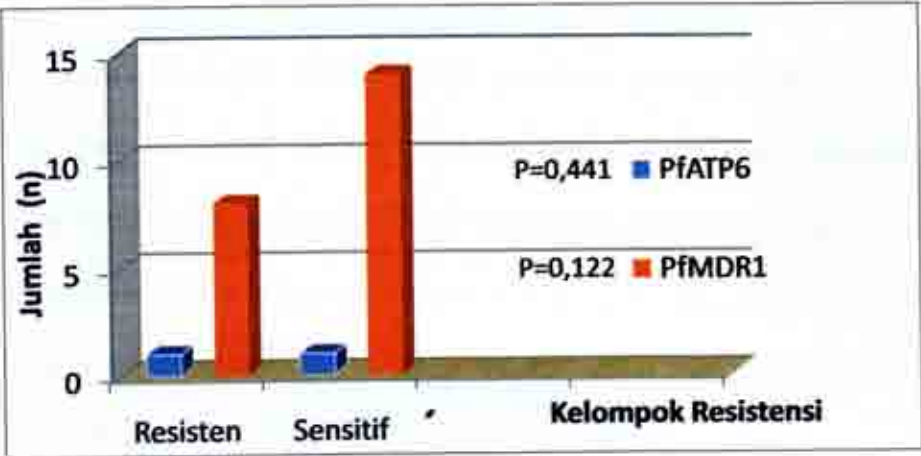
Nukleotida
Kodon

61 aaagagttga acaaaaagag taccgctgaa ttatttagaa aaataaagaa tgagaaaata - 40
121 tcattttttt taccgtttaa atgtttacct gcacaacata gaaaattatt atttatatca - 60
181 ttgtatgtg ctgtattatc aggaggaaca ttaccttttt ttatatctgt gtttggtgta - 80
241 atattaaagaacatgtatttaggtgatgat attaataccta taatattatc attagtatct - 100
301 ataggtttag tacaatttat attatcaatg atatcaagtt attgtatgga tgtaattaca - 120

Gambar 4.5 Urutan Nukleotida Dari 61 – 301 atau kodon 20 - 120. Terlihat perubahan pada basa antara 256 - 258.

4.4 Hasil Analisis Mutasi Kodon PfATP6 dan PfMDR1

Pola distribusi mutasi gen yang diteliti berdasarkan resistensi dapat dilihat pada gambar dibawah ini, dengan hasil pada mutasi PfATP6 dijumpai positif masing-masing 1 sampel untuk kelompok resisten yaitu RIII dan sensitif, sementara pada mutasi PfMDR1 dijumpai positif pada kelompok resisten 8 (53,3%) sampel yaitu 4 (26,3%) sampel RI, 1 (7%) sampel RII dan 3 (20%) sampel RIII serta yang sensitif 14 (31,3%) sampel:



Gambar 4.6 Distribusi Resistensi Berdasarkan Mutasi Gen

Setelah dilakukan analisis statistik pada kedua mutasi gen yang diteliti didapatkan hasil seperti terlihat pada kedua tabel dibawah ini dimana pada mutasi gen PfATP6 analisis statistik memperlihatkan tidak ada perbedaan bermakna atau hubungan mutasi kodon 263 dengan resistensi terhadap AAQ (p= 0,406; Odds Ratio: 0.310 (95% CI = 0.019 – 5.426)

Tabel 4.8 Hubungan Mutasi PfATP6, 263 Berdasarkan Resistensi Artesunat Amodiaquin

PfATP6, 263	Resistensi Invivo Artesunat Amodiaquin		p
	Resisten + (%)	Resisten - (%)	
Mutasi (+)	1 (6,67)	1 (2,22)	0.406
Mutasi (-)	14 (93,33)	44(97,78)	
Jumlah	15	45	60

Odds Ratio: 0.310 (95% CI = 0.019 – 5.426)

Pada mutasi gen PfMDR1 hasil penelitian memperlihatkan 8 (53.3%) sampel dari kelompok resisten memperlihatkan pola Y86, sedangkan 14 (31.1%) sampel kelompok sensitif memperlihatkan pola Y86. Analisis statistik memperlihatkan tidak ada perbedaan bermakna atau hubungan mutasi kodon 86 dengan resistensi terhadap AAQ ($p = 0,122$; Odds Ratio: 0.395 (95% CI = 0.120 – 1.305))

Tabel 4.9 Hubungan Mutasi PfMDR1 N86Y Berdasarkan Resistensi Artesunat Amodiaquin

PfMDR1	Resistensi Invivo Artesunat Amodiaquin		p
	Resisten + (%)	Resisten - (%)	
Mutasi (+)	8 (53,3)	14 (31,1)	0.122
Mutasi (-)	7 (46,7)	31 (68,9)	
Jumlah	15	45	60

Odds Ratio : 0.395 (95% CI = 0.120 – 1.305)

BAB V

PEMBAHASAN

Selama periode penelitian bulan Agustus 2010 hingga Januari 2011 ditemukan 65 orang penderita malaria di beberapa rumah sakit di Sumbar yang memenuhi kriteria penelitian, namun dalam perjalanannya 5 orang dikeluarkan karena 3 orang terinfeksi malaria campuran, 1 orang hamil, dan 1 orang mengundurkan diri serta kelima penderita juga tidak memenuhi kriteria untuk pemeriksaan resistensi molekuler.

5.1. Karakteristik Dasar Penderita

Pada penelitian ini umur rata-rata penderita adalah $32,97 \pm 15,88$ tahun yang termuda 13 tahun dan tertua 70 tahun. Hasil ini hampir sama dengan yang didapatkan oleh Indra (2003) pada kelompok artemeter yaitu $34,6 \pm 17,0$, dengan umur termuda 13 tahun dan tertua 60 tahun. Setiap orang dapat terinfeksi malaria dan perbedaan prevalensi menurut umur dan jenis kelamin berkaitan dengan perbedaan derajat kekebalan akibat variasi terpapar gigitan nyamuk. Penelitian efektifitas secara *invivo* untuk AAQ terutama pada dewasa tidak ditemukan oleh peneliti, yang terbanyak adalah pada anak-anak seperti penelitian oleh Thwing dkk (2009) dengan rata-rata usia yaitu 30,7 bulan.^{56, 57}

Suhu rata-rata pada penelitian ini adalah $37,48^{\circ}\text{C} \pm 0,76$ sementara penelitian Evanita (2002) mendapatkan suhu rata-rata $38,5^{\circ}\text{C} \pm 0,7$ dan Indra (2003) yang mendapatkan suhu rata-rata $38,1^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ pada kelompok terapi

artemeter, Thwing (2009) mendapatkan suhu rata-rata 38,2⁰C. Pada penelitian ini kriteria suhu berdasarkan suhu aksila $\geq 37,5^0\text{C}$ tetapi beberapa penderita didapatkan suhu yang normal karena menderita malaria kronis terutama yang bertempat tinggal di daerah endemis. Hal ini dipengaruhi oleh imunitas penderita yang bertempat tinggal di daerah endemis. ^{6, 56, 57}

Pada beberapa penderita demam dapat tidak terjadi, seperti di daerah hiperendemik banyak orang dengan parasitemia tanpa gejala. Gejala tersebut berhubungan dengan imunitas dan pengaruh pemberian profilaksis atau pengobatan yang tidak adekuat. Pada beberapa daerah seperti Irian banyak terjadi gejala nonspesifik berupa diare yang ternyata merupakan gejala malaria. Di RS di Minahasa dan Manado, gejala malaria tidak ditemukan pada 1,92% kasus, yaitu penderita yang masuk RS karena penyakit lain. Gejala klinis malaria dipengaruhi oleh strain plasmodium, imunitas tubuh dan jumlah parasit yang menginfeksi. ⁵⁸

Demikian halnya dengan anemia, pada penelitian ini ditemukan penderita anemia 21 (35%) penderita sedangkan Evanita (2002) mendapatkan anemia 17,9%, sedangkan Indra (2003) pada kelompok artemeter mendapatkan anemia 25%. Hal ini disebabkan pada penelitian ini penderita kebanyakan berasal dari daerah endemis, ditandai dengan pucat dan didukung pemeriksaan hemoglobin. Keadaan anemia merupakan gejala yang sering dijumpai pada infeksi malaria, lebih sering dijumpai pada penderita di daerah endemik, anak-anak dan ibu hamil. ^{6, 56, 59}

Di daerah endemik ketika transmisi tidak stabil, imunitas masyarakat terhadap malaria rendah, hal ini menyebabkan terjadinya serangan malaria

berulang yang merupakan kombinasi antara rekrudensi, relaps, rekuren dan reinfeksi (malaria kronis). Keadaan tersebut menimbulkan morbiditas yang tinggi yang sering disertai penurunan berat badan, anemia, kulit kering dan dehidrasi, sklera kuning, pucat dan hepatosplenomegali.⁵⁹

Hasil laboratorium pada penelitian ini secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna dengan demikian data dasar penelitian ini bersifat homogen sehingga tidak mempengaruhi hasil nantinya (bukan disebabkan oleh pengobatan). Dari gambaran laboratorium terlihat nilai hemoglobin, leukosit, dan trombosit dalam batas normal. Pada pemeriksaan fungsi hati didapatkan nilai rata-rata SGOT dan SGPT yang normal, demikian pula pemeriksaan faal ginjal yaitu ureum dan kreatinin ditemukan dalam batas normal. Berbeda pada hematokrit dan gula darah didapati dalam batas normal tetapi secara statistik hasil $p < 0,005$, hal ini dapat terjadi karena pengambilan sampel tidak dilakukan secara randomisasi atau stratifikasi sehingga terdapat nilai variasi yang lebar (ekstrim), namun dari beberapa penelitian diketahui keduanya tidak mempengaruhi respon terapi. Thwing dkk (2009) mendapati rata-rata hemoglobin adalah 9,9 g/dl serta kadarnya tidak bermakna secara statistik sesuai dengan teori.⁵⁷

5.2. Resistensi Pengobatan Dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhinya

Tingkat resistensi pada penelitian ini berdasarkan uji *invivo* standar 7 hari yang disederhanakan dari WHO, serta dilakukan pula pemeriksaan pada H28 (*extended*) untuk membedakan antara S dan RI. Hasil penelitian memperlihatkan

penderita yang sensitif sebanyak 45 (75%) orang, dan resisten sebanyak 15 (25%) orang, kemudian kelompok resisten dibagi menjadi RI sebanyak 6 (40%) orang, RII sebanyak 3 (20%) orang dan RIII sebanyak 6 (40%) orang.

Pada mulanya penelitian ini bertujuan melihat resistensi berdasarkan 4 kategori, namun pada perjalanannya karena hasil yang didapat tidak memenuhi syarat untuk analisis statistik maka kategori hanya dapat dikelompokkan menjadi 2 yaitu sensitif dan resisten. Penelitian lain yang menggunakan tingkat resistensi berdasarkan kategori yang sama seperti pada penelitian ini tidak ditemukan untuk penggunaan AAQ, yang terbanyak pada resistensi klorokuin. Penelitian lain memakai kategori *late parasitological failure* (LPF) pada uji invivo yang dilakukan dan maknanya pada wilayah endemisitas rendah hingga menengah sebanding dengan tingkat resistensi invivo WHO.¹⁵

Berdasarkan interpretasi invivo WHO yang diperbaharui, maka dari uji invivo yang digunakan pada penelitian ini dapat dikatakan didapatkan kegagalan terapi tanpa koreksi PCR adalah 25% (lebih dari 10%) diduga berhubungan dengan adanya resistensi silang penggunaan amodiakuin sebagai kombinasi di wilayah ini. Sebaiknya untuk menyingkirkan adanya reinfeksi pada RI atau LPF dilakukan koreksi PCR. Namun demikian dapat disimpulkan bahwa kombinasi AAQ tidak efektif lagi sebagai terapi antimalaria di Sumbar.⁶⁰

Disamping itu mengacu kepada protokol pemeriksaan dan pengawasan efikasi pengobatan antimalaria pada terapi malaria falsiparum tanpa komplikasi

WHO 2003 tentang perubahan kebijaksanaan pengobatan di suatu wilayah dinyatakan dalam 4 periode yaitu *Grace period* bila kegagalan terapi klinis antara 0-4%; *Alert* bila angkanya 5-14%; *Action* bila mencapai 15-24% dan *Change* bila $\geq 25\%$. Protokol yang sama dari WHO tahun 2006 dan laporan global efikasi obat dan resistensi obat antimalaria WHO 2010 menetapkan angka 10% untuk kegagalan terapi atau angka kesembuhan kurang dari 90% dalam melakukan perubahan kebijaksanaan pengobatan di suatu wilayah. Dengan demikian penggunaan kombinasi AAQ di Sumbar selain tidak efektif juga sudah mencapai periode perubahan (*change*) kebijakan, sehingga sebaiknya perlu ditetapkan terapi alternatif lain sebagai pengganti kombinasi ini melalui penelitian klinis.^{15, 60, 61}

Penelitian Hasugian dkk (2007) di Timika mendukung penelitian ini dimana dari 166 penderita didapatkan angka kegagalan parasitologis pada hari ke 42 infeksi *P. falciparum* dengan penggunaan AAQ adalah 22% dan menjadi 11% setelah koreksi PCR pada kasus reinfeksi dan bermakna secara statistik bila dibandingkan dengan kombinasi DHP dengan angka kegagalan parasitologis 6,8% dan 3,8% setelah koreksi PCR ($p = <0,01$ dan $p = 0,02$). Berdasarkan hal itu maka dilakukan perubahan kebijakan di Papua yaitu mengganti kombinasi AAQ dengan DHP. Sementara hasil penelitian ini lebih tinggi yaitu angka kegagalan parasitologis 25% dan walaupun dilakukan koreksi PCR diperkirakan hasilnya adalah 15% dengan menghilangkan RI sehingga tetap perlu dilakukan perubahan kebijakan.⁴⁷

Penelitian ini hampir sama metodenya dengan penelitian Thwing dkk (2009) yaitu secara *invivo* dan molekuler pada terapi AAQ di Kenya Selatan tetapi interpretasi *invivo* yang digunakan memakai kriteria kegagalan klinis dan parasitologis. Hasilnya tidak ada yang mengalami kegagalan pengobatan dini dan tidak ada yang gagal terapi dini (RIII). 16 dari 103 (15,5%) penderita termasuk dalam kegagalan pengobatan kasep parasitologis yaitu 1 orang pada H14, 13 orang pada H21 dan 2 orang pada H28, sementara kegagalan secara klinis yaitu 16 (15,5%) orang, sehingga total 32 (31,1%) penderita mengalami kegagalan terapi dan yang memenuhi respon klinis dan parasitologis memadai (ACPR) pada H28 adalah 71 (68,9%) orang, dimana hasil ini lebih tinggi dari penelitian ini. Setelah dilakukan koreksi PCR didapatkan angka ACPR 90,2% sehingga di wilayah ini AAQ masih efektif dan tetap direkomendasikan tetapi penggunaan amodiakuin tunggal disimpulkan dapat membahayakan penggunaan kombinasi AAQ di masa depan sebagai pilihan kombinasi dalam ACT.⁵⁷

Penelitian Huong dkk (2001) yang menguji 2 kelompok pemakaian artesunat dan meflokuin secara *invivo* dan *invitro* di Vietnam dengan masing-masing 25 penderita mendapati parasitemia muncul kembali pada 9 (36%) penderita kelompok artesunat pada H14 sampai H28 ($p=0,03$) namun tidak ditemukan RII atau RIII. Hasil berbeda dikarenakan penelitian tersebut membandingkan 2 kelompok obat sehingga hasil yang lebih tinggi kemungkinannya lebih besar, serta adanya RII dan RIII pada penelitian ini diduga

sebagai akibat penggunaan amodiakuin yang lebih resisten dibanding artesunat pada beberapa laporan.⁶²

Sebagai contoh pada penelitian Adjuik dkk (2002) yang membandingkan pemakaian kombinasi AAQ dengan amodiakuin tunggal pada anak-anak di 3 daerah di Afrika memperlihatkan hasil pada pemeriksaan H28 yaitu di Kenya 68%: 41% ($p < 0,0001$), di Senegal 82%: 79% ($p = 0,5$) dan di Gabon 85%:71% ($p = 0,02$) namun disimpulkan di 3 daerah tersebut kombinasi AAQ masih potensial penggunaannya dan resistensi lebih tinggi bila amodiakuin diberikan secara tunggal. Hal ini mungkin karena tidak dilakukan koreksi PCR tetapi berbeda dengan hasil penelitian ini dimana kedua terapi tersebut tidak dianjurkan lagi.⁷

Smithuis dkk (2010) yang meneliti efektivitas 5 kombinasi ACT yaitu AAQ, AL, AM, AM-L, dan DP dengan atau tanpa primaquin di Burma mendapati hasil pada 155 penderita anak dan dewasa yang mendapat AAQ, dimana pada hari ke28 rekurensi dan rekrudensi tertinggi ditemukan pada terapi AAQ dan menyimpulkan AAQ sebaiknya tidak digunakan lagi di Myanmar karena secara substansial kombinasi 4 lainnya lebih efektif. Hal ini berbeda dengan penelitian ini dimana AAQ masih efektif dan belum pernah dibandingkan dengan AL yang juga digunakan di Padang.⁶³

Sementara itu Ayede dkk (2010) meneliti pemakaian AAQ dengan A-SP pada 250 anak di Nigeria dan mendapatkan angka kesembuhan parasitologi pada keduanya sama yaitu 97,9% dan 95,6% ($p = 0,151$) sehingga terapi dengan A-SP

dapat menjadi terapi alternatif terapi lini pertama.⁶⁴ Peningkatan kasus malaria disebabkan banyak faktor antara lain meningkatnya resistensi vektor nyamuk terhadap penggunaan insektisida dan peningkatan resistensi parasit terhadap obat malaria termasuk golongan artemisin ataupun amodiakuin. Secara umum resistensi terjadi karena mutasi spontan parasit yang menyebabkan berkurangnya sensitivitas suatu obat atau kelompok obat. Faktor demografi dan populasi juga mempengaruhi resistensi dan sensitivitas obat.

5.2.1 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiakuin Berdasarkan Jenis Kelamin

Berdasarkan jenis kelamin didapatkan 32 (53,3%) pria dan 28 (46,7%) wanita dimana penderita pria lebih banyak daripada wanita. Evanita (2002) mendapatkan perbandingan pria dengan wanita adalah 44 (61,1%) pria dan 28 (38,9%) wanita sama dengan penelitian ini. Beberapa penelitian mendukung bahwa wanita mempunyai respon imun lebih kuat dibanding pria. Penelitian klinis dan epidemiologis menunjukkan adanya perbedaan jenis kelamin pada infeksi plasmodium diantara manusia. Insiden dan intensitas infeksi *P. falciparum* dilaporkan pada pria lebih tinggi dari wanita demikian pula dengan manifestasi infeksi yang terjadi. Penelitian di suatu sekolah di Ghana ditemukan prevalensi infeksi *P. falciparum* tidak berbeda dalam jenis kelamin tetapi densitas parasit memperlihatkan nilai 2 kali lebih tinggi pada

usia pubertas pada anak laki-laki, yang menunjukkan bahwa sirkulasi steroid sex mempengaruhi hasil ini.^{6, 65}

Perbedaan jenis kelamin dalam respon terhadap infeksi malaria telah dilaporkan pula pada dewasa tetapi mekanisme yang mendasarinya atau apakah perbedaan tersebut mempengaruhi respon terhadap terapi atau vaksin hanya sedikit yang diketahui. Penelitian pada hewan percobaan melengkapi penelitian mengenai mekanisme terhadap infeksi plasmodium yang terjadi. Pada tikus percobaan jantan didapatkan 3-6 kali mengalami kematian setelah terinfeksi dibanding betina. Klein dkk (2008) pada tikus percobaan mendapatkan bahwa kadar fisiologis estrogen dibanding progesteron merangsang imunitas dan estrogen kemungkinan melindungi wanita dari gejala penyakit selama infeksi malaria diperantarai oleh perbedaan sintesis interferon γ dan interleukin 10 yang dipengaruhi oleh estrogen.⁶⁵

Pada penelitian ini ditemukan terapi AAQ yang sensitif lebih banyak ditemukan pada laki-laki, yaitu 25 (78,13%) kasus dan lebih sedikit yaitu 7 (21,87%) kasus untuk resisten. Tidak ada perbedaan bermakna distribusi resistensi berdasarkan jenis kelamin ($p= 0.550$, $p > 0.05$). Pada beberapa penelitian menyatakan wanita lebih resisten dibandingkan pria hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini namun hubungannya tidak bermakna, diduga karena kultur masyarakat Sumbar yang mendukung dimana banyak wanita yang bekerja mencari nafkah membantu suami ke daerah sumber penularan malaria seperti hutan, sawah atau pantai sehingga sering terpapar gigitan

nyamuk dan terinfeksi seperti pria sehingga intensitas penyebaran resistensi sebanding antara pria dan wanita di wilayah ini.⁶⁶

5.2.2 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Endemisitas Asal Daerah

Endemisitas daerah didasarkan pada data insiden malaria per kabupaten/kota yang didapatkan dari Litbang Dinkes Tingkat I Sumatera Barat. Daerah dengan HIA adalah Mentawai, MIA adalah Pesisir Selatan, Pasaman, Sawahlunto Sijunjung, Solok dan kodya Sawahlunto, daerah lainnya adalah LIA termasuk Padang dan kabupaten Solok. Penelitian ini hanya menemukan 2 kategori daerah, yaitu MIA dan LIA. Kabupaten dan Kota dengan MIA adalah Pesisir Selatan dan Pasaman Barat, sedangkan LIA adalah Padang dan kabupaten Solok. Berdasarkan asal daerah penderita didapati 22 (36,7%) kasus berasal dari LIA atau nonendemik dan 38 (63,3%) kasus berasal dari MIA atau pernah berkunjung ke daerah endemis malaria. Hal ini berbeda dengan penelitian Loehoeri (2001) yang mendapatkan 47,8% berasal dari daerah MIA-HIA dan 52,2% berasal dari LIA dikarenakan sampel pada penelitian ini diambil pada beberapa daerah endemis di Sumbar dan mungkin pengaruh transmisi malaria tidak stabil di daerah endemis maka di daerah MIA banyak penderita malaria ditemukan. Pada daerah endemis resistensi lebih rendah karena imunitas tinggi akan menimbulkan gejala asimtomatik sehingga jarang diobati⁶⁷

Asal daerah penting dalam meningkatkan ketepatan diagnosis klinis terutama di daerah endemik malaria. Data dari laporan Dinkes tingkat I propinsi Sumbar tahun 2010 didapatkan berdasarkan API atau AMI Sumbar yang termasuk daerah *Medium-High Incidence Area* hanya kabupaten Mentawai, sedangkan berdasarkan *Spleen Rate* diketahui daerah kab. Solok (sebelum dipecah), Pesisir Selatan, Pasaman dan Sawahlunto Sijunjung termasuk daerah endemik.⁶⁸

Disamping itu hasil penelitian memperlihatkan kelompok resisten AAQ ditemukan pada 9 (23,7%) kasus di daerah MIA dan 6 (27,3%) kasus di daerah LIA. Sebaliknya pada kelompok sensitif sebagian besar ditemukan pada daerah MIA yaitu 29 (76,3%) kasus serta ditemukan 16 (72,7%) kasus AAQ sensitif pada daerah dengan LIA. Analisis menggunakan uji *chi square* tidak memperlihatkan perbedaan bermakna atau pengaruh resistensi berdasarkan endemisitas ($p = 0.757$, $p > 0.05$).

Hal yang sama didapatkan oleh Baird dkk (1999) dimana imunitas alamiah yang didapat mempunyai efek yang kecil terhadap kemampuan obat, penelitian ini membandingkan antara daerah hiperendemik dan hipoendemik dan ternyata tingkat resistensi klorokuin tidak berbeda secara bermakna. Imunitas terhadap malaria juga tidak permanen dimana bila penderita lama meninggalkan daerah endemis jika kembali ke daerah asalnya yang endemis dan terinfeksi maka dapat menjadi sakit.⁶⁹ Kekebalan bawaan pada malaria bersifat spesifik spesies dan spesifik

stadium, apabila seseorang memiliki kekebalan terhadap stadium aseksual darah, orang tersebut dapat menderita stadium lain. Antigen *P. falciparum* (Ag RESA) pada stadium cincin ditemukan dalam serum orang dewasa yang tinggal di daerah endemis, tetapi tidak ditemukan dalam serum penderita yang baru pertama kali terinfeksi⁴¹

5.2.3 Hubungan Resistensi Artesunat Amodiaquin Berdasarkan Densitas Parasit

Densitas parasit hari pertama pemeriksaan (D0) rata-rata adalah 2002 ± 6134 parasit/ μ l dengan nilai minimal 160 parasit/ μ l dan nilai maksimal 30.000 parasit/ μ l darah. Pada penelitian Evanita (2002) didapatkan densitas H0 rata-rata $8215,9 \pm 24496,8$ parasit/ μ l dengan nilai minimal 160 parasit/ μ l dan nilai maksimal 165.000 parasit/ μ l darah, hal ini berbeda karena pada penelitian ini penderitanya adalah malaria tanpa komplikasi serta malaria kronis sedangkan Evanita memasukkan penderita malaria berat. Sementara Thwing mendapati nilai rata-rata adalah 54.915 parasit/ μ l, lebih tinggi dari penelitian ini karena kriteria yang dipakai yaitu densitas parasit 2000-120.000 parasit/ μ l juga lebih tinggi.^{6, 57}

Hasil penelitian ini memperlihatkan variasi yang lebar dari densitas parasit. Pada kelompok resistensi, variasinya ditemukan antara 100 – 30.000 pada kelompok sensitif dan 240 – 25.000 pada kelompok resisten. Rata-rata densitas parasit kelompok resisten AAQ *invivo* adalah

1930.89 ± 6142.8 parasit/μl sedangkan kelompok sensitif adalah 2216 ± 6317.6 parasit/μl. Analisis dengan *independent t test* tidak memperlihatkan perbedaan bermakna densitas parasit pada kedua kelompok ($p = 0.757$, $P > 0.05$) terhadap resistensi. Penelitian Happi (2006) juga mendapatkan hasil yang sama pada pemakaian amodiakuin yaitu densitas parasit tidak berhubungan dengan kegagalan terapi ($p = 0.9$). Dikatakan bahwa infeksi malaria bersifat spesifik stadium dan spesifik strain yang dapat mempengaruhi derajat parasitemia.^{38, 70}

Penelitian Adam dkk (2009) terhadap beberapa penelitian klinis yang menggunakan artesunat menemukan bahwa tidak ada hubungan kadar parasitemia dengan kegagalan terapi ($p = 0.8$), densitas parasit mungkin merupakan pencerminan dari tingkat transmisi malaria disuatu daerah. Pada daerah yang transmisinya stabil penderita sering kali terinfeksi dengan strain yang berbeda secara multipel genetik.⁷¹

5.2.4 Hubungan Resistensi Berdasarkan Mutasi Gen PfATP6 Dan PfMDR1

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui mutasi pada kodon L263 PfATP6 dan N86Y PfMDR1 *P. falciparum* terhadap sampel yang mendapat terapi AAQ. Pada awalnya direncanakan menggunakan RFLP, namun setelah diuji menggunakan *software restriction mapper* (<http://www.restrictionmapper.org>) ternyata tidak ditemukan enzim yang cocok untuk kodon 263 PfATP6. Akhirnya dilakukan sekuensing parsial

untuk menganalisis kodon 263 dan 86. Analisis sekuensing tidak menggunakan perangkat lunak seperti *Clustal W2* karena hanya satu kodon yang dinilai.

Hasil pada penelitian ini memperlihatkan mutasi PfATP6 pada kodon 263 hanya ditemukan pada 2 (11,7%) sampel yaitu L263E. Analisis terhadap uji resistensi memperlihatkan L263E ditemukan 1 (2,22%) sampel pada kelompok resisten dan 1 (6,67%) sampel lagi pada kelompok sensitif. Hasil analisis statistik memperlihatkan tidak ada hubungan mutasi kodon L263 dengan resistensi terhadap AAQ ($p=0,406$; Odds Ratio: 0.310 (95% CI = 0.019–5.426). Sementara untuk gen PfMDR1 dari 22 (36,7%) sampel dengan mutasi positif ditemukan 8 (53.3%) sampel dari kelompok resisten memperlihatkan pola Y86, sedangkan dari kelompok sensitif 14 (31.1%) sampel memperlihatkan pola yang sama. Analisis statistik memperlihatkan tidak ada hubungan resistensi terhadap AAQ berdasarkan mutasi kodon Y86 ($p=0,122$; Odds Ratio: 0.395 (95% CI = 0.120 – 1.305).

Penelitian yang meneliti mutasi kodon L263 pada penggunaan derivat ART dalam hal ini artesunat belum banyak ditemukan dan mekanisme resistensi gen karena mutasi gen PfATP6 sendiri belum sepenuhnya jelas. Hyde (2005) mengemukakan pada derivat ART, gen target yang mengkode resistensi adalah ATP6 dengan kunci

determinannya adalah L263 serta gen MDR1 yang dapat mempengaruhi tingkat sensitifitasnya.⁷²

Penelitian Gama dkk (2010) yang melakukan penelitian secara sekuensing terhadap mutasi kedua gen yaitu pada kodon 86, 130, 184, 1034, 1042, 1109 serta 1246 untuk PfMDR1 dan kodon 243, 263, 402, 431, 623, 630, 639, 683, 716, 776, 769 dan 771 pada PfATP6 sebelum ACT digunakan sebagai terapi malaria di Brazil mendapati haplotipe NEF/CDVY ditemukan pada 97% sampel PfMDR1 sedangkan pada PfATP6 ditemukan 4 haplotipe yaitu wild-type (37%), 630S (35%), 402V (5%) dan mutasi ganda 630S + 402V (23%) dengan kesimpulan walaupun beberapa polimorfisme sudah dipastikan, tidak ada laporan pada kedua gen yang memediasi perubahan respon dari ACT terdeteksi sebelum ACT digunakan di Brazil. Selanjutnya haplotip tersebut sangat berguna sebagai referensi dasar resistensi pada populasi *P. falciparum* di wilayah yang tidak mengalami tekanan obat.⁷³

Marfurt dkk (2010) meneliti berbagai mutasi alel termasuk mutasi alel PfATP6 di Papua New Guinea, tidak menemukan adanya mutasi pada gen ini sementara mutasi pada PfCRT dan PfMDR hasilnya tinggi disertai beberapa variasi alel dan haplotip. Variasi mutasi gen yang ditemukan tidak berhubungan dengan kegagalan terapi. Kesimpulannya indikator berbasis molekuler harus dipertimbangkan berdasarkan etiologi dan kondisi sesuai wilayahnya terutama disesuaikan dengan OAM yang

digunakan dan tingkat imunitas yang sudah ada sebelumnya. Uji penanda resistensi molekuler adalah alat pelengkap yang dapat membantu pemilihan terapi terbaik dan alternatifnya yang potensial di suatu wilayah.⁷⁴

Thwing dkk (2009)) mendapati mutasi gen pada penggunaan AAQ yaitu kodon 86Y, wild type 84Y dan 1246Y pada PfMDR1 yang tinggi frekuensinya ditemukan pada sampel yang mengalami rekrudensi dan reinfeksi dibanding sampel dengan ACPR tetapi hanya kodon 86Y yang secara signifikan berkaitan dengan infeksi rekuren, baik pada kejadian reinfeksi dan rekrudesensi, dan sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya pada penggunaan AAQ yaitu di Tanzania dan Uganda (Holmgren dan Nsohya). Dengan demikian berdasarkan mutasi gen AAQ semua penelitian tersebut mendukung teori adanya hubungan mutasi gen dengan resistensi terhadap obat^{48, 49, 57}

Tinto dkk (2008) menemukan dua penanda molekuler resistensi klorokuin memperlihatkan kaitan yang sama baiknya sebagai penanda resistensi amodiakuin yaitu PfCRT T76 dan PfMDR1 Y86 sehingga dapat digunakan sebagai pengawasan resistensi amodiakuin terutama di wilayah dimana amodiakuin digunakan sebagai kombinasi dengan artesunat sebagai terapi lini pertama atau kedua.⁷⁴ Berbeda dengan penelitian ini dengan tehnik sekuensing parsial terhadap satu kodon pada kedua gen yang diteliti, hasilnya memang hanya mendapati 3,3% adanya mutasi pada

gen resistensi kodon L263 untuk artesunat dan 36,7% pada kodon Y86N (dugaan akibat mutasi gen terhadap amodiakuin), setelah dianalisis secara statistik ternyata tidak bermakna terhadap resistensi sehingga tidak dapat ditentukan lebih lanjut penggunaannya sebagai penanda diagnostik adanya kepastian resistensi molekuler kombinasi AAQ di wilayah Sumbar.

Picot dkk (2009) melakukan metaanalisis dan telaah sistematis mengenai korelasi penanda molekuler resistensi parasit terhadap respon terapi menyimpulkan bahwa penanda molekuler secara genetik berkaitan dengan peningkatan risiko kegagalan terapi sehingga walaupun penelitian ini hasilnya kedua kodon yang diteliti tidak bermakna atau menunjukkan kecenderungan saja pada mutasi gen PfMDR1,86Y (53,3% pada kelompok resisten dengan $p=0.122$), maka perlu penelitian terhadap mutasi pada kodon-kodon lain yang dapat menjadi penanda resistensi molekuler di wilayah ini.⁷⁶

Kombinasi AAQ sebagai terapi lini pertama malaria menggantikan klorokuin banyak diperkenalkan di berbagai negara, perannya adalah untuk mencegah perkembangan resistensi amodiakuin dimana parasit dengan cepat berkembang menjadi resisten terhadap amodiakuin didaerah dengan resistensi klorokuin yang luas. Disamping itu mekanisme resistensi pada amodiakuin belum sepenuhnya dimengerti. Mekanisme yang terjadi baik secara *invivo* dan *invitro* diketahui sebagai suatu bentuk resistensi silang antara klorokuin dan amodiakuin. Strain yang resisten terhadap klorokuin

memperlihatkan penurunan akumulasi amodiakuin pula, sehingga pada daerah dengan resistensi klorokuin yang tinggi akan menimbulkan resistensi terhadap amodiakuin. Peningkatan penggunaan amodiakuin akan meningkatkan strain *P. falciparum* yang menurun sensitifitasnya terhadap obat ini. Di Indonesia efikasi amodiakuin lebih baik dibanding klorokuin, tetapi di wilayah yang predominan dengan tingkat resistensi klorokuin tinggi angka kegagalan terapi 28 hari telah melebihi 25%.^{25, 47, 75}

Dengan demikian polimorfisme pada protein transport yang kedua yaitu PfMDRI dapat mempengaruhi respon terhadap beberapa jumlah obat. Mutasi alel 86Y dan 1246Y berkaitan dengan hilangnya respon dari klorokuin dan amodiakuin seperti yang dijumpai pada penelitian Dokomajilar dkk (2006) di Burkina Faso. Sebaliknya alel N86, D1246 dan alel wild type berhubungan dengan hilangnya respon secara invitro sejumlah obat termasuk meflokuin, halofantrin, kina dan ART.³²

Penelitian Nsobya dkk (2007) dengan 201 sampel sebelum terapi mendapati prevalensi mutasi alel meningkat secara signifikan untuk 86Y sebanyak 90,5% dan 1246Y 83,1% dengan $p=0.03$ sementara itu berbeda pada penelitian ini didapatkan mutasi N86Y yaitu 36,7% dengan $p=0.122$ yang tidak bermakna secara statistik karena penelitian ini memakai jumlah sampel lebih kecil atau minimal.⁴⁸ Holmgren dkk (2007) yang meneliti pemakaian amodiakuin monoterapi dan kombinasi dengan artesunat mendapati hasil yang sama dengan penelitian ini yaitu mutasi alel 86Y

tidak ditemukan tetapi terdapat tendensi adanya frekuensi resistensi yang lebih tinggi pada terapi kombinasi sementara pada pemakaian amodiakuin tunggal didapati hasilnya signifikan, hal ini didukung oleh hipotesis bahwa ACT dengan penurunan biomass parasit yang cepat dan efektif akan menurunkan risiko rekrudensi parasit yang berhubungan dengan mutasi terkait karena adanya penggunaan kombinasi obat.⁴⁹

Untuk pemakaian amodiakuin tunggal penelitian yang ada yaitu oleh Happi dkk (2006) di Nigeria mendapati 13% penderita (13 dari 101) mengalami kegagalan terapi, dengan kategori keseluruhannya RI dan kaitannya dengan mutasi gen PfMDRI pada kodon N86Y memiliki hubungan yang lemah ($OR = 5,02$, $95\%CI$ 1.051-23.89, $P=0,036$) dengan kegagalan terapi amodiakuin tunggal serta mutasi pada PfMDRI sebesar 29%. Hasil ini hampir sama dengan penelitian ini meskipun sampel lebih banyak dan hanya satu jenis OAM namun mendukung pemakaian amodiakuin masih efektif secara statistik walaupun diberikan sebagai monoterapi.⁷⁰

Dengan demikian beberapa penelitian mendukung adanya efikasi yang baik pada pemakaian kombinasi AAQ sebagai terapi potensial tetapi karena adanya kombinasi dengan amodiakuin yang pada dasarnya memiliki resistensi tinggi terutama di wilayah yang telah resisten terhadap klorokuin, dapat membuat kombinasi AAQ menjadi berkurang

efektifitasnya. Penelitian Holmgren dan Nsoby diatas menyimpulkan efektifitas AAQ dapat berkurang karena kombinasi dengan amodiakuin.

Hasil-hasil penelitian tersebut diatas mendukung dan menjelaskan hasil penelitian ini yang mendapatkan mutasi PfMDR1,86Y pada 31,1% sampel kelompok sensitif sebagai akibat berkurangnya sensitifitas AAQ itu sendiri karena mutasi terhadap amodiakuin tidak diekspresikan, sementara mutasi terhadap artesunat mungkin malah meningkatkan sensitifitasnya. Pada 46,7% sampel kelompok resisten ternyata tidak didapatkan mutasi, hal ini karena kemungkinan terjadinya mutasi bukan pada kodon 86Y tetapi kodon-kodon lain dari protein gen PfMDR1 atau karena pengaruh faktor eksternal seperti imunitas pejamu, variasi absorpsi dan metabolisme obat serta kesalahan menilai reinfeksi sebagai rekrudesensi.^{4, 32, 49, 73,76}

5.3. Respon Terapi dan Efek Samping

Respon terapi pada penelitian ini secara klinis rata-rata tercapai dalam 48-72 jam setelah terapi pada penderita yang demam > 37,5 C, namun tidak dilakukan analisis karena penderita yang tidak demam juga dimasukkan dalam penelitian ini, tidak ditemukan kejadian malaria berat setelah terapi. Penelitian Thwing mendapatkan 16 orang (15,5%) yang mengalami kegagalan terapi klinis.⁵⁷

Efek samping yang banyak terjadi adalah mual dan muntah pada 21 orang (35%) serta sakit kepala 10 orang (15%), tidak ditemukan efek samping

yang berat dan penderita tetap menghabiskan obatnya setelah diberikan terapi simptomatik lainnya.

5.4. Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini ditemukan keterbatasan penelitian yaitu jumlah sampel penelitian yang kurang sehingga tidak bermakna untuk mengukur efektifitas terapi akibat adanya mutasi pada penelitian resistensi obat secara molekuler. Selain itu pemeriksaan hanya pada satu kodon saja yang diduga bermutasi berdasarkan dukungan literatur, sementara kemungkinan mutasi pada kodon-kodon lain juga penting untuk diuji, untuk itu sebaiknya pemeriksaan dilakukan secara sekuensing total.

Hasil penelitian juga tidak dapat dibandingkan efektifitasnya dengan kombinasi ACT lain seperti AL yang juga digunakan di wilayah ini, sementara efektifitas kombinasi obat akan jelas terlihat bila dilakukan penelitian secara klinis dengan membandingkan 2 atau lebih kombinasi obat sehingga dapat ditetapkan kombinasi ACT lain sebagai pilihan terapi standar atau alternatif.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Resistensi penderita malaria falsiparum di beberapa rumah sakit di Sumatera Barat terhadap artesunat amodiakuin termasuk tinggi (angka kegagalan terapi 25% tanpa koreksi PCR).
2. Terdapat hubungan mutasi pada kedua gen yang diteliti dengan resistensi walaupun secara analisis statistik tidak bermakna
3. Terdapat mutasi gen PfMDR1, N86Y sebesar 53,3% pada kelompok resisten yang diduga berperan pada terjadinya resistensi amodiakuin walaupun secara analisis statistik tidak bermakna
4. Tidak terdapat hubungan resistensi malaria falsiparum terhadap artesunat amodiakuin dengan jenis kelamin, endemitas asal daerah dan densitas parasit

6.2. Saran

1. Mulai dipikirkan resistensi penggunaan amodiakuin sebagai kombinasi sehingga perlu untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel lebih besar
2. Diperlukan penelitian terhadap penanda molekuler mutasi gen PfMDR1 pada kodon-kodon lainnya sebagai penanda diagnostik adanya resistensi molekuler kombinasi artesunat amodiakuin di Sumbar

3. Kombinasi artesunat amodiakuin sebagai antimalaria tidak efektif lagi sesuai kebijakan pengawasan efikasi obat WHO, sehingga sebaiknya tidak digunakan lagi sebagai pengobatan malaria di Sumatera Barat

DAFTAR PUSTAKA

1. Tjitra E. Pengobatan malaria dengan kombinasi artemisinin. Simposium Nasional Pengendalian Malaria. Surabaya. 2004: 1-9
2. Gunawan S. Epidemiologi malaria. Dalam Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinik dan Penanganan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2000. Hal: 1-13
3. Kusriastuti R. Kebijakan dan strategi tatalaksana malaria di Indonesia. Dalam Proceeding Book KPPIK FKUI. Jakarta. 2009: Hal: 78-92
4. Gunawan CA, Leatemia LD, Siagian RD. Implikasi klinis resistensi obat antimalaria. Dalam Malaria dari Molekuler ke Klinis. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2010. Hal: 311-23
5. Setiawan B. Pengalaman klinis menggunakan terapi kombinasi berbasis artemisinin (ACT) pada kasus malaria. Dalam Proceeding Book KPPIK FKUI. Jakarta. 2009: Hal: 96-102
6. Evanita L. Tingkat resistensi malaria falsiparum terhadap klorokuin dan faktor-faktor yang mempengaruhinya di Bagian Penyakit Dalam RS Dr. M. Djamil Padang. Makalah Akhir Peserta Pendidikan Dokter Spesialis Penyakit Dalam FK Unand 2002
7. WHO. Assessment of theurapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria. In Draft March. WHO 2001. p: 1-37
8. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A et al. Amodiaquine-Artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomized multicentre trial. The Lancet 2002; 359: 1365-72
9. WHO. Containment of malaria multi-drug resistance on the Cambodia-Thailand border, report of an informal consultation. WHO 2007. p: 1-23
10. WHO. In Guidelines for the treatment of malaria. Geneva. WHO 2006. p: 1-266

11. Syafruddin D. Dasar molekular resistensi parasit terhadap obat antimalaria. Dalam Malaria dari Molekuler ke Klinis. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2010. Hal: 64-84
12. Syafruddin D, Asih PB, Casey GJ et al. Molecular epidemiology of *plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 174-81
13. Ferdinand JL, Arbani PR. Situasi malaria di Indonesia dan penanggulangannya. Dalam Malaria dari Molekuler ke Klinis. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2010. Hal: 1-15
14. Peta Kesehatan Indonesia 2007. Download dari Pusat Data dan Informasi Kesehatan Departemen Kesehatan 2008.
15. WHO. In Susceptibility *plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring 1996-2004. Geneva. WHO 2006. p: 1-148
16. Mutabingwa TK. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy!. Acta Tropica 95 2005; 95: 305-15
17. Tjitra E. Resistensi obat antimalaria. Slide Presentasi pada Seminar Tatalaksana Malaria 2011: 1-35
18. Golenser J, Wagnine JH, Krugliak M et al. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. International Journal for Parasitology 2006; 36: 1427-41
19. Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL et al. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. The J of Biological Chemistry 1999; 274 (27): 19383- 88
20. Dahlstrom S, Veiga MI, Ferreira P et al. Diversity of the Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase orthologue of Plasmodium Falciparum (PfATP6). Infection, Genetics and Evolution 2008; 8: 340 -5

21. Menegon M, Sannela AR, Majorie G et al. Detection of novel point mutations in the *plasmodium falciparum* ATPase6 candidate gene for resistance to artemisinin. *Parasitology International* 2008; 57: 233-5
22. Kannan R, Kumar K, Kukreti S, Chauhan VS. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J* 2005: 409-18
23. Jung M, Kim H, Nam KY, No KT. Three-dimensional structure of *plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase(PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005;15: 2994-7
24. Dahlstrom S. Role of PfATP6 and PfMRP1 in *plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. 2009: 1-33
25. Afonso A, Hunt P, Choogmant S et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in lack genes ATP6 (encoding the Sarcoplasmic dan Endoplasmic Retikulum Ca²⁺ ATPase), tctp, mdr1, and cg10. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(2): 480-9
26. Cowman AF. The P-glycoprotein homologues of *plasmodium falciparum*: are they involved in chloroquin resistance?. *Parasitology Today* 1991; 7 (4): 70-5
27. Koenderink JB, Kavishe RA, Rijpma SR et al. The ABCs of multidrug resistance in malaria. *Trends in Parasitology* 2010; 26: 440-6
28. Ding XC, Beck HP, Raso G. Plasmodium sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends in Parasitology* 2011; 27(2): 74-82
29. Reed MB, Saliba KS, Caruana SR et al. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *plasmodium falciparum*. *Nature* 2000; 403: 906-9
30. Adjei JO, Kurtzhals JAL, Rodrigues OP, et al. Amodiaquine-Artesunat vs artemeter lumefantrin for uncomplicated malaria in Ghanaian children: a randomized efficacy and safety trial with one year follow up. *Malaria Journal* 2008; 7(127): 1-11
31. Dokomajilar CZM, Lankoande G, Dorsey I et al. Roles of specific Plasmodium Falciparum mutations in resistance to amodiaquine and

- sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2006; 75: 162-5.
32. Sanches CP, Dave A, Stein WD et al. Transporters as mediators of drug resistance in *plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology* 2010; 40: 1109-18
 33. Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in PfMDRI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003: 2418-23
 34. Rohrbach P, Sanches CP, Hayton K et al. Genetic linkage of PfMDRI with food vacuolar solute import in *plasmodium falciparum*. *The EMBO Journal* 2006; 25: 3000-11
 35. Peters W. *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. London Academy Press 1987: 1-9
 36. White NJ. Antimalarial drug resistance. *The J of Clin Invest* 2004; 8: 1084-92
 37. Hasting IM, Watkins WM. Intensity of malaria transmission and the evolution of drug resistance. *Acta Tropika* 2005; 94: 218-9
 38. Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM et al. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of invitro resistance. *TRENDS in Molecular Medicine* 2006; 12 (5): 200-5
 39. Khrisna S, Uhlemann AC, Haynes RK. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates* 2004; 7: 233-44
 40. Sutanto S. Diagnosis mikroskopik dan serologik malaria. Dalam *Malaria dari Molekuler ke Klinis*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2010. Hal: 103-44
 41. Nugroho A, Harijanto PN, Datau EA. Imunologi pada malaria. Dalam *Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinik dan Penanganan*. Penerbit Buku Kedoktera EGC. Jakarta. 2000. Hal: 128-50