

Keragaman Genetik dari Msp 1, Msp 2, dan Glurp pada *Plasmodium Falciparum* di Kabupaten Sumba Tengah, Nusa Tenggara Timur

GENETIC DIVERSITY OF THE MSP-1, MSP-2, AND GLURP GENES Of Plasmodium Falciparum IN THE CENTRAL OF SUMBA, EAST NUSA TENGGARA

Fridolina Mau¹, E. Elsa Herdiana Murhandarwati²

¹Loka Litbang P2B2 Waikabubak

Jln. Basuki Rahmat Km 5 Puu Weri Waikabubak, Nusa Tenggara Timur

²Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Email : fridolin.lokawkb@gmail.com

Submitted : 15-3-2016, Revised : 18-3-2016, Revised : 21-4-2016, Accepted : 13-5-2016

Abstract

Malaria is still a public health problem in Central Sumba regency, East Nusa Tenggara. Over the past decade, anti malaria drugs resistance has rapidly become a major public health problem in the East Nusa Tenggara, including Central Sumba regency. The problem of malaria control are not only influenced by the anti malaria drugs resistance on P. faciparum and specific genes but also by many variations of allele of Plasmodium malaria. A study is needed especially on molecular epidemiology of P. falciparum using locus gene Merozoites Surface Protein 1 (MSP 1), Merozoites Surface Protein (MSP2) and Glutamate Rich Protein (GLURP), which aims to identify the genetic diversity marker of Plasmodium falciparum in Central Sumba Regency. The method applied was a nested Polymerase Chain Reaction (PCR) to each locus gen separately. The results of the 50 fresh blood of patients infected with P. falciparum, each gene locus of MSP 1, MSP 2 and GLURP can be identified as much as 38%, 12% and 10%. The third gene locus was found only in 38 % (19/50) positive samples. It can be identified 7 alleles at each locus genes, three classes' MSP1 allele (15.8 %), four classes of MSP alleles (21.1%) and three classes of GLURP alleles (15.8 %). A multigenotype infection of P. falciparum and MSP 2 deleted was diverse marker of P. falciparum gene locus with varied class of alleles. It can be concluded that multigenotype infections have occurred in research location.

Keywords : allele, P. falciparum, MSP 1, MSP 2, GLUP, diversity.

Abstrak

Malaria masih menjadi masalah kesehatan di Kabupaten Sumba Tengah, Nusa Tenggara Timur. Selama beberapa dekade terakhir resistensi obat telah dengan cepat menjadi masalah utama malaria di wilayah NTT termasuk Kabupaten Sumba Tengah. Masalah pengendalian malaria diduga tidak hanya dipengaruhi oleh resistensi obat anti malaria (OAM) dan gen tertentu pada *P. faciparum* tetapi juga oleh banyaknya variasi alel *Plasmodium*. Untuk itu perlu dilakukan penelitian epidemiologi molekuler pada *P. falciparum* dengan menggunakan lokus gen *Merozoit Surface Protein 1, 2* (MSP1 - MSP2) dan *Glutamate Rich Protein* (GLURP), yang bertujuan mengidentifikasi keragaman genetik penyandi *Plasmodium falciparum* di Kabupaten Sumba Tengah. Metode pemeriksaan yang digunakan adalah *nested polymerase chain reaction* (PCR) terhadap masing-masing lokus gen secara terpisah. Dari 50 darah segar penderita terinfeksi *P. falciparum*, masing-masing lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP yang dapat diidentifikasi sebanyak 38%,12% dan 10%. Ketiga lokus gen hanya ditemukan pada 38 % (19/50) sampel positif. Teridentifikasi 7 alel pada masing-masing lokus gen yaitu pada MSP 1 ditemukan 3 kelas alel (15,8%), MSP 2 ditemukan 4 kelas alel (21,1%) dan GLURP

ditemukan 3 kelas alel (15,8%). Infeksi multigenotip yang ditemukan pada penderita infeksi *P. falciparum* dan MSP 2 adalah lokus gen penyandi *P. falciparum* yang beragam kelas alel. Kesimpulan telah terjadi infeksi multigenotip di lokasi penelitian.

Kata kunci : alel, *P. falciparum*, MSP 1, MSP 2, GLURP, keragaman

PENDAHULUAN

Malaria di Nusa Tenggara Timur (NTT) hingga saat ini masih menjadi masalah karena kasus malaria terus mengalami peningkatan secara signifikan. Hasil survei Riset Kesehatan Dasar (Riskedas) tahun 2013 menunjukkan bahwa, NTT termasuk dalam lima provinsi tertinggi angka malaria di Indonesia Timur dengan insidensi 6,8% dan prevalensi 23,3% dan berada di atas angka prevalensi nasional.¹

Tingginya kasus malaria tidak terlepas dari keberadaan *Plasmodium* sebagai agen penyebab malaria, nyamuk *Anopheles* betina sebagai vektor, serta lingkungan fisika, kimia dan biologi yang sangat mendukung eksistensi penyakit ini.² Walaupun upaya pengendalian malaria berupa promotif, preventif dan kuratif telah dilaksanakan dengan baik namun malaria masih termasuk dalam daftar sepuluh penyakit utama di NTT.³

Kegagalan pengobatan yang disebabkan resistensi parasit terhadap Obat Anti Malaria (OAM) merupakan masalah dalam pengendalian malaria di Indonesia yang dihadapi saat ini. Resistensi OAM pada *Plasmodium falciparum* sering dihubungkan dengan masalah genetik, karena parasit mudah bermutasi membentuk strain baru. Pada *Plasmodium* telah diketahui adanya polimorfisme dan umumnya infeksi malaria multiklon terjadi di berbagai daerah dengan transmisi tinggi, sedang maupun rendah. Pada *P. falciparum* di dunia diketahui terdapat kurang lebih 14 strain dan di Indonesia strain-strain *Plasmodium* belum semuanya diketahui.⁴

Masalah pengendalian malaria diduga tidak hanya dipengaruhi oleh resistensi OAM pada *P. falciparum*, *P. vivax* dan gen tertentu tetapi juga oleh banyaknya variasi alel *Plasmodium*. Di NTT telah dilakukan penelitian epidemiologi molekuler pada *P. falciparum* dengan menggunakan lokus gen *Merozoit Surface Protein 1, 2* (MSP1- MSP2) dan *Glutamate Rich Protein* (GLURP), yang

bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik penyandi *P. falciparum* di Kabupaten Sumba Tengah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Kabupaten Sumba Tengah Provinsi Nusa Tenggara Timur pada bulan Mei 2015. Penelitian ini menggunakan desain *Cross Sectional*. Sampel pada penelitian ini adalah penderita positif malaria hasil survei *Mass Blood Survey* (MBS) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Kriteria inklusi: penderita positif malaria dengan kepadatan parasit aseksual 1–100.000/ul, laki-laki dan perempuan umur >1 tahun dan penderita malaria tanpa komplikasi penyakit, serta bersedia menandatangani persetujuan mengikuti penelitian. Kriteria eksklusi: penderita dengan komplikasi penyakit lain, ibu hamil dan malnutrisi.

Spesimen yang berupa darah segar dikumpulkan dengan tahapan sebagai berikut; terhadap penderita positif *P. falciparum* yang terjaring dalam kegiatan MBS dilakukan pengambilan darah vena oleh petugas puskesmas untuk kepentingan pemeriksaan DNA. Dari setiap penderita suspek malaria diambil 3cc darah vena kemudian darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA, dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-5°C. Sampel darah dikirim ke Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK UGM) untuk dilakukan pemeriksaan variasi genetik *P. falciparum* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Isolasi *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) *P. falciparum* dengan mengacu pada petunjuk dari Favorgen Kit. Identifikasi terhadap ketiga lokus gen dilakukan secara terpisah pada tiap-tiap lokus gen. Primer yang digunakan untuk

ketiga lokus gen terdiri dari primer untuk PCR pertama (P) dan PCR *nested* (N).

Urutan basa primer MSP 1, MSP 2 dan GRULP mengacu pada L.Ranfart Cartwrite.5 Masing-masing lokus gen adalah MSP1 (P1: 5'CAC ATG AAA GTT ATC AAG AAC TTG TC3', P2: 3'GTA CGT CTA ATT CAT TTG CAC G5'; N1: 5'GCA GTA TTG ACA GGT TAT GG3', N2: 3'GAT TGAAAG GTATTT GAC5'); MSP2 (P1: 5'GAA GTT AAT TAA AAC ATT GTC3', P2: 3'GAG GGA TGT TGC TGC TCC ACA G5', N1: 5'CTA GAA CCA TGC ATA TGT CC3', N2: 3'GAG TAT AAG GAG AAG TAT G5') dan GLURP (P1: 5'ACA TGC AAG TGT TGA TCC3', P2: 3'GAT GGT TTG GGA GTA ACG5', N1: 5'TGA ATT CGA AGA TGT TCA CAC TGA AC3', N2: 3'TGT AGG TAC CAC GGG TTC TTG TGG5').

Keadaan masing-masing reagen untuk reaksi PCR pertama dan *nested* adalah: PCR buffer tanpa MgCl₂ 1x, dNTP mix 200 µM, MgCl₂ 2,5 mM (*Aplied Biosystem*), Primer 100 nM dan Tag polymerase 0,70 U (*invitrogen*) dengan volume akhir reaksi 25 µl. Volume sampel DNA untuk ketiga lokus gen dengan konsentrasi sama pada reaksi pertama adalah 2,5 µl, sedangkan untuk reaksi kedua adalah 1 µl untuk MSP 1 dan MSP 2, dan 0,5 µl untuk GLURP. Pada reaksi PCR yang pertama sampel DNA yang digunakan telah diencerkan terlebih dahulu (5 kali pengenceran).

Program PCR pada tahap pertama dan kedua adalah sama, yaitu untuk MSP1 dan MSP2 dengan program predenaturasi 95°C selama 5 menit; 30 siklus untuk denaturasi, annealing dan ekstensi masing-masing adalah 95°C selama 30 detik, 50°C–30 detik, 72°C selama 1 menit dan terakhir 72°C–5 menit. Sedangkan untuk GLURP, predenaturasi 95°C selama 3 menit, 30 siklus untuk denaturasi, annealing dan ekstensi masing-masing adalah 95°C–25 detik, 50°C–1 menit, 72°C–2 menit dan terakhir 72°C–5 menit. Setelah amplifikasi, kedua produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose (2%) yang mengandung etidium bromide (3%) dan dengan voltase 100 volt selama 35 menit. Pada setiap kali elektroforesis selalu disertakan petanda DNA interval 100 bp untuk mempermudah analisis. Produk DNA selanjutnya divisualisasikan dan didokumentasikan dengan mesin Geldoc 100 dalam ruang gelap dan jika tidak terjadi amplifikasi DNA pada tiap-tiap lokus gen maka dilakukan pengulangan. Apabila hasil baca pengulangan tetap menunjukkan negatif, maka lokus gen tersebut dinyatakan tidak teridentifikasi.

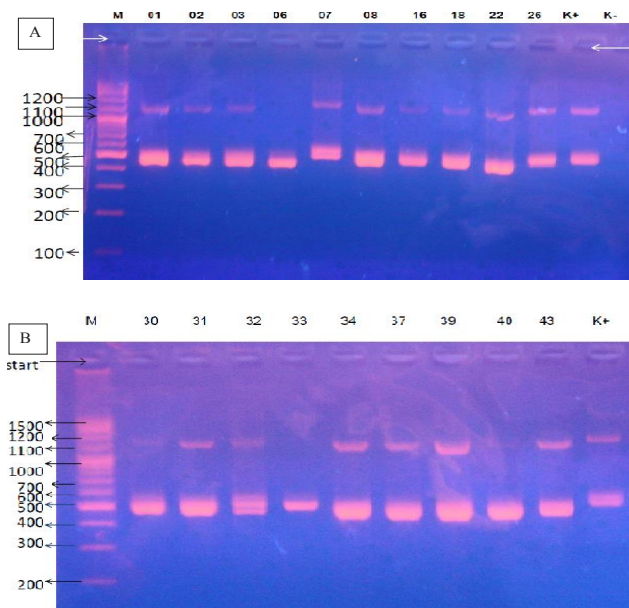
Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dengan menghitung munculnya pita DNA pada masing-masing lokus gen kemudian diklasifikasikan menurut acuan di tabel Brockman *A. et al.*⁶

Tabel 1. Klasifikasi Kode Alel Gen MSP1, MSP 2 dan GLURP pada *Plasmodium falciparum* (Brockman A. et al, 1999)

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

HASIL

Tiga lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP dari 50 sampel positif tidak semua berhasil diidentifikasi. Pada tiga lokus gen yang diidentifikasi keberhasilan terbanyak ditemukan pada lokus gen MSP 1 sebanyak 38% (19/50), MSP 2 sebanyak DNA 12% (6/50) dan GLURP sebanyak 10% (5/50). Hasil amplifikasi untuk mendeteksi MSP 1 *P. falciparum* terdeteksi sebanyak 19 sampel di mana pada plate A adalah nomor sampel M, 01, 02, 03, 06, 07, 08, 16, 18, 22, 26, K+, K- dan pada plate B ditemukan pada nomor sampel M, 30, 31, 32, 33, 34 (Gambar 1.).



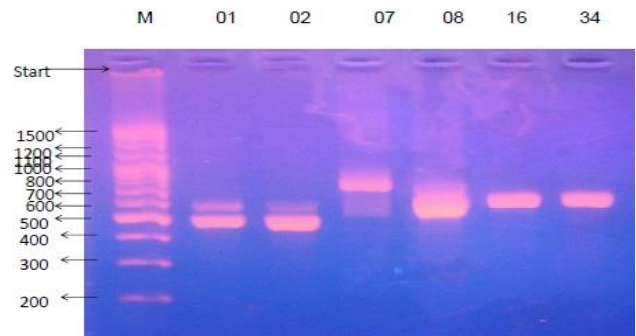
Gambar 1. Hasil Amplifikasi *P. falciparum* Lokus Gen MSP 1 pada Penderita Positif Malaria di Kabupaten Sumba Tengah, NTT. 2015

Panjang basa masing-masing lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP dihitung dengan menggunakan alat bantu (mistar). Pada gambar A, panjang basa diklasifikasikan dalam kode alel menurut Brockman *et al.* Pada MSP 1 *P. falciparum* persamaan garis regresi linier antara jarak pita terhadap log panjang basa penanda DNA adalah $Y = 0,000898X + 2,250$. Panjang pita DNA sampel dalam bentuk log adalah sebagai berikut; 01 = 487 bp, 02 = 487 bp, 03 = 487 bp, 06 = 487 bp, 07 = 509 bp, 16 = 487 bp, 18 = 478 bp, 22 = 460 bp, 26 = 487 bp dan K+ = 500 bp.

Pada gambar B, persamaan garis regresi linier antara jarak pita terhadap log panjang basa

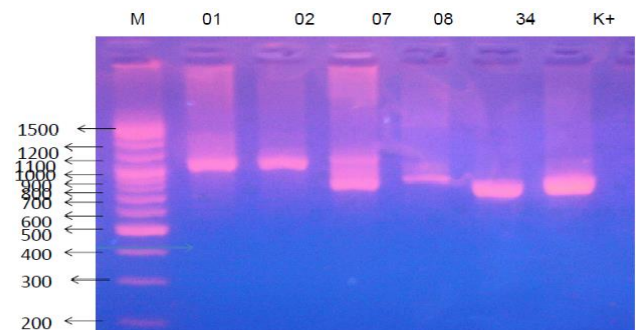
DNA penanda adalah $Y = 0,000884X + 2,257$. Panjang pita DNA sampel dalam bentuk log adalah sebagai berikut; 30 = 500 bp, 31 = 496 bp, 32 = 499 pb, 33 = 496 bp, 34 = 472 bp, 37 = 480 bp, 39 = 472 bp, 40 = 480 bp, 43 = 488 bp dan K+=516bp.

Hasil amplifikasi untuk mendeteksi MSP 2 *P. falciparum* terdeteksi 6 sampel pada nomor urutan sampel M, 01, 02, 07, 08, 16, dan 34. Hasil elektroforesis identifikasi MSP 2 (Gambar 2.).



Gambar 2. Hasil Amplifikasi *P. falciparum* Lokus Gen MSP 2 pada Penderita Positif Malaria di Kabupaten Sumba Tengah, NTT. 2015

Pada MSP 2, persamaan regresi linier antar log panjang basa penanda DNA adalah $Y = 0,000704X + 2,350$. Panjang pita DNA sampel dalam bentuk log adalah 01 = 492 bp, 02 = 480 bp, 07 = 775 bp, 08 = 556 bp, 16 = 600 bp, 34 = 600 bp. Hasil amplifikasi untuk mendeteksi GLURP *P. falciparum* terdeteksi 5 sampel pada nomor urutan sampel M, 01, 02, 07, 08 34 dan K+. Hasil elektroforesis identifikasi GLURP dapat dilihat pada gambar nomor 3 berikut ini;



Gambar 3. Hasil Amplifikasi *P. falciparum* Lokus Gen GLURP pada Penderita Malaria Hasil Kegiatan Mass Blood Survey (MBS) di Kabupaten Sumba Tengah Tahun 2015

Persamaan garis linier antara jarak pita terhadap log panjang basa DNA pada GLURP adalah $Y = 0,00461X + 2,537$. Panjang pita DNA sampel dalam bentuk log adalah 01 = 1086 bp, 02 = 1050 bp, 07 = 700 bp, 08 = 930, 34 = 800 bp dan K+ = 836 bp.

Identifikasi kelas alel dari lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP sebanyak 7 kelas alel yaitu

kelas alel (1), (3), (6), (7), (8), (11) dan (12), yang diklasifikasikan berdasarkan kode alel menurut Brockman *et al*, 1999. Untuk *P. falciparum* sekuenjing dilakukan untuk membuktikan bahwa fragmen yang mempunyai panjang berbeda adalah fragmen yang sama (bukan alel yang berbeda). Kode alel yang ditemukan dari hasil sekuenjing dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi Kode Alel Lokus Gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP *Plasmodium falciparum*, yang Terdeteksi pada Penderita Suspek Malaria di Kabupaten Sumba Tengah. NTT. 2015

Kode sampel	MSP 1 (bp)	MSP 2 (bp)	GLURP (bp)	Jumlah alel terdeteksi
01	500 (3)	500 (3)	1100 (12)	2
02	500 (3)	500 (3)	1100 (12)	2
03	500 (3)	-	-	-
06	400 (1)	-	-	-
07	600 (6)	800 (11)	-	-
08	500 (3)	600 (6)	800 (7)	3
16	500 (3)	700 (8)	800 (7)	3
18	500 (3)	-	-	-
22	400 (1)	-	-	-
26	500 (3)	-	-	-
30	500 (3)	-	-	-
31	500 (3)	-	-	-
32	500 (3)	-	-	-
33	500 (3)	-	-	-
34	400 (1)	700 (8)	700 (6)	3
37	400 (1)	-	-	-
39	400 (1)	-	-	-
40	400 (1)	-	-	-
43	400 (1)	-	-	-

Keterangan: (angka) merupakan klasifikasi kode alel menurut Brockman, *et al* (1999). Total jumlah alel yang terdeteksi ada 7 alel yaitu kelas alel (1), (3), (6), (7), (8), (11) dan (12).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian tentang keragaman genetik *P. falciparum* pada penelitian ini menggambarkan telah terjadi infeksi multigenotip di Kabupaten Sumba Tengah. Infeksi multigenotip artinya infeksi yang disebabkan oleh dua atau lebih alel dari satu lokus gen petanda *P. falciparum*. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan di Malaysia, dimana ditemukan 87% infeksi multigenotip pada penderita *P. falciparum*.⁷ Hal serupa juga

ditemukan di Kalimantan dan Sulawesi dimana 65,52% terjadi infeksi multigenotipe.⁸

Dilaporkan dari Kepulauan Mentawai (Sumatera Barat) dilaporkan adanya infeksi multigenotip. Sebagian besar pulau di Indonesia telah melaporkan adanya infeksi multigenotip. Hal ini terjadi karena secara genetik parasit *Plasmodium* mudah bermutasi menghadapi berbagai tekanan faktor eksternal sehingga membentuk strain baru, antara lain akibat resistensi terhadap obat anti malaria.⁹

Tiga lokus gen MSP 1, MSP 2, dan GLURP memiliki keragaman genetik pada populasi sehingga sering digunakan dalam berbagai penelitian, baik dalam identifikasi kasus gagal pengobatan maupun untuk mengukur tingkat transmisi malaria dan juga bermanfaat untuk studi epidemiologi molekuler lainnya.¹⁰

Identifikasi tiga lokus gen MSP 1, MSP 2, dan GLURP dari sejumlah sampel penelitian tidak semua berhasil teridentifikasi dan keberhasilan hanya mencapai 38%, 12%, dan 10%. Hal ini tidak sejalan dengan hasil penelitian di Uganda yang menunjukkan keberhasilan identifikasi genotipe yang cukup baik hingga 99%, 96% dan 98% untuk lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP.¹¹ Beberapa hasil penelitian menyebutkan sensitifitas aplikasi PCR pada lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP dapat mencapai 3 parasit/ml darah atau setara dengan 0,04 (*Iregular Red Blood Cell*) IRBC/500 leukosit, kegagalan identifikasi dapat terjadi akibat rusaknya DNA penyimpanan yang berbeda dan metode yang digunakan pada waktu penyimpanan maupun pengambilan sampel darah.¹²

Hasil penelitian ini menunjukkan jumlah alel pada masing-masing lokus gen ternyata bervariasi. Pada lokus gen MSP 1 dan GLURP ditemukan tiga sedangkan pada MSP 2 ditemukan empat kelas alel. Hasil ini sama dengan parasit *P. falciparum* di Thailand yang menemukan lebih dari tiga kelas alel, namun hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan di Kalimantan dan Sulawesi dimana pada lokus gen MSP 1 ditemukan satu kelas alel sedangkan MSP 2 dan GLURP hanya ditemukan dua kelas alel.¹³ Beberapa hasil penelitian membuktikan MSP 2 sangat cocok digunakan sebagai marker adanya infeksi multigenoti dan untuk membedakan alel secara individu karena lokus gen MSP 2 memiliki banyak variasi alel (polimorfik).¹⁴

Pada penelitian ini tidak ditemukan infeksi tunggal namun jumlah alel hasil analisis pada tiga lokus gen MSP 1, MSP 2 dan GLURP, dari sampel teridentifikasi ditemukan 38% infeksi multigenotip. Hal ini sejalan dengan penelitian di Iran yang menemukan 30% infeksi *P. falciparum* disebabkan oleh dua atau lebih genotipe *P. falciparum*.¹⁵ Penelitian ini menunjukkan adanya

perbedaan dengan beberapa hasil penelitian di Thailand dimana masih ditemukan infeksi satu genotip lebih dominan sedangkan di Kalimantan dan Sulawesi ditemukan 65,52% infeksi satu genotip. Semua temuan ini menunjukkan bahwa setiap populasi di lokasi penelitian memiliki cukup banyak variasi genetik.¹⁶

Beberapa penelitian terdahulu telah menemukan infeksi *P. falciparum* disandi oleh banyaknya variasi genetik yang dikenal dengan infeksi multigenotipe yang sangat berpengaruh terhadap keparahan infeksi *P. falciparum*. Penelitian yang dilakukan di Nigeria pada lokus gen MSP 1, menunjukkan adanya perbedaan gejala klinis yang merupakan karakteristik dari genotip infeksi *P. falciparum* dan yang berperan pada beratnya penyakit ini. Adapun peranan lokus gen MSP 2 adalah sebaliknya dimana infeksi *P. falciparum* multigenotip mempunyai risiko yang lebih kecil untuk menjadi malaria berat bila dibandingkan dengan monoinfeksi.¹⁷

Banyaknya alel yang ditemukan pada penelitian ini mempunyai panjang gelombang yang bervariasi yang dikelompokkan menurut Brockman *et.al*. Panjang gelombang pada lokus gen MSP 1 400 – 519 bp, MSP 2 500 – 800 bp dan GLURP 700 – 1100 bp, dengan variasi terbanyak ditemukan pada lokus gen MSP 2. Hasil penelitian serupa di beberapa daerah seperti di India, Afrika Thailand dan Iran ditemukan variasi genetik namun pengelompokkan panjang gelombang pada masing – masing kelas alel mengacu pada metode lain.^{18,19, 20}

KESIMPULAN

Identifikasi tiga lokus gen petanda *P. falciparum* yaitu MSP 1, MSP 2 dan GLURP ditemukan infeksi multigenotip yaitu infeksi yang disebabkan oleh dua atau lebih alel dari tiga lokus gen *P.falciparum*. Pada MSP 1 ditemukan tiga kelas alel, MSP 2 ditemukan empat kelas alel dan GLURP ditemukan 3 kelas alel, tidak ditemukan infeksi tunggal/satu genotipe. Masing-masing kelas alel memiliki panjang gelombang yang bervariasi yaitu MSP 1 400 – 519 bp, MSP 2 500 – 800 bp dan GLURP 700-1100 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Sumba Tengah, Kepala Bagian P2PL dan Pengelola Malaria Kabupaten Sumba Tengah, Kepala Puskesmas Lawonda, Managa, Weeluri dan Malinjak bersama para tenaga mikroskopis puskesmas serta tenaga laboratorium Parasitologi FK UGM yang telah membantu dan memberi dukungan hingga berakhirnya penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Departemen Kesehatan R.I. Laporan Riset Kesehatan Dasar; 2013.
2. Universitas Gadjah Mada. Modul panduan praktis entomologi medis. Devisi Entomologi Kedokteran; 2011.
3. Profil Dinas Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Timur tahun; 2015.
4. Congpuong K, Sukaram R, Prompan Y, Dornae A. Genetic diversity of the msp-1, msp-2, and glurp genes of Plasmodium falciparum isolates along the Thai-Myanmar borders. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4(8): 598 – 602.
5. Cartwrite LR, Tanabe K, Sakihama N, Hatory T, Golman I, Escalante AA. et al. Genetic Distance in Housekeeping Genes Between Plasmodium falciparum and Plasmodium reichenowi and Within P. Falciparum. *Journal of Molecular Evolution* 2004; 59(7); 687 – 694.
6. Brockman A, Paul R E L, Anderson T J T Hackford I, Phaihun L, Looareesuwan, Nosten F and Day. K P. Application of Genetic Markers to the Identification of Recrudescens Plasmodium falciparum infections on the Northwestern Border of Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(1):14 – 21.
7. Atroosh WM, Al-Mekhlafi HM, Mahdy MAK, Saif-Ali R, Al-Makhlafi AM, Surin J. Genetik diversity of Plasmodium falciparum isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 dan MSP-2 genes. *Parasites & Vector.* 2011; 4:233.
8. Handayani S, Salwati E, Tjitra E. Keragaman genetik petanda P. falciparum dari spesies subyek penelitian monitoring Dihidroartemisinin-Piperakuin di Kalimantan dan Sulawesi. *Media Litbang Kesehatan.* 2012;22 (3): 120 – 130.
9. Pisesa FA, Identifikasi variasi sekuen dan analisis hubungan kekerabatan gen merozoite surface protein 1 (Msp-1) Plasmodium falciparum Isolat Kepulauan Mentawai. [internet] [disitasi 20 Februari 2016] Diunduh dari <http://www.pasca.unand.ac.id>.
10. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(2):225 – 32.
11. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. Plasmodium falciparum msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malaria Journal.* 2011;10:79.
12. Kiwanuka, G. Genetic diversity in Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997–2007. *J Vector Borne Dis.* 2009;46: 1 – 12.
13. Amodu O, K.Oyededeji S. I.Ntoumi F, Orimadegun AE, Gbadegesin RA, Olumese PE, et al. Complexity of the msp2 locus and the severity of childhood malaria, in south–western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102:95 – 102.
14. Greenhouse B, Dokomajilar C, Hubbard A, Rosenthal P and Dorsey G. Impact of Transmission Intensity on the accuracy of genotyping to distinguish recrudescence from new infection in antimalarial clinical trials. *American Society for Microbiology.* 2007;51(9):3096 – 3103.
15. Wang Y, Koneko O, Sattabongkot J, Chen JH, Lu F, Chai JY, Takeo S. et al. Genotype polymorphism of Plasmodium vivax MSP 1p, a paralog of merozoite surface protein 1 from worldwide isolates. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 84(2):292 – 297.
16. World Health Organization. Genotyping to Identify Parasite Populations. WHO meeting, Amsterdam 29 – 31 May 2008.
17. Heidari A, Keshavaraz H, Rokni MB and Jelinek T. Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of Plasmodium falciparum in a major endemic region of Iran. *Korean Journal of Parasitology.* 2007;45 (1): 59– 63.
18. Sutar SKD, Gupta B, Ranjit M, Kar SK, Dais A. Sequence analysis of coding DNA fragmen of pfert and pfmdr-1 genes in plasmodium falciparum isolates from Odisha, India. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(1): 78 – 84.

19. Heidari A, Keshavaraz H, Rokni M B and Jelinek T. Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of Plasmodium falciparum in a major endemic region of Iran. Korean Journal of Parasitology. 2007;45 (1): 59–63.
20. Muggitu K, Adjuik M, Snounou G, Ntoumi F, Taylor W, Mshinda H, et al. Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of Plasmodium falciparum malaria conducted in Sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. Tropical Medicine and International Health. 2006;11(9):1350 – 1359.