

Identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Gen *pvmdr1* pada Penderita Malaria Vivaks di Minahasa Tenggara (Sulawesi Utara)

Ervi Salwati, Sarwo Handayani, Rabea Pangerti Jekti

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
email: ervisalwati@yahoo.com

Abstract

Parasite resistance to antimalarial drugs is an obstacle to malaria elimination. In *Plasmodium vivax*, up to now, a marker to distinguish between resistant and susceptible is not available yet. Identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in *P. vivax* for multidrug resistance (*pvmdr1*) is potential approach due to *pvmdr1* gene is orthologous to the *pfmdr1* of *P. falciparum*, have been related to multidrug resistance. The purpose of this study was to identify SNPs/mutations on *pvmdr1* gene of malaria vivax patients who came to the Primary Health Centers, Touluaan and Tombatu Minahasa Tenggara (North Sulawesi). Blood samples and slide of blood smears were collected from patients who infected with *P. vivax* or mixed infection of *P. vivax* and *P. falciparum*. After the species were cross checked by certified microscopist then confirmed by PCR, SNP identification were performed by sequencing technique. Only 83 of 99 recruited subjects were included inclusion criteria. Sequencing result showed that 59 of 83 subjects were analysed to identify the SNP. We found 5 nonsynonymous SNPs, namely at the point G698S, M908L, Y976F, L1076F, and K1261E.

Key words: *Plasmodium vivax*, Single Nucleotide Polymorphism, Gen *pvmdr1*, Mutation

Abstrak

Resistensi parasit terhadap obat anti malaria merupakan salah satu kendala untuk eliminasi malaria. Pada *Plasmodium vivax*, sampai saat ini penanda parasit yang resisten dengan yang masih sensitif belum tersedia. Identifikasi *Single Nucleotide* (SNP) gen *pvmdr1* *P. vivax* multidrug resistance (*pvmdr1*) merupakan pendekatan yang potensial, karena gen *pvmdr1* ortolog dengan gen *pfmdr1* *P. falciparum* yang telah terbukti berkaitan dengan multidrug resisten. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi SNP/mutasi pada gen *pvmdr1* dari pasien malaria vivax yang berobat ke Puskesmas Touluaan dan Tombatu di Minahasa Tenggara (Sulut). Sampel darah dan sediaan apusan darah tebal dan tipis dikumpulkan dari pasien yang terinfeksi *P. vivax* atau infeksi campuran *P. vivax* dan *P. falciparum*. Setelah spesies dicek ulang oleh mikroskopis pusat dan dikonfirmasi dengan teknik PCR, dilanjutkan dengan identifikasi SNP dengan teknik sekuensing. Dari 99 subjek yang dikumpulkan hanya 83 subjek yang memenuhi kriteria inklusi. Hasil sekuensing memperlihatkan bahwa 59 dari 83 sampel dianalisa untuk identifikasi SNP. Kami menemukan 5 SNP nonsynonymous yaitu pada titik G698S, M908L, Y976F, L1076F, dan K1261E.

Kata kunci: *Plasmodium vivax*, Single Nucleotide Polymorphism, Gen *pvmdr1*, Mutasi

Pendahuluan

Salah satu tantangan yang dihadapi dalam upaya eliminasi malaria di Indonesia adalah adanya penyebaran parasit yang resisten terhadap obat anti malaria (OAM). World Health Organization (WHO) telah merekomendasikan penggunaan *artemisinin based combination therapy* (ACT) untuk pengobatan malaria *falciparum* dan vivaks yang resisten terhadap beberapa obat malaria.^{1,2}

Pada *P. vivax*, studi untuk memantau penyebaran parasit yang resisten belum semaju *P. falciparum*. Mungkin ini disebabkan oleh adanya fase relaps (stadium hipnozoit dorman di hati) dan kultur *P. vivax* (*continuous in vitro*) yang belum bisa berhasil seperti pada *P. falciparum*. Mengidentifikasi dan mempelajari gen-gen yang berpotensi terkait dengan resistensi parasit terhadap obat anti malaria merupakan hal yang sangat penting. Salah satu gen berpotensi adalah gen *pvmdr1* yang merupakan gen ortolog

dengan gen *pfmdr1* pada *P.falciparum*, yang telah diidentifikasi sebagai penanda genetik yang memungkinkan untuk resisten klorokuin.³

Penelitian tentang identifikasi SNP pada gen *pvmdr1* telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dan telah ditemukan bermacam-macam mutasi pada gen tersebut.⁴⁻¹⁰ Namun keterkaitannya dengan resistensi klorokuin atau obat anti malaria lainnya masih beragam. Single Nucleotide Polymorphism (Y976F) telah dilaporkan (2007) oleh Suwanurusk et.al¹⁰ bahwa isolat lapangan dari Thailand dan Timika (Provinsi Papua) memperlihatkan ada hubungan antara SNP Y976F pada gen *pvmdr1* dengan berkurangnya sensitivitas terhadap klorokuin secara *in vitro*. Mutasi Y976F secara bermakna lebih dominan pada isolat Indonesia (96%, 24/25) dibandingkan dengan isolat Thailand (43%, 3/7). Selanjutnya Marfurt et.al¹¹, melaporkan bahwa SNP Y976F gen *pvmdr1* dapat sebagai prediktor yang kuat untuk menilai kegagalan pengobatan secara *in vivo*. Sebaliknya yang terjadi di Madagaskar⁴ penggunaan klorokuin sudah digantikan dengan ACT (artesunat amodiakuin) dan pada penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa SNP Y976F tidak bisa digunakan untuk monitoring resisten klorokuin.

Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi SNP pada gen *pvmdr1* pada subyek yang terinfeksi *P.vivax* atau infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*) untuk melihat prevalensi SNP/mutasi gen.

Metode

Koleksi Sampel Lapangan

Sebanyak 99 subjek dikumpulkan dari 2 Puskesmas yaitu Puskesmas Touluaan (76 subjek) dan Tombatu (23 subjek), Minahasa Tenggara (Sulut), pada bulan April-November 2012

Spesimen Penelitian

Spesimen berupa darah vena ($\pm 0,5$ ml) dimasukkan ke dalam tabung yang sudah berisi 4.5 ml Guanidin HCl (6M) (perbandingan 1:9) dan untuk konfirmasi hasil mikroskopis di lapangan, dibuat juga 2 slide apusan darah tebal dan tipis untuk masing-masing subjek. DNA diekstraksi menggunakan Qiagen kit sesuai dengan petunjuk yang ada di brosur (QIAamp® DNA Mini Kit, Cat No. 51304). Spesimen dipilih bila dinyatakan positif *P.vivax saja* atau campuran *P.vivax* dan *P.falciparum* berdasarkan pemeriksaan mikroskopis dan telah dikonfirmasi secara molekuler dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Jumlah spesimen yang direkrut di lapangan dan kemudian diperiksa di laboratorium Parasitologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Jakarta, sebanyak 99 spesimen.

Identifikasi Spesies dengan Teknik PCR

Target amplifikasi DNA adalah gen *species-specific sequences* pada *small-subunit ribosomal RNA* (SSUrRNA). Cara dan primer yang digunakan dapat dilihat pada Salwati dkk.¹⁴

Identifikasi SNP pada Gen *pvmdr1*

Terdiri dari 4 tahap:

- (1) Amplifikasi fragmen-fragmen dari gen *pvmdr1*. Untuk mengetahui SNP yang ada pada gen *pvmdr1*, gen tersebut dibagi menjadi fragmen-fragmen (5 fragmen) dulu di mana setiap fragmen tersebut akan diamplifikasi dengan menggunakan sepasang primer (*forward* dan *reverse*) yang tumpang tindih satu sama lain.¹⁰ Ke 5 pasang primer tersebut mempunyai urutan basa sebagai berikut:

Tabel 1. Urutan Basa

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

Volume total : 50 ml yang mengandung 5 ml of 10x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.20 mM masing-masing dNTP, 1 mM setiap primer, 1.25 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), dan 2 µl DNA genomik PCR dilakukan dibawah kondisi berikut: predenaturasi : 95°C-10 menit dilanjutkan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C, selama 40 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit.

- (2) Visualisasi produk PCR, divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarose 2% dengan voltase 100V selama 35 menit
- (3) Sekuensing DNA. Sebelum disekuensing, produk PCR dipurifikasi dengan langkah seperti berikut:
 - a. Purifikasi produk PCR dengan ExoSAP-IT yang bertujuan untuk membersihkan produk dari sisa-sisa primer dan nukleotida sehingga hasil lebih baik. Caranya adalah sebagai berikut: Untuk setiap reaksi, 5 µl produk PCR dicampur dengan 2 µl ExoSAP-IT, diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, diinkubasi

lagi pada 80°C selama 15 menit untuk menginaktifkan ExoSAP.

- b. Menyiapkan reaksi sekuensing dilakukan dengan volume akhir 6 µl yang mengandung 1.1 µl H₂O, Big dye buffer 1.2 µl, BigDye Terminator v3.1, 1.2 µl primer masing 0,5 µl dan templat 2 µl (produk yang telah dimurnikan dengan ExoSAP).
- c. Purifikasi produk PCR sekuensing dengan BigDye Xterminator Purification Kit, bertujuan untuk menyingkirkan BigDye Terminator sehingga tidak ada lagi *dye blobs*. Caranya adalah sebagai berikut: Reaksi PCR sekuensing disentrifus selama 1 menit, 2000 rpm (di atas *cold block*), kemudian ditambahkan 10 µl XTerminator solution dan 45 µl SAM solution ke dalam masing-masing sumur yang berisi 6 µl reaksi PCR sekuensing, dihomogenisasi selama 30 menit dengan vortek atau *plate shaker* (1800 rpm), disentrifus lagi selama 2 menit pada 2000 rpm dan tempatkan ke dalam mesin sekuensing (Genetic analyzer)

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan *software* Bioedit dan membandingkannya dengan gen referensi (PvSal-1 *mdr1* gene, GenBank accession no. AY618622)

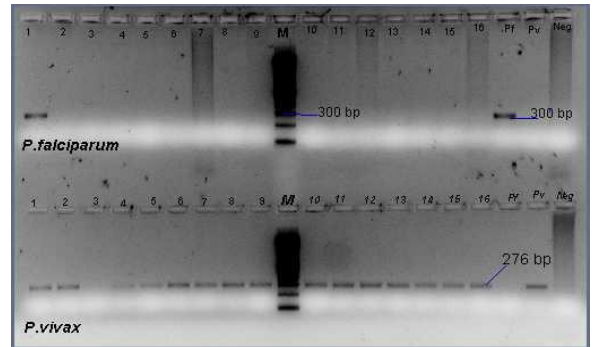
Hasil

Cek Silang (Pemeriksaan Mikroskopis) oleh Tim Mikroskopi Pusat

Jumlah penderita tersangka malaria yang datang berkunjung ke puskesmas Touluaan dan Tombatu, Minahasa Tenggara (Sulut) sebanyak 99 subjek (pencapaian 99%). Dari puskesmas Touluaan terkumpul 76 dan Tombatu 23 subjek. Dari hasil pengecekan ulang (cek silang) oleh Tim Mikroskopik Pusat, hasil menunjukkan bahwa ternyata 6 subjek yang dianggap positif oleh petugas puskesmas ternyata pada apusan darah mereka tidak ditemukan parasit (negatif), di samping itu, ditemukan juga 9 subjek yang terinfeksi *P.falciparum* tunggal.

Identifikasi Spesies dengan Teknik PCR

Walau sampai sekarang mikroskopi masih sebagai baku emas, tetapi mempunyai keterbatasan antara lain tidak dapat mendeteksi parasit yang berada dibawah batas ambang penglihatan. WHO telah merekomendasikan untuk menggunakan teknik PCR dalam mengidentifikasi spesies. Oleh karena itu perlu untuk mengoreksi hasil spesiasi oleh tim Pusat dengan teknik PCR. Berikut ini adalah gambar hasil spesiasi dengan teknik PCR (Gambar 1)



Gambar 1. Visualisasi Pita DNA dari Parasit Malaria Melalui Elektroforesis Sumur 1-16 adalah Sampel (Sumur Atas Menunjukkan Pf dan Bawah Menunjukkan Pv), M= Marker, Pf = Kontrol Positif Pf, Pv= Kontrol Positif Pv dan 'neg'= Kontrol Negatif .

Ketidakesuaian antara hasil cek silang yang dilakukan oleh mikroskopis pusat dengan PCR dapat dilihat pada Tabel 1. Koreksi PCR terhadap 6 negatif oleh mikroskopis pusat hasilnya 100% benar, begitu juga untuk yang 9 *P.falciparum* dengan teknik PCR juga terdeteksi sebagai *P.falciparum*. Jumlah *P.falciparum* menjadi 10 dengan koreksi PCR karena infeksi campuran (PvPf) yg terdeteksi oleh mikroskopis pusat terdeteksi sebagai mono infeksi *P.falciparum* dengan PCR. Di samping itu, 3 subjek yang teridentifikasi sebagai *P.vivax* secara mikroskopis, dengan teknik PCR terdeteksi sebagai infeksi campuran (*P.vivax* dan *P.falciparum*). Dengan demikian terdapat 83 subjek yang dapat dilakukan analisis lebih lanjut.

Tabel 1.
Koreksi PCR Terhadap Hasil Spesiasi Oleh Mikroskopis Pusat

Puskesmas	Mikroskopi					Koreksi PCR				
	Pv	Pf	PvPf	Neg	Total	Pv	Pf	PvPf	Neg	Total
Touluaan	64	5	2	5	76	62	5	4	5	76
Tombatu	17	4	1	1	23	17	5	0	1	23
Total	81	9	3	6	99	79	10	4	6	99

Keterangan : Terdapat 83 subjek yang memenuhi syarat yaitu 79 subjek terinfeksi P.vivax saja dan 4 terinfeksi P.vivax dan P.falciparum

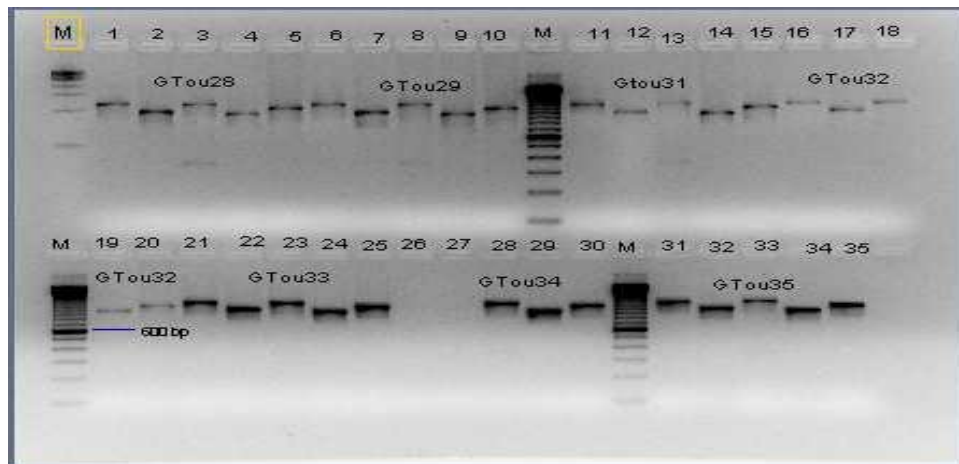
Tabel 2.
Distribusi Frekuensi Variabel Umur, Jenis Kelamin dan Densitas Parasit

Variabel	Jumlah (n=83)	Prosentase
Umur		
< 10 tahun	27	32,5
≥ 10 tahun	56	67,5
Jenis Kelamin		
perempuan	39	47
laki-laki	44	53
Densitas parasit		
< 100 / μ l darah	3	3,6
≥ 100 / μ l darah	80	96,4

Karakteristik Subjek Penelitian

Dari 83 subjek (83,8%) yang dapat dianalisis datanya, jumlah penderita laki-laki sedikit lebih banyak dibandingkan dengan perempuan (44 vs 39) dengan rentang umur 3-66 tahun, dimana penderita yang berumur ≥ 10 tahun lebih banyak dari penderita yang berumur < 10 tahun masing-

masing 56 subjek dan 27 subjek. Sebanyak 80 subjek (96,4%) mempunyai densitas ≥ 100 parasit/ μ l darah (Tabel 2). Densitas parasit aseksual *P.vivax* dari 83 subjek berkisar antara 50-69,320 parasit/ μ l darah dengan rata-rata 4.473 parasit/ μ l darah. Tidak ada keterkaitan umur, jenis kelamin dengan densitas parasit.



Gambar 2. Visualisasi Amplifikasi 5 Fragmen Gen *pvmdr1*

Sumur 1-5= sampel GTou-20 berturut-turut fragmen 1,2,3, 4 dan 5.
 Sumur 6-10= sampel GTou-29 berturut-turut fragmen 1, 2,3, 4 dan 5
 Sumur 11-15= sampel GTou-31 berturut-turut fragmen 1, 2,3, 4 dan 5 dstnya M= Marker (penanda)

Analisis Gen *pvmdr1*

Dari 83 subjek, hanya 74 yang sukses teramplifikasi untuk kelima 5 fragmen dan sisa, 9 subjek memperlihatkan bahwa salah satu atau lebih fragmen tidak teramplifikasi (Gambar 2). Dari 83 subjek yang disekuensing, hasil yang dapat dianalisa secara utuh (kelima fragmen), sebanyak 59 subjek (71%). Ditemukan 5 SNP yang mengalami perubahan asam amino (non synonomous) pada titik G698S, M908L, Y976F, L1076F, dan K1261E di mana masing-masing berasal dari mutasi nukleotida yaitu: G2092A, A2727C, A2927T, T3226C dan A3781G Disamping itu ada dua mutasi yang tidak memperlihatkan perubahan asam amino yaitu G132A dan A1587G.

Pembahasan

Hasil uji silang mikroskopis menunjukkan masih ditemukannya kesalahan diagnosis oleh tenaga mikroskopis puskesmas yaitu 6 subjek yang terdiagnosis positif padahal tidak ditemukan parasit dalam darah tersebut dan 10 subjek terdiagnosa malaria dengan spesies yang berbeda. Hal ini

menunjukkan bahwa kemampuan tenaga mikroskopis di puskesmas masih perlu ditingkatkan. Keakuratan hasil tergantung pengalaman dan latihan membaca *slide* yang terus menerus.

Sembilan subjek yang memperlihatkan bahwa salah satu atau lebih fragmen tidak teramplifikasi, namun tetap menyertakannya untuk disekuensing. Lima dari sembilan (55%) memperlihatkan hasil sekuensing yang cukup baik (elektropherogram bagus). Secara keseluruhan, hasil sekuensing yang diperlihatkan melalui elektropherogram bagus pada 1 ul produk DNA (tanpa pengenceran). Namun, pada beberapa kasus, ada beberapa fragmen hasil skuensingnya tidak bagus (bisa pada salah satu primer atau ke duanya) padahal jika diperhatikan hasil visualisasi fragmen tersebut, pita DNA nya cukup bagus (jelas). Oleh karenanya, pada beberapa subjek, analisis gen *pvmdr1* tidak bisa secara utuh disajikan karena ada fragmen-fragmen yang tidak bisa dianalisis. Dari 83 subjek yang disekuensing, hasil yang dapat dianalisis secara utuh (kelima fragmen), sebanyak 59 subjek (71%). Pada 59 subjek tersebut, ditemukan 5 SNP yang

mengalami perubahan asam amino (nonsynonamous) pada titik G698S, M908L, Y976F, L1076F, dan K1261E di mana masing-masing berasal dari mutasi nukleotida yaitu: G2092A, A2727C, A2927T, T3226C dan A3781G

Penelitian tentang identifikasi SNP yang terdapat pada gen *pvmdr1* telah dilaporkan dalam beberapa penelitian sebelumnya.⁴⁻¹⁰ Dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya, ternyata ke lima SNP tersebut sudah pernah dilaporkan. SNP Y976F dan L1076F merupakan SNP yang selalu muncul pada setiap analisa gen *pvmdr1* yang dilaporkan⁴⁻¹⁰, sementara G698T dan M908L dilaporkan pada penelitian Barnadas et.al⁴ dan K1261E pada penelitian Imwong et.al⁹. Suwanarusk et.al¹⁰ dalam penelitiannya melaporkan bahwa isolat lapangan dari Thailand dan Timika (Propinsi Papua) memperlihatkan ada hubungan antara keberadaan SNP Y976F gen *pvmdr1* yang semakin tinggi dengan berkurangnya sensitivitas terhadap klorokuin *in vitro*. Mutasi 976F pada *pvmdr1* terdapat pada 96% (123/128) isolat Papua (klorokuin sudah resisten) dan 25% (17/69) dari isolat Thai (klorokuin masih sensitif). Sementara itu, Brega et.al⁵ melaporkan, dari beberapa daerah yang berbeda endemisitas (Thailand 9, Indonesia 3, Turkey 3, Azerbaijan 4 dan French Guyana 4), mutasi Y976F diobservasi hanya pada 6 (26%) dari 23 sampel: 4 sampel dari Thailand dan 2 dari Indonesia. Sangat mengagetkan, tidak ada mutasi Y976F yang ditemukan pada sampel dari French Guyana di mana CQR pada *P.vivax* telah dilaporkan. Hasil yang mirip juga ditemukan pada penelitian Bernadas et.al⁴ yang meneliti pada 3 site : Selatan (5 subjek), Barat (53 subjek), dan Pusat (22 subjek) melaporkan bahwa dari 80 subjek tersebut, menemukan 10 mutasi yang nonsynonymous : F194Y, S510T, S513R, I636T, G698S, A829V, M908L, T958M, Y976F, dan F1076L. Mutasi M908L, T958M, dan F1076L

ditemukan 100% disetiap site, berikut disusun oleh S513R, G698S, dan Y976F (96.3%-98.8%). Sisanya hanya 1.3%-7.5%. Bernadas berkesimpulan bahwa mutasi Y976F tidak bermanfaat untuk memonitoring CQR yang telah ada di Madagaskar.

Peneliti lain, Lu et.al⁸ dengan menggunakan referensi Sal 1 sebagai *wild type*, mengidentifikasi 5 mutasi non synonymous yaitu: S513R, Y976F, F1076L, K997R dan K1393N. Mutasi Y976F ditemukan pada isolat Thailand (17.9%), Myanmar (13.3%), dan Papua New Guinea (PNG, 100% sampel hanya 1), tetapi tak satu pun dari Republic of Korea (ROK). Sementara mutasi pada posisi F1076L terdapat pada isolat ROK (100%), Thailand (60.7%), dan Myanmar (46.7%). Seperti diketahui, PNG adalah daerah dari Indonesia di mana *P.vivax* pertama kali dilaporkan (1989) resisten terhadap klorokuin (CQR)¹³, begitu juga Myanmar juga dilaporkan telah resisten dengan klorokuin. Sementara di Thailand dan ROK, klorokuin masih sensitif walau baru-baru ini beberapa kasus sudah dikonfirmasi resisten klorokuin di ROK⁸. Tidak ada isolat dengan resistensi tingkat tinggi yang ditemukan pada penentuan kesensitivitas secara *in vitro*.

Beberapa SNP yang diteliti pada gen *pvmdr1* dan *pvcrto* dari isolat *P.vivax* SNP Y976F menunjukkan frekuensi cukup tinggi (97.8%-100%) namun tidak memperlihatkan adanya hubungan dengan CQR^{4,6,7}. Orjuelau- Sanchez et al.⁷ pada orang-orang Brazil dari daerah Amazon CQR sudah bersirkulasi tetapi analisis SNP pada sekuens koding dan non koding gen *pvmdr1* dan *pvcrto* menunjukkan tidak ada hubungan dengan CQR. Di samping itu, walau mereka mendeteksi SNP cukup banyak (24 SNP), tetapi mereka tidak menemukan SNP pada posisi homolog dengan *pfmdr1*

Pada penelitian ini, fragmen ke 4 yang mengandung asam amino kodon 976,

memperlihatkan bahwa semua subjek yang sukses disekuensing (70/70, 100%) adalah bertipe mutant (976F). Perubahan Y--->F pada kodon 976 (TAC--->TTC) diobservasi pada semua subjek. Hasil ini, memperkuat penelitian sebelumnya¹⁴ yang subjeknya dari puskesmas yang sama, di mana Y976F yang terdeteksi pada penelitian monitoring obat DHP dengan teknik PCR–mismatch primer, memperlihatkan semua hasil positif mutant (63 subjek).

Kesimpulan

Ditemukan 5 SNP yang non synonymous yaitu: G698S, M908L, Y976F, L1076F, dan K1261E. Walau ke 5 SNP ini sudah dilaporkan oleh peneliti-peneliti lain sebelumnya, data ini, dapat dijadikan sebagai data dasar untuk pengembangan lebih lanjut terkait resistensi obat antimalaria pada *P.vivax* berdasarkan data sendiri.

Saran

SNP-SNP yang ditemukan perlu diaplikasikan pada sampel arsip uji klinik di mana ada dua kelompok yaitu yang gagal dan sukses pengobatan. Apakah SNP-SNP yang ditemukan pada penelitian ini sama atau tidak dengan yang di dua kelompok sampel uji klinik. Pemunculan SNP dapat sebagai bentuk alternatif variasi sekuens dan bisa untuk identifikasi gen atau penelitian pemetaan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami tujukan pada : Kepala Puskesmas dan staf di Touluaan dan Tombatu; tim peneliti Balitbangkes yang telah banyak membantu dalam penelitian ini; tenaga mikroskopis dalam mengecek ulang hasil pemeriksaan mikroskopi di lapangan. Ucapan terima kasih juga tertuju untuk Sdr. Arie Ardiansyah yang telah membantu dalam mengoperasikan mesin sekuensingnya dan Sdr. Hana Apsari yang mengajarkan dan membantu untuk identifikasi SNP. Tak

lupa kami ucapkan terima kasih kepada Prof.dr.Emiliana Tjitra PhD, atas bantuan dan masukannya.

Daftar Rujukan

1. World Health Organization. 2001. Antimalarial drug combination therapy. Report of WHO Informal Consultation 4-5 April 2001. Geneva: WHO,.
2. World Health Organization. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. In: 2006 WHM, ed. Geneva: WHO
3. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *P. vivax* *mdr*-Like Gene of *P.falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*; 108:13–23.
4. Barnadas, C., A. Ratsimbaoa, M. Tichit, C. Bouchier, M. Jahevitra, S. Picot, and D. Menard. 2008. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvmr1* and *pvcr1*-genes. *Antimicrob. agents Chemother.* 52:4233–4240
5. Brega S, Meslin B, de Monbrison F et al. 2005. Identification of the *Plasmodium vivax* *mdr*-like gene (*pvmr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis*; 91:272
6. Sa, J. M., T. Nomura, J. Neves, J. K. Baird, T. E. Wellems, H. A. del Portillo. 2005. *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey adapted strains. *Exp. Parasitol.* 109:256–259.
7. Orjuela-Sánchez P, de Santana Filho FS Machado-Lima A et.al. 2009. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the *crt-o* and *mdr1* Genes of *Plasmodium vivax* among Chloroquine-Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region. 3561–3564 *Anti microbial agents and chemotherapy*, Aug., p. 3561–3564
8. Lu F, Lim CS., Nam DH, Kim K, Lin K, Kim TS, Lee HW, Chen JH, Wang Y, Sattabongkot J., and Han ET .2011. Genetic polymorphism in *pvmr1* and *pvcr1*-o genes in relation to in

- vitro drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Acta Tropica* vol 117 Feb;117(2):69-75
9. Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Pongtavornpinyo, W., Nakeesathit, S., Nair, S., Newton, P., Nosten, F., Anderson, T.J., Dondorp, A., Day, N.P., White, N.J., 2008. Gene amplification of the multidrug resistance 1 gene of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand, Laos, and Myanmar. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2657–2659.
 10. Suwanarusk, R., B. Russell, M. Chavchich, F. Chalfein, E. Kenangalem, V. Kosaisavee, B. Prasetyorini, K. A. Piera, M. Barends, A. Brockman, U.Lek-Uthai, N. M. Anstey, E. Tjitra, F. Nosten, Q. Cheng, and R. N. Price. 2007. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterization and association with molecular polymorphisms. *PLoS ONE* 2: e1089
 11. Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Müller I, Sie A, Goroti M, Reeder JC, Beck HP, Picot S, Genton B. 2008. Molecular markers of in vivo' *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*. *Infect Dis.* Aug 1;198(3):409-17
 12. Baird JK, Basri H, Purnomo, Bangs MJ, Subianto B, et al. (1991) Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 44: 547–552.
 13. Brockman A. Marfurt J. Molecular Malaria Workshop II. (NIHRD, Jakarta / May 19-30, 2008). Course Manual. Genotyping protocols for *P. falciparum* and *P. vivax*.
 14. Salwati E. Deteksi *P.vivax* Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Y976F dari sampel monitoring pengobatan dihidroartemisinin-piperakuin di Kalimantan dan Sulawesi. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, vol. 22 no.3 hal.112-19, September 2012