

Analisis Mutasi Gen *Pfmdr1* 1246 pada Penderita Malaria di Mamuju Sulawesi Barat

Analysis of mutation of Pfmdr1 1246 in Malaria Patients in Mamuju District, West Sulawesi

Yenni Yusuf¹⁾*, Hartono²⁾, Syafruddin^{1,3)}

¹⁾Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran

Universitas Hasanuddin. Jl Perintis Kemerdekaan km.10 Tamalanrea, Makassar

²⁾Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Makassar. Jl. Daeng Tata Raya, Makassar

³⁾Eijkman Institute of Molecular Biology

Jl. Diponegoro 69, Jakarta

Received 12th June 2013 / Accepted 16th August 2013

ABSTRAK

Parasit *Plasmodium falciparum* dapat mengembangkan mekanisme resistensi terhadap obat anti-malaria melalui mutasi gen yang terjadi pada parasit tersebut, termasuk gen *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance protein 1 (*Pfmdr1*). Mutasi pada gen tersebut dapat terjadi pada beberapa posisi codon, termasuk posisi 1246, yaitu perubahan asam aspartat ke tirosin. Alel mutan 1246Y telah dikaitkan dengan kegagalan terapi anti-malaria amodiaquine. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis mutasi gen *Pfmdr1* 1246 pada penderita malaria di kabupaten Mamuju provinsi Sulawesi Barat yang akan memulai terapi kombinasi artesunate-amodiaquin (AS-AQ). Dari 18 sampel penderita malaria, analisis gen tersebut menunjukkan tidak ada alel 1246Y pada seluruh sampel. Hasil follow-up pasien selama 28 hari menunjukkan regimen AS-AQ efektif sebagai terapi anti-malaria di daerah tersebut.

Kata kunci: *Pfmdr1*, 1246Y, Resistensi Obat Anti-Malaria, Artesunate-Amodiaquin

ABSTRACT

Plasmodium falciparum has the ability to develop resistance to anti-malarial drugs through mutations at some genes, including *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance protein 1 (*Pfmdr1*). *Pfmdr1* mutations might occur at some codon positions, including position 1246 in which aspartic acid is changed into tyrosine. It is suggested that the mutant allele, 1246Y, is related to treatment failures with amodiaquine, an anti-malarial drug. The aim of this research is to analyse the mutation of *Pfmdr1* 1246 in malaria patients

*Korespondensi:

email: yenni.ys@gmail.com

who will receive treatment with combination of artesunate-amodiaquine (AS-AQ). From 18 samples, none has the allele of 1246 Y. Follow up to the patients until day 28 shows that AS-AQ is clinically effective to treat malaria.

Key words : *Pfmdr1*, 1246Y, Anti-Malarial Drug Resistance, Artesunate-Amodiaquin

PENDAHULUAN

Plasmodium falciparum merupakan parasit yang dapat menyebabkan malaria serebral, salah satu bentuk malaria yang mematikan (Pasvol, 2005). Secara historis, parasit tersebut memiliki kemampuan untuk beradaptasi dengan obat anti-malaria sehingga menimbulkan resistensi obat (Rajeev dkk, 2008). Resistensi obat tentunya berimplikasi pada kegagalan terapi yang dapat membahayakan kondisi pasien. Akibat resistensi tersebut, terapi lini pertama terhadap malaria telah beberapa kali mengalami pergantian.

Penelitian molekuler telah mengidentifikasi adanya beberapa gen pada parasit tersebut yang dapat mengalami mutasi dan mengakibatkan terjadinya resistensi obat klorokuin pada parasit mutan. Salah satu di antaranya adalah gen *Plasmodium falciparum multi-drug resistance protein 1 (Pfmdr1)* (Ruetz dkk, 1996). Mutasi pada gen ini dapat terjadi pada beberapa posisi codon yaitu kodon 86 (asparagin menjadi tirosin), kodon 1034 (serin menjadi sistein), kodon 1042 (asparagin menjadi asam aspartat), dan kodon 1246 (asam aspartat menjadi tirosin) (Rajeev dkk, 2008). Selain itu, gen ini juga telah dikaitkan dengan kegagalan terapi amodiaquine, salah satu obat yang dikombinasikan dengan artesunate sebagai Artemisinin-based combination therapy (ACT), terapi lini pertama yang sekarang direkomendasikan WHO (Holmgren dkk, 2007; WHO 2011).

Karena itu penelitian mengenai bagaimana polimorfisme gen *Pfmdr1* pada pasien malaria di suatu daerah dapat memberikan gambaran mengenai resistensi obat anti malaria pada parasit yang ada di daerah tersebut. Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa pada beberapa sampel darah penderita malaria di Kabupaten Mamuju, Sulawesi Barat ditemukan mutasi gen *Pfmdr1* pada posisi 86, namun tidak terdapat mutasi pada posisi 1042 (Syafruddin dkk, 2005). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis polimorfisme gen *Pfmdr1* pada posisi 1246 pada pasien malaria di daerah tersebut. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian uji efektifitas obat anti malaria artesunate-amodiaquin di beberapa lokasi di kabupaten tersebut. Selain itu akan dievaluasi bagaimana hubungan antara polimorfisme gen tersebut dengan efektifitas terapi yang diberikan.

METODE

1. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di dua lokasi, yaitu dusun Tapandulu dan Puskesmas Tapalang yang terletak di Kabupaten Mamuju, Provinsi Sulawesi Barat, Indonesia.

2. Subjek penelitian

Subjek penelitian ini adalah pasien yang memeriksakan diri ke Puskesmas Tapalang dan bidan desa di Dusun Tapandulu. Kriteria inklusi adalah riwayat demam dalam 24 jam terakhir, usia di atas

3 tahun, didiagnosis positif menderita malaria melalui pemeriksaan mikroskopik, belum mendapatkan terapi anti-malaria, dan bersedia mengikuti penelitian. Kriteria eksklusi adalah kehamilan, malaria berat, dan demam karena sebab lain.

3. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada rentang waktu Oktober-November 2011 dan Maret-April 2012.

4. Pengambilan sampel

Pasien pada saat didiagnosis positif menderita malaria (hari ke-0) diambil darah periferinya lalu disimpan pada kertas saring khusus (*Whatmann filter paper*) untuk kemudian dianalisis molekuler di Laboratorium Malaria 1 di Eijkman Institute of Molecular Biology, Jakarta. Sebelum pengambilan sampel setiap pasien menandatangani informed consent terlebih dulu sebagai tanda persetujuan untuk ikut dalam penelitian.

Pengambilan sampel darah juga dilakukan pada hari ke-1, ke-2, ke-3, ke-7, ke-14, ke-21 dan ke-28, setelah diberikan terapi artesunate-amodiaquin selama 3 hari (hari 0, 1, dan 2) untuk mengevaluasi efektivitas terapi.

5. Analisis gen *Pfmdr1* codon 1246

Dilakukan ekstraksi dan purifikasi DNA dari sampel darah kering yang ada pada kertas saring dengan menggunakan kit QIAamp DNA mini kit. Kemudian nested PCR dilakukan untuk mengamplifikasi gen *Pfmdr1* pada sampel DNA yang telah dipurifikasi, sesuai metode yang dilakukan Asih, dkk (2009).

Untuk menentukan apakah sampel mengandung gen yang telah mengalami mutasi (mutan) atau belum (*wild-type*), maka dilakukan *restriction fragment length*

polymorphism (RFLP), yaitu inkubasi 5 µL produk PCR tersebut pada suhu 37°C selama 2 jam dengan enzim *EcoRV* untuk menganalisis digesti enzim tersebut terhadap produk PCR.

Hasil digesti enzim kemudian divisualisasi di bawah UV-trans iluminator setelah dielektroforesis pada gel agar. Parasit mutan akan mengalami pemotongan gen dengan memproduksi dua band yaitu berukuran 135 bp dan 85 bp sedangkan *wild-type* tidak mengalami pemotongan (ukuran band 220 bp).

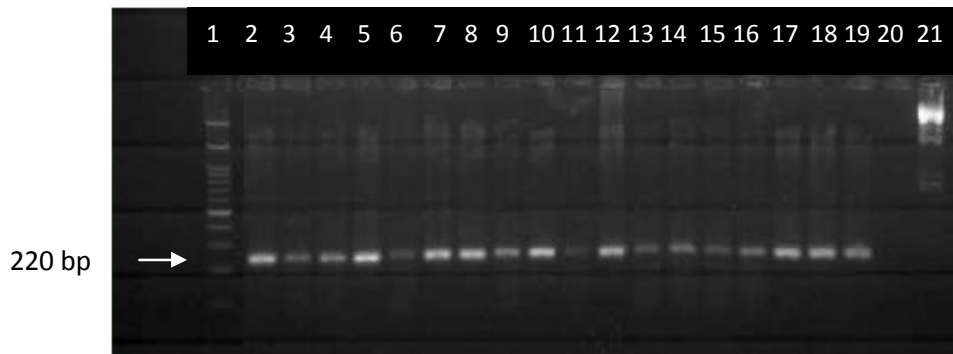
6. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar Sulawesi Selatan

HASIL

Diperoleh 12 sampel dari dusun Tapandulu dan 8 sampel dari Puskesmas Tapalang sehingga terdapat total 20 sampel darah positif malaria yang dianalisis. Dari 20 sampel, 18 sampel dapat diamplifikasi gen *Pfmdr1* 1246. Hasil RFLP menunjukkan tidak ada band yang terpotong dari 18 sampel, yang berarti pada seluruh sampel tidak terjadi mutasi gen *Pfmdr1* pada codon posisi 1246 (gambar 1).

Dari 18 kasus yang dapat dianalisis, reinfeksi pada hari ke-21 atau ke-28 terjadi pada 6 penderita (33%). Reinfeksi tersebut dideteksi melalui pemeriksaan DNA parasit yang positif dari sampel pada hari ke-21 atau ke-28. Namun, secara klinis semua subjek penelitian tidak mengalami tanda-tanda kegagalan terapi, yaitu timbulnya kembali gejala malaria yang dapat diamati secara klinis.



Gambar 1. Hasil RFLP gen *Pfmdr1* codon 1246. Lane 1 menunjukkan 1000 bp universal ladder, lane 20 kontrol negatif, lane 21 kontrol positif (lambda DNA); lane 2-19 DNA sampel. Tidak terjadi mutasi D1246Y pada seluruh sampel yang dianalisis (band 220 bp)

PEMBAHASAN

Mamuju merupakan salah satu daerah endemik malaria di Indonesia. Data yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Provinsi Mamuju menunjukkan bahwa total kasus malaria di kabupaten tersebut pada tahun 2011 adalah sebesar 1814 kasus.

Diduga resistensi parasit malaria terhadap klorokuin juga telah terjadi di daerah ini sehingga terapi lini pertama telah beralih ke penggunaan artemisinin-based combination therapy (ACT), yaitu kombinasi artesunate-amodiaquine.

Resistensi obat anti-malaria pada daerah tersebut dapat diperkirakan dari deteksi mutasi pada gen *Pfmdr1* pada sampel penderita. *Pfmdr1* merupakan sebuah ATP-Binding cassette (ABC) transporter pada *Plasmodium* yang berfungsi dalam memompa senyawa-senyawa tertentu keluar dari sel (Ferreira dkk, 2011). Pada studi mengenai mutasi yang terjadi pada *Pfmdr1* yang berkaitan dengan resistensi obat anti malaria, ditemukan bahwa ada beberapa posisi *point-mutation* yang dapat terjadi pada gen tersebut yaitu pada codon posisi 86, 184, 1034, 1042 dan 1246 (Rajeev dkk, 2008).

Namun demikian, pola mutasi gen tersebut yang ditemukan berbeda-beda di setiap daerah endemik malaria. Pada sebuah penelitian di Iran bagian tenggara, misalnya, ditemukan bahwa 20 % isolat yang mengalami kegagalan terapi dengan klorokuin dianalisis mengandung mutasi *Pfmdr1* N86Y, namun tidak ditemukan mutasi pada posisi yang lain, termasuk pada posisi 1246 (Jalousian dkk, 2008).

Pada codon posisi 1246 di gen *Pfmdr1*, mutasi yang dapat terjadi adalah D1246Y yaitu perubahan alel D1246 (asam aspartat) menjadi 1246Y (tirosin). Dikatakan bahwa strain parasit yang resisten terhadap klorokuin di Asia dan Afrika umumnya tidak mengalami point mutation gen *Pfmdr1* di posisi 1246, sedangkan strain resisten di Amerika Selatan umumnya mengalami mutasi di posisi tersebut (Rajeev dkk, 2008). Hal ini sejalan dengan penelitian Asih dkk (2009) di Kabupaten Sumba Barat yang menemukan bahwa seluruh sampel penderita tersebut tidak ada yang mengandung alel 1246Y.

Alel 1246Y juga dikaitkan dengan kegagalan terapi amodiaquine (Holmgren dkk, 2007). Karena itu efektivitas terapi

artesunate-amodiaquine dalam penelitian ini mungkin salah satunya disebabkan tidak adanya alel mutan tersebut.

Selain gen *Pfmdr1*, gen yang juga diduga mempengaruhi sensitivitas parasit terhadap terapi klorokuin adalah *Plasmodium falciparum chloroquine transporter (Pfcrt)*. Protein ini mengkode sebuah protein membran vakuola digestiv. Bila terjadi mutasi pada gen tersebut maka terjadi peningkatan eflux atau transportasi klorokuin keluar dari sel Plasmodium (Johnson dkk, 2002).

Pada penelitian ini tidak terjadi kegagalan terapi secara klinis. Pemeriksaan darah perifer secara mikroskopik juga tidak menunjukkan adanya *Plasmodium spp.* Namun, pada pemeriksaan DNA melalui glurp genotyping pada sampel hari ke-21 atau ke-28, dideteksi adanya *Plasmodium* pada beberapa sampel, yang menunjukkan terjadinya re-infeksi. Hal ini mungkin disebabkan jumlah parasit yang sangat rendah dalam darah sehingga tidak dapat dideteksi dalam pemeriksaan mikroskopis darah perifer. Namun, munculnya kembali parasit dalam darah penderita tidak menunjukkan adanya gejala klinis sehingga disimpulkan bahwa terapi tersebut efektif secara klinis. Tidak dapat ditentukan apakah reinfeksi pada hari ke-21 atau ke-28 berarti kegagalan terapi karena perlu dibandingkan terlebih dahulu genotipe dari parasit tersebut dengan parasit yang menginfeksi pada hari ke-0.

Karena keterbatasan waktu dan lokasi penelitian, jumlah sampel dalam penelitian ini hanya sebanyak 18, yang berarti hanya sekitar 1% dari jumlah seluruh kasus tahun sebelumnya. Dengan demikian, hasil penelitian ini mungkin belum dapat memberikan gambaran umum mengenai

polimorfisme gen tersebut di daerah Mamuju. Namun didukung oleh hasil penelitian lainnya di daerah Sumba atau pun Asia secara umum, kemungkinan alel dominan di daerah tersebut adalah D1246.

KESIMPULAN

Tidak ditemukan adanya *point-mutation* pada gen *Pfmdr1* di posisi 1246 pada sampel darah penderita malaria di daerah Mamuju Sulawesi Barat. Artesunate-amodiaquine merupakan kombinasi terapi malaria yang efektif secara klinis di daerah tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Prof Dr dr Nurpudji Astuti SpGK, kepala Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin atas dana penelitian lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Asih PBS, Rogers WO, Susanti AI, Rahmat A, Rozi IE, Kusumaningtyas MA, Krisin, Sekartuti, Dewi RM, Coutrier FN, Sutamihardja A, JAM van der Ven A, Sauerwein RW and Syafruddin D. 2009. *Seasonal distribution of anti-malarial drug resistance alleles on the island of Sumba, Indonesia*. Malaria Journal. 8: 222
- Ferreira PE, Holmgren G, Veiga MI, Uhlén P, Kaneko A, Gil JP. 2011. *PfMDR1: Mechanisms of Transport Modulation by Functional Polymorphisms*. PLoS One. 6(9): e23875.
- Holmgren G, Hamrin J, Svärd J, Mårtensson A, Gil JP, Björkman A. 2007. *Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa*. Infection, Genetics and Evolution. 7(5): 562–569

- Jalousian F, Dalimi A, Samiee SM, Ghaffarifar F, Soleymanloo F, Naghizadeh R. 2008. *Mutation in pfmdr1 gene in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates, Southeast Iran*. International Journal of Infectious Diseases. 12(6): 630-634.
- Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu ABS, Bray PG, Ward SA. 2004. *Evidence for a central role for PfCRT in conferring Plasmodium falciparum resistance to diverse antimalarial agents*. Mol.Cell. 15(6): 867-877.
- Pasvol G, 2005. *The treatment of complicated and severe malaria*. Br Med Bull 75-76 (1): 29-47.
- Rajeev K, Mehlotra RK, Mattera G, Bockarie MJ, JMaguire JD, Baird JK, Alifrangis M, Dorsey G, Rosenthal PJ, Fryauff DJ, Kazura JW, Stoneking M, Zimmerman PA. 2008. *Discordant Patterns of Genetic Variation at Two Chloroquine Resistance Loci in Worldwide Populations of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum*. Antimicrob. Agents Chemother. 52(6): 2212-2222.
- Ruetz S, Delling U, Brault M, Schurr E, Gros P. 1996. *The pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells*. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America. 93(18): 9942-9947.
- Syafruddin D, Asih PBS, Casey GJ, Maguire J, Baird JK, Nagesha HS, Cowman AF, & Reeder JC 2005. *Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Resistance To Antimalarial Drugs In Indonesia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72(2): 174–181.
- WHO. 2011. *Global Plan for Artemisinin Resistance Containment*. Geneva: WHO.