



UNIVERSITAS INDONESIA

**ALEL 211T, 802T DAN 1192A
GEN URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOSILTRANSFERASE 2B7
PENYANDI ENZIM PEMETABOLISME
DIHIDROARTEMISININ
PADA DAERAH ENDEMIK MALARIA DI INDONESIA**

TESIS

**JOICE VILADELVIA KALUMPIU
1006768995**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
FARMAKOLOGI KLINIK
JAKARTA
JANUARI 2014**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ALEL 211T, 802T DAN 1192A
GEN URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOSILTRANSFERASE 2B7
PENYANDI ENZIM PEMETABOLISME
DIHIDROARTEMISININ
PADA DAERAH ENDEMIK MALARIA DI INDONESIA**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Spesialis Farmakologi Klinik (SpFK)**

**JOICE VILADELVIA KALUMPIU
1006768995**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
FARMAKOLOGI KLINIK
JAKARTA
JANUARI 2014**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu

NPM : 1006768995

Tanda Tangan :



Tanggal : 9 Januari 2014

HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu
NPM : 1006768995
Program Studi : Spesialis Farmakologi Klinik
Judul Tesis : Alel 211T, 802T dan 1192A gen uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7 penyandi enzim pemeta- bolisme dihidroartemisin di daerah endemik malaria di Indonesia

Tesis ini telah disetujui oleh:


Pembimbing 1 : Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK


(.....)

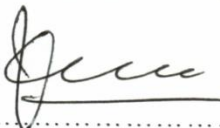
Pembimbing 2 : Dr. Puji Budi Setia Asih, S.Si


(.....)

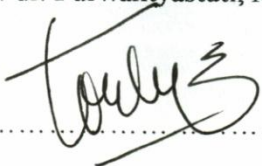
Pembimbing 3 : Dr. Melva Louisa, S.Si, Apt, M.Biomed


(.....)

Pembimbing 4 : Prof. dr. Frans D. Suyatna, PhD, SpFK


(.....)

Ketua Program Studi Farmakologi Klinik FKUI
Prof. Dr. dr. Purwastyastuti, M.Sc, SpFK


(.....)

Ketua Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI
dr. Wawaimuli Arozal, PhD, M.Biomed


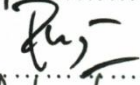
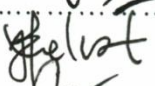
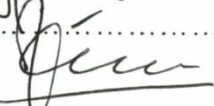
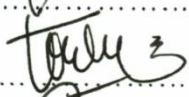



(.....)

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu
NPM : 1006768995
Program Studi : Dokter Spesialis Farmakologi Klinik
Judul Skripsi : Alel 211T, 802T dan 1192A gen uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7 penyandi enzim pemeta- bolisme dihidroartemisin di daerah endemik malaria di Indonesia

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Spesialis Farmakologi Klinik pada Program Studi Dokter Spesialis Farmakologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK (.....)
Pembimbing : Dr. Puji Budi Setia Asih, S.Si (.....)
Pembimbing : Dr. Melva Louisa, S.Si, Apt, M.Biomed (.....)
Pembimbing : Prof. dr. Frans D. Suyatna, PhD, SpFK (.....)
Penguji : Prof. Dr. dr. Purwastyastuti, M.Sc, SpFK (.....)
Penguji : dr. Vivian Soetikno, SpFK (.....)
Penguji : Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed (.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 9 Januari 2014

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena atas kasih dan anugerah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Dokter Spesialis Farmakologi Klinik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada:

1. Prof. DR. dr. Rianto Setiabudy, SpFK selaku pembimbing I, atas waktu dan pikiran yang telah dicurahkan dalam memberikan bimbingan dan arahnya.
2. DR. Puji Budi Setia Asih, S.Si selaku pembimbing II, yang telah membukakan jalan dan bersedia menerima penulis meneliti di Laboratorium Malaria LBM Eijkman serta membimbing dan mendorong penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan tesis ini.
3. DR. Melva Louisa, S.Si, Apt, M.Biomed selaku pembimbing III, atas kepercayaannya menawarkan penelitian ini serta perhatian dan kasihnya yang luar biasa, bimbingan, pertolongan, waktu dan dorongan yang tanpa kenal lelah membuat penulis tetap semangat dan mampu menyelesaikan setiap tahap dalam penelitian dan tesis ini.
4. Prof. dr. Frans D. Suyatna, SpFK selaku pembimbing IV, atas kebaikan dan perhatiannya selama penulis menyusun tesis ini.

5. Prof. dr. Sangkot Marzuki M.Sc, PhD selaku Direktur dan Prof. dr. Herawati Sudoyo, PhD selaku deputi direktur LBM Eijkman, atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian dan menggunakan semua fasilitas.
6. dr. Syafruddin, PhD selaku kepala Laboratorium Malaria LBM Eijkman, yang telah bermurah hati mengizinkan penggunaan *blood blot* dari dua belas propinsi di Indonesia, alat serta bahan penelitian.
7. dr. Wawaimuli Arozal, Mbiomed, PhD selaku Kepala Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI yang selalu memberikan perhatian dan dukungannya.
8. Prof. Dr. dr. Purwastyastuti, MSc, SpFK selaku Ketua Program Studi dan dr. Instianty, SpFK, PhD selaku Sekretaris Program Studi Farmakologi dan Terapeutik FKUI atas bimbingan, ide, dan masukan dalam penyusunan tesis penulis.
9. Seluruh staf Dosen Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI yang turut memberikan dorongan dan bimbingan selama masa pendidikan kami di FKUI.
10. Rekan-rekan di Laboratorium Malaria LBM Eijkman yang banyak memberikan masukan dan bantuan yang berharga serta keramahannya sehingga membuat penelitian ini menjadi pengalaman yang tak terlupakan.
11. Rekan-rekan PPDS (khususnya Anggi dan Fitriah) seperjuangan yang memberikan dorongan dan semangat serta penghiburan selama kami menjalani pendidikan di Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
12. Mba Fitri, mba medya, dan bu Ika yang senantiasa membantu kelancaran studi kami, serta semua karyawan di Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
13. Mamaku, Mama mertua, serta adik-adikku tercinta, terima kasih atas setiap doa, dukungan, perhatian tak terbatas dan tulus yang kalian berikan.

14. Suami, sahabat, kekasihku tercinta dr. Werlinson Tobing, terima kasih atas dorongan semangat, kekuatan, pertolongan, pengertian dan kesabaran yang berlimpah yang senantiasa kau berikan sehingga aku mampu melewati semua rintangan.
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Tuhan Yesus memberkati kalian semua dan membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Semoga karya tulis ini bermanfaat bagi sesama dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Amin

Jakarta, Januari 2014

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu
NPM : 1006768995
Program Studi : Spesialis Farmakologi Klinik
Departemen : Farmakologi Klinik dan Terapeutik
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Alel 211T, 802T dan 1192A
gen uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7
penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisin
di daerah endemik malaria di Indonesia**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 9 Januari 2014

Yang menyatakan

(Joice Viladelvia Kalumpiu)

ABSTRAK

Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu
Program Studi : Spesialis Farmakologi Klinik
Judul : Alel 211T, 802T dan 1192A gen uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7 penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin di daerah endemik malaria di Indonesia

Latar belakang

Kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) merupakan salah satu rejimen lini pertama untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi di Indonesia. Dihidroartemisinin (DHA) adalah obat anti malaria derivat artemisinin yang dimetabolisme oleh uridin difosfat glukuronosiltransferase (UGT) 1A9 dan 2B7. Hingga saat ini telah ditemukan 3 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) nonsinonimus pada *UGT2B7*, yang terdapat pada ekson 1, 2 dan 5. SNP tersebut berkontribusi pada perubahan aktivitas glukuronidasi *UGT2B7*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari distribusi dan frekuensi varian alel dari gen *UGT2B7* pada daerah endemik malaria di Indonesia.

Metode

Bahan penelitian sejumlah 240 sampel berasal dari bahan biologis tersimpan anonim yang diambil dari dua belas daerah endemik malaria di Indonesia. Analisis dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang dilanjutkan dengan metode sekuensing untuk melihat varian alel *UGT2B7* yaitu 211T, 802T, dan 1192A.

Hasil

Diperoleh varian alel *UGT2B7* yaitu 211T (10,4%) dan 802T (9,4%) di Indonesia. Frekuensi dan distribusi varian alel 211T dan 802T hampir sama pada daerah hipoendemik (masing-masing 11% dan 10,6%) dan di daerah hiperendemik (masing-masing 10% dan 8,75%). Pada penelitian ini tidak ditemukan alel 1192A.

Kesimpulan

Varian alel 211T merupakan varian alel dengan frekuensi tertinggi dibandingkan dengan kedua alel lainnya. Tidak terdapat perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel 211T dan 802T pada daerah hipoendemik dan hiperendemik malaria di Indonesia.

Kata kunci:

Dihidroartemisinin, *UGT2B7* ekson 1 (211T), *UGT2B7* ekson 2 (802T), *UGT2B7* ekson 5 (1192A), varian alel.

ABSTRACT

Name : Joice Viladelvia Kalumpiu
Study Program : Clinical Doctor Pharmacologist
Title : Allele 211T, 802T, 1192A uridine diphosphate glucuronosil-transferase 2B7 metabolizing enzyme dihydroartemisinin in malaria endemic areas in Indonesia

Background

The combination of dihydroartemisinin-piperazine (DHP) is one of the first-line treatment regimens for uncomplicated malaria in Indonesia. Dihydroartemisinin (DHA) is a derivative of artemisinin antimalarial drugs metabolized by *uridine diphosphate (UDP)- glucuronosiltransferase (UGT) 1A9 and 2B7*. To date, 3 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) has been found in *UGT2B7* nonsynonimus, which is located in exon 1, 2 and 5. These SNPs contributes to the changes in glucuronidation activity of *UGT2B7*. This study was aimed to determine the distribution and frequency of the variant alleles *UGT2B7* in malaria endemic areas in Indonesia.

Methods

Two hundred and forty samples used in this study were taken from anonymous stored biological materials from twelve malaria endemic areas in Indonesia. Samples were analyzed using *Polymerase Chain Reaction (PCR)* followed by sequencing methods to see *UGT2B7* variant allele, 211T, 802T, and 1192A.

Results

We found variant alleles of 211T (10.4%) and 802T (9.4%) from twelve malaria endemic areas in Indonesia. Frequencies and distribution variant alleles 211T and 802T were similar at hipoendemic areas (11% and 10.6%, respectively) compared with hyperendemic areas (10% and 8.75%, respectively). Variant allele 1192A was not found in this study.

Conclusion

Variant allele 211T is the highest in frequencies compared with the other alleles. There was no difference in frequencies and distribution pattern variant allele 211T and 802T at hipoendemic and hyperendemic area in Indonesia.

Keywords:

Dihydroartemisinin, *UGT2B7* exon 1 (211T), *UGT2B7* exon 2 (802T), *UGT2B7* exon 5 (1192), variant allele.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	5
1.3. Tujuan penelitian	6
1.3.1. Tujuan umum	6
1.3.2. Tujuan khusus	6
1.4. Manfaat penelitian	6
1.5. Kerangka konsep	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Obat antimalaria berbasis artemisinin	9
2.1.1. Struktur kimia	10
2.1.2. Mekanisme kerja	11
2.1.3. Farmakokinetik	11
2.1.4. Efek samping dan toksisitas	14
2.1.5. Kombinasi Dihidroartemisinin-Piperakuin	15
2.2. Uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7 (UGT2B7)	17
2.2.1. Peranan enzim UGT2B7	19
2.2.2. Polimorfisme UGT2B7	19
2.3. Perbedaan populasi dalam farmakogenetik dan dampak klinis	21
2.4. Biomolekuler untuk deteksi polimorfisme	24
2.4.1. Polymerase chain reaction (PCR)	24
2.4.2. Elektroforesis DNA	26
2.4.3. Sekuensing DNA	27

3.	METODOLOGI PENELITIAN	28
3.1.	Disain penelitian	28
3.2.	Tempat dan waktu penelitian	28
3.3.	Sampel penelitian	28
3.4.	Batasan operasional	29
3.5.	Analisis biomolekuler	30
3.6.	Alat dan bahan	30
3.6.1.	Alat	30
3.6.2.	Bahan	30
3.7.	Cara kerja	31
3.7.1.	Isolasi DNA	32
3.7.2.	Amplifikasi DNA dengan Metode PCR	32
3.7.3.	Elektroforesis DNA	35
3.7.4.	Sekuensing DNA	35
3.8.	Analisis statistik	37
3.9.	Alur penelitian	38
4.	HASIL PENELITIAN	39
4.1.	Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 1	40
4.2.	Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 2	45
4.3.	Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 3	50
4.4.	Rangkuman gambaran distribusi dan frekuensi varian alel gen <i>UGT2B7</i> penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin pada dua belas daerah endemik malaria di Indonesia	53
5.	PEMBAHASAN	55
6.	KESIMPULAN DAN SARAN	61
	DAFTARREFERENSI	62
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1. Kerangka konsep penelitian	7
Gambar 2.1. Nilai <i>Annual Parasite Incidence</i> di Indonesia	8
Gambar 2.2. Struktur kimia artemisinin dan derivatnya	10
Gambar 2.3. Enzim pemetabolisme artemisinin dan derivatnya	13
Gambar 2.4. Struktur UGT2B7	18
Gambar 3.1. Dua belas daerah endemik malaria di Indonesia	29
Gambar 3.2. Kondisi PCR untuk deteksi polimorfisme gen <i>UGT2B7</i> Ekson 1	33
Gambar 3.3. Kondisi PCR untuk deteksi polimorfisme gen <i>UGT2B7</i> Ekson 2 dan 5	33
Gambar 3.4. Peta gen <i>UGT2B7</i> berdasarkan Bank gen AC 111000 (156578 pb)	34
Gambar 3.5. Alur penelitian	38
Gambar 4.1. Alur seleksi sampel	39
Gambar 4.2. Gambaran elektroforesis amplikon fragmen gen <i>UGT2B7</i> untuk penentuan genotip <i>UGT2B7</i> ekson 1	40
Gambar 4.3. Gambaran elektroforegram <i>UGT2B7</i> ekson 1	41
Gambar 4.4. Gambaran elektroforesis amplikon fragmen gen <i>UGT2B7</i> untuk penentuan genotip <i>UGT2B7</i> ekson 2	45
Gambar 4.5. Gambaran elektroforegram <i>UGT2B7</i> ekson 2	46
Gambar 4.6. Gambaran elektroforesis amplikon fragmen gen <i>UGT2B7</i> untuk penentuan genotip <i>UGT2B7</i> ekson 5	50
Gambar 4.7. Gambaran salah satu elektroforegram <i>UGT2B7</i> ekson 2	51
Gambar 4.8. Rangkuman distribusi dan frekuensi alel-alel <i>UGT2B7</i> penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisnin pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Berbagai penelitian polimorfisme <i>UGT2B7</i>	20
Tabel 3.1. Primer untuk amplifikasi <i>UGT2B7</i> ekson 1, 2 dan 5	31
Tabel 3.2. Daerah target serta posisi perubahan nukleotida dan asam amino	37
Tabel 4.1. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 1 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia	43
Tabel 4.2. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 1 berdasarkan endemisitas malaria	44
Tabel 4.3. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 2 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia	48
Tabel 4.4. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 2 berdasarkan endemisitas malaria	49
Tabel 4.5. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 5 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia	52
Tabel 4.6. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme <i>UGT2B7</i> ekson 5 berdasarkan endemisitas malaria	53

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Riwayat hidup
- Lampiran 2. Sampel yang dipakai dalam penelitian untuk amplifikasi *UGT2B7* ekson 1, 2 dan 5
- Lampiran 3. Sampel yang gagal diamplifikasi pada *UGT2B7* ekson 5
- Lampiran 4. Kode asam amino

DAFTAR SINGKATAN

WHO	= World Health Organization
API	= Annual Parasite Incidence
ACT	= Artemisinin-based combination therapies
DHP	= Dihydroartemisinin-piperaquin
Pfmdr1	= Plasmodium falciparum multidrug resistance gene 1
Pfcr1	= Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter
Dhfr	= Dihydrofolate reductase
Dhps	= Dihydrofolate synthase
CYP	= Sitokrom P450
UDP	= Uridin difosfat
UGT	= Uridin difosfat-glukuronosiltransferase
DHA	= Dihydroartemisinin
SNP	= Single nucleotide polymorphisms
ALP	= Alkaline phosphatase
ALT	= Alanine aminotransferase
AST	= Aspartate aminotransferase
GGT	= Gamma-glutamyl transpeptidase
HDL	= High-density lipoprotein
LDL	= Low-density lipoprotein
GSH	= Glutathione
SOD	= Super oxidase dimutase
PXR	= Pregnane X receptor
CAR	= Constitutive androsterone receptor
C _{max}	= Consentration maximum
AUC	= Area Under the Curve
T _{max}	= Time maximum
UDPGA	= Uridine diphosphoglucuronic acid
DNA	= Deoksiribo Nucleic Acid
Indels	= Insertion/deletion
PL	= Pemetabolisme lambat (poor metabolizers)
PM	= Pemetabolisme menengah (intermediary metabolizers)
PC	= Pemetabolisme cepat (extensive metabolizers)
PU	= Pemetabolisme ultracepat (ultrarapid metabolizers)
VKORC1	= Vitamine K epoxidase reductase complex subunit 1
PCR	= Polymerase chain reaction
ddNTP	= Dideoksinukleotida
dNTP	= Deoksinukleosida
MBS	= Mass blood survey
PBS	= Phosphate buffer saline
TAE	= Tris Acetate-EDTA

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan global di seluruh dunia. Laporan Badan Kesehatan Dunia (*World health Organization*, WHO) 2012 mencatat terdapat 104 negara endemik malaria dengan estimasi beban biaya mencapai 1,84 milyar dolar. Pada tahun 2012, WHO melaporkan 207 juta kasus malaria dengan kematian mencapai 627 ribu jiwa.¹ Sebagian besar kasus malaria terjadi di Afrika (90%) dengan kematian anak usia kurang dari 5 tahun tercatat sebanyak 3000 jiwa dalam satu hari.²

Badan Kesehatan Dunia membagi area endemisitas malaria menjadi tiga kelompok, yaitu area dengan endemisitas tinggi (*high transmission*, hiperendemik), endemisitas rendah (*low transmission*, hipoendemik), dan bebas malaria. Pada area hiperendemik ditemukan ≥ 1 insiden malaria per 1000 populasi per tahun, sedangkan pada area hipoendemik ditemukan < 1 insiden malaria per 1000 populasi per tahun. Pembagian area endemisitas malaria terkait dengan kebijakan eliminasi malaria dunia. Pada area hipoendemik, terapi antimalaria diberikan jika telah ada konfirmasi parasitologi. Pada area hiperendemik, pemberian antimalaria dapat langsung diberikan, terutama pada anak usia < 5 tahun dengan klinis malaria tanpa konfirmasi dari parasitologi.³ Pada tahun 2010, dilaporkan penduduk Indonesia sebanyak 89.700.000 (37%) jiwa tinggal di daerah hiperendemik dan 17.000.000 (7%) jiwa tinggal di daerah hipoendemik, sedangkan di daerah bebas malaria sebanyak 136.000.000 (56%).¹ Profil data kesehatan Indonesia tahun 2012 melaporkan kematian akibat malaria mencapai 252 jiwa.⁴

Program eliminasi malaria di Indonesia tertuang dalam keputusan Menteri Kesehatan RI No 293/MENKES/SK/IV/2009. Pelaksanaan pengendalian malaria menuju eliminasi dilakukan secara bertahap dari daerah dengan endemisitas rendah ke tinggi. Eliminasi malaria di wilayah DKI Jakarta, Bali, dan Bareleng Binkar

diharapkan tercapai pada tahun 2010. Di wilayah Jawa, Aceh dan Riau, eliminasi malaria diharapkan tercapai tahun 2015, sedangkan wilayah Sumatera, Nusa Tenggara Barat, Kalimantan dan Sulawesi dicapai pada tahun 2020, dan akhirnya wilayah Papua, Nusa Tenggara Timur, dan Maluku diharapkan tercapai pada tahun 2030.⁴

Upaya penanggulangan malaria di Indonesia sejak tahun 2007 dipantau dengan menggunakan indikator *Annual Parasite Incidence* (API). Nilai API nasional di Indonesia tahun 2012 rata-rata adalah 1,69 per 1000 penduduk dengan insidens tertinggi terdapat di Papua (85,75 per 1000 penduduk). Berdasarkan nilai API di Indonesia pada tahun 2012, daerah hipoendemik malaria terdapat di Jawa dan Bali, sedangkan daerah Papua, Maluku, Nusa Tenggara, Sulawesi, Kalimantan, dan Sumatera bervariasi dari hiperendemik sampai hipoendemik. Indikator keberhasilan rencana strategis (Renstra) Kementerian Kesehatan adalah menurunnya API menjadi 1 per 1.000 penduduk pada tahun 2015.⁴

Pada tahun 2001, badan kesehatan dunia merekomendasikan kombinasi derivat artemisinin (*artemisinin-based combination therapies*, ACTs) sebagai terapi lini pertama untuk mengobati malaria *P. falciparum* tanpa komplikasi, dan selama beberapa tahun terakhir ini, banyak negara endemik malaria mengganti kebijakan nasional pengobatan malaria di negara mereka dengan ACT, termasuk Indonesia.⁵ Pada tahun 2004, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia mengganti klorokuin menjadi kombinasi artesunat-amodiakuin sebagai terapi lini pertama dalam pengobatan malaria *P. falciparum* tanpa komplikasi, karena banyaknya bukti yang telah menunjukkan adanya resistensi klorokuin di berbagai daerah di Indonesia.^{5, 6} Namun kegagalan pengobatan akibat amodiakuin ternyata sudah dilaporkan di beberapa negara,⁷ terutama Indonesia,⁸⁻¹⁰ sehingga pada tahun 2009 Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menjadikan kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) menjadi salah satu lini pertama untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi dan awalnya digunakan secara khusus pada daerah Papua.¹¹

Secara garis besar kegagalan pengobatan malaria dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu faktor lingkungan, faktor *agent* (penyebab), dan faktor inang (*host*). Faktor

lingkungan meliputi cuaca, suhu, kelembaban, angin, sinar matahari, curah hujan, dan sebagainya, semuanya ini berpengaruh terhadap proses migrasi, perkembangbiakan, bahkan penularan nyamuk.¹² Pada parasit, salah satu penyebab kegagalan pengobatan adalah karena adanya polimorfisme pada parasit yang menyebabkan terjadinya resistensi obat antimalaria.¹³⁻¹⁵ Pada inang (*host*), kegagalan pengobatan maupun efek samping obat dapat berkaitan dengan kelainan yang dapat mengganggu metabolisme obat.¹⁶ Salah satu faktor yang diduga berperan pada proses tersebut adalah polimorfisme gen yang berperan pada enzim pemetabolisme. Polimorfisme ini merupakan penyebab timbulnya variasi respon yang berbeda antar individu dalam populasi.

Dihydroartemisinin (DHA) adalah obat anti malaria derivat artemisinin dan merupakan metabolit utama dari artesunat, artemeter, dan arteeter.¹⁷ DHA mempunyai waktu paruh yang pendek (sekitar 45 menit). Metabolisme DHA tidak melalui fase satu, namun langsung melalui fase dua yaitu melalui glukuronidasi oleh enzim uridin difosfat glukuronosiltransferase (UGT) 1A9 dan 2B7. Enzim tersebut memetabolisme DHA secara cepat menjadi α -dihydroartemisinin- β -glucuronide yang inaktif.¹⁸ Glukuronidasi merupakan reaksi metabolisme fase dua terpenting dan sebagian besar diperantarai oleh UGT yang sangat polimorfik.¹⁹ Karena biotransformasi dihydroartemisinin menjadi metabolit inaktifnya mempunyai peran yang penting dalam efektifitas anti malaria, maka variasi genetik pada enzim tersebut diduga dapat menyebabkan variabilitas respon antar individu.

Pada manusia telah diidentifikasi 31 gen UGT dan dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu *UGT1*, *UGT2*, *UGT3* dan *UGT8*.²⁰ Polimorfisme genetik pada gen penyandi enzim pemetabolisme obat mengakibatkan enzim yang disandi aktivitasnya berkurang atau meningkat, sehingga berpotensi mengakibatkan terjadinya efek samping obat atau kegagalan terapi. Beberapa studi menunjukkan adanya polimorfisme dan mutasi pada gen *UGT1A9* dan *UGT2B7*. Sejauh ini telah diketahui 3 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) nonsinonimus pada *UGT1A9* dan 3 SNP nonsinonimus pada *UGT2B7*. Gen *UGT1A9* dan *UGT2B7* telah diteliti pada populasi Afrika, Asia, dan Kaukasia. Gen *UGT2B7* merupakan gen *UGT2B* utama

pada manusia. Penelitian yang dilakukan pada populasi Afrika Barat, Papua New Guinean, dan Amerika Utara memperlihatkan lebih banyak polimorfisme pada gen *UGT2B7* dibandingkan dengan *UGT1A9*.²¹ Beberapa penelitian telah melaporkan frekuensi polimorfisme (SNP) dari gen *UGT1A9*, yaitu frekuensi SNP 8G>A ditemukan pada 2,5% populasi Afrika-Amerika,²² 98T>C pada 2,2–3,6% Kaukasia²² dan 766G>A pada <1% populasi Jepang.²³ Sedangkan frekuensi polimorfisme *UGT2B7* ditemukan lebih banyak pada populasi, yaitu SNP 211G>T (ekson-1) pada 14,8–18,5% populasi Jepang,²⁴⁻²⁶ 802C>T (ekson-2) pada 24,4–29,3% populasi Jepang dan 48,9–53,7% Kaukasia,²⁴⁻²⁸ serta 1192G>A (ekson-5) pada <1% populasi Jepang.²⁵ Berdasarkan semua studi tersebut, maka penelitian ini difokuskan pada *UGT2B7* terutama ekson 1, 2, dan 5.

Dihydroartemisinin dikombinasikan dengan piperakuin (Dihydroartemisinin-Piperakuin, DHP) yang mempunyai waktu paruh lebih panjang untuk meningkatkan efektivitas dan mencegah rekrudensi. Penelitian yang dilakukan di Jayapura dan Maumere memperlihatkan efektifitas dihydroartemisinin-piperakuin (DHP) terhadap malaria mencapai 97%.²⁹ DHP sebenarnya merupakan obat yang cukup aman, namun penelitian terbaru yang dilakukan pada hewan coba terhadap DHP dengan dosis terapi dan *double* dosis terapi memperlihatkan peningkatan yang signifikan terhadap ureum, kreatinin, bilirubin, ALP (*alkaline phosphatase*), ALT (*alanine aminotransferase*), AST (*aspartate aminotransferase*), GGT (*gamma-glutamyl transpeptidase*), kolesterol total, HDL (*high-density lipoprotein*), dan LDL (*low-density lipoprotein*). Penelitian ini juga memperlihatkan penurunan asam askorbat hati dan GSH (*glutathione*) serta penurunan aktivitas enzim katalase hati dan SOD (*super oxidase dimutase*) pada hewan coba yang menerima DHP dosis ganda.³⁰ Pada manusia, DHP dapat mengakibatkan perpanjangan interval QT, gangguan irama jantung, gangguan elektrolit, teratogenik pada trimester awal kehamilan, gangguan hati, gangguan darah, neurotoksisitas, dan gangguan saluran cerna. DHA juga dapat sedikit menurunkan aktivitas *CYP1A2*, sehingga berpotensi meningkatkan kadar substrat *CYP1A2*.³¹ Gangguan saluran cerna seperti mual, muntah, nyeri abdomen, dan diare dapat membuat pasien menghentikan pengobatan, sehingga dapat timbul kegagalan terapi.

Penggunaan DHP pada daerah endemik malaria di seluruh dunia masih sangat sedikit, sehingga informasi terkait efek samping dan juga polimorfisme terkait enzim pemetabolisme obat tersebut juga masih sangat terbatas.

Badan kesehatan dunia menghimbau perlunya dilakukan monitoring efektifitas dan keamanan ACT untuk semua negara yang menggunakan ACT. Namun sampai saat ini informasi mengenai polimorfisme pada *UGT2B7* di populasi, terutama Asia masih sangat terbatas. Di Indonesia belum ada data mengenai distribusi dan frekuensi polimorfisme *UGT2B7* yang diduga berperan penting dalam metabolisme dihidroartemisinin, terutama pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia, yaitu Provinsi Aceh (Sabang dan Aceh), Sumatera Utara (Nias), Bangka Belitung, Kalimantan Tengah (Palangkaraya), Kalimantan Selatan (Banjarmasin), Maluku Utara (Halmahera), Sulawesi Barat (Mamuju), Nusa Tenggara Timur (Sumba dan Flores), Papua (Sentani), dan DKI Jakarta (Kepulauan Seribu).

1.2. Rumusan masalah

Dihidroartemisinin dimetabolisme oleh enzim UGT1A9 dan UGT2B7. Polimorfisme UGT, terutama *UGT2B7* dapat mempengaruhi metabolisme obat, termasuk obat anti malaria, sehingga dapat terjadi variasi respon antar individu. Peningkatan aktivitas enzim dapat menyebabkan kegagalan terapi, sedangkan penurunan aktivitas enzim dapat meningkatkan efek samping/toksisitas obat. Oleh karena itu sangat penting untuk dipelajari peranan gen UGT yang terkait dengan obat antimalaria, khususnya ACT, sehingga timbul pertanyaan bagaimanakah distribusi dan frekuensi varian alel dari gen *UGT2B7* ekson 1, 2, dan 5 yang berperan dalam metabolisme dihidroartemisinin pada populasi di dua belas daerah endemik malaria di Indonesia.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mempelajari distribusi dan frekuensi varian alel *UGT2B7* yang berperan pada metabolisme fase II obat antimalaria artemisinin di daerah endemik malaria di Indonesia

1.3.2 Tujuan khusus

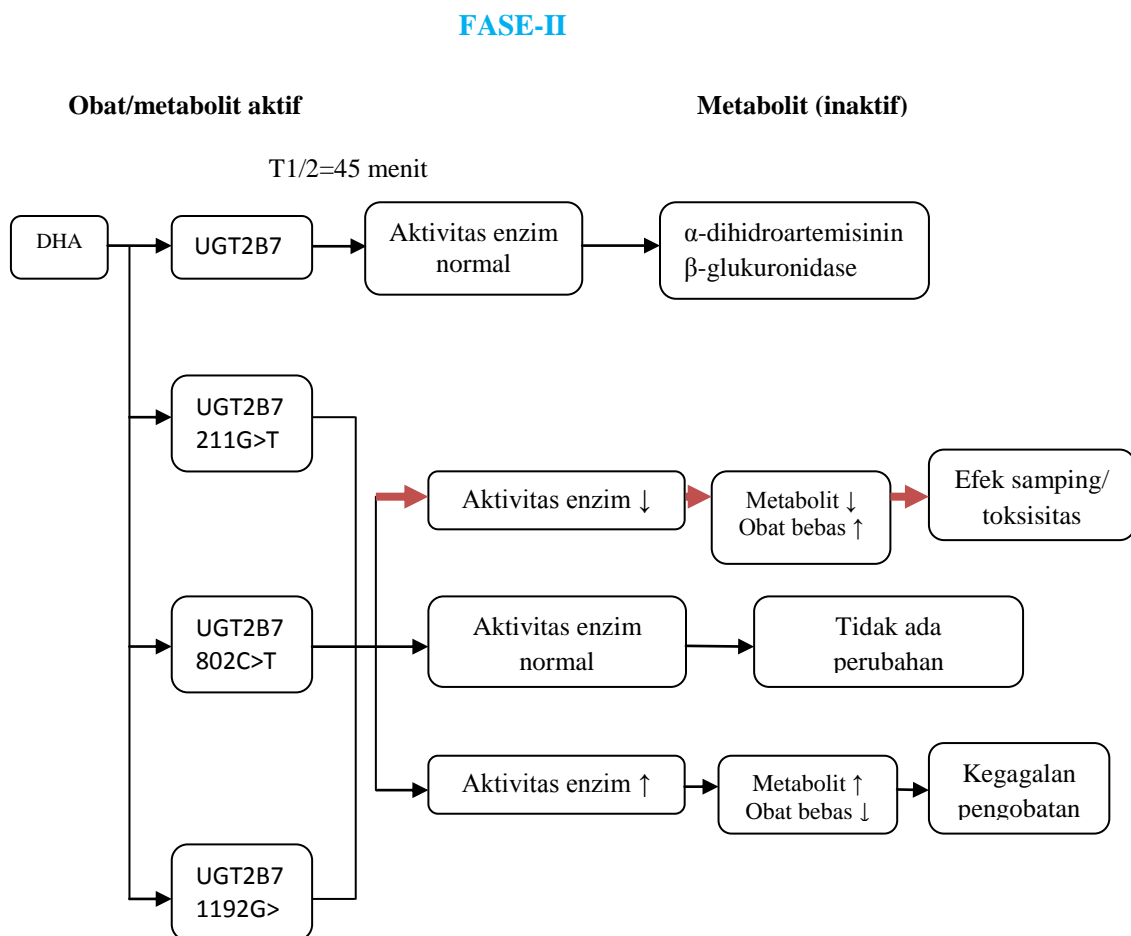
- Mempelajari frekuensi alel 211T gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia
- Mempelajari frekuensi alel 802T gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia
- Mempelajari frekuensi alel 1192A gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia

1.4 Manfaat penelitian

- Pada aspek kesehatan masyarakat, hasil penelitian dapat dipakai sebagai acuan untuk optimalisasi pengobatan dan meminimalisasi efek samping maupun kegagalan pengobatan penyakit malaria.
- Pada khasanah keilmuan, memberikan tambahan pengetahuan dibidang farmakogenetik, khususnya pola distribusi dan frekuensi alel 211T, 802T, 1192A gen *UGT2B7* yang berperan dalam metabolisme dihidroartemisinin pada populasi di dua belas daerah endemik malaria di Indonesia.

1.5 Kerangka konsep

Dihidroartemisinin dimetabolisme pada fase dua melalui enzim UGT1A9 dan UGT2B7. Polimorfisme pada gen penyandi enzim pemetabolisme tersebut dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim. Penelitian ini fokus pada enzim UGT2B7. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.1.



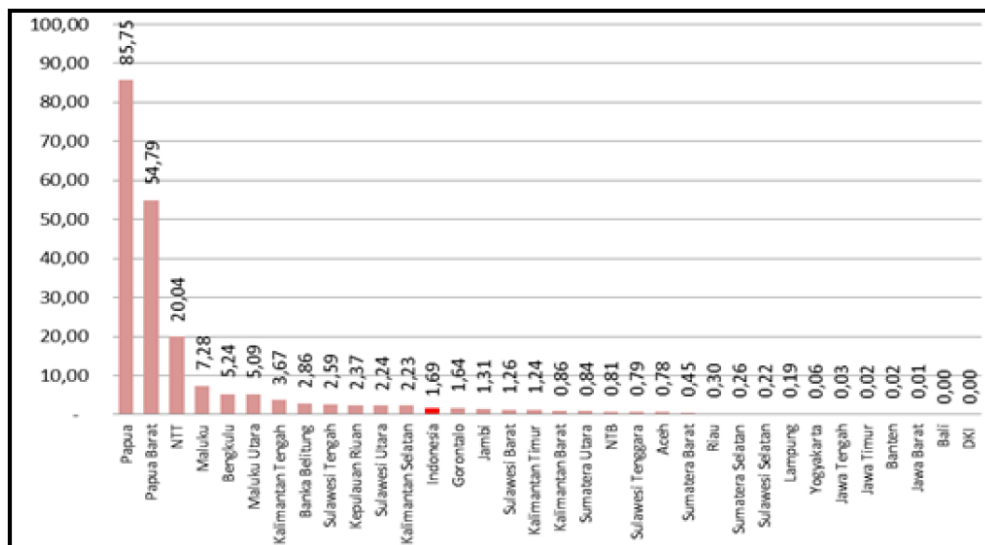
Gambar 1.1. Kerangka konsep penelitian

DHA=Dihidroartemisinin; UGT2B7=uridin difosfat glukuronosiltransferase 2B7

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Malaria merupakan salah satu penyakit menular yang disebabkan oleh parasit protozoa dari genus Plasmodium. Di Indonesia malaria merupakan salah satu masalah kesehatan utama dengan angka kesakitan dan angka kematian yang tinggi. Berdasarkan nilai API malaria di Indonesia tahun 2012 rata-rata adalah 1,69 per 1000 penduduk dengan insidens tertinggi terdapat di Papua sebesar 85,75 per 1000 penduduk). Terdapat 21 daerah dengan nilai API dibawah nilai API nasional, dan 12 daerah dengan nilai API diatas nilai API nasional.⁴ Nilai API di berbagai provinsi di Indonesia dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Nilai Annual Parasite Incidence di Indonesia

Laporan nilai API di Indonesia tahun 2012⁴

Lima spesies Plasmodium yang dapat menyebabkan malaria pada manusia adalah *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, dan *P. knowlesi*. Plasmodium *falciparum* merupakan penyebab hampir 90% kasus dan penyebab kematian diseluruh dunia.⁴ Salah satu masalah utama yang dihadapi Indonesia dalam penanggulangan penyakit malaria pada saat ini adalah telah menyebarnya galur-galur parasit yang telah resisten terhadap obat antimalaria yang terkait dengan polimorfisme pada gen parasit. Polimorfisme pada gen *pfmdr1* (*P. falciparum multidrug resistance gene 1*) dan gen *pfcr1* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter*) berkaitan dengan resistensi terhadap klorokuin.^{13, 14} Selain itu, polimorfisme pada gen *dhfr* (*dihydrofolate reductase*) dan *dhps* (*dihydrofolate synthase*) berkaitan dengan resistensi terhadap obat antifolat dan sulfa.¹⁵

2.1. Obat antimalaria berbasis artemisinin

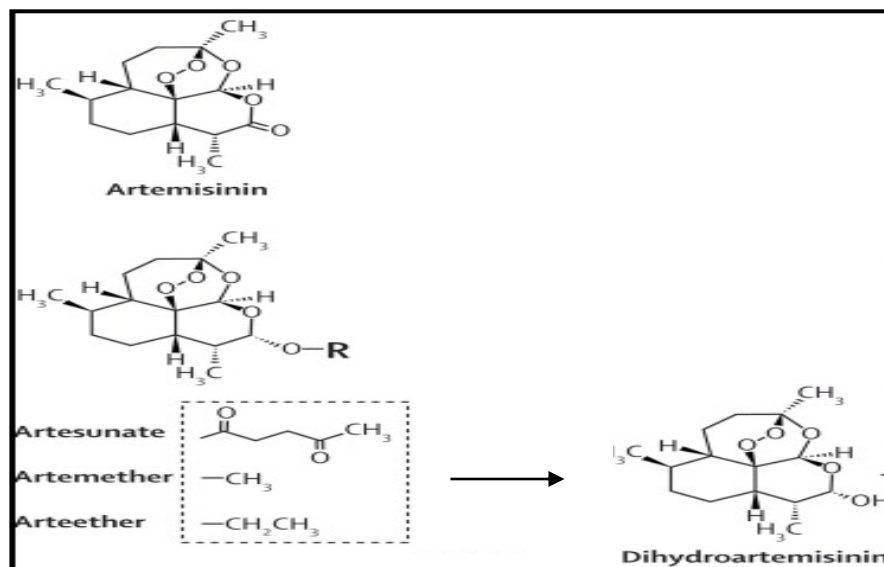
Badan Kesehatan Dunia (WHO) sejak tahun 2001 merekomendasikan *artemisinin-based combination therapy* (ACT) sebagai terapi lini pertama untuk malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. Kebijakan tersebut telah diikuti oleh 79 negara termasuk Indonesia.^{5, 6} Pada tahun 2004, kombinasi artesunat-amodiakuin ditetapkan sebagai terapi lini pertama dalam pengobatan malaria *P. falciparum* tanpa komplikasi akibat timbulnya resistensi klorokuin diseluruh Indonesia. Namun kegagalan pengobatan akibat amodiakuin ternyata sudah dilaporkan di beberapa negara,⁷ terutama Indonesia,⁸⁻¹⁰ sehingga pada tahun 2009, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menjadikan kombinasi dihidroartemisinin-piperaquin (DHP) menjadi salah satu lini pertama untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi dan awalnya digunakan secara khusus pada daerah Papua.¹¹

Artemisinin berasal dari tanaman ‘qinghao’ (*Artemisia annua L.*) dan awalnya digunakan dalam pengobatan tradisional Cina untuk mengobati demam pada masa dinasti Yin (265-420 sebelum masehi).³² Pada tahun 1979, artemisinin diperkenalkan diseluruh dunia setelah para ilmuwan Cina berhasil mengekstrak artemisinin dan mengidentifikasi struktur kimianya.³³ Setelah itu, beberapa derivat semisintetik

artemisinin berhasil dikembangkan untuk meningkatkan efikasinya. Derivat artemisinin yang banyak dipakai adalah artesunate, artemeter, arteeter, dan dihidroartemisinin.

2.1.1. Struktur kimia

Artemisinin merupakan obat antimalaria golongan seskuiterpen lakton trioksan dengan jembatan endoperoxida sebagai efek antiparasitnya. Derivat artemisinin dibentuk dengan cara modifikasi pada rantai karbon kesepuluh (C10) atau keempat belas (C14).³² Struktur kimia artemisinin dan derivatnya dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur kimia artemisinin dan derivatnya

Perubahan struktur kimia artemisinin menjadi derivat semisintetiknya.

(Dimodifikasi berdasarkan kepustakaan³⁴)

2.1.2. Mekanisme kerja

Artemisinin dan derivatnya bekerja secara cepat pada fase seksual maupun aseksual parasit dan memberikan respon klinis yang cepat dibandingkan antimalaria lain karena dapat membunuh parasit malaria dalam hitungan menit dengan rasio reduksi parasit mencapai 10.000 kali lipat per siklus eritrositik.³⁵

Hipotesis mengenai mekanisme kerja artemisinin pada parasit masih belum diketahui secara jelas. Artemisinin mampu membasmi trofozoit dan gametosit. Artemisinin diduga bekerja melalui jembatan endoperoksida menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang diikuti dengan alkilasi protein dan heme sehingga terjadi kerusakan membran parasit. Mekanisme kerja spesifik lain meliputi penghambatan pada retikulum sarkoplasmik-endoplasmik kalsium ATPase falciparum, mengganggu transport elektron mitokondria dan transport protein parasit, serta merusak fungsi mitokondria parasit.³²

Derivat artemisinin biasanya dikombinasikan dengan obat antimalaria lain yang struktur kimianya berbeda dan mempunyai waktu paruh yang lebih panjang. Walaupun waktu paruh artemisinin dan derivatnya pendek, namun obat ini dapat menurunkan jumlah parasit secara signifikan, sehingga hanya menyisakan sedikit parasit yang harus dibunuh oleh obat pasangannya yang mempunyai waktu eliminasinya lebih panjang.³⁶

Lima kombinasi ACT yang direkomendasikan oleh Badan Kesehatan Dunia adalah Artesunat-Amodiakuin, Artesunat-Meflokuin, Artesunat-Sulfadoksin Pirimetamin, Artemeter-Lumefantrin, dan Dihidroartemisinin-piperakuin. Kombinasi artesunat dengan sulfadoksin pirimetamin dilaporkan mulai timbul resistensi sehingga jarang digunakan.³⁷

2.1.3. Farmakokinetik

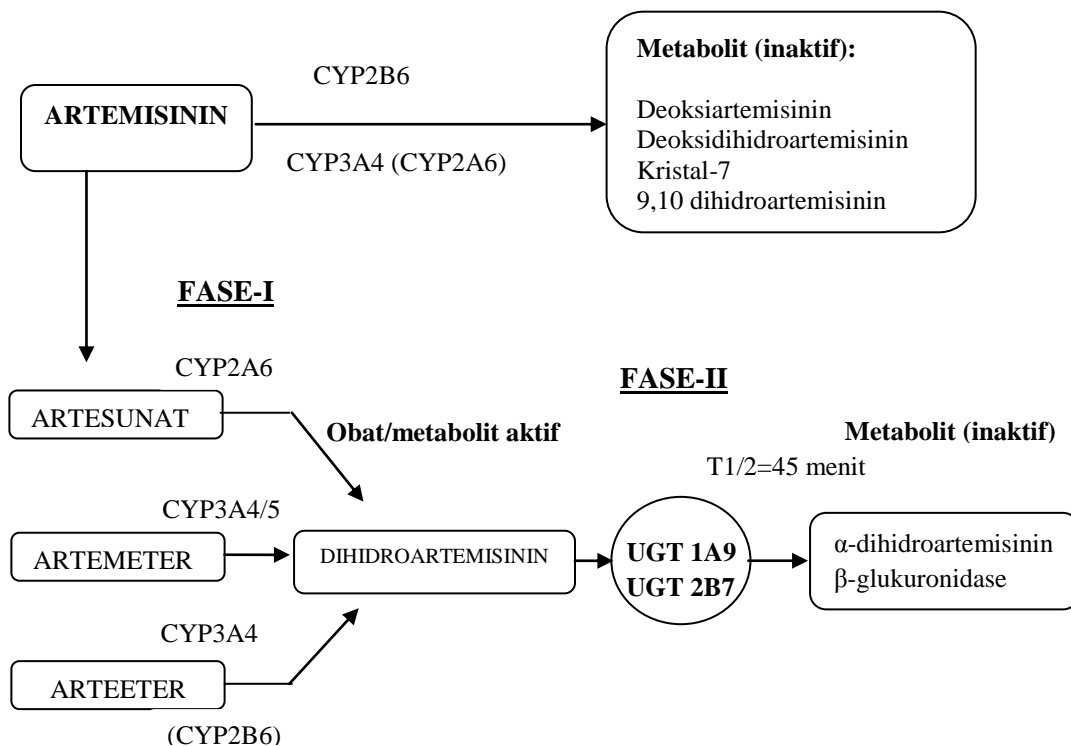
Artemisinin sukar larut dalam air maupun minyak sehingga tidak dapat diberikan secara intravena. Artemisinin stabil pada suhu tinggi, namun tidak stabil dalam suasana asam maupun basa.³⁸⁻⁴⁰ Obat ini dimetabolisme terutama oleh CYP2B6 dan sekunder oleh CYP3A4, serta sedikit oleh CYP2A6.³⁴ Waktu paruh

setelah pemberian peroral berkisar 1 jam. Artemisinin merupakan penghambat poten CYP1A2 dan diduga juga menghambat reaksi glukuronidasi pada orang sehat. Artemisinin dapat menginduksi CYP3A4, CYP2B6, dan MDR1 (*multi drug resistance 1*) di hepatosit dan sel intestinal manusia melalui aktivasi PXR (*pregnane X receptor*) dan CAR (*constitutive androsterone receptor*).^{41, 42} Autoinduksi artemisinin terdeteksi setelah pemberian artemisinin dosis tunggal dan dapat mempengaruhi kinetik dosis selanjutnya yang diberikan 1 minggu kemudian. Sehingga, artemisinin mungkin masih dapat mempengaruhi efek farmakologis obat lain walaupun setelah *time lag* selama beberapa hari. Induksi mencapai maksimum 7-14 hari, sehingga apabila diberikan obat lain yang dimetabolisme oleh enzim yang sama maka dapat mengakibatkan kadar plasma obat yang diberikan bersamaan menurun dan mencapai kadar subterapeutik.^{34, 43} Terapi antimalaria yang suboptimal dapat mengakibatkan meningkatnya morbiditas dan mortalitas.

Artesunat, artemeter dan arteeter diubah menjadi DHA yang merupakan metabolit aktif. Artesunat larut dalam air, sedangkan artemeter dan arteeter larut dalam minyak. Artesunat secara cepat diubah menjadi DHA. Obat ini terdapat dalam bentuk sediaan injeksi, oral, dan rektal. Pada pemberian secara intravena, bioavailabilitas artesunat mencapai 82%, waktu paruh sekitar 15 menit, klirens 2-3 L/kg/jam dan volume distribusi 0,1-0,3/kg. Metabolisme obat ini diperantarai oleh CYP2A6.⁴⁴ Artemeter mempunyai waktu paruh sekitar 1 jam setelah pemberian peroral. Obat ini dimetabolisme oleh CYP3A4. Arteeter hanya tersedia dalam bentuk injeksi intramuskular. Obat ini mempunyai masa paruh yang panjang (> 20 jam) karena absorpsinya yang lambat. Arteeter dimetabolisme oleh CYP3A4 dan CYP2B6.

Dihydroartemisinin (DHA) adalah obat anti malaria derivat artemisinin dan merupakan metabolit utama dari artesunat, artemeter, dan arteeter.¹⁷ DHA bersifat tidak larut dalam air, tidak stabil pada suasana asam dan memerlukan formula yang tepat untuk menjamin absorpsi yang kuat. Pada pemberian oral, DHA memiliki bioavailabilitas > 80%. Kadar puncak tercapai dalam 25 menit setelah pemberian. Klirens DHA berkisar antara 0.5 - 1.5 L/kg/jam dan volume distribusi antara 0.5 - 1.0

L/kg. Ikatan protein plasma DHA 43% pada orang sehat. DHA mempunyai rasio ekstraksi yang tinggi. Obat ini bekerja cepat dan mempunyai waktu paruh yang pendek 30-60 menit (sekitar 45 menit). Metabolisme DHA langsung melalui fase dua yaitu melalui glukuronidasi oleh UGT1A9 dan UGT2B7, yang secara cepat diinaktifkan menjadi α -dihydroartemisinin- β -glucuronide.¹⁸ Metabolisme artemisinin dan derivatnya dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Enzim pemetabolisme artemisinin dan derivatnya

(Dimodifikasi berdasarkan dari kepustakaan³⁴)

Terdapat perbedaan farmakokinetik DHA pada orang sehat dan penderita malaria. Isavadharm PT dkk⁴⁵ memaparkan bahwa kadar C_{max} DHA meningkat 1,6 kali dan AUC 2,3 kali pada pasien malaria dibandingkan pada subjek sehat, sedangkan waktu paruh dan T_{max} sama antar kedua kelompok. Volume distribusi meningkat 2,3 kali dan klirens 2 kali lipat pada orang sehat dibanding pada pasien malaria. Kadar DHA pada wanita lebih tinggi dibandingkan pada pria. Kadar DHA juga dipengaruhi oleh berat badan. Farmakokinetik DHA pada fase akut malaria berbeda signifikan dibandingkan pada fase konvalesen, hal ini diduga akibat adanya perubahan farmakokinetik DHA terkait dengan perubahan fisiologis pasien yang terjadi pada fase akut dan konvalesen.

Studi dengan hewan coba mengatakan bahwa tidak terdapat mekanisme autoinduksi DHA pada tikus.⁴⁶ Namun kemungkinan adanya autoinduksi pada pasien malaria diperlihatkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Le Thi dkk.⁴⁷ Penelitian tersebut memaparkan bahwa tidak adanya perbedaan kadar DHA pada dua hari pertama terapi namun terjadi penurunan kadar AUC yang signifikan pada hari kelima terapi. Pada penelitian tersebut didapatkan penurunan kadar plasma DHA secara *time dependent* setelah diberikan dosis yang sama secara berulang pada subjek sehat. Inkonsisten farmakokinetik DHA ini juga dapat merupakan akibat dari perbedaan formulasi DHA, proses *manufacturing*, perbedaan peresepan, dan variasi etnik.

2.1.4. Efek samping dan toksisitas

Efek samping dan toksisitas DHA yang sering terjadi adalah gangguan gastrointestinal (mual, muntah, nyeri abdomen, dan diare). Gangguan saluran cerna dapat membuat pasien menghentikan pengobatan, sehingga dapat timbul kegagalan terapi. Efek samping muntah pada awal pengobatan dilaporkan mencapai 11%.⁴⁸ Efek samping lain meliputi pusing, tinitus, bradikardi, hipersensitivitas, retikulositopenia transien, neutropenia, peningkatan enzim hati, pemanjangan interval QT, neurotoksisitas (kerusakan neuron di batang otak), teratogenik (menghambat eritropoesis fetal, keguguran, deformitas anggota badan), perubahan audiometrik yang ireversibel. Studi derivat artemisinin pada hewan coba telah dilaporkan secara

signifikan berupa neurotoksisitas (kerusakan otak), namun belum ada laporan pada studi manusia. WHO melarang penggunaan derivat artemisinin pada wanita hamil di awal trimester, namun memperbolehkan penggunaannya pada trimester kedua dan ketiga.³¹

2.1.5. Kombinasi Dihidroartemisinin-Piperakuin

Dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) merupakan salah satu obat ACT kombinasi tetap yang diberikan per oral sekali sehari selama 3 hari. DHP merupakan salah satu lini pertama pengobatan malaria tanpa komplikasi di Indonesia. Tiap satu tablet DHP mengandung 40 mg dihidroartemisinin dan 320 mg piperakuin. Kisaran dosis tunggal harian DHA 2-4 mg/kgBB dan piperakuin (PPQ) 16-32 mg/kgBB.⁴⁹ Penelitian yang dilakukan di Jayapura dan Maumere memperlihatkan efektivitas dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) terhadap malaria mencapai 97%.²⁹

Piperakuin merupakan senyawa biskuinolin yang secara struktur terkait dengan klorokuin dan 4-aminokuinolin lainnya. Piperakuin menggantikan klorokuin sebagai terapi lini utama malaria pada tahun 1978 di Cina, dan terjadi resistensi piperakuin pada akhir 1980. Piperakuin bersifat lipofilik dengan bioavailibilitas oral yang rendah dan absorpsinya meningkat jika diberikan bersama makanan tinggi lemak. Piperakuin mempunyai volume distribusi yang besar 600-900 L/kg, klirens 0,9-1,4 l/jam/kg, dan waktu paruh panjang 20-30 hari (2-3 minggu). Piperakuin bekerja melalui hambatan kimia dari detoksifikasi heme parasit. Obat ini dimetabolisme oleh CYP3A4. Kecepatan rata-rata ekskresinya menurun setelah pemberian dosis berulang. Obat ini bersifat lipofilik dan sangat mudah diserap, dengan T_{max} 2 jam setelah pemberian dosis tunggal. Piperakuin merupakan obat dengan potensi kardiotoxik dan dapat memperpanjang interval QRS dan QT serta dapat menyebabkan hipotensi postural dan hipoglikemia. Artemisinin juga dapat memperpanjang interval QT, sehingga penggunaan keduanya secara sinergis meningkatkan resiko kardiotoxikitas.⁵⁰

Dihidroartemisinin-piperakuin sebenarnya merupakan obat yang cukup aman, namun penelitian terbaru yang dilakukan pada hewan coba terhadap DHP dengan

dosis terapi dan *double* dosis terapi memperlihatkan peningkatan yang signifikan terhadap ureum, kreatinin, bilirubin, ALP, ALT, AST, GGT, kolesterol total, HDL, dan LDL. Penelitian ini juga memperlihatkan penurunan asam askorbat hati dan GSH serta penurunan aktivitas enzim katalase hati dan SOD pada hewan coba yang menerima DHP dosis ganda.³³

Penelitian farmakokinetik DHP pada anak di Thailand menjelaskan bahwa anak mempunyai volume distribusi sentral yang kecil dan waktu paruh yang pendek. Pada penelitian ini memperlihatkan kadar piperakuin yang tinggi pada awal terapi dan kemudian menurun secara cepat. Kadar plasma piperakuin yang rendah mencapai periode kritis pada 3-20 hari setelah mulai pengobatan, sehingga pada anak resiko rekrudensi dan reinfeksi meningkat dibandingkan populasi yang lain. Meningkatnya kegagalan terapi pada anak telah ditemukan di Papua barat dengan ditemukannya kadar $AUC_{(3-20)}$ piperakuin yang rendah pada hari ke 7 terapi. Respon terapi pada awal pengobatan ditentukan hampir seluruhnya oleh DHA, jadi kadar piperakuin yang tinggi pada awal pengobatan tidaklah terlalu menguntungkan. Namun, setelah siklus aseksual kedua (> 4 hari), semua DHA telah dieliminasi dan eradikasi parasit sepenuhnya tergantung pada piperakuin.⁵⁰

Tarning dkk⁵¹ meneliti farmakokinetik DHP pada wanita hamil dengan malaria tanpa komplikasi. Pada penelitiannya terlihat penurunan bioavailabilitas DHA sebesar 38% dan terjadi peningkatan eliminasi klirens piperakuin sebesar 45%. Waktu paruh piperakuin yang memendek dan bioavailabilitas DHA yang menurun dapat menimbulkan kegagalan pengobatan dan ancaman terjadinya resistensi pengobatan. Pada wanita hamil aktivitas enzim sitokrom (seperti CYP3A4 dan CYP2D6) dan UGT meningkat (seperti UGT1A4 dan UGT2B7) sehingga menyebabkan meningkatnya kecepatan metabolisme obat-obat yang dimetabolisme oleh enzim tersebut. Mekanisme induksi enzim-enzim tersebut selama kehamilan juga dapat meningkatkan metabolisme lintas pertama DHA dan mempercepat klirens.

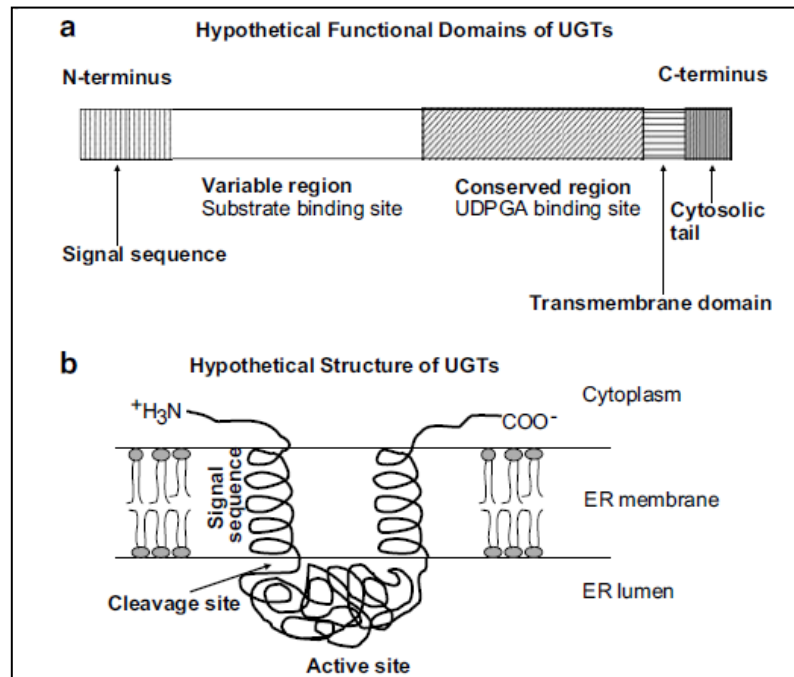
2.2. Uridin difosfat glukuronosiltransferase (UGT) 2B7

Proses metabolisme obat pada manusia terdiri dari dua fase. Pada fase pertama, terjadi reaksi oksidasi, reduksi, dan hidrolisis yang mengubah obat menjadi lebih polar, sehingga obat menjadi inaktif, lebih aktif atau kurang aktif. Sedangkan pada fase kedua merupakan reaksi konyugasi dengan substrat endogen yaitu asam glukuronat, asam sulfat, asam asetat, atau asam amino, dan hasilnya menjadi sangat polar, dengan demikian hampir selalu tidak aktif. Pada fase pertama, enzim sitokrom P450, khususnya CYP3A4/5 merupakan enzim pemetabolisme utama yang banyak ditemukan. Pada fase dua, glukuronidasi merupakan reaksi metabolisme terpenting dan sebagian besar diperantarai oleh enzim uridin difosfat (UDP)-glukuronosiltransferase (UGT). Reaksi glukuronidasi dan sulfasi mengakibatkan pembentukan metabolit dengan koefisien partisi air-lipid yang tinggi, sehingga lebih larut dalam air dan memfasilitasi akumulasi metabolit dibagian sel/tubuh yang kaya air agar mudah dikeluarkan. Sedangkan reaksi asetilasi dan sulfasi menginaktifkan aktivitas biologis obat melalui perubahan kecil pada muatan molekul sehingga berpengaruh pada daya larutnya.⁵²

UGT banyak diekspresikan di hati, dan juga di jaringan ekstrahepatik seperti saluran cerna, ginjal, otak, kulit, paru-paru, payudara, epitel olfaktorius, jaringan adiposa, plasenta, ovarium, prostat, testis dan kelenjar adrenal. UGT mentransfer sebagian asam glukuronat dari *uridine diphosphoglucuronic acid* (UDPGA) ke gugus fungsional (hidroksil, karboksil, amino, sulfur) dari substrat spesifik sehingga terbentuk *β -D-glucoopyranosiduronic acids* (glukuronida). Glukuronida ini kemudian akan dipotong oleh enzim *β -glucuronidase* agar mudah diekskresikan melalui empedu atau urin.^{19, 53} Proses glukuronidasi pada umumnya menghasilkan metabolit yang inaktif, namun dapat juga menghasilkan metabolit yang aktif/toksik.⁵⁴ Enzim fase II banyak ditemukan di sitosol, kecuali UGT yang merupakan enzim mikrosomal.^{19, 53} Struktur UGT dapat dilihat pada Gambar 2.4.

Sebanyak 31 UGT telah berhasil diidentifikasi pada manusia dan dikelompokkan kedalam empat famili yaitu *UGT1*, *UGT2*, *UGT3* dan *UGT8*. Penulisan nama gen (*nomenclature*) yang direkomendasikan adalah huruf kapital dan

cetak miring (*italic*), sedangkan untuk cDNA, mRNA, protein dan enzim menggunakan huruf kapital dan tanpa cetak miring untuk semua spesies.^{20, 55}



Gambar 2.4. Struktur UGT2B7

Struktur fungsional dan hipotetikal dari UGT2B7.⁵⁶

Famili UGT1 terletak di kromosom 2q37, mempunyai panjang sekitar 200 kb dan terdiri dari 13 promotor pada ekson 1 serta ekson 2-5 yang saling berbagi. Famili *UGT2* dibagi menjadi dua subfamili yaitu *UGT2A* dan *UGT2B*. Setiap gen *UGT2* terdiri dari 6 ekson dan tidak saling berbagi antara anggota famili *UGT2*, kecuali *UGT2A1* dan *UGT2A2*. Karena anggota disetiap famili *UGT2* secara umumnya mempunyai > 70% sekuens yang sama, maka sangat sulit untuk mengidentifikasi ortolog semua spesies. Gen *UGT2* berlokasi di kromosom 4q13 dan terdiri dari 3 anggota subfamili *UGT2A* dan 12 anggota (7 gen dan 5 pseudogen) subfamili *UGT2B*. *UGT3* mempunyai 7 ekson yang terletak di kromosom 5p13.2, sedangkan *UGT8* mempunyai 5 ekson yang terletak di kromosom 4q26.^{20, 53, 55}

2.2.1. Peran enzim UGT2B7

Enzim UGT, terutama *UGT1* dan *UGT2*, sangat penting dalam proses detoksifikasi, karena mereka lebih efisien menggunakan UDP asam glukuronat sebagai donor *glycosyl*, sehingga lebih larut air dan mudah dikeluarkan.^{57, 58} Protein famili *UGT2* mempunyai spesifisitas yang lebih besar dalam reaksi glukuronidasi substrat endogen. UGT2B7 adalah kelompok besar (superfamili) enzim yang berperan penting dalam metabolisme berbagai substrat endogen (asam empedu, steroid, bilirubin, vitamin yang larut dalam lemak, retinoid, lipid, dan hormon) maupun eksogen (obat, karsinogen, polutan, bahan berbahaya di lingkungan, dan sebagainya).⁵³ Penelitian William JA dkk⁵⁹ menyatakan bahwa dari 200 obat yang sering diresepkan di Amerika, sepertujuhnya mengalami glukuronidasi dan sebagian besar reaksi tersebut dimetabolisme oleh UGT2B7 (35%).

2.2.2. Polimorfisme *UGT2B7*

Beberapa studi menunjukkan adanya polimorfisme dan mutasi pada gen *UGT2B7*. Gen *UGT2B7* merupakan gen *UGT2B* utama pada manusia. Penelitian yang dilakukan pada populasi di Afrika Barat, Papua New Guinea, dan Amerika Utara memperlihatkan lebih banyak polimorfisme pada gen *UGT2B7* dibandingkan dengan *UGT1A9*.²¹ Sejauh ini telah diketahui 3 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) nonsinonimus pada *UGT2B7*. Polimorfisme *UGT2B7* nonsinonimus yang telah ditemukan pada populasi adalah polimorfisme 211G>T pada ekson 1, 802C>T pada ekson 2, dan 1192G>A pada ekson 5.²¹ Polimorfisme nonsinonimus merupakan mutasi pada nukleotida yang mengubah asam amino. Sedangkan polimorfisme sinonimus tidak mengubah asam amino dan dikenal dengan sebutan *silent mutation/silent substitution*. Polimorfisme atau mutasi dapat terjadi di daerah promotor, intron, dan exon. Frekuensi polimorfisme *UGT2B7* pada populasi yang telah dilakukan oleh berbagai studi dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Berbagai penelitian polimorfisme *UGT2B7*

Kriteria	Tahun	Oleh	UGT	Populasi	%	Ref
Obat Non Malaria						
Morfin	2003	Hirota	<i>UGT2B7</i> 211 G>T	Jepang	18,5%	24
	2003	Hirota	<i>UGT2B7</i> 802 C>T	Jepang	29,3%	
(-)	2004	Saeki	<i>UGT2B7</i> 1192 G>A	Jepang	0,4%	25
	2004	Saeki	<i>UGT2B7</i> 802 C>T	Jepang	25,4%	
	2004	Saeki	<i>UGT2B7</i> 211 G>T	Jepang	17,3%	
	2000	Bhasker	<i>UGT2B7</i> 802 C>T	Kaukasia	48,9%	27
	2000	Bhasker	<i>UGT2B7</i> 802 C>T	Jepang	26,8%	
Obat Malaria						
Dihidroartemisinin	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 211G>T	Asia Amerika	9%	21
	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 211G>T	Hispanik-Amerika	2%	
	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 802C>T	Afrika Barat	21%	
	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 802C>T	Papua New Guinea	28%	
	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 802C>T	Amerika Utara	28-52%	
	2007	Rajeev	<i>UGT2B7</i> 1192G>A	Afrika Barat, Papua New Guinea, Amerika Utara	0 %	

Polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 memperlihatkan adanya mutasi nonsinonimus jika terjadi perubahan asam amino di posisi 71 yaitu Alanin (Ala) menjadi Serin (Ser), atau terjadi perubahan untaian urutan basa GCT menjadi TCT pada basa nukleotida di posisi ke 211 yaitu Guanin (G) menjadi Timin (T). Polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 memperlihatkan adanya mutasi nonsinonimus jika terjadi perubahan asam amino di posisi 268 yaitu Histidin (His) menjadi Tirosin (Tyr), atau terjadi perubahan untaian urutan basa CAT menjadi TAT pada basa nukleotida di posisi ke 802 yaitu Sitosin (C) menjadi Timin (T). Polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 memperlihatkan mutasi nonsinonimus jika terdapat perubahan asam amino di posisi

398 yaitu asam Aspartat (Asp) menjadi Asparagin (Asn), atau terjadi perubahan urutan basa GAT menjadi AAT pada basa nukleotida di posisi ke 1192 yaitu Guanin (G) menjadi Adenin (A).

Fungsi signifikan dari polimorfisme 211G>T belum jelas diketahui dan penelitian terhadap polimorfisme ini masih sangat terbatas, namun diketahui bahwa kodon 71 terletak di bagian N-terminal tempat ikatan dengan substrat dan ikatan enzim-substrat tersebut dapat menyebabkan perubahan substrat dari lipofilik menjadi hidrofilik sehingga mudah diekskresi.²⁵ Fungsi signifikan dari polimorfisme 802C>T terhadap metabolisme dihidroartemisinin juga masih belum diketahui, namun terdapat beberapa penelitian dengan obat lain yang juga dimetabolisme oleh enzim yang sama diperkirakan dapat menggambarkan fungsi dari polimorfisme gen penyandi enzim ini.⁶⁰⁻⁶³

Polimorfisme 1192G>A juga belum diketahui dampak klinisnya, namun diketahui bahwa lokasi D398 terletak di bagian tengah akhir (bagian tempat ikatan UDP-asam glukuronat). Adanya perubahan asam amino diduga berpengaruh pada tempat ikatan tersebut. Suatu studi menyatakan bahwa polimorfisme tersebut menurunkan aktivitas glukuronidasi *7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin* in vitro dibandingkan dengan tipe normal (*unpublish data*).²⁵

2.3. Perbedaan populasi dalam farmakogenetik dan dampak klinis

Keragaman genetik terjadi akibat adanya perbedaan pada genom manusia.⁶⁴ Istilah polimorfisme genetik secara umum didefinisikan sebagai variasi pada sekuens DNA yang diwariskan dan terjadi dengan frekuensi minimal 1 % dalam populasi. Dua tipe utama variasi sekuens yang telah dihubungkan dengan variasi pada fenotip pada manusia yaitu *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan *insertion/deletion* (*indels*). Dari kedua tipe tersebut, SNP merupakan penyebab paling umum dari variasi DNA. SNP adalah mutasi dari 1 pasang basa pada lokus spesifik yang umumnya terdiri dari dua alel.⁶⁵ Pada genom manusia ditemukan sekitar 1 SNP setiap seratus sampai tiga ratus pasang basa, tergantung daerah gen.^{64, 66} Sebagian besar SNP tidak menimbulkan perubahan efek pada sel, organ atau fungsi tubuh, namun

sebagian dapat merupakan predisposisi terhadap suatu penyakit atau mempengaruhi respon tubuh terhadap obat jika terjadi indels atau SNP nonsinonimus. Obat yang sama dengan dosis yang sama, dapat memberikan efek yang berbeda pada orang yang memiliki genetik yang berbeda.

Perbedaan respon obat antar individu yang berhubungan dengan varian sekuens pada gen yang menyandi enzim pemetabolisme obat, transporter obat, atau target obat dipelajari dalam farmakogenetik. Farmakogenetik merupakan salah satu bidang farmakologi klinik yang mempelajari variasi respon obat yang disebabkan oleh faktor genetik. Ilmu ini berawal dari pengamatan klinis mengenai kejadian efek samping, atau profil farmakokinetik yang tidak lazim terhadap obat yang diberikan dalam dosis standar, yang hanya terjadi pada sejumlah kecil individu. Kepentingan dari studi farmakogenetik ini adalah untuk mengetahui atau mengenali individu-individu dalam populasi atau kelompok etnik tertentu yang mempunyai varian genetik berbeda, yang dapat bereaksi atau mendapatkan respons obat yang tidak sewajarnya dibandingkan anggota populasi lain pada umumnya, sehingga dapat dilakukan upaya-upaya pencegahan, misalnya dengan menyesuaikan besar dosis atau dengan menghindari pemakaian obat tertentu pada individu tertentu/etnik tertentu.⁶⁷

Keragaman genetik dalam populasi menyebabkan terjadinya subpopulasi dengan kemampuan metabolisme yang berbeda. Subpopulasi *poor metabolizers* (pemetabolisme lambat, PM), memiliki dua alel mutan homozigot sehingga kemampuan metabolisme pada subpopulasi ini rendah. Subpopulasi *intermediary metabolizers* (pemetabolisme menengah, IM), memiliki satu alel mutan heterozigot. Subpopulasi *extensive metabolizers* (pemetabolisme cepat, EM), memiliki dua alel normal sehingga mempunyai kemampuan metabolisme tinggi. Subpopulasi *ultrarapid metabolizers* (pemetabolisme ultracepat=UM) memiliki copy gen lebih dari dua.⁶⁸

Subpopulasi EM dan UM memetabolisme obat dengan sangat cepat sehingga mengakibatkan rendahnya kadar obat dalam plasma, akibatnya terjadi kegagalan pengobatan. Sebaliknya, subpopulasi PM memetabolisme obat dengan lambat sehingga meningkatkan kadar obat dalam plasma yang mengakibatkan terjadinya

toksisitas. Namun, kegagalan pengobatan juga dapat dialami oleh supopulasi PM jika obat diberikan dalam bentuk *pro-drug* yang memerlukan bioaktivasi terlebih dahulu.³⁴ Efek farmakologis suatu obat dipengaruhi oleh berbagai faktor, oleh karena itu polimorfisme genetik enzim pemetabolisme obat belum tentu menimbulkan dampak klinis yang bermakna. Polimorfisme genetik enzim pemetabolisme obat memiliki relevansi klinik bila enzim yang polimorfik itu besar peranannya dalam proses metabolisme obat dan obat yang dimetabolismenya mempunyai indeks terapeutik yang kecil.

Keragaman farmakogenetik terjadi pada subpopulasi yang berbeda etnik atau ras dengan frekuensi yang berbeda. Contohnya, polimorfisme asetilasi menimbulkan dampak klinis berupa neurotoksisitas isoniazid, reaksi hipersensitifitas terhadap sulfonamid dan lupus yang dipicu oleh hidralazin. Frekuensi PM mutasi gen *NAT2* (*N-acetyltransferase 2*) cukup tinggi pada populasi Afrika (32-80%), Asia (27-69%), dan Kaukasia (73-89%). *CYP2D6* merupakan enzim yang terlibat dalam metabolisme berbagai macam obat, terutama antidepresan, antipsikotik, analgesik, antiaritmia, antimalaria dan antiemetik. Frekuensi PM akibat mutasi gen *CYP2D6* paling banyak dialami oleh orang kulit putih (8%), UM sering terjadi di Afrika Utara (5%), sedangkan IM banyak ditemukan di Asia (51%). Polimorfisme *CYP2B6*, terutama *CYP2B6*6* yang dapat mengakibatkan penurunan aktivitas enzim, telah ditemukan pada beberapa populasi yang berbeda termasuk populasi Kaukasia (15-25%), Afrika (25-49%) dan Asia (12-19%). *CYP2B6*6* dihubungkan dengan naiknya kadar plasma obat sehingga dapat terjadi toksisitas. Demikian juga dengan mutasi *CYP2C8*2* memperlihatkan penurunan metabolisme sekitar 50% dan *CYP2C8*3* sekitar 85%. Frekuensi *CYP2C8*2* ditemukan sebesar 18% terdapat pada populasi kulit hitam, namun sangat jarang pada populasi kulit putih, sebaliknya *CYP2C8*3* ditemukan paling banyak di populasi kulit putih (23%).⁶⁹ Polimorfisme gen *VKORC1* (*vitamine K epoxidase reductase complex subunit 1*) -1639 G>A (AA) dan 1173 C>T (TT) pada penggunaan warfarin banyak ditemukan pada populasi Cina (82-85%) dan memiliki resiko perdarahan yang lebih besar dari pasien pembawa alel *wild-type*, sehingga perlu dilakukan penurunan dosis pada pasien dengan mutasi tersebut.^{67, 70-72}

Dampak klinis polimorfisme UGT1A1*6 baik homozigot maupun heterozigot dikaitkan dengan toksisitas dari irinotekan dan banyak ditemukan pada populasi Jepang, demikian halnya dengan polimorfisme pada transporter BCRP (*breast cancer resistance protein*) yang banyak ditemukan di Asia.

2.4. Biomolekuler untuk deteksi polimorfisme

Polimorfisme gen *UGT2B7* dapat dinilai pada tingkat fenotip maupun genotip. Penilaian fenotip dapat dilakukan dengan pengukuran AUC (*area under the plasma concentration versus time curve*) senyawa induk di dalam plasma dan rasio senyawa induk terhadap metabolit di dalam plasma atau urin setelah pemberian obat penanda aktivitas enzim (*marker drug*). PM memiliki rasio metabolit terhadap obat di dalam urin yang relatif lebih rendah.^{73, 74} Metode ini memberikan indikasi tentang aktivitas enzim tetapi tidak dapat mengidentifikasi apakah variabilitas disebabkan oleh faktor genetik atau hal-hal lain.

Penentuan genotip (*genotyping*) memberikan informasi langsung mengenai alel gen *UGT2B7* yang ada tetapi interpretasi yang akurat memerlukan pemahaman mengenai hubungan antara tipe genotip tertentu dengan fenotipnya. Polimorfisme gen *UGT2B7* dapat dideteksi dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction*.

2.4.1. Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah metode enzimatik yang ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983 dan digunakan untuk memperbanyak suatu sekuens DNA tertentu secara invitro.⁷⁵ PCR banyak digunakan untuk kepentingan medis maupun penelitian biologis, seperti deteksi penyakit hereditas, identifikasi sidik jari genetik, diagnosis penyakit infeksi, kloning gen, test paternitas dan menghitung DNA. Untuk reaksi ini diperlukan deoksinukleotida sebagai sumber energi dan nukleosida untuk sintesis DNA, enzim DNA polimerase, sepasang primer (*forward* dan *reverse*), cetakan DNA (*template*), dan larutan dasar (*buffer*) yang mengandung magnesium. Primer yang terdiri dari oligonukleotida untai tunggal selain sebagai pelacak, juga sebagai pembatas fragmen untai DNA yang akan

digandakan.⁷⁵ Cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi PCR merupakan DNA hasil isolasi dari dot blot dengan metode Chelex-100 (Wooden).⁷⁶

Proses PCR berlangsung dalam tiga tahap yaitu denaturasi cetakan DNA oleh panas, annealing primer oligonukleotida terhadap sekuens target untai tunggal, dan ekstensi (pemanjangan) primer oleh *thermostable* DNA polimerase. Denaturasi bertujuan untuk memisahkan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Suhu denaturasi dapat ditentukan oleh kandungan nukleotida G+C dan panjang molekul DNA. Semakin besar proporsi G+C dan semakin panjang molekul DNA, semakin tinggi temperatur yang diperlukan untuk memisahkan kedua rantai DNA. Annealing bertujuan untuk meletakkan primer ke dalam cetakan DNA. Pada tahap annealing, primer terikat pada rantai tunggal dengan suhu tertentu. Jika suhu terlalu tinggi, oligonukleotida primer kurang menempel sehingga amplifikasi sangat rendah. Jika terlalu rendah, annealing primer yang nonspesifik dapat terjadi dan menghasilkan amplifikasi segmen DNA yang tidak dikehendaki.⁷⁷ Ekstensi merupakan proses penyelesaian pemanjangan primer menggunakan untai tunggal DNA sebagai cetakannya sehingga menghasilkan DNA untai ganda. Proses pemanjangan primer oleh DNA polimerase berlangsung dari arah 5'P ke 3'OH. Satu siklus denaturasi, annealing dan ekstensi memerlukan waktu beberapa menit. Jumlah siklus yang diperlukan untuk amplifikasi tergantung jumlah kopi template DNA yang ada pada awal reaksi dan efisiensi ekstensi primer dan amplifikasi. Setelah proses berlangsung beberapa siklus (biasanya 25-35 siklus), sekuens diantara kedua primer (termasuk sekuens primer) meningkat secara eksponensial.⁷⁵

PCR mempunyai beberapa keuntungan, pertama, dapat digunakan dengan jumlah DNA yang relatif sedikit (dalam nanogram), kedua, tidak membutuhkan kloning gen sehingga lebih cepat daripada teknik lain, ketiga, jarang menggunakan probe radioaktif untuk mendeteksi sekuens DNA spesifik atau mutasi. Namun PCR juga memiliki beberapa kekurangan, seperti perlunya pengetahuan untuk membuat primer yang khusus dapat mengidentifikasi sekuens yang diinginkan, PCR yang tinggi sensitifitasnya sangat rentan terhadap kontaminasi, dan tidak dapat digunakan untuk mendeteksi adanya delesi yang besar.

2.4.2. Elektroforesis DNA

Elektroforesis merupakan serangkaian teknik yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA berdasarkan karakteristik fisiknya, seperti ukuran, bentuk, atau titik isoelektrik melalui muatan elektrik. Teknik ini banyak dipakai di forensik, biologi molekular, genetika, mikrobiologi, dan biokimia. Elektroforesis DNA dapat menggunakan gel agarosa, poliakrilamid, atau komposit agarosa-akrilamid. Visualisasi fragmen DNA dilakukan secara dengan tehnik elektroforesis yang memanfaatkan medan listrik untuk mengukur tingkat migrasi molekul bermuatan dalam cairan. Pemisahan atau perpindahan molekul-molekul dalam elektroforesis antara lain dipengaruhi oleh ukuran molekul dan konsentrasi gel. DNA memiliki muatan negatif pada pH netral sehingga ketika dimasukkan ke dalam sumur gel yang terletak pada ujung katoda, DNA akan bergerak ke arah anoda. Mobilitas fragmen DNA tergantung pada ukuran DNA dan tidak tergantung pada sekuens atau jenis basa penyusunnya.⁷⁸ Lokasi DNA dalam gel dapat ditentukan secara langsung dengan pewarnaan oleh konsentrasi rendah *fluorescent intercalating dyes*, misalnya etidium bromida.⁷⁹ Apabila DNA terdiri atas banyak fragmen dengan berbagai ukuran, fragmen-fragmen tersebut akan terpisah dan terlihat sebagai pita-pita.

Gel agarosa merupakan gel yang umum digunakan untuk proses elektroforesis DNA. Gel tersebut digunakan untuk memisahkan fragmen DNA untai ganda dengan panjang 70 pb (konsentrasi 3%) sampai 800.000 pb (konsentrasi 0,1%).⁷⁸ Faktor-faktor yang menentukan kecepatan migrasi DNA melalui gel agarose adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, konformasi DNA, etidium bromida dalam gel dan buffer elektroforesis, voltase yang diberikan, tipe agarose, dan buffer elektroforesis. Selain gel agarosa, etidium bromida juga diperlukan dalam proses visualisasi DNA. Etium bromida akan menyusup di antara nukleotida dan menyerap sinar UV pada panjang gelombang 300 nm. Oleh karena itu, ketika gel dipaparkan sinar UV pita-pita DNA akan berpendar. Panjang fragmen sampel DNA dapat diketahui dengan cara membandingkannya dengan penanda atau marka DNA.⁷⁸

2.4.3. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA adalah teknik penentuan urutan nukleotida yang terdapat di dalam suatu fragmen DNA.^{80, 81} Dua metode yang dapat digunakan untuk melakukan sekuensing DNA yaitu metode pemotongan DNA secara kimiawi (bukan dengan enzim) yang dikembangkan oleh Maxam-Gilbert dan metode Sanger yang menggunakan enzim. Metode Sanger merupakan metode yang sering digunakan. Metode ini dikembangkan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977 dan dikenal sebagai metode terminasi rantai atau *Sanger sequencing*.⁸² Sekuensing DNA digunakan terutama untuk mengkarakterisasi klon DNA baru, untuk mengkonfirmasi klon atau mutasi, untuk mengetahui ketepatan mutasi baru, hubungan ligasi, produk PCR; dan untuk beberapa kasus, sebagai sarana skrining untuk mengidentifikasi polimorfisme dan mutasi pada gen tertentu.⁷⁹

Pada metode ini cetakan DNA untai tunggal ditambahkan ke dalam empat campuran reaksi yang terdiri dari DNA polimerase, 4 deoksinukleotida (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) yang telah dilabel radioaktif dan primer oligonukleotida. Satu dari 4 deoksinukleotida (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ditambahkan pada masing-masing campuran reaksi. Dideoksinukleotida (ddNTP) ini akan berkompetisi dengan deoksinukleosida (dNTP) untuk berikatan dengan ujung 3' untai DNA yang sedang diperpanjang. ddNTP tidak memiliki gugus 3'OH, sehingga begitu ddNTP bergabung, untai DNA tidak lagi memiliki gugus 3'OH dan tidak ada lagi nukleotida lain yang dapat ditambahkan. Hal ini mengakibatkan terhentinya proses polimerasi DNA. Dengan cara ini dari empat reaksi sintesis akan diperoleh empat kelompok polinukleotida yang berbeda yang diakhiri dengan basa ddNTP tertentu pada ujung pemanjangan fragmen dan dengan panjang fragmen beragam, sementara ujung fragmen yang lainnya identik. Pada proses elektroforesis diperoleh suatu undakan urutan DNA yang panjangnya berbeda-beda dengan ddNTP tertentu pada ujung akhir pemanjangan. Metode DNA sequencing yang sering digunakan sekarang adalah automated DNA sequencing yang merupakan pengembangan metode Sanger sequencing menggunakan mesin DNA sequencer.⁸⁰

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Disain penelitian

Penelitian deskriptif.

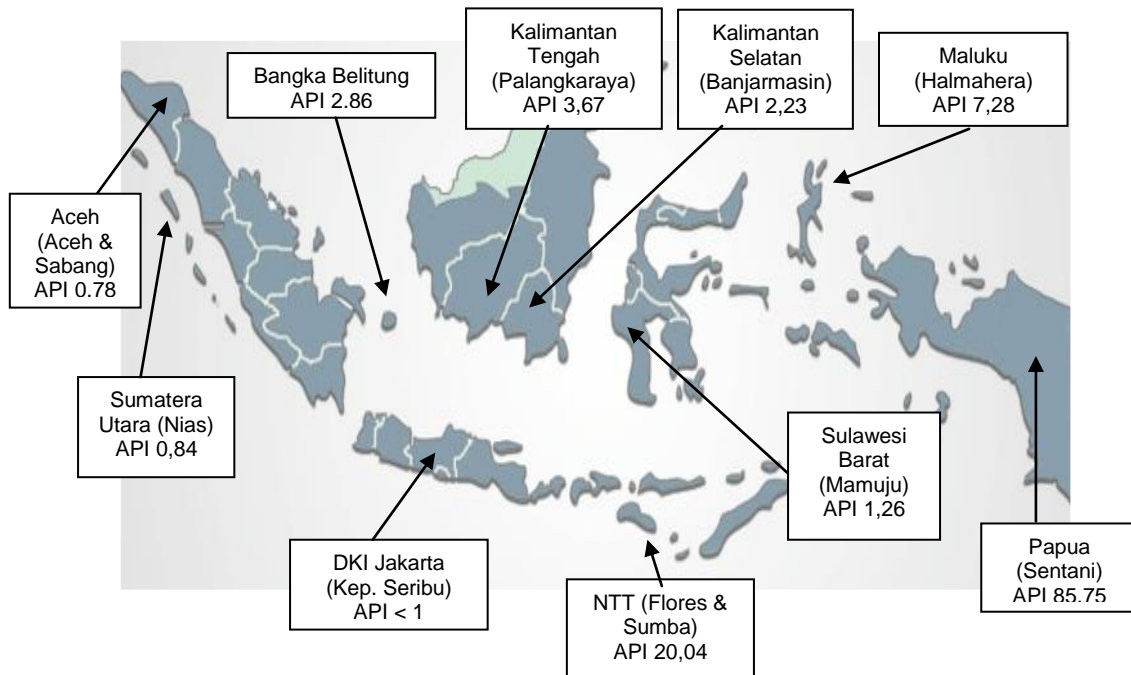
3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, pada bulan April sampai September 2013.

3.3. Sampel penelitian

Sampel merupakan sampel anonim bahan biologis tersimpan di laboratorium malaria Lembaga Biologi Molekular Eijkman. Pengambilan sampel tersebut dilakukan melalui *mass blood survey* (MBS) pada populasi di dua belas daerah endemik malaria (Gambar 3.1.) yang bervariasi endemisitasnya yaitu empat daerah hipoendemik dan delapan daerah hiperendemik. Daerah hipoendemik dengan $API < 1$ adalah Provinsi Aceh (Sabang dan Aceh), Sumatera Utara dan DKI Jakarta. Daerah hiperendemik dengan $API \geq 1$ yaitu Bangka Belitung, Kalimantan Tengah, Kalimantan Selatan, Maluku Utara, Sulawesi Barat, Nusa Tenggara Timur (Sumba dan Flores), dan Papua.

Pengambilan sampel melalui MBS dilakukan di daerah endemis malaria, tanpa memandang data demografis, etnisitas, silsilah, status kesehatan dan status pengobatan partisipan. Sampel dipilih secara random sederhana sebanyak 10% (20 sampel) dari total bahan biologis tersimpan dari setiap daerah endemik sehingga total sampel yang dianalisis adalah 240 sampel.



Gambar 3.1. Dua belas daerah endemik malaria di Indonesia

Pengambilan sampel di dua belas daerah endemik malaria berdasarkan nilai API⁴

3.4. Batasan operasional

Annual Parasite Incidens (API): angka kesakitan malaria (berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium) per 1000 penduduk dalam satu tahun dan dinyatakan dalam permil ‰.

Menurut WHO malaria report (2008) :

Daerah endemisitas rendah (hipoendemik) : < 1 per 1000 penduduk per tahun

Daerah endemisitas tinggi (hiperendemik) : ≥ 1 per 1000 penduduk per tahun

Daerah bebas malaria : tidak adanya kejadian malaria dalam beberapa tahun.

3.5. Analisis biomolekuler

Analisis biomolekuler untuk penentuan genotip gen *UGT2B7* terdiri dari beberapa tahap. Proses dimulai dengan isolasi DNA dari tetes darah di kertas saring. Isolat DNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan (*template*) dalam proses amplifikasi fragmen DNA gen target menggunakan teknik PCR (*polymerase chain reaction*). Setelah itu, dilakukan sekuensing DNA untuk memastikan apakah ampikon yang diperiksa sesuai dengan target DNA yang diinginkan.

3.6. Alat dan bahan

3.6.1. Alat

Semua alat yang digunakan dalam penelitian terdapat di laboratorium malaria Eijkman. Alat yang digunakan adalah mesin PCR thermocycle PE-9700 [Perkin Elmer], pipet mikropipeter [Eppendorf, FinnpiPETTE], *vortexer*, mesin sentrifugasi [Sorval®MC 12 V-DuPont], penangas air atau inkubator [Thermolyne], perangkat elektroforesis dan peralatan foto elektroforesis gel/*Gel doc* [BioRad], alat dan panci pemanas, kotak penyimpanan es (*ice box*), lemari pendingin, *microwave*, gelas ukur 250, 500, 1000, dan 2000 ml [Schott], dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

3.6.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, mulai dari tahap isolasi DNA sampai sekuensing adalah:

- a. Isolasi DNA : tetesan darah (*blood blot*) di kertas saring; 0,5% saponin dalam 1x *phosphate buffer saline* (PBS); 1x PBS pH 7,4; 20% *chelex-100* (BioRad®) dalam ddH₂O (akuabidest) steril dengan pH 10,5.
- b. Amplifikasi dengan PCR: isolat DNA; bahan campuran PCR yang terdiri dari 2,5 µL 10x PCR *buffer*, 0,5 µL MgCl₂, 0,5 µL dNTPs, 0,25 µL Taq DNA polimerase; primer (0,25 µL *forward* dan 0,25 µL *reverse*) untuk UGT2B7 ekson 1, UGT2B7 ekson 2, dan UGT2B7 ekson 5 dengan konsentrasi 40

pmol/ml; dan ddH₂O 18,3 µL. Primer yang dipakai pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Primer untuk amplifikasi *UGT2B7* ekson 1, 2 dan 5

Gen	Ekson	R/F	Primer	Panjang Produk PCR	Referensi
<i>UGT2B7</i>	1	Forward	5'- AAGGGTTACATTTTAACTTCTTGG-3'	934	Saeki dkk ²⁵
		Reverse	5'-ATTCACTTACCAAAAACCCCACT-3'		
<i>UGT2B7</i>	2	Forward	5'- GACAATGGGGAAAGCTGACG-3'	116	Zimmerman dkk ⁸³
		Reverse	5'- GTTTGGCAGGTTTGCAGTG-3'		
<i>UGT2B7</i>	5	Forward	5'- ACCGTATAGCCTTCAGTTACATAC-3'	744	Saeki dkk ²⁵
		Reverse	5'-AGAAAATGGTTATACTCTGAGGTG-3'		

- c. Elektroforesis pada gel agarosa: hasil amplifikasi, bubuk agarosa (Sigma-Aldrich®), 1x *Tris Acetate-EDTA* (TAE), etium bromida, dapar loading, dan marka (λ DNA/ava II).
- d. Sekuensing: produk PCR, *Membrane Binding Solution* (yang telah ditambahkan etanol 95%), 50 µL *Nuclease-Free Water*, primers 4 pmol sebanyak 0,5 µL, ddH₂O 1,5 µL, *big dye sequencing* 3 µL, 25 µL EtOH absolute, 1 µL 3 M sodium asetat, dan 25 µL EtOH 70%.
- e. Bahan lain: kertas parafilm [American National Can], plastik *clingwrap* dan *aluminium foil*; sarung tangan lateks, tabung Eppendorf 1,5 ml, 1 ml dan 0,5 ml, tip pipet mikropipiler kuning dan biru [LP Italiana Spa], serta tisu.

3.7. Cara kerja

Proses penentuan genotip gen *UGT2B7* terdiri dari beberapa tahap (lihat alur penelitian pada Gambar 3.5). Proses dimulai dengan isolasi DNA, kemudian isolat DNA tersebut digunakan sebagai cetakan dalam proses amplifikasi fragmen DNA gen target menggunakan teknik PCR, setelah itu, dilakukan sekuensing DNA.

3.7.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode *Chelex-100* (Wooden).⁷⁶ Pengambilan sampel untuk isolasi DNA diperoleh dari tusukan ujung jari tangan relawan dengan lanset secara aseptik, kemudian darah diteteskan pada kertas saring *Whatman*. Tetesan darah pada kertas saring tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam plastik kedap udara dan disimpan dalam suhu kamar sampai digunakan. Kertas saring yang mengandung tetesan darah dipotong kecil-kecil sekitar 1 cm² kemudian dimasukkan ke dalam tabung ukuran 1,5 mL. Pada setiap tabung 1,5 mL tersebut ditambahkan 1 mL larutan saponin 0,5%. Tabung dikocok perlahan beberapa kali, dan disimpan selama minimal 4 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit lalu supernatan dibuang.

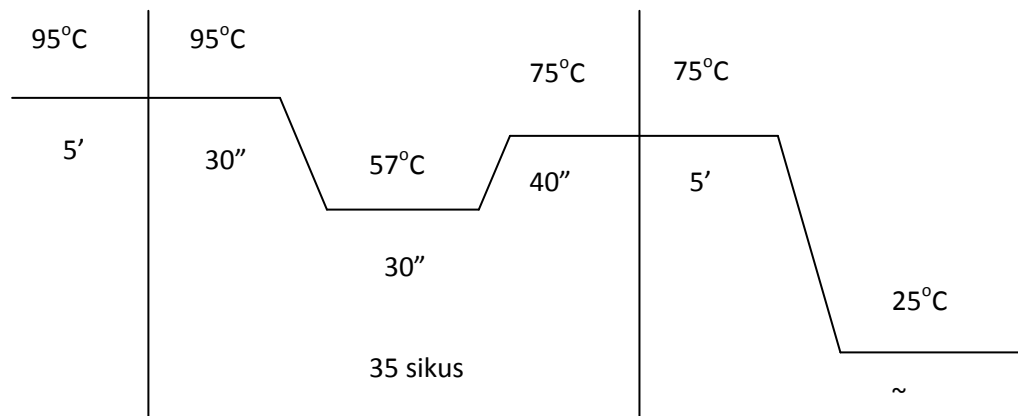
Pencucian dilakukan dengan menambahkan 1 mL PBS pada setiap tabung, kemudian tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, setelah itu supernatan dibuang. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali sampai sampel bebas dari eritrosit. Setelah itu, 100 µL ddH₂O steril dan 50 µL larutan *Chelex-100* 20% ditambahkan pada setiap tabung. Tabung kemudian direbus dalam air mendidih selama 10 menit, diselingi *vortexing* setiap 5 menit. Setelah itu tabung tersebut disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dipisahkan dari endapan *Chelex-100* dengan menggunakan pipet mikro, kemudian dipindahkan ke tabung ukuran 1,5 mL baru yang steril dan disimpan pada suhu -20°C, untuk digunakan sebagai bahan cetakan DNA (*DNA template*) untuk PCR.

3.7.2. Amplifikasi DNA dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*)

Untuk amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR dilakukan sebagai berikut: sampel DNA 2,5 µL ditambahkan pada bahan campuran PCR. Setelah itu dilakukan amplifikasi dengan kondisi PCR yang berbeda untuk masing-masing ekson.

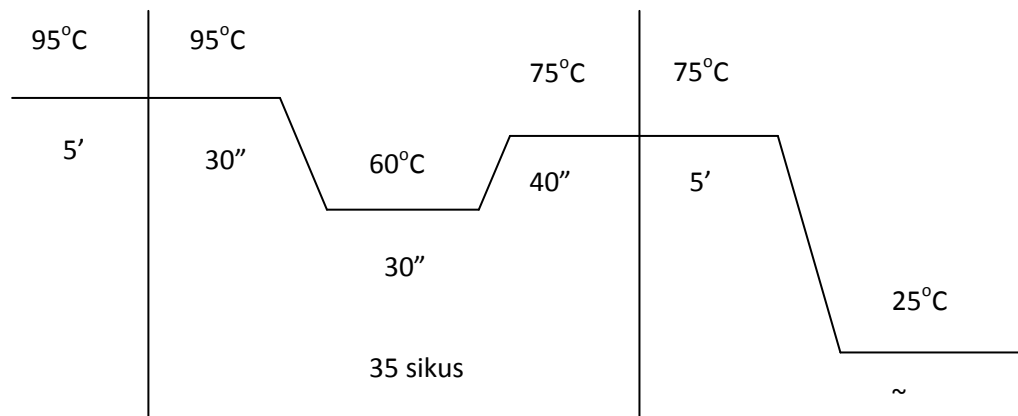
Kondisi PCR hasil optimasi laboratorium diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, kemudian amplifikasi dilakukan dengan cara denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik (suhu 57°C untuk UGT2B7 ekson 1, 60°C untuk UGT2B7 ekson 2 dan ekson 5) dan ekstensi

pada 72°C selama 40 detik untuk 35 siklus. Langkah ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit. Kondisi PCR untuk optimasi dapat dilihat pada Gambar 3.2 dan Gambar 3.3. Peta gen *UGT2B7* dengan fokus pada ekson 1, 2 dan 5 yang dalam penelitian ini diamplifikasi untuk mendeteksi polimorfisme *UGT2B7* 211G>T, 802C>T, 1192 G>A dapat dilihat pada Gambar 3.4.



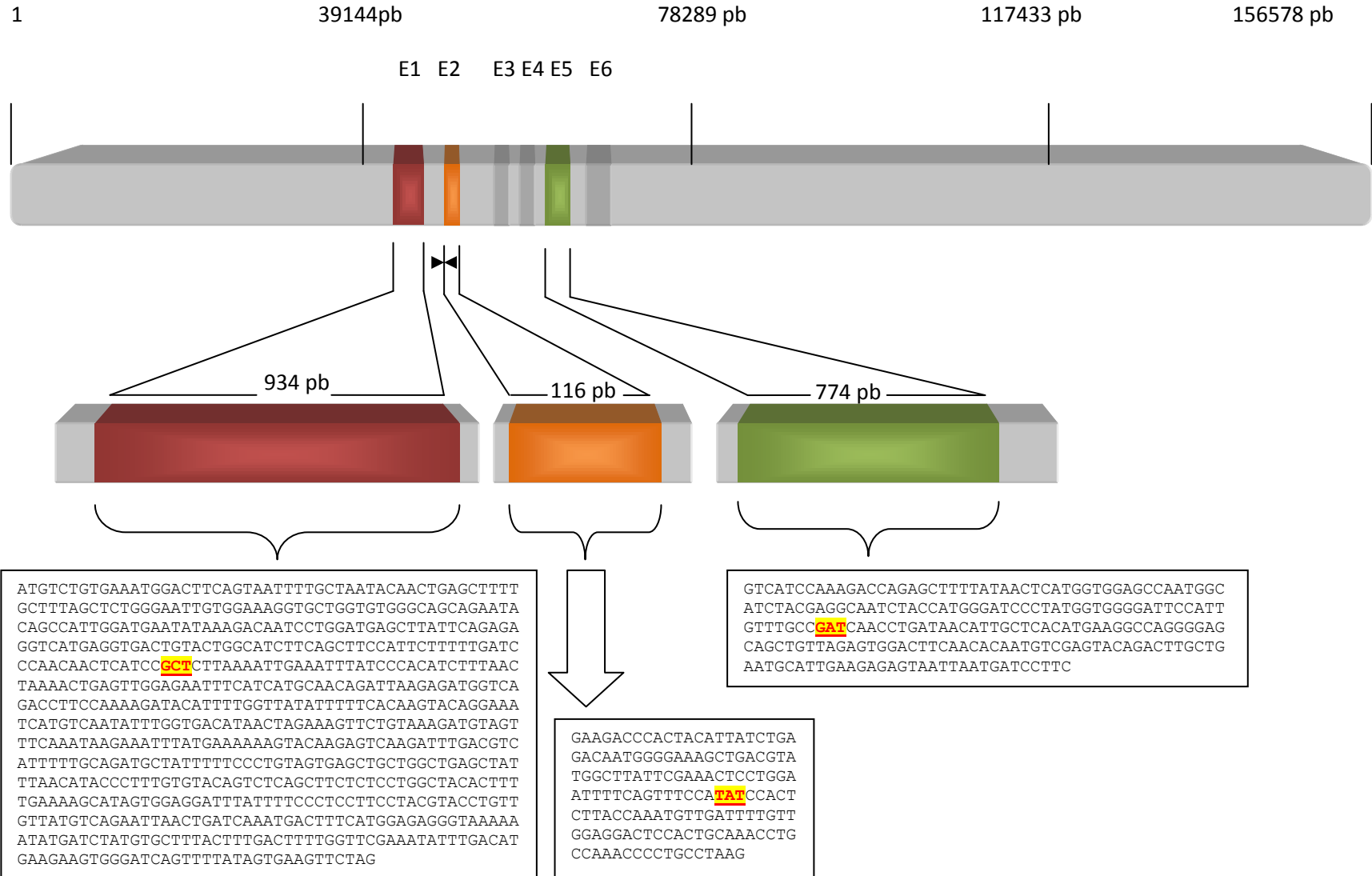
**Gambar 3.2. Kondisi PCR untuk primer pada tabel 3.1.
deteksi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1**

Kondisi PCR meliputi tiga tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi.



**Gambar 3.3. Kondisi PCR untuk primer pada tabel 3.1.
deteksi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 2 dan 5**

Kondisi PCR meliputi tiga tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi.



Gambar 3.4. Peta gen *UGT2B7* berdasarkan Bank gen AC 111000 (156578 pb)

3.7.3. Elektroforesis DNA

Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada 2% (w/V) gel agarosa yang dibuat dengan melarutkan 2 gram serbuk agarosa dengan 100 mL larutan 1x TAE. Larutan ini dipanaskan di dalam *microwave* selama 1,5 menit sampai agarosa larut dan homogen, lalu ditambahkan zat pewarna etidium bromida 10 μ L dan diaduk hingga merata, kemudian dipanaskan kembali selama 10 detik. Larutan agarosa kemudian dituangkan ke cetakan agar yang telah disisipi sisir untuk membentuk sumur-sumur. Setelah membeku agar dipindahkan ke aparatus elektroforesis *sub marine* yang berisi *buffer* 1x TAE.

Elektroforesis dilakukan memasukkan DNA hasil amplifikasi sebanyak 5 μ L ke dalam sumur-sumur pada gel agarosa dan mesin dijalankan dengan tegangan 70 volt selama 35-45 menit sampai hampir mencapai batas bawah gel. Visualisasi pita-pita DNA dilakukan menggunakan *gel-doc* (Bio-Rad) pada panjang gelombang UV 300 nm dan dibandingkan dengan marka DNA yang sesuai.

3.7.4. Sekuensing DNA

Tahapan sekuensing DNA meliputi purifikasi DNA, PCR sekuensing dan presipitasi. Data sekuensing kemudian dianalisis berdasarkan prosedur yang terdapat dalam *Automated DNA sequencing*. Mesin sekuenser yang digunakan adalah ABI3730XL (96 kapiler).

a. Purifikasi DNA

Purifikasi DNA dengan sentrifugasi dilakukan sebagai berikut : Produk PCR ditambahkan pada *Membrane Binding Solution* (yang telah ditambahkan etanol 95%). Satu SV *minicolumn* diletakkan pada *collection tube* untuk setiap reaksi PCR. Produk PCR dipindahkan ke SV *minicolumn* dan di inkubasi selama 1 menit dalam suhu kamar kemudian disentrifugasi dalam mikrosentrifus pada 12.000 rpm selama 1 menit. SV *minicolumn* dipindahkan dari *spin column* dan cairan dibuang dari *collection tube*, kemudian SV *minicolumn* diletakkan kembali pada *collection tube*.

Column dibersihkan dengan cara menambahkan 700 μL *membrane wash solution* (MWS) yang telah diencerkan dengan etanol 95% pada SV *minicolumn*. SV *minicolumn* disentrifugasi dalam mikrosentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. *Collection tube* dikosongkan sama seperti sebelumnya dan SV *minicolumn* ditempatkan kembali di *collection tube*. Ulangi pembersihan dengan 500 μL MWS dan sentrifugasi selama 5 menit pada 12.000 rpm. SV *minicolumn* dipindahkan dari sentrifus dengan hati-hati jangan sampai membasahi bagian bawah *column*. *Collection tube* dikosongkan dan sentrifus kembali *column* tersebut selama 1 menit dengan tutup terbuka sehingga etanol yang tersisa akan menguap. SV *minicolumn* dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung mikrosentifus 1,5 mL yang bersih kemudian ditambahkan 50 μL *Nuclease-Free Water* langsung ke bagian tengah *column* dengan ujung pipet jangan sampai menyentuh membran. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. SV *minicolumn* dibuang dan tabung mikrosentrifus yang mengandung DNA disimpan pada suhu 4°C atau -20°C.

b. PCR sekuensing

Campuran bahan yang diperlukan adalah produk purifikasi 2,5 μL , primers 4 pmol sebanyak 0,5 μL , ddH₂O 1 μL , dan *big dye sequencing* 1 μL . Kondisi PCR hasil optimasi laboratorium diawali dengan denaturasi awal pada suhu 96°C selama 3 menit, kemudian amplifikasi dilakukan dengan cara denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 5 detik, dan ekstensi pada 62°C selama 4 menit untuk 25 siklus.

c. Presipitasi

Tahapan presipitasi dilakukan dengan cara : ke dalam tabung *ependorf* dimasukkan 25 μL EtOH absolute, 1 μL 3 M sodium asetat, dan produk PCR 10 μL , semuanya dicampur sampai homogen dan disimpan dalam lemari es minimal 10 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit dalam suhu 4°C kemudian di aspirasi secara perlahan dan ditambahkan 25 μL EtOH 70%.

Larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dalam suhu 4°C kemudian di aspirasi dengan hati-hati lalu dikeringkan dengan cara memasukkan tabung ke dalam *speed-vac* selama 5 menit.

Tabel 3.2. Daerah target serta posisi perubahan nukleotida dan asam amino

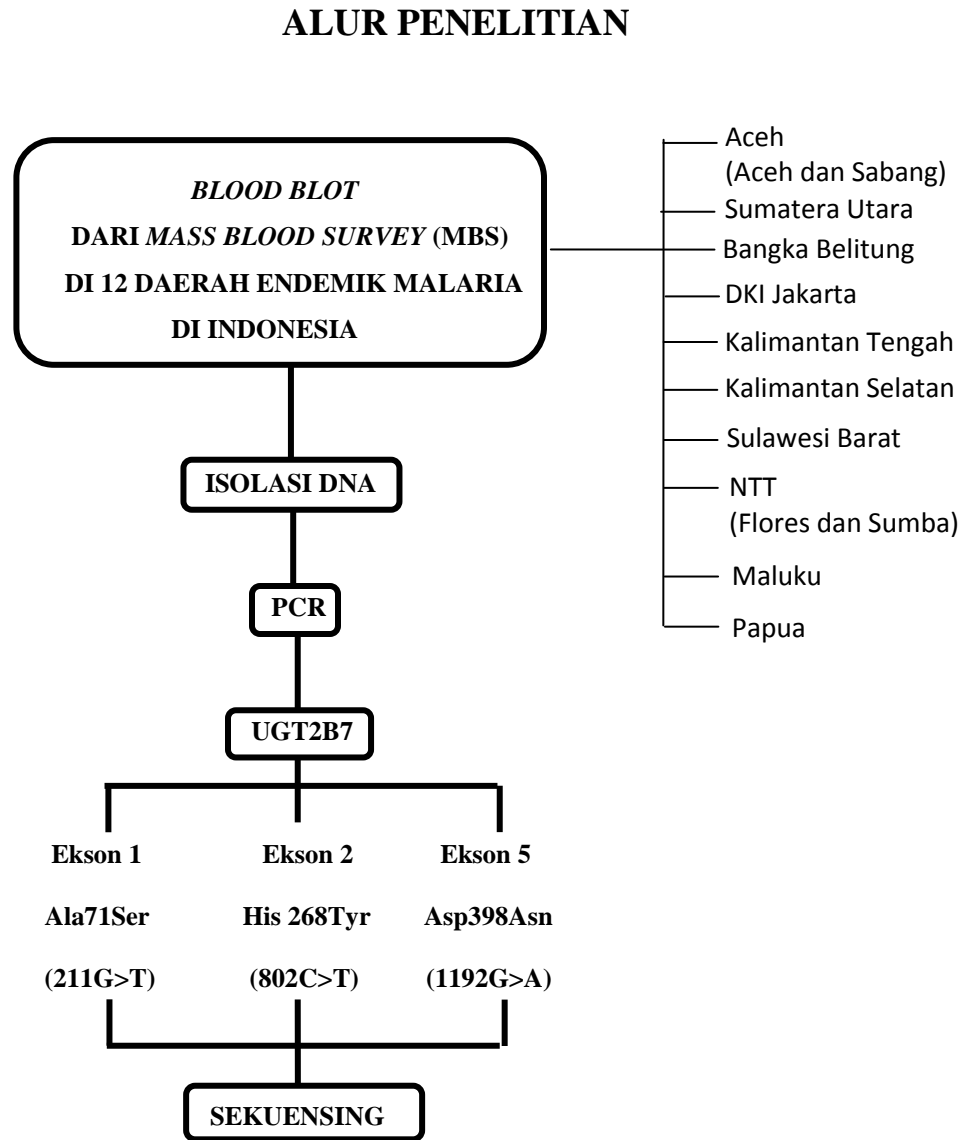
Gen	Ekson	Nukleotida	Asam Amino	Perubahan Untaian Basa	Referensi
<i>UGT2B7</i>	1	G ₂₁₁ T	Ala ₇₁ Ser (A ₇₁ S)	GCT → TCT	Saeki dkk ²⁵
<i>UGT2B7</i>	2	C ₈₀₂ T	His ₂₆₈ Tyr (H ₂₆₈ Y)	CAT → TAT	Zimmerman dkk ⁸³
<i>UGT2B7</i>	5	G ₁₁₉₂ A	Asp ₃₉₈ Asn (D ₃₉₈ N)	GAT → AAT	Saeki dkk ²⁵

3.8. Analisis statistik

- a. Frekuensi genotip dan alel mutan di setiap daerah endemis malaria disajikan dalam bentuk presentase terhadap total sampel.
- b. Perbedaan frekuensi genotip dan alel mutan antara daerah hipoendemik dan hiperendemik dihitung menggunakan uji *chi-square*.

3.9. Alur penelitian

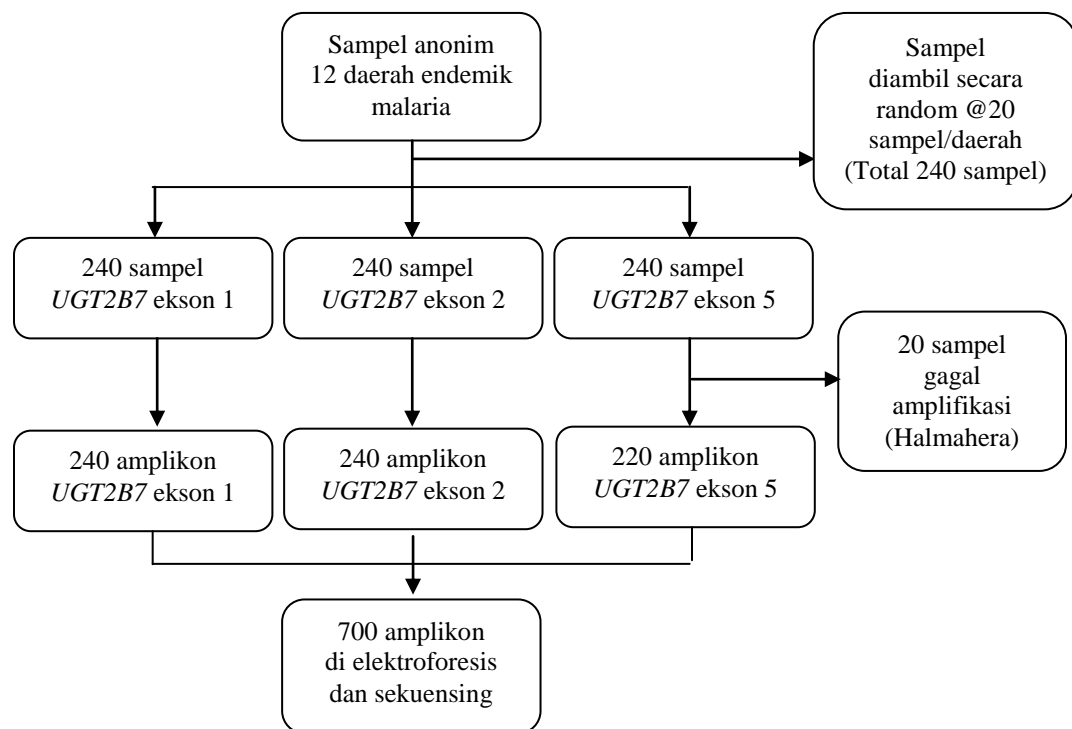
Alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5. Alur penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

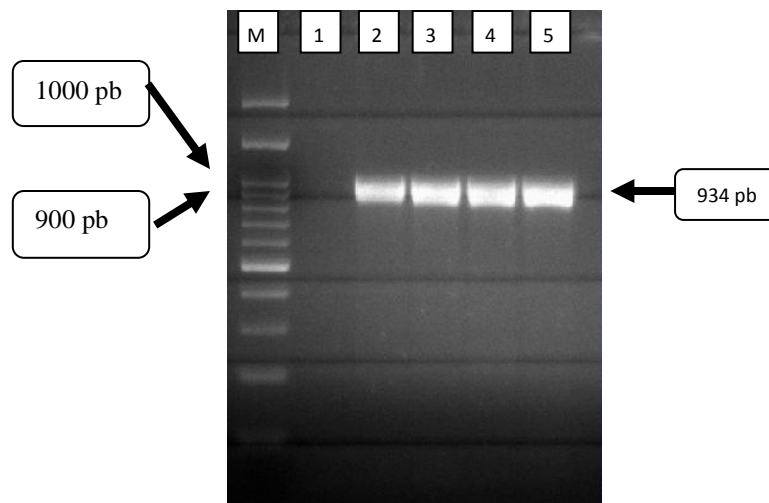
Total 240 sampel dilakukan amplifikasi untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1, 2, dan 5. Untuk *UGT2B7* ekson 1 dan 2, semua sampel berhasil teramplifikasi. Untuk *UGT2B7* ekson 5, 220 sampel berhasil memberikan amplikon, sedangkan 20 sampel gagal teramplifikasi, yaitu pada provinsi Maluku (Halmahera). Proses seleksi sampel dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Alur seleksi sampel

4.1. Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 1, yaitu untuk mempelajari frekuensi alel 211T gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia

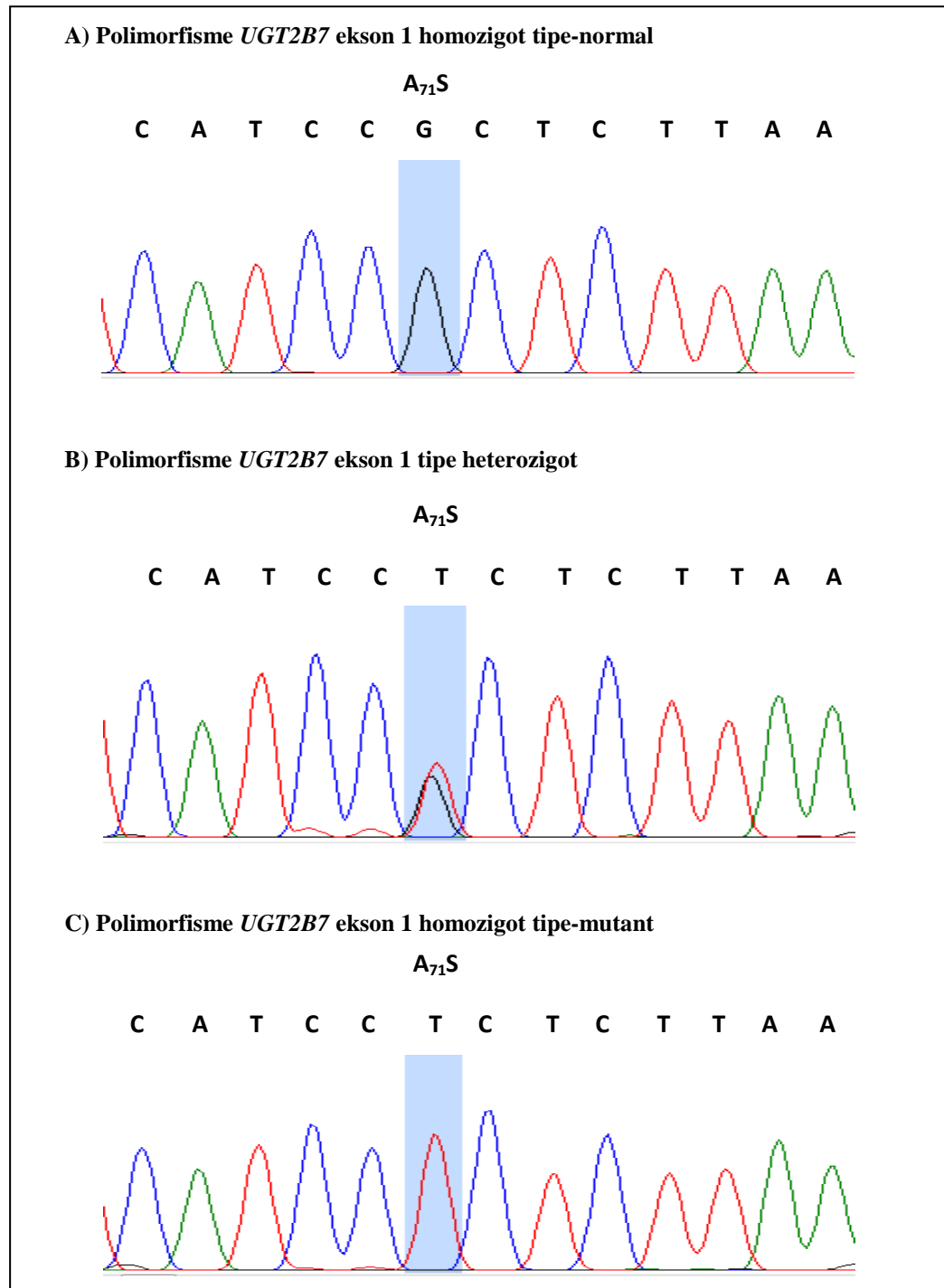
Amplifikasi DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1 menggunakan PCR menghasilkan amplicon dengan pita tunggal (*single band*) yang dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Gambaran elektroforesis amplicon fragmen gen *UGT2B7* untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1

Pita DNA tunggal dengan ukuran 934 pb, terletak di lajur 2-4.
M: Marka λ DNA/Ava II. Lajur 1 kontrol negatif, lajur 5 kontrol positif.

Untuk mengetahui polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 dilakukan sekuensing DNA pada semua sampel yang berhasil teramplifikasi. Pada homozigot tipe normal, tidak terjadi mutasi, sehingga tidak terjadi perubahan asam amino. Sekuensing DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1 memperlihatkan adanya mutasi jika terjadi perubahan asam amino di posisi 71 yaitu Alanin (Ala) menjadi Serin (Ser), atau terjadi perubahan untaian urutan basa GCT menjadi TCT pada basa nukleotida di posisi ke 211 yaitu Guanin (G) menjadi Timin (T) yang terlihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Gambaran elektroforegram *UGT2B7* ekson 1

- A) Homozigot tipe-normal, terlihat untaian urutan basa GCT pada posisi nukleotida 211.
- B) Tipe heterozigot, terlihat perubahan untaian urutan basa GCT menjadi TCT yang saling bertumpuk pada posisi nukleotida 211 dan terjadi perubahan asam amino di posisi 71 yaitu Alanin menjadi Serin.
- C) Homozigot tipe-mutant, terlihat perubahan untaian urutan basa GCT menjadi TCT pada posisi nukleotida 211 dan terjadi perubahan asam amino di posisi 71 yaitu Alanin menjadi Serin.

Gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1 dari 12 daerah endemik malaria di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 4.1. Dari 240 sampel didapatkan 194 (80,8%) individu dengan homozigot tipe normal. Pada tipe ini, frekuensi terbanyak sebesar 100% (n=20) ditemukan di provinsi Kalimantan Tengah (Palangkaraya) dan frekuensi terendah sebesar 50% (n=10) di provinsi Bangka Belitung. Total polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1 didapatkan pada 46 (19,2%) individu. Polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 terbagi menjadi dua tipe: 1) Tipe heterozigot (genotip G/T) sebesar 17,5% (n=42) dengan frekuensi tertinggi ditemukan di provinsi Bangka Belitung dan NTT (Sumba) masing-masing sebesar 40% (n=8), serta 2) Homozigot tipe mutant (genotip T/T) sebesar 1,7% (n=4) dengan frekuensi tertinggi ditemukan di provinsi Bangka Belitung sebesar 10% (n=2). Total varian alel 211T ditemukan sebesar 10,4% (n=50) dengan frekuensi tertinggi yaitu 30% (n=13) ditemukan pada provinsi Bangka Belitung.

Tabel 4.1. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Provinsi	Genotip			Alel			
	n*	G/G n (%)	G/T n(%)	T/T n(%)	n [†]	G n(%)	T n(%)
Aceh (Aceh)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Aceh (Sabang)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
Sumatera Utara (Nias)	20	14(70%)	5 (25%)	1 (5%)	40	33 (82,5%)	7 (17,5%)
Bangka Belitung	20	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)	40	28 (70%)	12 (30%)
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Maluku (Halmahera)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
NTT (Sumba)	20	12 (60%)	8 (40%)	0	40	32 (80%)	8 (20%)
NTT (Flores)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Papua (Sentani)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	15 (75%)	5 (25%)	0	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Total (N)	240	194 (80,8%)	42 (17,5%)	4 (1,7%)	480	430 (89,6%)	50 (10,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

Berdasarkan endemisitasnya, pada 8 daerah hiperendemik malaria di Indonesia yaitu di provinsi Bangka Belitung, Kalimantan Tengah (Palangkaraya), Kalimantan Selatan (Banjarmasin), Maluku (Halmahera), Sulawesi Barat (Mamuju), NTT (Sumba dan Flores) serta Papua (Sentani) didapatkan polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 dengan frekuensi 19% (n=30), dengan varian alel 211T ditemukan sebesar 10% (n=33). Sedangkan pada 4 daerah hipoendemik malaria di Indonesia yaitu provinsi Aceh (Aceh dan Sabang), Sumatera Utara (Nias) dan DKI Jakarta (Kepulauan Seribu) didapatkan 20% (n=16) polimorfisme *UGT2B7* ekson 1, dengan varian alel 211T sebesar 11% (n=17) yang dapat dilihat Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 berdasarkan endemisitas malaria

Endemisitas	Genotip				Alel		
	n*(%)	G/G n(%)	G/T n(%)	T/T n(%)	n†(%)	G n(%)	T n(%)
Hiperendemik	160 (67%)	130 (81%)	27 (17%)	3 (2%)	320 (67%)	287 (90%)	33 (10%)
Hipoendemik	80 (33%)	64 (80%)	15 (19%)	1 (1%)	160 (33%)	143 (89%)	17 (11%)
Total (N)	240	194 (80,8%)	42 (17,5%)	4 (1,7%)	480	430 (89,6%)	50 (10,4%)

Keterangan:

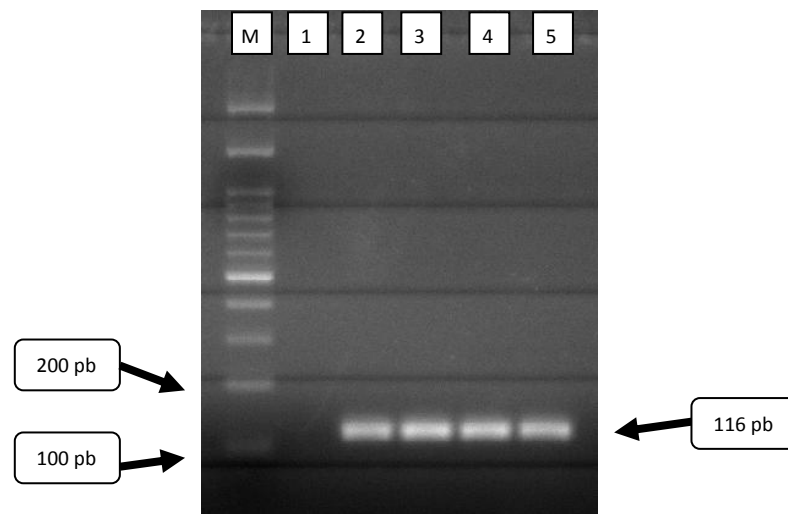
* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

p = 0,916 (*Chi-square*)

4.2. Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 2, yaitu untuk mempelajari frekuensi alel 802T gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia

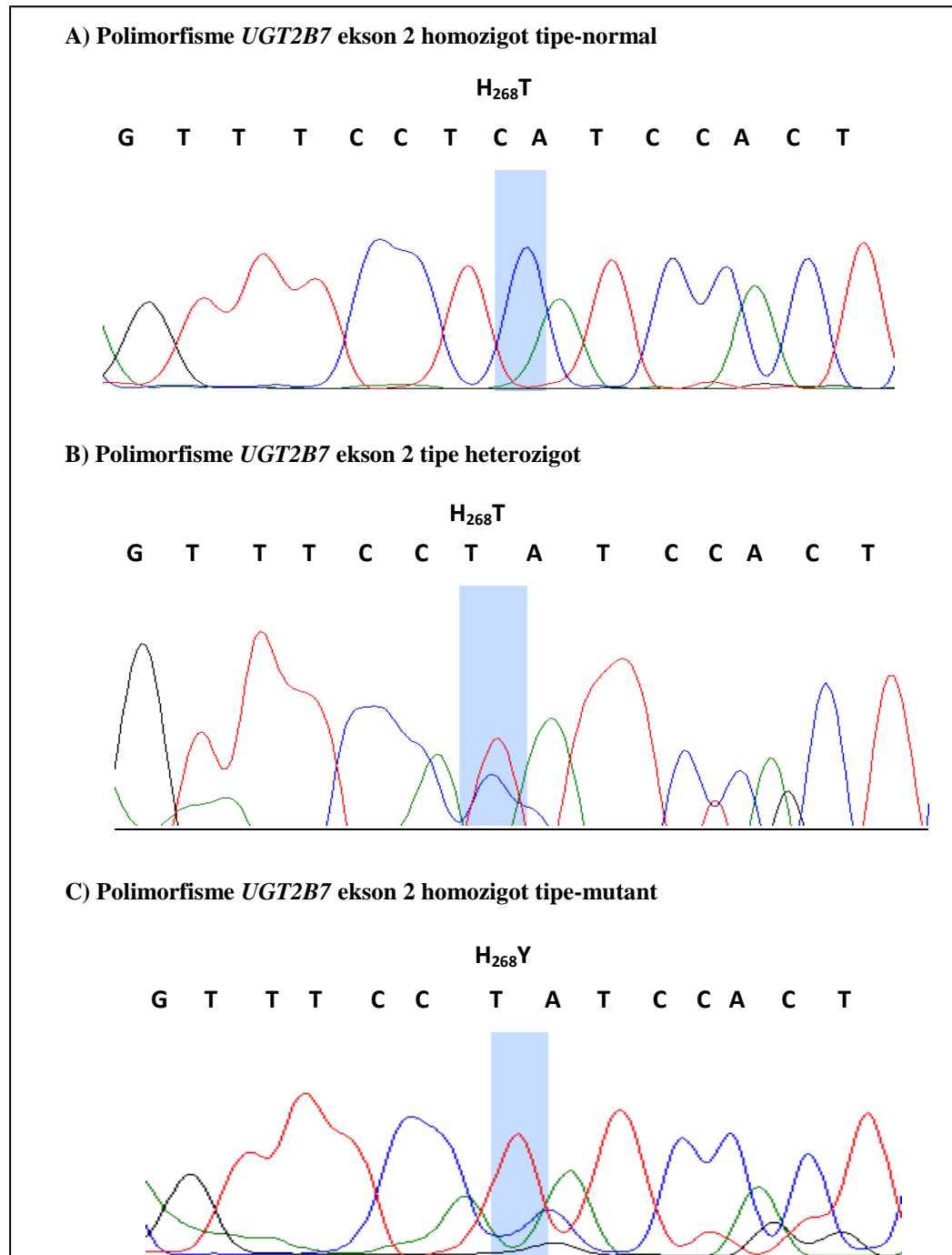
Amplifikasi DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 2 menggunakan PCR menghasilkan amplicon dengan pita tunggal (*single band*) yang dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Gambaran elektroforesis amplicon fragmen gen *UGT2B7* untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 2

Pita DNA tunggal dengan ukuran 116 pb, terletak di lajur 2-4.
M: Marka λ DNA/Ava II. Lajur 1 kontrol negatif, lajur 5 kontrol positif.

Untuk mengetahui polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 dilakukan sekuensing DNA pada semua sampel yang berhasil teramplifikasi. Pada homozigot tipe normal, tidak terjadi mutasi, sehingga tidak terjadi perubahan asam amino. Sekuensing DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 2 memperlihatkan adanya mutasi jika terjadi perubahan asam amino di posisi 268 yaitu Histidin (His) menjadi Tirosin (Tyr), atau terjadi perubahan untaian urutan basa CAT menjadi TAT pada basa nukleotida di posisi ke 802 yaitu Sitosin (C) menjadi Timin (T) yang terlihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Gambaran elektroforegram *UGT2B7* ekson 2

- A) Homozigot tipe-normal, terlihat untaian urutan basa CAT pada posisi nukleotida 802.
- B) Tipe Heterozigot, terlihat perubahan untaian urutan basa CAT menjadi TAT yang saling bertumpuk pada posisi nukleotida 802 dan terjadi perubahan asam amino di posisi 268 yaitu Histidin menjadi Tirosin.
- C) Homozigot tipe-mutant, terlihat perubahan untaian urutan basa CAT menjadi TAT pada posisi nukleotida 802 dan terjadi perubahan asam amino di posisi 268 yaitu Histidin menjadi Tirosin.

Gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 2 dari 12 daerah endemik malaria di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 4.3. Dari 240 sampel didapatkan 200 (83,3%) individu dengan homozigot tipe normal, dengan frekuensi terbanyak sebesar 100% (n=20) didapatkan di provinsi Bangka Belitung, Maluku (Halmahera) dan NTT (Flores), sedangkan frekuensi terendah sebesar 45% (n=9) didapatkan di provinsi Papua (Sentani). Total polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 ditemukan pada 40 (16,7%) individu. Individu dengan tipe heterozigot (genotip C/T) *UGT2B7* ekson 2 ditemukan sebesar 14,6% (n=35) dengan frekuensi tertinggi ditemukan pada daerah Sentani yaitu sebesar 55% (n=11), sedangkan individu dengan homozigot tipe mutant (genotip T/T) ditemukan sebesar 2,1% (n=5) dengan frekuensi tertinggi ditemukan di provinsi Kalimantan Tengah (Palangkaraya) sebesar 10% (n=2). Total varian alel 802T ditemukan sebesar 9,4% (n=45) dengan frekuensi 27,5% (n=11) ditemukan pada provinsi Papua (Sentani).

Tabel 4.3. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Provinsi	Genotip				Alel		
	n*	C/C n (%)	C/T n(%)	T/T n(%)	n [†]	C n(%)	T n(%)
Aceh (Aceh)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
Aceh (Sabang)	20	15 (75%)	5 (25%)	0	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Sumatera Utara (Nias)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
Bangka Belitung	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	13 (65%)	5 (25%)	2 (10%)	40	31 (77,5%)	9 (22,5%)
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	16 (80%)	3 (15%)	1 (5%)	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	19 (95%)	1 (5%)	0	40	39 (97,5%)	1 (2,5%)
Maluku (Halmahera)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
NTT (Sumba)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
NTT (Flores)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Papua (Sentani)	20	9 (45%)	11 (55%)	0	40	29 (72,5%)	11 (27,5%)
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	12 (60%)	8 (40%)	0	40	32 (80%)	8 (20%)
Total (N)	240	200 (83,3%)	35 (14,6%)	5 (2,1%)	480	435 (90,6%)	45 (9,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

Berdasarkan endemisitasnya, pada 8 daerah hiperendemik malaria di Indonesia yaitu di provinsi Bangka Belitung, Kalimantan Tengah (Palangkaraya), Kalimantan Selatan (Banjarmasin), Maluku (Halmahera), Sulawesi Barat (Mamuju), NTT (Sumba dan Flores) serta Papua (Sentani) didapatkan polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 dengan frekuensi 15% (n=24), dengan varian alel 802T ditemukan sebesar 8,75% (n=28). Sedangkan pada 4 daerah hipoendemik malaria di Indonesia yaitu provinsi Aceh (Aceh dan Sabang), Sumatera Utara (Nias) dan DKI Jakarta (Kepulauan Seribu) didapatkan 20% (n=16) polimorfisme *UGT2B7* ekson 2, dengan varian alel 802T sebesar 10,6% (n=17) yang dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 berdasarkan endemisitas malaria

Endemisitas	Genotip				Alel		
	n*(%)	C/C n(%)	C/T n(%)	T/T n(%)	n†(%)	C n(%)	T n(%)
Hiperendemik	160 (67%)	136 (85%)	20 (12,5%)	4 (2,5%)	320 (67%)	292 (91,25%)	28 (8,75%)
Hipoendemik	80 (33%)	64 (80%)	15 (18,75%)	1 (1,25%)	160 (33%)	143 (89,4%)	17 (10,6%)
Total (N)	240	200 (83,3%)	35 (14,6%)	5 (2,1%)	480	435 (90,6%)	45 (9,4%)

Keterangan:

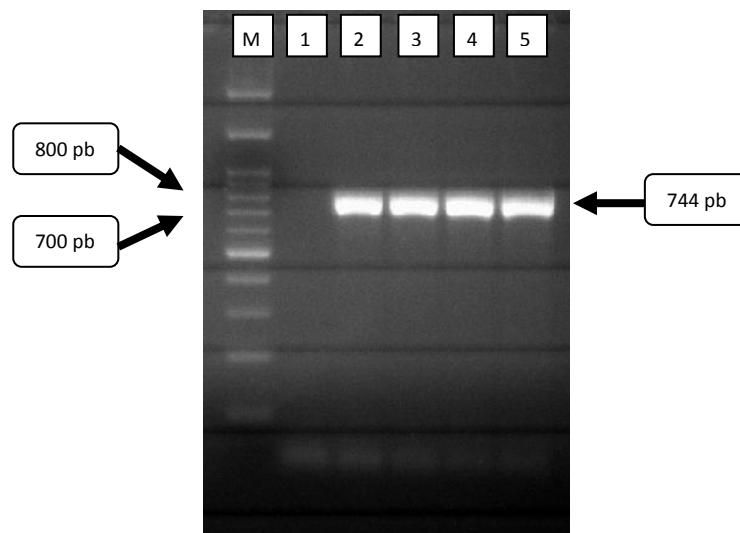
* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

p = 0,62 (*Chi-square*)

4.3. Hasil penelitian untuk mencapai tujuan khusus 3, yaitu untuk mempelajari frekuensi alel 1192A gen *UGT2B7* dan distribusinya pada daerah hiperendemik dan hipoendemik di 12 daerah endemik malaria di Indonesia

Amplifikasi DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 5 menggunakan PCR menghasilkan amplicon dengan pita tunggal (*single band*) yang dapat dilihat pada Gambar 4.6.

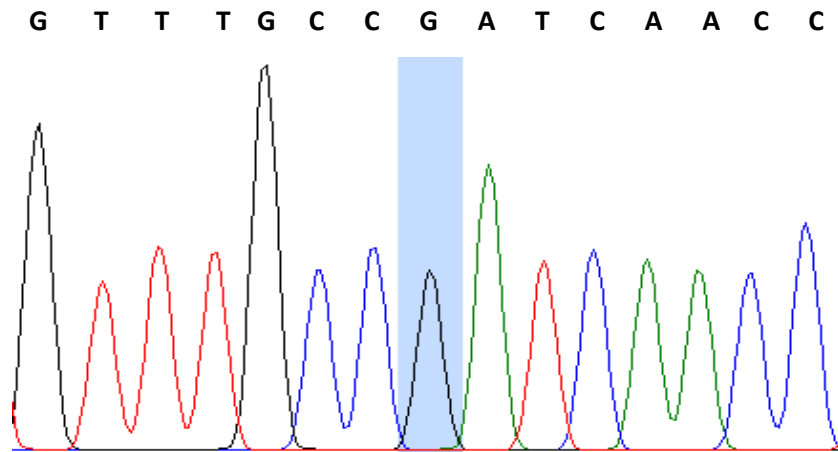


Gambar 4.6. Gambaran elektroforesis amplicon fragmen gen *UGT2B7* untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 5

Pita DNA tunggal dengan ukuran 744 pb, terletak di lajur 2-4.

M: Marka λ DNA/Ava II. Lajur 1 kontrol negatif, lajur 5 kontrol positif.

Sekuensing DNA untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 5 tidak memperlihatkan adanya mutasi (Gambar 4.7). Mutasi terjadi jika terdapat perubahan asam amino di posisi 398 yaitu asam Aspartat (Asp) menjadi Asparagin (Asn), atau terjadi perubahan urutan basa GAT menjadi AAT pada basa nukleotida di posisi ke 1192 yaitu Guanin (G) menjadi Adenin (A).



Gambar 4.7. Gambaran salah satu elektroforegram *UGT2B7* ekson 5

Terlihat untaian urutan basa GAT pada posisi nukleotida 1192 (homozigot tipe normal) dan tidak terjadi perubahan asam amino di posisi 368 yaitu asam Aspartat menjadi Asparagin.

Gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 5 dari 12 daerah endemik malaria di Indonesia, berdasarkan pembagian wilayah dan endemisitas dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Tabel 4.6. Dari 220 sampel didapatkan semua individu dengan homozigot tipe normal. Tidak ditemukan polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia yang kami teliti. Dari semua sampel, terjadi gagal amplifikasi pada sampel yang diambil dari provinsi Maluku (Halmahera) sebanyak 20 sampel (8,3%).

Tabel 4.5. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Daerah	Genotip				Alel		
	n*	G/G n (%)	G/A n(%)	A/A n(%)	n [†]	G n(%)	A n(%)
Aceh (Aceh)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Aceh (Sabang)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Sumatera Utara (Nias)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Bangka Belitung	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Maluku (Halmahera)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTT (Sumba)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
NTT (Flores)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Papua (Sentani)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Total (N)	220	220 (100%)	0	0	440	440 (100%)	0

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

N/A = *not available*

Tabel 4.6. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 berdasarkan endemisitas malaria

Endemisitas	Genotip				Alel		
	n*(%)	G/G n(%)	G/A n(%)	A/A n(%)	n†(%)	G n(%)	A n(%)
Hiperendemik	140 (64%)	140 (100%)	0	0	280 (64%)	280 (100%)	0
Hipoendemik	80 (36%)	80 (100%)	0	0	160 (36%)	160 (100%)	0
Total (N)	220	220 (100%)	0	0	440	440 (100%)	0

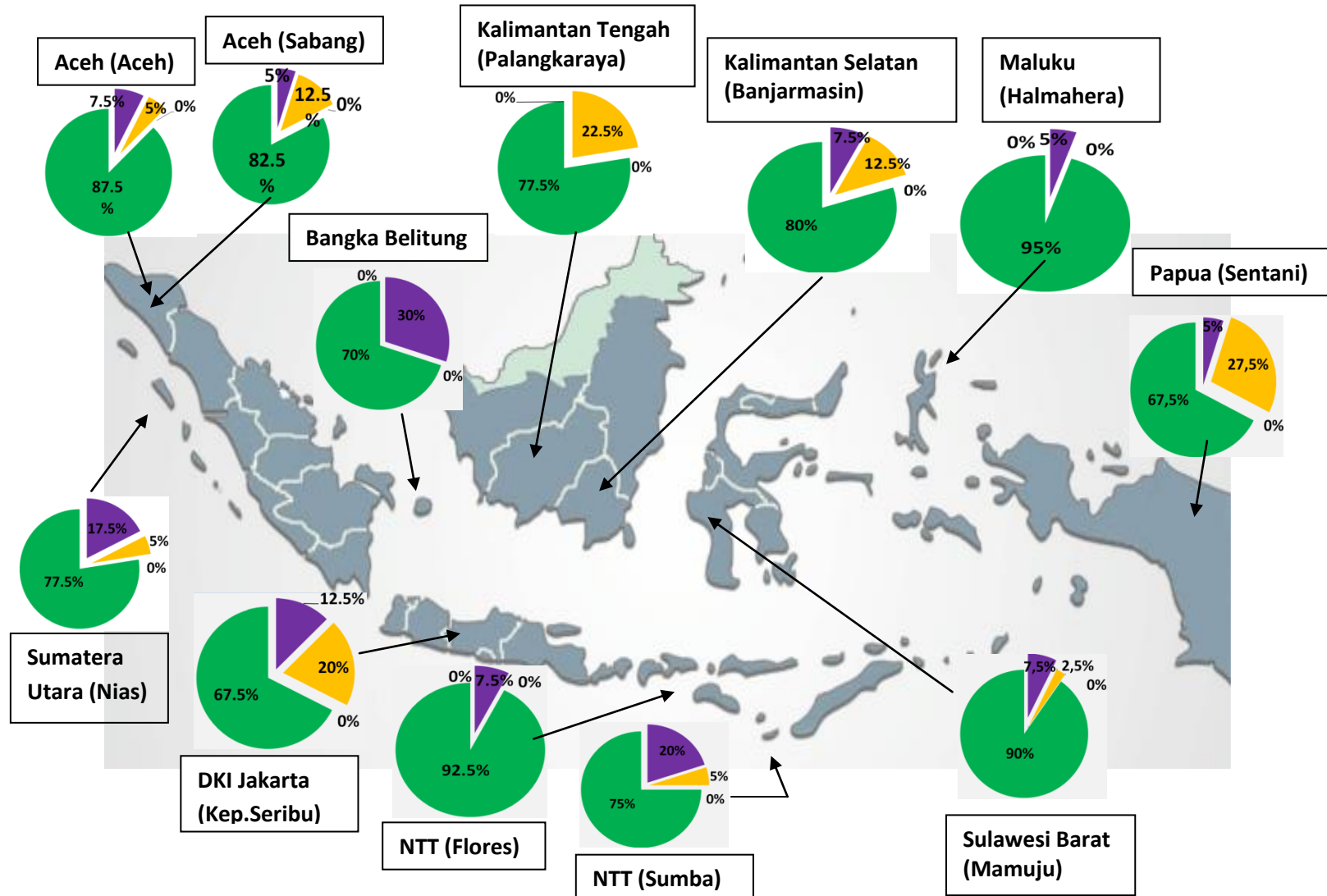
Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

4.4 Rangkuman gambaran distribusi dan frekuensi varian alel gen *UGT2B7* penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin pada dua belas daerah endemik malaria di Indonesia.

Gambaran distribusi dan frekuensi alel-alel *UGT2B7* penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin, yaitu 211T (*UGT2B7* ekson 1), 802T (*UGT2B7* ekson2) dan 1192A (*UGT2B7* ekson 5) pada dua belas daerah endemik malaria di Indonesia terangkum dalam gambar 4.8.



Gambar 4.8. Rangkuman distribusi dan frekuensi alel-alel *UGT2B7* penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisnin pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia.

●: alel 211T (ekson 1), ● alel 802T (ekson 2); ● alel 1192A (ekson 5); ● e normal

BAB 5 PEMBAHASAN

Penentuan genotip yang dilakukan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing pada penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1, ekson 2 dan ekson 5 pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia. Sampel yang diambil pada penelitian merupakan sampel *mass blood survey* (MBS) yang berasal dari individu yang tinggal di daerah endemik malaria, tanpa melihat status kesehatan individu tersebut.

Total 240 sampel yang diamplifikasi untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1, 2 dan 5, namun hanya *UGT2B7* ekson 1 (934 pb) dan 2 (116 pb) yang berhasil teramplifikasi seluruhnya. Pada *UGT2B7* ekson 5 (744 pb), 20 sampel gagal teramplifikasi. Salah satu penyebab terjadinya hal ini mungkin disebabkan karena adanya *null-allele*. *Null-allele* merupakan suatu keadaan DNA yang tidak berhasil teramplifikasi sehingga tidak diperoleh *band* pada visualisasi dengan gel elektroforesis.⁸⁴ Dalam hal ini, perbedaan akibat variasi ukuran alel merupakan salah satu sebab terjadinya *null-allele*. Alel yang pendek lebih efektif teramplifikasi dibandingkan dengan alel yang panjang. Hal ini memungkinkan untuk ditemukannya alel pendek saja pada individu yang heterozigot.⁸⁵ Terjadinya *null-allele* mungkin juga disebabkan akibat ketidakstabilan kualitas maupun kuantitas cetakan DNA atau dapat juga disebabkan karena *slippage* selama amplifikasi PCR.⁸⁶ Faktor lain yang dapat juga menyebabkan kegagalan amplifikasi adalah kesalahan dalam proses PCR (*human error*), DNA tidak berhasil terekstraksi karena jumlah darah yang digunakan terlalu sedikit, *blood blot* yang rusak, atau gagalnya pemisahan DNA dari *blot* oleh larutan chelex-100.

Ekson 1 gen *UGT2B7*. Pada penelitian ini ditemukan bahwa polimorfisme 211G>T (A₇₁S) pada ekson 1 merupakan polimorfisme terbanyak dari seluruh alel pada penelitian ini, yaitu sebesar 19,2% [(n=42/240 (tipe heterozigot), n=4/240 (homozigot tipe-mutant)]. Varian alel 211T ditemukan sebesar 10,4% (n=50) dengan frekuensi tertinggi 30% (n=12) ditemukan pada provinsi Bangka Belitung dan

frekuensi terendah (0%) pada provinsi Kalimantan Tengah (Palangkaraya). Dua penelitian di Jepang, melaporkan polimorfisme 211G>T sebesar 17,3 % dan 18,5 %.^{24, 25} Hasil tersebut tidak berbeda dengan hasil penelitian ini. Penelitian yang dilakukan Rajeev dkk²¹ dan Jing Li dkk⁸⁷ dengan populasi di beberapa negara menyimpulkan bahwa 211T banyak terdapat pada populasi dengan keturunan Asia, dengan frekuensi tinggi ditemukan pada Asia-Amerika sebesar 9%. Berdasarkan endemisitas malaria, tidak ditemukan adanya perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel 211T antara wilayah hiperendemik dengan hipoendemik ($p=0,92$).

Fungsi signifikan dari polimorfisme ini belum jelas diketahui dan penelitian terhadap polimorfisme ini masih sangat terbatas. Kodon 71 terletak di bagian N-terminal sebagai situs pengikatan dengan substrat. Ikatan antara substrat enzim menyebabkan substrat yang lipofilik menjadi hidrofilik sehingga mudah di ekskresi. Jika terjadi polimorfisme pada asam amino A₇₁S, maka terjadi perubahan asam amino alanin yang hidrofobik menjadi asam amino serin yang hidrofilik, yang diperkirakan dapat menyebabkan perubahan afinitas enzim terhadap substrat. Penelitian yang dilakukan Takekuma dkk⁸⁸ terhadap carvedilol memperlihatkan penurunan aktivitas glukuronidasi pada pasien gagal jantung kronik dengan polimorfisme A71S. Hal ini terlihat dari menurunnya nilai V_{max}/K_m Carvedilol tipe S dan R masing-masing sebesar 51,4% dan 51,9% dibandingkan dengan tipe normal.

Ekson 2 gen *UGT2B7*. Polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 2 [802C>T (H268T)] ditemukan sebesar 16,7% [(n=35/240 (tipe heterozigot) dan n=5/240 (homozigot tipe-mutant)]. Varian alel 802T ditemukan sebesar 9,4% (n=45) dengan frekuensi tertinggi 27,5% (n=11) ditemukan pada provinsi Papua (Sentani) dan frekuensi terendah ditemukan pada provinsi Bangka Belitung, NTT (Flores), dan Maluku (Halmahera). Beberapa penelitian melaporkan bahwa pada populasi Jepang polimorfisme gen *UGT2B7* 802C>T mencapai 24,4% sampai 29,3%,^{24, 25} serta pada populasi Kaukasia dapat mencapai 48,9% sampai 53,7%.²⁷ Penelitian yang dilakukan Rajeev dkk²¹ juga membuktikan cukup tingginya polimorfisme ini pada populasi, yaitu 21% pada Afrika Barat, 28% pada Papua New Guinean, dan 52% pada Amerika Utara. Frekuensi semua penelitian tersebut berbeda dengan hasil penelitian ini, hal ini

mungkin dikarenakan adanya perbedaan etnis, sehingga pada studi ini tidak dapat dibandingkan dengan negara lain. Berdasarkan endemisitas malaria, tidak ditemukan adanya perbedaan frekuensi dan pola distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* 802C>T maupun varian alel 802T antara wilayah hiperendemik dengan hipoendemik.

Fungsi signifikan dari polimorfisme ini terhadap metabolisme dihidroartemisinin masih belum diketahui, namun terdapat beberapa penelitian dengan obat lain yang juga dimetabolisme oleh enzim yang sama dapat menggambarkan fungsi dari polimorfisme gen penyandi enzim ini. Penelitian yang dilakukan Oliver dkk⁶⁰ terhadap polimorfisme *UGT2B7* 802C>T pada zidovudine memperlihatkan penurunan 1,9 kali efisiensi glukoronidasi zidovudine pada varian Y268. Levesque dkk⁶¹ juga memperlihatkan kenaikan kadar C_{max} , asam mikofenolat bebas, dan kadar asam mikofenolat total pada sukarelawan sehat dengan polimorfisme 802C>T. Namun penelitian yang dilakukan Holthe dkk⁶² terhadap 802C>T pada morfin tidak memperlihatkan adanya hubungan antara polimorfisme 802C>T dengan glukuronidasi morfin dan rasio *glucuronide:morphine* pada manusia. Sehingga dapat disimpulkan bahwa fenotip akibat polimorfisme *UGT2B7* 802C>T mungkin bersifat spesifik terhadap substrat. Dari beberapa penelitian diatas, terlihat bahwa adanya polimorfisme tersebut dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga dapat meningkatkan kadar obat dalam darah. Pemberian dihidroartemisinin pada individu dengan polimorfisme ini diperkirakan juga dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga kadar obat bebas dalam plasma meningkat dan mengakibatkan timbulnya efek samping /toksisitas yang lebih berat dibandingkan individu lainnya.

Ekson 5 gen *UGT2B7*. Pada studi ini, tidak ditemukan polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 5 (1192 G>A) pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan di Afrika Barat, Papua New Guinean, Amerika Utara. Penelitian di Jepang juga hanya menemukan polimorfisme 1192 G>A sebesar < 1% dari populasi. Walaupun terdapat kegagalan amplifikasi sebesar 8,3 %, namun karena sangat sedikitnya polimorfisme ini pada populasi, maka kegagalan ini dapat diabaikan. Fungsi signifikan dari adanya polimorfisme ini juga belum diketahui, namun diketahui bahwa lokasi D398 terletak di bagian tengah akhir

(bagian tempat ikatan UDP-asam glukuronat). Adanya perubahan asam amino akan berpengaruh pada tempat ikatan tersebut. Suatu studi menyatakan bahwa polimorfisme tersebut menurunkan aktivitas glukuronidasi *7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin* in vitro dibandingkan dengan tipe normal.²⁵

Aspek klinik polimorfisme ekson 1, 2 dan 5 pada gen *UGT2B7*. Fenotip dihidroartemisinin terhadap gen *UGT2B7* sampai sekarang masih belum banyak diketahui. Populasi dengan fenotip *poor metabolizer* dapat memperlambat aktivitas enzim pemetabolisme obat sehingga dapat timbul efek samping atau toksisitas, sedangkan populasi dengan fenotip *ultrarapid metabolizer* dapat meningkatkan aktivitas enzim pemetabolisme sehingga dapat timbul kegagalan pengobatan. Dari ketiga polimorfisme pada penelitian ini, hanya 802C>T cukup banyak diteliti dan memperlihatkan perubahan fungsi aktivitas enzim yang menurun,^{60, 61, 63} sehingga diduga bahwa polimorfisme ini terkait dengan fenotip *poor metabolizer*. Fenotip yang terkait dengan polimorfisme gen 211G>T dan 1192 G>A juga masih belum banyak diketahui. Namun diduga keduanya dapat menurunkan aktivitas glukuronidasi sehingga diperkirakan fenotip dari polimorfisme ini juga adalah fenotip *poor metabolizers*. Pada individu dengan fenotip *poor metabolizers*, perlu dilakukan pengawasan yang lebih ketat pada pemberian obat-obatan yang dimetabolisme oleh *UGT2B7*, khususnya dihidroartemisinin.

Artemisinin dan derivatnya sebenarnya merupakan obat yang cukup aman, namun berbagai penelitian hewan coba menunjukkan adanya efek neurotoksisitas.⁸⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Price dkk⁴⁸ memperlihatkan timbulnya efek samping artemisinin yaitu mual (16%), muntah (11%), anoreksia (34%), dan pusing (5%). Berbagai penelitian pada juga menunjukkan adanya ototoksitas ireversibel,⁹⁰⁻⁹² hemoglobinuria,^{93, 94} pemanjangan interval QT,^{89, 95-97} gangguan saluran cerna,⁹⁷ teratogenik, dan sebagainya.³¹ Derivat artemisinin di metabolisme secara cepat menjadi metabolit aktifnya yaitu dihidroartemisinin, sehingga efek samping/toksitas yang terjadi merupakan efek dari dihidroartemisinin. Walaupun efek samping dihidroartemisinin sendiri tidak terlalu banyak dilaporkan, namun efek samping berbahaya seperti teratogenik, neurotoksisitas, dan perpanjangan interval QT tidak

bisa begitu saja dikesampingkan, mengingat efek samping tipe B yang dapat muncul tanpa terduga pada setiap individu. Selain itu, kombinasi DHA bersama dengan piperakuin yang juga mempunyai efek kardi toksik akan semakin meningkatkan efek sinergis kardi toksisitas dari keduanya.⁹⁶ Beberapa hal dapat dilakukan untuk meminimalisasi efek samping maupun toksistas DHA seperti *monitoring* efek samping obat, menurunkan dosis obat, mengganti dengan obat antimalaria lain, serta pemberian obat antiemetik maupun PPI (Proton-Pump Inhibitor) juga dapat dilakukan.

Informasi mengenai peran polimorfisme *UGT2B7* dalam metabolisme maupun farmakokinetik dihidroartemisinin masih sangat terbatas. Terdapat variasi antarindividu yang cukup besar terhadap farmakokinetik DHA. Dasar dari variabilitas farmakokinetik yang besar antarindividu tersebut salah satunya mungkin termasuk akibat polimorfisme enzim pemetabolisme obat. Penjelasan untuk hal ini mungkin akibat dari kontribusi bersama dari kedua polimorfisme, yaitu sitokrom P450 dan *UGT2B7*. Sitokrom P450 adalah enzim yang terlibat dalam metabolisme fase I obat artemisinin.²¹ Penelitian yang dilakukan oleh Rajeev dkk²¹ menemukan bahwa 33 % dari populasi Afrika Barat dan 42 % dari Papua New Guinea mempunyai kedua polimorfisme, yaitu *CYP2B6* 516G>T dan *UGT2B7* 802C>T. Meskipun konsekuensi fenotip akibat polimorfisme ini belum ditentukan, individu-individu pembawa kedua polimorfisme tersebut mungkin mempunyai farmakokinetik dan efektivitas obat yang berbeda dibandingkan dengan mereka yang hanya mempunyai salah satu polimorfisme.

Keunggulan penelitian ini adalah jumlah sampel yang cukup banyak dan cukup menggambarkan distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* di Indonesia. Penelitian ini juga merupakan penelitian pertama yang melihat frekuensi dan pola distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* di Indonesia dengan pengambilan sampel di fokuskan pada 12 daerah endemisitas malaria. Keterbatasan penelitian ini adalah kurangnya data demografis subjek penelitian karena sampel diambil pada saat MBS.

Penggunaan dihidroartemisinin sebagai antimalaria masih belum banyak digunakan di berbagai negara endemik malaria, sehingga informasi mengenai efek

samping maupun polimorfisme pada enzim pemetabolismenya juga masih sangat terbatas. Studi lebih lanjut perlu dilakukan untuk mempelajari fenotip/dampak klinis dari polimorfisme UGT2B7, dan implikasi gabungan dari polimorfisme pemetabolisme obat pada fase satu maupun fase dua atau gabungan dari varian alel pada fase dua.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

A). Pada penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Ditemukan alel 211T sebesar 10,4% pada daerah endemik malaria di Indonesia. Tidak ditemukan perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel tersebut pada daerah hiperendemik maupun hipoendemik malaria di Indonesia.
2. Ditemukan alel 802T sebesar 9,4% pada daerah endemik malaria di Indonesia. Tidak ditemukan perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel tersebut pada daerah hiperendemik maupun hipoendemik malaria di Indonesia.
3. Tidak ditemukan alel 1192A pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia.

B). Pada penelitian ini dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut:

1. Berdasarkan hasil penelitian yang didapat, diperlukan studi untuk penentuan fenotip dihidroartemisin.
2. Berdasarkan hasil penelitian yang didapat, ditemukan frekuensi alel 211T yang tinggi pada provinsi Bangka Belitung (30%) dan alel 802T pada provinsi Papua (Sentani, 27,5%), sehingga diperlukan studi lanjutan dengan pengambilan sampel fokus pada kedua daerah tersebut.
3. Berdasarkan hasil penelitian yang didapat, diperlukan adanya pengawasan akibat efek samping pada pemberian obat antimalaria dihidroartemisinin di daerah endemis malaria.
3. Berdasarkan hasil penelitian yang didapat, diperlukan suatu studi lanjutan mengenai efek samping maupun toksisitas dari implikasi gabungan alel 211T dan 802T gen *UGT2B7* pada pemberian obat dihidroartemisinin.

DAFTAR REFERENSI

1. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2012. Available URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html. Download at February 25th,2013.
2. Greenwood BM BK, Whitty CJM, Targett GAT. Malaria. *Lancet* 2005;365:1487-98.
3. World Health Organization (WHO). World malaria report 2008. Switzerland. 2008.
4. Informasi Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan RI. 2013.
5. Fryauff DJ, Soekartono, Tuti S, et al. Survey of resistance in vivo to chloroquine of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in North Sulawesi, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92:82-3.
6. Sumawinata IW, Bernadeta, Leksana B. Very high risk of therapeutic failure with chloroquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:416-20.
7. World Health Organization (WHO). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000 – 2010. Switzerland. 2010.
8. Hasugian AR, Purba HLE, Kenangalem E, et al. Dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(8):1067-74.
9. Elyazar IRF, Hay SI, Baird JK. Malaria distribution, prevalence, drug resistance and control in Indonesia. *Adv Parasitol.* 2011;74:41-175.
10. Asih PBS, Dewi RM, Tuti S, et al. Efficacy of artemisinin-based combination therapy for treatment of persons with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in West Sumba district, East Nusa Tenggara province, Indonesia, and genotypic profiles of the parasite. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 914-8.
11. Pedoman Pelaksanaan kasus malaria di Indonesia. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. 2009.
12. Dale P, Sipe N, Anto S, et al. Malaria in Indonesia: A summary of recent research into its environmental relationships. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36(1):1-13.
13. Warhurst DC. Molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2001;344:299-302.
14. Syafruddin D, Asih PBS, Siregar JE, Tjitra E. Molecular basis of antimalarial drug resistance in Indonesia. In : Marzuki S, Verhoef J, Snippe H, eds. *Tropical disease from molecule to bedside*, 2003. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.p.103-15.
15. Cowman AF. The molecular basis of resistance to the sulfons, sulfonamides, and dihydrofolate reductase inhibitors. In : Sherman IW, ed. *Malaria parasite biology, pathogenesis and protection*. Washington:ASM Press:1998.p.317-30.
16. World Health Organization (WHO). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drug: report on global monitoring:1999-2004,2005:1-133.
17. Balint GA. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther.* 2001;90:261-5.

18. Ilett KF, Ethell BT, Maggs JL, et al. Glucuronidation of dihydroartemisinin in vivo and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:1005-1012.
19. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):136-58.
20. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, et al. Nomenclature update for mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(10):667-85.
21. Rajeev KM, Bockarie MJ, Zimmerman PA. Prevalence of UGT1A9 and UGT2B7 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in West African, Papua New Guinean, and North American Population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:1-8.
22. Villeneuve L, Girard H, Fortier LC, Gagne JF, Guillemette C. Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:117–28.
23. Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, et al. Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306:688–93.
24. Hirota T, Ieiri I, Takane H, Sano H, Kawamoto K, Aono H, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy. *Drug Metab Dispos.* 2003;31:677–680.
25. Saeki M, Saito Y, Jinno H, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos.* 2003;32:1048–54.
26. Saito K, Moriya H, Sawaguchi T, Hayakawa T, Nakahara S, Goto A, et al. Haplotype analysis of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene (UGT2B7) polymorphisms in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem.* 2006;39:303–308.
27. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, et al. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics.* 2000;10:679–85.
28. Lampe JW, Bigler J, Bush AC, Potter JD. Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15 (D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:329–33.
29. Tjitra E, Hasugian AR, Siswantoro H, Prasetyorini B, Ekowatiningsih R, Yusnita EA, et al. Efficacy and Safety of Artemisinin-naphthoquine versus Dihydroartemisinin-piperaquine in Adult Patients with Uncomplicated Malaria: a multi-center study in Indonesia. *Malar J.* 2012;53(11):1-14.
30. Olayinka ET, Ore A. Alterations in antioxidant status and biochemical indices following administration of dihydroartemisinin-piperaquine phosphate (P-ALAXIN). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 2013;5(4):44-53.
31. Eurartesim. Available URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-product. Download at Mei 16th, 2013.
32. Li J, Zhou B. Biological actions of artemisinin: insight from medicinal chemistry studies. *Molecules.* 2010;15:1378-97.
33. The Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group. Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin Med J.* 1979;92:811-16.

34. Kerb R, Fux R, Morike K, Kremsner PG, Gil JP, Gleiter CH, et al. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:760-74.
35. White NJ. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354:739-49.
36. Nosten F, White NJ. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:181-92.
37. World Health Organization (WHO). Guidelines for the treatment of malaria. 2006. WHO. Geneva.
38. Lin AJ, Klayman DL. Thermal rearrangement and decomposition products of artemisinin (qinghaosu). *J Org Chem.* 1985;50:4504-8.
39. Liu JM, Ni MY, Fan JF, et al. Structure and reaction of arteannuin. *Acta Chimica Sinica.* 1979;37:129-140.
40. Zhou WS, Wen YC. Studies on structure and synthesis of arteannuin and its related compounds. VI the structures of arteannuin degradation products. *Acta Chim Sin.* 1984;42:455-9.
41. Burk O, Arnold KA, Nussler AK, et al. Antimalarial artemisinin drug induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 2005;67:1954-65. .
42. Simonsson US, Lindell M, Raffalli-Mathieu F, et al. In vivo and mechanistic evidence of nuclear receptor CAR induction by artemisinin. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:647-53.
43. Ashton M, Nguyen DS, Nguyen VH, et al. Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;63:482-93.
44. Morris CA, Duparc S, Fuhrer IB, et al. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J.* 2011;10:1-17.
45. Isavadharm PT, Watt G, Eamsila C, Jongsakul K, Li Q, et al. Comparative pharmacokinetics and effect kinetics of orally administered artesunate in healthy volunteers and patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):717-21.
46. Zhu F, Du F, Li X, et al. An investigation of the auto-induction of and gender-related variability in the pharmacokinetics of dihydroartemisinin in the rat. *Malar J.* 2012;11:1-9.
47. Le Thi DT, Le NH, Nguyen CH, et al. Pharmacokinetics of a five-day oral dihydroartemisinin monotherapy regimen in patients with uncomplicated falciparum malaria. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23:158–164.
48. Price R, Vugt MV, Phaipun L, et al. Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(4):547-55.
49. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman pelaksanaan kasus malaria di Indonesia: Gebrak Malaria. 2011.
50. Tarning J, Ashley EA, Lindergardh N, et al. Population pharmacokinetics of piperazine after two different treatment regimens with dihydroartemisinin-piperazine in patients with plasmodium falciparum malaria in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;522(3):1052-61.
51. Tarning J, Rijken MJ, McGready R, et al. Population pharmacokinetics of dihydroartemisinin-piperazine in pregnant and nonpregnant women with uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;54(4): 1997-2007.

52. Gonzalez FJ, Coughtrie M, Tukey RH. Drug metabolism. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill;2011.p.123-45.
53. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferase: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
54. Burchell B, Coughtrie MW. UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther.* 1989;43:261-89.
55. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, et al. The UDP-glycosyltransferase gene superfamily recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics.* 1997; 7(4):255-69.
56. Nagar S, Remmel RP. Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene.* 2006;25:1659-72.
57. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glycosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J.* 1994;303:233-40.
58. Mackenzie PI, Gregory PA, Gardner-stephen DA, et al. Regulation of UDP-glycosyltransferase genes. *Curr Drug Metab.* 2003;4(3):249-57.
59. Williams JA, Hyland R, Jones BC, et al. Drug-drug interactions for UDP-Glucuronosyltransferase substrate: a pharmacokinetics explanation for typically observed low exposure (AUC1/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 2004;11(32):1201-8.
60. Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green MD, Tephly TR, et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). *Drug Metab Dispos.* 2000;28:497-509.
61. Levesque E, Delage R, Biancamano MOB, Caron P, Bernard O, et al. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphism on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Phar Ther.* 2007;81(3):392-400.
62. Holthe M, Klepstad P, Zahlens K, Borchgrevink PC, Hagen L, et al. Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the UGT2B7 H268Y and UGT1A1*28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002; 58:353–356.
63. Court MH, Krishnaswamy S, Hao Q, Duan SX, Patten CJ, et al. Evaluation of 3'-azido-3'- deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:1125–1133.
64. Guttmacher AE, Cullins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med.* 2002;374:1512-20.
65. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, et al. Mapping and Sequencing of Structural Variation from Eight Human Genomes. *Nature.* 2008;453:56-64.
66. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic Mapping in Human Disease. *Science.* 2008;322:881-8.
67. Relling MV, Giacomini KM. Pharmacogenetic. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill;2011.p.145-65.
68. Sundberg IM, Sim SC, Gomez A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphism on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007;116:496-526.

69. Totah RA, Rettle AE. Perspectives in clinical pharmacology cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:341-52.
70. Yuan HY, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Human Mol Genet.* 2005;14:1745-51.
71. Gazalo L, et al. Genetic polymorphism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) 1173 C>T in a Chinese and a Caucasian population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98:611-13.
72. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, et al. Polymorphism in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics.* 2001;11:597-607.
73. Mc Kinnon RA, Evans AM. Cytochrome P450 pharmacogenetics. *Aust J Hosp Pharm.* 2000;30:102-5.
74. Rodrigues AD, Rushmore TH. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development studies and clinical consequences. *Current Drug Metab.* 2002;3:289-309.
75. Taylor GR. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR eds. *PCR a practical approach.* Oxford: IRL Press;1993.p.1-14.
76. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1993;9:303-5.
77. Sambrook J, Russell DW. Chapter 8: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Vol 2, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.p.4-9.
78. Sealey PG, Southern EM. Gel electrophoresis of DNA. In Rickwood D, Hames D, eds. *Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach.* Oxford: IRL Press Ltd; 1982. p.39-55.
79. Sambrook J, Russell DW. Chapter 5: Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Vol 1, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.p.2-7.
80. Davies RW. DNA sequencing. In: Rickwood D, Hames D, eds. *Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach.* Oxford: IRL Press Ltd; 1982. p.117-48.
81. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating-inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74:5463-7.
82. Sambrook J, Russell DW. Chapter 12: DNA sequencing. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Vol 2, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.p.4-9.
83. Zimmermann A, Blaszkewicz M, Roth G, et al. UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 C802T (His268Tyr) Polymorphism in Bladder Cancer Cases. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(13-14):911-4.
84. Treuren, R.V. Estimating Null Allele Frequencies at a Microsatellite Locus in the Oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). 1998. *Molecular Ecology* 7: 1413-17.
85. Dakin E.E, Avise J.C. Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis. 2004. *Heredity* 93 : 504-9.
86. Gagneux, P. Boesch C, Woodruff D.S. Microsatellite Scoring Errors Associated with Noninvasive Genotyping Based on Nuclear DNA Amplified from Shed Hair. 1997. *Molecular Ecology* 6: 861-8.

87. Li J, Menard V, Benish R.L. Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implication for HIV/AIDS treatment. *Pharmacogenomics*. 2012;13(5):555-70.
88. Takekuma Y, Takenaka T, Yamazaki K, et al. Stereoselective metabolism of racemic carvedilol by UGT1A1 and UGT2B7, and effect of mutation of these enzyme on glucuronidation activity. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(11):2146-53.
89. Brewer TG, Peggins JO, Grate SJ, et al. Neurotoxicity in animals due to arteether and artemether. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(suppl 1):33-6.
90. Toovey S, Jamieson A. Audiometric changes associated with the treatment of uncomplicated falciparum malaria with co-artemether. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98:261-7.
91. Toovey S. Effects of weight, age and time on artemether-lumefantrine associated ototoxicity and evidence irreversibility. *Travel Med Infect Dis*. 2006;4:71-6.
92. Kager PA, Schultz MJ, Zijlstra EE, et al. Arteether administration in human: preliminary studies of pharmacokinetics, safety and tolerance. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88:53-4.
93. South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT). Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366:717-25.
94. Nettleton G, Jose A, Jamieson A, et al. Haemoglobinuria in a case of falciparum malaria treated with co-artemether. *Travel Med Infect Dis*. 2003;1:45-6
95. Hien TT, White NJ. Qinghaosu. *Lancet*. 1993;341:603-8.
96. Karunajeewa H, Lim C, Hung T, et al. Safety evaluation of fixed combination piperazine plus dihydroartemisinin (Artekin) in Cambodian children and adults with malaria. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;57(1):93-9.
97. Valecha N, Phyo AP, Mayxay M, et al. An open-label, randomised study of dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-mefloquine for falciparum malaria in asia. *Plos one*. 2010;5:1-10.

Lampiran 1. Riwayat Hidup

Nama : Joice Viladelvia Kalumpiu

Tempat/tanggal lahir : Jakarta, 6 Juni 1979

Agama : Kristen

Status : Menikah

Pendidikan :

1985-1991 SD IMMANUEL Jakarta

1991-1994 SMP YADIKA-2 Jakarta

1994-1997 SMA YADIKA-2 Jakarta

1997-2003 Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti Jakarta

Pekerjaan :

2008-sekarang Staf pengajar di departemen Farmakologi Universitas Trisakti
Jakarta

Lampiran 2. Sampel yang dipakai dalam penelitian untuk amplifikasi *UGT2B7* ekson 1, 2 dan 5

A) Daerah hipoendemik

ACEH		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	AC 1	G/G	C/C	G/G
2	AC 2	G/T	C/C	G/G
3	AC 3	G/G	C/C	G/G
4	AC 4	G/G	C/C	G/G
5	AC 5	G/T	C/C	G/G
6	AC 6	G/G	C/C	G/G
7	AC 7	G/G	C/C	G/G
8	AC 8	G/T	C/C	G/G
9	AC 9	G/G	C/C	G/G
10	AC 10	G/G	C/C	G/G
11	AC 11	G/G	C/C	G/G
12	AC 12	G/G	C/C	G/G
13	AC 13	G/G	C/C	G/G
14	AC 14	G/G	C/C	G/G
15	AC 15	G/G	C/C	G/G
16	AC 16	G/G	C/C	G/G
17	AC 17	G/G	C/C	G/G
18	AC 18	G/G	C/C	G/G
19	AC 19	G/G	T/T	G/G
20	AC 20	G/G	C/C	G/G

SABANG		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	SAB 500189	G/G	C/C	G/G
2	SAB 500188	G/G	C/C	G/G
3	SAB 50038	G/G	C/C	G/G
4	SAB 50032	G/G	C/T	G/G
5	SAB 50035	G/G	C/C	G/G
6	SAB 500236	G/G	C/C	G/G
7	SAB 50037	G/G	C/T	G/G
8	SAB 50040	G/G	C/C	G/G
9	Sab 50082	G/T	C/C	G/G
10	Sab 50083	G/T	C/C	G/G
11	SAB 50087	G/G	C/T	G/G
12	SAB 50090	G/G	C/C	G/G
13	SAB 500181	G/G	C/C	G/G
14	SAB 500182	G/G	C/T	G/G
15	SAB 500183	G/G	C/C	G/G
16	SAB 500184	G/G	C/T	G/G
17	SAB 500185	G/G	C/C	G/G
18	SAB 500190	G/G	C/C	G/G
19	SAB 500232	G/G	C/C	G/G
20	SAB 500235	G/G	C/C	G/G

KEPULAUAN SERIBU		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	KS 451	G/G	C/C	G/G
2	KS 452	G/T	C/T	G/G
3	KS 453	G/G	C/C	G/G
4	KS 454	G/G	C/T	G/G
5	KS 455	G/T	C/C	G/G
6	KS 456	G/T	C/C	G/G
7	KS 457	G/G	C/T	G/G
8	KS 458	G/G	C/C	G/G
9	KS 459	G/G	C/C	G/G
10	KS 460	G/G	C/T	G/G
11	KS 461	G/G	C/T	G/G
12	KS 462	G/G	C/C	G/G
13	KS 463	G/G	C/T	G/G
14	KS 464	G/T	C/C	G/G
15	KS 465	G/G	C/C	G/G
16	KS 466	G/G	C/T	G/G
17	KS 467	G/G	C/C	G/G
18	KS 468	G/G	C/T	G/G
19	KS 469	G/G	C/C	G/G
20	KS 470	G/T	C/C	G/G

NIAS		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	LW 2	G/G	C/C	G/G
2	LW 7	G/T	C/C	G/G
3	LW 10	G/G	C/C	G/G
4	LW 22	G/G	C/C	G/G
5	LW 23	G/T	C/C	G/G
6	LW 25	G/G	C/C	G/G
7	LW 28	G/T	C/C	G/G
8	LW 30	G/G	C/C	G/G
9	LW 41	G/G	C/C	G/G
10	LW 42	G/G	C/C	G/G
11	LW 43	G/G	C/C	G/G
12	LW 47	G/G	C/T	G/G
13	LW 48	G/G	C/C	G/G
14	LW 49	G/G	C/C	G/G
15	LW 50	T/T	C/C	G/G
16	LW 63	G/T	C/C	G/G
17	LW 66	G/G	C/C	G/G
18	LW 126	G/T	C/C	G/G
19	LW 127	G/G	C/T	G/G
20	LW 34	G/G	C/C	G/G

B) Daerah hiperendemik

BANGKA BELITUNG		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	BB 21	G/G	C/C	G/G
2	BB 23	G/G	C/C	G/G
3	BB 24	G/T	C/C	G/G
4	BB 28	T/T	C/C	G/G
5	BB 29	G/G	C/C	G/G
6	BB 30	G/T	C/C	G/G
7	BB 41	G/G	C/C	G/G
8	BB 42	G/G	C/C	G/G
9	BB 47	G/G	C/C	G/G
10	BB 49	G/G	C/C	G/G
11	BB 50	G/T	C/C	G/G
12	BB 51	T/T	C/C	G/G
13	BB 52	G/T	C/C	G/G
14	BB 53	G/G	C/C	G/G
15	BB 55	G/G	C/C	G/G
16	BB 56	G/T	C/C	G/G
17	BB 58	G/G	C/C	G/G
18	BB 59	G/T	C/C	G/G
19	BB 60	G/T	C/C	G/G
20	BB 428	G/T	C/C	G/G

BANJARMASIN		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	BJ 41	G/T	C/C	G/G
2	BJ 26	G/T	C/C	G/G
3	BJ 27	G/G	C/C	G/G
4	BJ 28	G/G	C/C	G/G
5	BJ 29	G/G	C/C	G/G
6	BJ 30	G/G	C/C	G/G
7	BJ 31	G/G	C/C	G/G
8	BJ 32	G/T	C/C	G/G
9	BJ 33	G/G	C/T	G/G
10	BJ 35	G/G	C/C	G/G
11	BJ 36	G/G	C/C	G/G
12	BJ 37	G/G	C/C	G/G
13	BJ 38	G/G	C/C	G/G
14	BJ 39	G/G	C/T	G/G
15	BJ 40	G/G	C/C	G/G
16	BJ 42	G/G	T/T	G/G
17	BJ 43	G/G	C/C	G/G
18	BJ 44	G/G	C/T	G/G
19	BJ 45	G/G	C/C	G/G
20	BJ 46	G/G	C/C	G/G

HALMAHERA		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	Hal 1	G/G	C/C	X
2	Hal 2	G/G	C/C	X
3	Hal 3	G/G	C/C	X
4	Hal 4	G/G	C/C	X
5	Hal 5	G/T	C/C	X
6	Hal 6	G/G	C/C	X
7	Hal 7	G/G	C/C	X
8	Hal 8	G/G	C/C	X
9	Hal 9	G/G	C/C	X
10	Hal 10	G/G	C/C	X
11	Hal 18	G/G	C/C	X
12	Hal 34	G/G	C/C	X
13	Hal 89	G/T	C/C	X
14	Hal 97	G/G	C/C	X
15	Hal 120	G/G	C/C	X
16	Hal 221	G/G	C/C	X
17	Hal 264	G/G	C/C	X
18	Hal 283	G/G	C/C	X
19	Hal 30	G/G	C/C	X
20	Hal 205	G/G	C/C	X

MAMUJU		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	MA 0122	G/G	C/C	G/G
2	MA 0309	G/G	C/C	G/G
3	MA 1116	G/G	C/C	G/G
4	MA 1600	G/G	C/C	G/G
5	MA 1540	G/G	C/C	G/G
6	MA 2060	G/T	C/C	G/G
7	MA 2240	G/G	C/C	G/G
8	MA 2250	G/G	C/C	G/G
9	MA 2284	G/G	C/C	G/G
10	MA 2290	G/G	C/C	G/G
11	MA 2464	G/G	C/C	G/G
12	MA 3076	G/G	C/C	G/G
13	MA 4186	G/G	C/T	G/G
14	MA 4246	G/G	C/C	G/G
15	MA 4880	G/G	C/C	G/G
16	MA 4890	G/T	C/C	G/G
17	MA 5003	G/G	C/C	G/G
18	MA 5256	G/G	C/C	G/G
19	MA 5433	G/T	C/C	G/G
20	MA 5599	G/G	C/C	G/G

NTT - FLORES		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	NTT 1	G/G	C/C	G/G
2	NTT 2	G/G	C/C	G/G
3	NTT 4	G/T	C/C	G/G
4	NTT 5	G/G	C/C	G/G
5	NTT 6	G/G	C/C	G/G
6	NTT 7	G/G	C/C	G/G
7	NTT 8	G/G	C/C	G/G
8	NTT 10	G/G	C/C	G/G
9	NTT 11	G/G	C/C	G/G
10	NTT 12	G/G	C/C	G/G
11	NTT 13	G/T	C/C	G/G
12	NTT 15	G/G	C/C	G/G
13	NTT 20	G/G	C/C	G/G
14	NTT 22	G/G	C/C	G/G
15	NTT 23	G/G	C/C	G/G
16	NTT 24	G/G	C/C	G/G
17	NTT 21	G/G	C/C	G/G
18	NTT 19	G/G	C/C	G/G
19	NTT 14	G/T	C/C	G/G
20	NTT 18	G/G	C/C	G/G

NYARU MENTENG		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	NM 1	G/G	C/C	G/G
2	NM 2	G/G	C/C	G/G
3	NM 3	G/G	C/C	G/G
4	NM 4	G/G	C/C	G/G
5	NM 5	G/G	C/C	G/G
6	NM 7	G/G	T/T	G/G
7	NM 8	G/G	C/T	G/G
8	NM 10	G/G	C/T	G/G
9	NM 11	G/G	C/C	G/G
10	NM 12	G/G	T/T	G/G
11	NM 13	G/G	C/C	G/G
12	NM 14	G/G	C/C	G/G
13	NM 15	G/G	C/C	G/G
14	NM 16	G/G	C/T	G/G
15	NM 17	G/G	C/T	G/G
16	NM 18	G/G	C/C	G/G
17	NM 19	G/G	C/C	G/G
18	NM 20	G/G	C/C	G/G
19	NM 9	G/G	C/T	G/G
20	NM 6	G/G	C/C	G/G

SUMBA		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	SUM 01	G/G	C/C	G/G
2	SUM 26	G/G	C/C	G/G
3	SUM 27	G/T	C/C	G/G
4	SUM 28	G/T	C/C	G/G
5	SUM 29	G/G	C/C	G/G
6	SUM 30	G/T	C/C	G/G
7	SUM 31	G/G	C/C	G/G
8	SUM 32	G/T	C/C	G/G
9	SUM 33	G/T	C/C	G/G
10	SUM 34	G/G	C/C	G/G
11	SUM 35	G/G	C/C	G/G
12	SUM 36	G/G	C/C	G/G
13	SUM 37	G/G	C/C	G/G
14	SUM 38	G/T	C/C	G/G
15	SUM 39	G/G	C/C	G/G
16	SUM 40	G/G	T/T	G/G
17	SUM 41	G/G	C/C	G/G
18	SUM 42	G/T	C/C	G/G
19	SUM 43	G/G	C/C	G/G
20	SUM 49	G/T	C/C	G/G

SENTANI		Ekson 1	Ekson 2	Ekson 5
NO	KODE SAMPEL	GENOTIP	GENOTIP	GENOTIP
1	STN 006	G/G	C/T	G/G
2	STN 011	G/G	C/T	G/G
3	STN 066	G/G	C/T	G/G
4	STN 067	G/G	C/C	G/G
5	STN 068	G/G	C/T	G/G
6	STN 072	G/G	C/T	G/G
7	STN 073	G/G	C/T	G/G
8	STN 074	G/G	C/C	G/G
9	STN 075	T/T	C/T	G/G
10	STN 076	G/G	C/C	G/G
11	STN 078	G/G	C/C	G/G
12	STN 080	G/G	C/C	G/G
13	STN 082	G/G	C/T	G/G
14	STN 086	G/G	C/T	G/G
15	STN 091	G/G	C/C	G/G
16	STN 094	G/G	C/T	G/G
17	STN 102	G/G	C/T	G/G
18	STN 105	G/G	C/C	G/G
19	STN 108	G/G	C/C	G/G
20	STN 109	G/G	C/C	G/G

Lampiran 3. Sampel yang gagal diamplifikasi pada UGT2B7 ekson 5

Hal 1
Hal 2
Hal 3
Hal 4
Hal 5
Hal 6
Hal 7
Hal 8
Hal 9
Hal 10
Hal 18
Hal 30
Hal 34
Hal 89
Hal 97
Hal 120
Hal 221
Hal 205
Hal 264
Hal 283

Lampiran 4. Kode asam amino

Asam amino			Kodon
Alanin	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Arginin	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparagin	Asn	N	AAT, AAC
Asam aspartat	Asp	D	GAT, GAC
Sistein	Cys	C	TGT, TGC
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Asam glutamat	Glu	E	GAA, GAG
Histidin	His	H	CAT, CAC
Isoleusin	Lle	I	ATT, ATC, ATA
Leusin	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lisin	Lys	K	AAA, AAG
Metionin	Met	M	ATG
Fenilalanin	Phe	F	TTT, TTC
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Treonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Tirosin	Tyr	Y	TAT, TAC
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Stop			TAA, TAG, TGA

ALEL 211T, 802T DAN 1192A GEN URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOSILTRANSFERASE 2B7 PENYANDI ENZIM PEMETABOLISME DIHIDROARTEMISININ PADA DAERAH ENDEMIK MALARIA DI INDONESIA

Joice Viladelvia Kalumpiu,^{1,2} Rianto Setiabudi,³ Puji Budi Setia Asih,⁴
Melva Louisa,³ Frans D Suyatna,³ Fitriah¹

¹Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

²Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

³Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

⁴Laboratorium Malaria Lembaga Biologi Molekuler Eijkman

Abstrak:

Latar belakang: Kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) merupakan salah satu rejimen lini pertama untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi di Indonesia. Dihidroartemisinin (DHA) adalah obat anti malaria derivat artemisinin yang dimetabolisme oleh uridin difosfat glukuronosiltransferase (UGT) 1A9 dan 2B7. Hingga saat ini telah ditemukan 3 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) nonsinonimus pada *UGT2B7*, yang terdapat pada ekson 1, 2 dan 5. SNP tersebut berkontribusi pada perubahan aktivitas glukuronidasi *UGT2B7*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari distribusi dan frekuensi varian alel dari gen *UGT2B7* pada daerah endemik malaria di Indonesia. **Metode:** Bahan penelitian sejumlah 240 sampel berasal dari bahan biologis tersimpan anonim yang diambil dari dua belas daerah endemik malaria di Indonesia. Analisis dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang dilanjutkan dengan metode sekuensing untuk melihat varian alel *UGT2B7* yaitu 211T, 802T, dan 1192A. **Hasil:** Diperoleh varian alel *UGT2B7* yaitu 211T (10,4%) dan 802T (9,4%) di Indonesia. Frekuensi dan distribusi varian alel 211T dan 802T hampir sama pada daerah hipoendemik (masing-masing 11% dan 10,6%) dan di daerah hiperendemik (masing-masing 10% dan 8,75%). Pada penelitian ini tidak ditemukan alel 1192A. **Kesimpulan:** Varian alel 211T merupakan varian alel dengan frekuensi tertinggi dibandingkan dengan kedua alel lainnya. Tidak terdapat perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel 211T dan 802T pada daerah hipoendemik dan hiperendemik malaria di Indonesia. **Kata kunci:** Dihidroartemisinin, *UGT2B7* ekson 1 (211T), *UGT2B7* ekson 2 (802T), *UGT2B7* ekson 5 (1192A), varian alel.

Abstract:

Background: The combination of dihydroartemisinin-piperazine (DHP) is one of the first-line treatment regimens for uncomplicated malaria in Indonesia. Dihydroartemisinin (DHA) is a derivative of artemisinin antimalarial drugs metabolized by *uridine diphosphate* (UDP)- *glucuronosyltransferase* (UGT) 1A9 and 2B7. To date, 3 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) has been found in *UGT2B7* nonsynonimus, which is located in exon 1, 2 and 5. These SNPs contributes to the changes in glucuronidation activity of *UGT2B7*. This study was aimed to determine the distribution and frequency of the variant alleles *UGT2B7* in malaria endemic areas in Indonesia. **Methods:** Two hundred and forty samples used in this study were taken from anonymous stored biological materials from twelve malaria endemic areas in Indonesia. Samples were analyzed using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) followed by sequencing methods to see *UGT2B7* variant allele, 211T, 802T, and 1192A. **Results:** We found variant alleles of 211T (10.4%) and 802T (9.4%) from twelve malaria endemic areas in Indonesia. Frequencies and distribution variant alleles 211T and 802T were similar at hipoendemic areas (11% and 10.6%, respectively) compared with hyperendemic areas (10% and 8.75%, respectively). Variant allele 1192A was not found in this study. **Conclusion:** Variant allele 211T is the highest in frequencies compared with the other alleles. There was no difference in frequencies and distribution pattern variant allele 211T and 802T at hipoendemic and hyperendemic area in Indonesia. **Keywords:** Dihydroartemisinin, *UGT2B7* exon 1 (211T), *UGT2B7* exon 2 (802T), *UGT2B7* exon 5 (1192), variant allele.

PENDAHULUAN

World health Organization (WHO) mencatat terdapat 104 negara endemik malaria di dunia, dengan 207 juta kasus malaria dan kematian mencapai 627 ribu jiwa.¹ Area dengan risiko malaria terbagi menjadi area endemisitas tinggi (hiperendemik), rendah (hipoendemik), dan bebas malaria. Pada area hipoendemik, terapi antimalaria diberikan jika telah ada konfirmasi parasitologi. Pada area hiperendemik, pemberian antimalaria dapat langsung diberikan pada anak usia < 5 tahun dengan klinis malaria tanpa konfirmasi dari parasitologi.² Sebanyak 37% penduduk Indonesia tinggal di daerah hiperendemik, 7% di daerah hipoendemik dan 56% tinggal di daerah bebas malaria.¹

Profil data kesehatan Indonesia (2012) melaporkan kematian akibat malaria mencapai 252 jiwa, dengan nilai *Annual Parasite Incidence* (API) nasional adalah 1,69 per 1000 penduduk dimana insidens tertinggi terdapat di Papua (85,75 ‰). Berdasarkan nilai API tersebut, daerah endemisitas malaria di Indonesia mencakup daerah hipoendemik yaitu di Jawa dan Bali, sedangkan daerah Papua, Maluku, Nusa Tenggara, Sulawesi, Kalimantan, dan Sumatera bervariasi dari hiperendemik sampai hipoendemik. Pelaksanaan pengendalian malaria menuju eliminasi dilakukan secara bertahap dari daerah dengan endemisitas rendah ke tinggi dengan indikator keberhasilan adalah menurunnya API menjadi 1 per 1.000 penduduk pada tahun 2015.³

Pada tahun 2009 Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menjadikan kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) menjadi salah satu lini pertama untuk pengobatan malaria tanpa komplikasi.⁴ Dihidroartemisinin (DHA) adalah obat anti malaria derivat artemisinin dan merupakan metabolit utama dari artesunat, artemeter, dan arteeter.⁵ DHA mempunyai waktu paruh yang pendek (sekitar 45 menit), sehingga untuk meningkatkan efektivitas dan mencegah rekrudensi maka penggunaannya dikombinasikan dengan piperakuin yang mempunyai waktu paruh lebih panjang. Metabolisme DHA langsung melalui fase dua yaitu glukuronidasi oleh enzim uridin difosfat glukuronosiltransferase (UGT) 1A9 dan 2B7, yang menghasilkan α -dihydroartemisinin- β -glucuronide inaktif.⁶

Glukuronidasi merupakan reaksi metabolisme fase dua terpenting dan sebagian besar diperantarai oleh UGT yang sangat polimorfik.⁷ UGT2B7 merupakan salah satu enzim pemetabolisme dihidroartemisinin pada manusia dan polimorfisme pada gen penyandi enzim tersebut paling banyak ditemukan pada populasi. Penelitian yang dilakukan di Afrika Barat, Papua New Guinean, dan Amerika Utara memperlihatkan lebih banyak polimorfisme pada gen *UGT2B7* dibandingkan dengan *UGT1A9*.⁸ Sejauh ini telah diketahui 3 SNP (*single nucleotide polymorphisms*) nonsinonim pada *UGT2B7* yaitu SNP 211G>T (ekson-1) pada 14,8–18,5% populasi Jepang,⁹⁻¹¹ 802C>T (ekson-2) pada 24,4–29,3% populasi Jepang dan 48,9–53,7% Kaukasia,⁹⁻¹³ serta 1192G>A (ekson-5) pada <1% populasi Jepang.¹⁰ Karena biotransformasi dihidroartemisinin menjadi metabolit inaktifnya mempunyai peran yang penting dalam efektifitas anti malaria, maka adanya variasi genetik pada enzim tersebut diduga dapat menyebabkan variabilitas respon antar individu. Polimorfisme genetik pada gen penyandi enzim pemetabolisme obat mengakibatkan enzim yang disandi aktivitasnya berkurang atau meningkat, sehingga berpotensi mengakibatkan terjadinya efek samping obat atau kegagalan terapi.

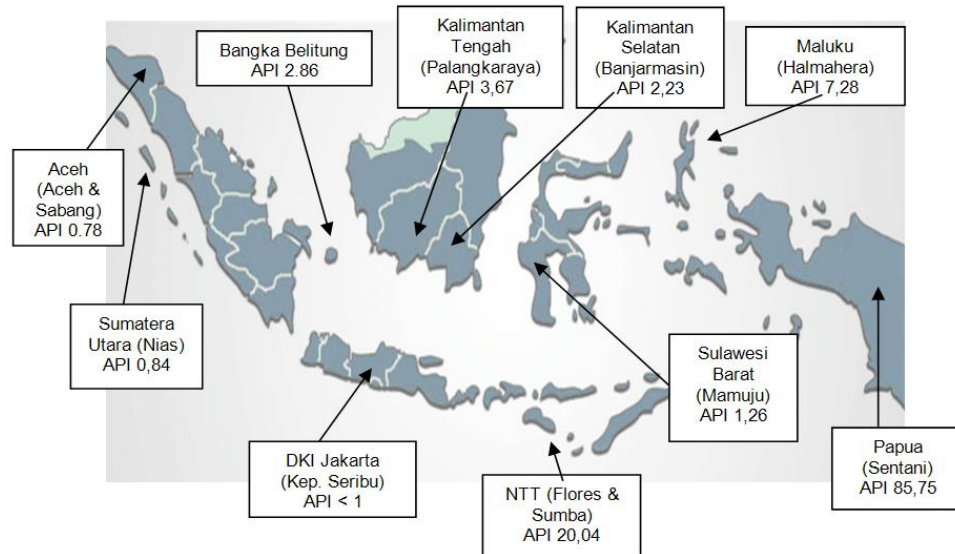
Badan kesehatan dunia menghimbau perlunya dilakukan monitoring efektifitas dan keamanan ACT untuk semua negara yang menggunakan ACT. Namun sampai saat ini informasi mengenai polimorfisme pada *UGT2B7* di populasi, terutama Asia masih sangat terbatas. Di Indonesia belum ada data mengenai distribusi dan frekuensi polimorfisme *UGT2B7* yang diduga berperan penting dalam metabolisme dihidroartemisinin, terutama pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia, yaitu Provinsi Aceh (Sabang dan Aceh), Sumatera Utara (Nias), Bangka Belitung, Kalimantan Tengah (Palangkaraya), Kalimantan Selatan (Banjarmasin), Maluku Utara (Halmahera), Sulawesi Barat (Mamuju), Nusa Tenggara Timur (Sumba dan Flores), Papua (Sentani), dan DKI Jakarta (Kepulauan Seribu).

METODE PENELITIAN

Sampel

Penelitian deskriptif ini dilaksanakan di Laboratorium Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, pada bulan April sampai September 2013. Sebanyak 240 sampel yang dipakai adalah sampel anonim bahan biologis tersimpan di laboratorium malaria Lembaga Biologi Molekuler Eijkman yang diambil secara random (@20 sampel per daerah). Pengambilan sampel tersebut dilakukan melalui

mass blood survey (MBS) pada populasi di dua belas daerah endemik malaria (Gambar 1) yang bervariasi endemisitasnya yaitu empat daerah hipoendemik dan delapan daerah hiperendemik. Daerah hipoendemik dengan API < 1 adalah Provinsi Aceh (Sabang dan Aceh), Sumatera Utara dan DKI Jakarta. Daerah hiperendemik dengan API ≥ 1 yaitu Bangka Belitung, Kalimantan Tengah, Kalimantan Selatan, Maluku Utara, Sulawesi Barat, Nusa Tenggara Timur (Sumba dan Flores), dan Papua.



Gambar 1. Dua belas daerah endemik malaria di Indonesia

Analisis biomolekuler

Analisis biomolekuler untuk penentuan genotip gen *UGT2B7* terdiri dari beberapa tahap. Proses dimulai dengan isolasi DNA dari tetes darah di kertas saring dengan metode Wooden. Isolat DNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan (*template*) dalam proses amplifikasi fragmen DNA gen target menggunakan teknik PCR (*polymerase chain reaction*). Bahan untuk amplifikasi dengan PCR adalah isolat DNA 2,5 µL; bahan campuran PCR (2,5 µL 10x PCR *buffer*, 0,5 µL MgCl₂, 0,5 µL dNTPs, 0,25 µL Taq DNA polymerase, ddH₂O 18,3 µL, dan primer (0,25 µL *forward* dan 0,25 µL *reverse*) konsentrasi 40 pmol/ml). Primer yang digunakan untuk *UGT2B7* ekson 1 (5'-AAGGGTTACATTTTAACTTCTTGG-3' dan 5'-ATCCTTACCAAAACCCCACT-3'), untuk *UGT2B7* ekson 2 (5'-GACAATGGGGAAAGCTGACG-3' dan 5'-GTTTGGCAGGTTTGCAGTG-3') sedangkan untuk *UGT2B7* ekson 5 (5'-ACCGTATAGCCTTCAGTTACATAC-3' dan 5'-AGAAAATGGTTATACTCTGAGGTG-3'). Kondisi PCR hasil optimasi laboratorium adalah denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik (suhu 57°C untuk *UGT2B7* ekson 1, 60°C untuk *UGT2B7* ekson 2 dan ekson 5) dan ekstensi pada 72°C selama 40 detik untuk 35 siklus. Langkah ekstensi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit.

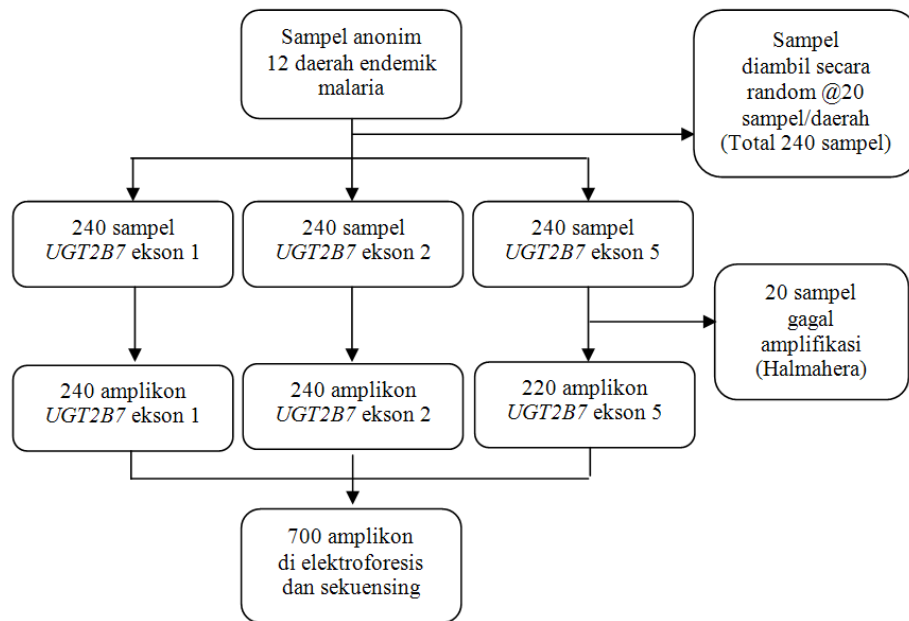
Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis pada 2% (w/V) gel agarosa. Visualisasi pita-pita DNA dilakukan menggunakan *gel-doc* (Bio-Rad) pada panjang gelombang UV 300 nm dan dibandingkan dengan marka DNA yang sesuai. Untuk *UGT2B7* ekson 1 dihasilkan fragmen DNA pita tunggal dengan 934 pb, ekson 2 dengan 116 pb, dan ekson 5 dengan 744 pb. Setelah itu, dilakukan sekuensing DNA berdasarkan prosedur yang terdapat dalam *Automated DNA sequencing*. Mesin sekuenser yang digunakan adalah ABI3730XL (96 kapiler).

Analisis data

Frekuensi genotip dan alel mutan di setiap daerah endemis malaria disajikan dalam bentuk presentase terhadap total sampel. Perbedaan frekuensi genotip dan alel mutan antara daerah hipoendemik dan hiperendemik dihitung menggunakan uji *chi-square*.

HASIL

Total 240 sampel dilakukan amplifikasi untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1, 2, dan 5. Untuk *UGT2B7* ekson 1 dan 2, semua sampel berhasil teramplifikasi. Untuk *UGT2B7* ekson 5, terjadi gagal amplifikasi sebanyak 20 sampel (8,3%), yaitu pada provinsi Maluku (Halmahera). Proses seleksi sampel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Alur seleksi sampel

Gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1 di 12 daerah endemik malaria di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 1. Dari 240 sampel didapatkan 194 (80,8%) individu dengan homozigot tipe normal. Total polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1 didapatkan pada 46 (19,2%) individu yaitu tipe heterozigot (genotip G/T) sebesar 17,5% (n=42) dengan frekuensi tertinggi ditemukan di provinsi Bangka Belitung dan NTT (Sumba) masing-masing sebesar 40% (n=8), serta homozigot tipe-mutant (genotip T/T) sebesar 1,7% (n=4) dengan frekuensi tertinggi ditemukan di provinsi Bangka Belitung sebesar 10% (n=2). Total varian alel 211T ditemukan sebesar 10,4% (n=50) dengan frekuensi tertinggi yaitu 30% (n=13) ditemukan pada provinsi Bangka Belitung.

Tabel 1. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Provinsi	Genotip			Alel			
	n*	G/G n (%)	G/T n(%)	T/T n(%)	n [†]	G n(%)	T n(%)
Aceh (Aceh)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Aceh (Sabang)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
Sumatera Utara (Nias)	20	14(70%)	5 (25%)	1 (5%)	40	33 (82,5%)	7 (17,5%)
Bangka Belitung	20	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)	40	28 (70%)	12 (30%)
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Maluku (Halmahera)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
NTT (Sumba)	20	12 (60%)	8 (40%)	0	40	32 (80%)	8 (20%)
NTT (Flores)	20	17 (85%)	3 (15%)	0	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)
Papua (Sentani)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	15 (75%)	5 (25%)	0	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Total (N)	240	194 (80,8%)	42 (17,5%)	4 (1,7%)	480	430 (89,6%)	50 (10,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

Pada 8 daerah hiperendemik malaria di Indonesia, didapatkan polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 dengan frekuensi 19% (n=30) dengan varian alel 211T ditemukan sebesar 10% (n=33). Sedangkan pada 4 daerah hipoendemik malaria di Indonesia didapatkan 20% (n=16) polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 dengan varian alel 211T sebesar 11% (n=17) yang dapat dilihat Tabel 2.

Tabel 2. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 1 berdasarkan endemisitas malaria

Endemisitas	Genotip			Alel			
	n*(%)	G/G n(%)	G/T n(%)	T/T n(%)	n [†] (%)	G n(%)	T n(%)
Hiperendemik	160 (67%)	130 (81%)	27 (17%)	3 (2%)	320 (67%)	287 (90%)	33 (10%)
Hipoendemik	80 (33%)	64 (80%)	15 (19%)	1 (1%)	160 (33%)	143 (89%)	17 (11%)
Total (N)	240	194 (80,8%)	42 (17,5%)	4 (1,7%)	480	430 (89,6%)	50 (10,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

p = 0,916 (*Chi-square*)

Pada gen *UGT2B7* ekson 2, gambaran distribusi dan frekuensi di 12 daerah endemik malaria di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 3. Dari 240 sampel didapatkan 200 (83,3%) individu dengan homozigot tipe normal. Total polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 ditemukan pada 40 (16,7%) individu, dengan tipe heterozigot (genotip C/T) sebesar 14,6% (n=35) yang frekuensi tertinggi pada daerah Sentani sebesar 55% (n=11), sedangkan homozigot tipe mutant (genotip T/T) ditemukan sebesar 2,1% (n=5) dengan frekuensi tertinggi pada provinsi Kalimantan Tengah (Palangkaraya) sebesar 10% (n=2). Total varian alel 802T ditemukan sebesar 9,4% (n=45) dengan frekuensi 27,5% (n=11) ditemukan pada provinsi Papua (Sentani).

Tabel 3. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Provinsi	Genotip				Alel		
	n*	C/C n (%)	C/T n(%)	T/T n(%)	n [†]	C n(%)	T n(%)
Aceh (Aceh)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
Aceh (Sabang)	20	15 (75%)	5 (25%)	0	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Sumatera Utara (Nias)	20	18 (90%)	2 (10%)	0	40	38 (95%)	2 (5%)
Bangka Belitung	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	13 (65%)	5 (25%)	2 (10%)	40	31 (77,5%)	9 (22,5%)
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	16 (80%)	3 (15%)	1 (5%)	40	35 (87,5%)	5 (12,5%)
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	19 (95%)	1 (5%)	0	40	39 (97,5%)	1 (2,5%)
Maluku (Halmahera)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
NTT (Sumba)	20	19 (95%)	0	1 (5%)	40	38 (95%)	2 (5%)
NTT (Flores)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Papua (Sentani)	20	9 (45%)	11 (55%)	0	40	29 (72,5%)	11 (27,5%)
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	12 (60%)	8 (40%)	0	40	32 (80%)	8 (20%)
Total (N)	240	200 (83,3%)	35 (14,6%)	5 (2,1%)	480	435 (90,6%)	45 (9,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

Berdasarkan endemisitasnya, pada 8 daerah hiperendemik malaria di Indonesia didapatkan polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 dengan frekuensi 15% (n=24), dengan varian alel 802T ditemukan sebesar 8,75% (n=28). Sedangkan pada 4 daerah hipoendemik malaria di Indonesia didapatkan 20% (n=16) polimorfisme *UGT2B7* ekson 2, dengan varian alel 802T sebesar 10,6% (n=17) yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 2 berdasarkan endemisitas malaria

Endemisitas	Genotip				Alel		
	n*(%)	C/C n(%)	C/T n(%)	T/T n(%)	n [†] (%)	C n(%)	T n(%)
Hiperendemik	160 (67%)	136 (85%)	20 (12,5%)	4 (2,5%)	320 (67%)	292 (91,25%)	28 (8,75%)
Hipoendemik	80 (33%)	64 (80%)	15 (18,75%)	1 (1,25%)	160 (33%)	143 (89,4%)	17 (10,6%)
Total (N)	240	200 (83,3%)	35 (14,6%)	5 (2,1%)	480	435 (90,6%)	45 (9,4%)

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

p = 0,62 (*Chi-square*)

Gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 5 dari 12 daerah endemik malaria di Indonesia, berdasarkan pembagian wilayah dan endemisitas dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 6. Dari 220 sampel didapatkan semua individu dengan homozigot tipe normal. Tidak ditemukan polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia yang kami teliti.

Tabel 5. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 berdasarkan 12 wilayah di Indonesia

Daerah	Genotip				Alel		
		G/G	G/A	A/A		G	A
	n*	n (%)	n(%)	n(%)	n [†]	n(%)	n(%)
Aceh (Aceh)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Aceh (Sabang)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Sumatera Utara (Nias)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Bangka Belitung	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Tengah (Palangkaraya)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Kalimantan Selatan (Banjarmasin)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Sulawesi Barat (Mamuju)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Maluku (Halmahera)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
NTT (Sumba)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
NTT (Flores)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Papua (Sentani)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
DKI Jakarta (Kep. Seribu)	20	20 (100%)	0	0	40	40 (100%)	0
Total (N)	220	220 (100%)	0	0	440	440 (100%)	0

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

N/A = *not available*

Tabel 6. Gambaran frekuensi dan distribusi polimorfisme *UGT2B7* ekson 5 berdasarkan endemisitas malaria

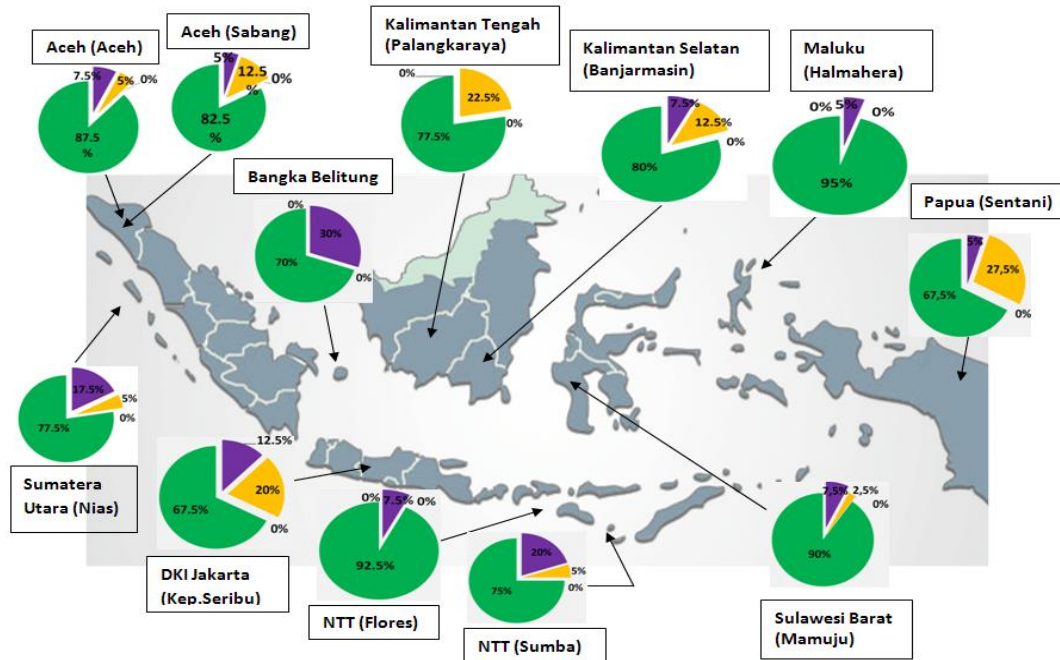
Endemisitas	Genotip				Alel		
		G/G	G/A	A/A		G	A
	n*(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n [†] (%)	n(%)	n(%)
Hiperendemik	140 (64%)	140 (100%)	0	0	280 (64%)	280 (100%)	0
Hipoendemik	80 (36%)	80 (100%)	0	0	160 (36%)	160 (100%)	0
Total (N)	220	220 (100%)	0	0	440	440 (100%)	0

Keterangan:

* = Total sampel per daerah untuk penentuan genotip

† = Total alel dari seluruh genotip per daerah

Rangkuman gambaran distribusi dan frekuensi alel-alel *UGT2B7* penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin, yaitu 211T (*UGT2B7* ekson 1), 802T (*UGT2B7* ekson 2) dan 1192A (*UGT2B7* ekson 5) pada dua belas daerah endemik malaria di Indonesia terangkum dalam Gambar 3.



Gambar 3. Rangkuman distribusi dan frekuensi alel-alel *UGT2B7* penyandi enzim pemetabolisme dihidroartemisinin pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia.

Ket: ● alel 211T (ekson 1); ● alel 802T (ekson 2); ● alel 1192A (ekson 5); ● tipe normal

DISKUSI

Penentuan genotip yang dilakukan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing pada penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 1, ekson 2 dan ekson 5 pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia. Sampel yang diambil pada penelitian merupakan sampel *mass blood survey* (MBS) yang berasal dari individu yang tinggal di daerah endemik malaria, tanpa melihat status kesehatan individu tersebut.

Total 240 sampel yang diamplifikasi untuk penentuan genotip *UGT2B7* ekson 1, 2 dan 5, namun hanya *UGT2B7* ekson 1 (934 pb) dan 2 (116 pb) yang berhasil teramplifikasi seluruhnya. Pada *UGT2B7* ekson 5 (744 pb), 20 sampel gagal teramplifikasi. Salah satu penyebab terjadinya hal ini mungkin disebabkan karena adanya *null-allele*. *Null-allele* merupakan suatu keadaan DNA yang tidak berhasil teramplifikasi sehingga tidak diperoleh *band* pada visualisasi dengan gel elektroforesis.¹⁴ Dalam hal ini, perbedaan akibat variasi ukuran alel merupakan salah satu sebab terjadinya *null-allele*. Alel yang pendek lebih efektif teramplifikasi dibandingkan dengan alel yang panjang. Hal ini memungkinkan untuk ditemukannya alel pendek saja pada individu yang heterozigot.¹⁵ Terjadinya *null-allele* mungkin juga disebabkan akibat ketidakstabilan kualitas maupun kuantitas cetakan DNA atau dapat juga disebabkan karena *slippage* selama amplifikasi PCR.¹⁶ Faktor lain yang dapat juga menyebabkan kegagalan amplifikasi adalah kesalahan dalam proses PCR (*human error*), DNA tidak berhasil terekstraksi karena jumlah darah yang digunakan terlalu sedikit, *blood blot* yang rusak, atau gagalnya pemisahan DNA dari *blot* oleh larutan chelex-100.

Ekson 1 gen *UGT2B7*. Pada penelitian ini ditemukan bahwa polimorfisme 211G>T (A₇₁S) pada ekson 1 merupakan polimorfisme terbanyak dari seluruh alel pada penelitian ini, yaitu sebesar

19,2% [(n=42/240 (tipe heterozigot), n=4/240 (homozigot tipe-mutant)]. Varian alel 211T ditemukan sebesar 10,4% (n=50) dengan frekuensi tertinggi 30% (n=12) ditemukan pada provinsi Bangka Belitung dan frekuensi terendah (0%) pada provinsi Kalimantan Tengah (Palangkaraya). Dua penelitian di Jepang, melaporkan polimorfisme 211G>T sebesar 17,3 % dan 18,5 %.^{9,10} Hasil tersebut tidak berbeda dengan hasil penelitian ini. Penelitian yang dilakukan Rajeev dkk⁸ dan Jing Li dkk¹⁷ dengan populasi di beberapa negara menyimpulkan bahwa 211T banyak terdapat pada populasi dengan keturunan Asia, dengan frekuensi tinggi ditemukan pada Asia-Amerika sebesar 9%. Berdasarkan endemisitas malaria, tidak ditemukan adanya perbedaan frekuensi dan pola distribusi varian alel 211T antara wilayah hiperendemik dengan hipoendemik ($p=0,92$).

Fungsi signifikan dari polimorfisme ini belum jelas diketahui dan penelitian terhadap polimorfisme ini masih sangat terbatas. Kodon 71 terletak di bagian N-terminal sebagai situs pengikatan dengan substrat. Ikatan antara substrat enzim menyebabkan substrat yang lipofilik menjadi hidrofilik sehingga mudah di ekskresi. Jika terjadi polimorfisme pada asam amino A₇₁S, maka terjadi perubahan asam amino alanin yang hidrofobik menjadi asam amino serin yang hidrofilik, yang diperkirakan dapat menyebabkan perubahan afinitas enzim terhadap substrat. Penelitian yang dilakukan Takekuma dkk¹⁸ terhadap carvedilol memperlihatkan penurunan aktivitas glukuronidasi pada pasien gagal jantung kronik dengan polimorfisme A71S. Hal ini terlihat dari menurunnya nilai V_{max}/K_m Carvedilol tipe S dan R masing-masing sebesar 51,4% dan 51,9% dibandingkan dengan tipe normal.

Ekson 2 gen *UGT2B7*. Polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 2 [802C>T (H268T)] ditemukan sebesar 16,7% [(n=35/240 (tipe heterozigot) dan n=5/240 (homozigot tipe-mutant)]. Varian alel 802T ditemukan sebesar 9,4% (n=45) dengan frekuensi tertinggi 27,5% (n=11) ditemukan pada provinsi Papua (Sentani) dan frekuensi terendah ditemukan pada provinsi Bangka Belitung, NTT (Flores), dan Maluku (Halmahera). Beberapa penelitian melaporkan bahwa pada populasi Jepang polimorfisme gen *UGT2B7* 802C>T mencapai 24,4% sampai 29,3%,^{9,10} serta pada populasi Kaukasia dapat mencapai 48,9% sampai 53,7%.¹² Penelitian yang dilakukan Rajeev dkk⁸ juga membuktikan cukup tingginya polimorfisme ini pada populasi, yaitu 21% pada Afrika Barat, 28% pada Papua New Guinean, dan 52% pada Amerika Utara. Frekuensi semua penelitian tersebut berbeda dengan hasil penelitian ini, hal ini mungkin dikarenakan adanya perbedaan etnis, sehingga pada studi ini tidak dapat dibandingkan dengan negara lain. Berdasarkan endemisitas malaria, tidak ditemukan adanya perbedaan frekuensi dan pola distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* 802C>T maupun varian alel 802T antara wilayah hiperendemik dengan hipoendemik.

Fungsi signifikan dari polimorfisme ini terhadap metabolisme dihidroartemisinin masih belum diketahui, namun terdapat beberapa penelitian dengan obat lain yang juga dimetabolisme oleh enzim yang sama dapat menggambarkan fungsi dari polimorfisme gen penyandi enzim ini. Penelitian yang dilakukan Oliver dkk¹⁹ terhadap polimorfisme *UGT2B7* 802C>T pada zidovudine memperlihatkan penurunan 1,9 kali efisiensi glukuronidasi zidovudine pada varian Y268. Levesque dkk²⁰ juga memperlihatkan kenaikan kadar C_{max}, asam mikofenolat bebas, dan kadar asam mikofenolat total pada sukarelawan sehat dengan polimorfisme 802C>T. Namun penelitian yang dilakukan Holthe dkk²¹ terhadap 802C>T pada morfin tidak memperlihatkan adanya hubungan antara polimorfisme 802C>T dengan glukuronidasi morfin dan rasio *glucuronide:morphine* pada manusia. Sehingga dapat disimpulkan bahwa fenotip akibat polimorfisme *UGT2B7* 802C>T mungkin bersifat spesifik terhadap substrat. Dari beberapa penelitian diatas, terlihat bahwa adanya polimorfisme tersebut dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga dapat meningkatkan kadar obat dalam darah. Pemberian dihidroartemisinin pada individu dengan polimorfisme ini diperkirakan juga dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga kadar obat bebas dalam plasma meningkat dan mengakibatkan timbulnya efek samping /toksisitas yang lebih berat dibandingkan individu lainnya.

Ekson 5 gen *UGT2B7*. Pada studi ini, tidak ditemukan polimorfisme gen *UGT2B7* ekson 5 (1192 G>A) pada 12 daerah endemik malaria di Indonesia. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan di Afrika Barat, Papua New Guinean, Amerika Utara. Penelitian di Jepang juga hanya menemukan polimorfisme 1192 G>A sebesar < 1% dari populasi. Walaupun terdapat kegagalan amplifikasi sebesar 8,3 %, namun karena sangat sedikitnya polimorfisme ini pada populasi, maka kegagalan ini dapat diabaikan. Fungsi signifikan dari adanya polimorfisme ini juga belum diketahui, namun diketahui bahwa lokasi D398 terletak di bagian tengah akhir (bagian tempat ikatan UDP-asam

glukuronat). Adanya perubahan asam amino akan berpengaruh pada tempat ikatan tersebut. Suatu studi menyatakan bahwa polimorfisme tersebut menurunkan aktivitas glukuronidasi *7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin* in vitro dibandingkan dengan tipe normal.¹⁰

Aspek klinik polimorfisme ekson 1, 2 dan 5 pada gen *UGT2B7*. Fenotip dihidroartemisinin terhadap gen *UGT2B7* sampai sekarang masih belum banyak diketahui. Populasi dengan fenotip *poor metabolizer* dapat memperlambat aktivitas enzim pemetabolisme obat sehingga dapat timbul efek samping atau toksisitas, sedangkan populasi dengan fenotip *ultrarapid metabolizer* dapat meningkatkan aktivitas enzim pemetabolisme sehingga dapat timbul kegagalan pengobatan. Dari ketiga polimorfisme pada penelitian ini, hanya 802C>T cukup banyak diteliti dan memperlihatkan perubahan fungsi aktivitas enzim yang menurun,^{19, 20, 22} sehingga diduga bahwa polimorfisme ini terkait dengan fenotip *poor metabolizer*. Fenotip yang terkait dengan polimorfisme gen 211G>T dan 1192 G>A juga masih belum banyak diketahui. Namun diduga keduanya dapat menurunkan aktivitas glukuronidasi sehingga diperkirakan fenotip dari polimorfisme ini juga adalah fenotip *poor metabolizers*. Pada individu dengan fenotip *poor metabolizers*, perlu dilakukan pengawasan yang lebih ketat pada pemberian obat-obatan yang dimetabolisme oleh *UGT2B7*, khususnya dihidroartemisinin.

Artemisinin dan derivatnya sebenarnya merupakan obat yang cukup aman, namun berbagai penelitian hewan coba menunjukkan adanya efek neurotoksisitas.²³ Penelitian yang dilakukan oleh Price dkk²⁴ memperlihatkan timbulnya efek samping artemisinin yaitu mual (16%), muntah (11%), anoreksia (34%), dan pusing (5%). Berbagai penelitian pada juga menunjukkan adanya ototoksitas ireversibel,²⁵⁻²⁷ hemoglobinuria,^{28, 29} pemanjangan interval QT,^{23, 30-32} gangguan saluran cerna,³² teratogenik, dan sebagainya.³³ Derivat artemisinin di metabolisme secara cepat menjadi metabolit aktifnya yaitu dihidroartemisinin, sehingga efek samping/toksisitas yang terjadi merupakan efek dari dihidroartemisinin. Walaupun efek samping dihidroartemisinin sendiri tidak terlalu banyak dilaporkan, namun efek samping berbahaya seperti teratogenik, neurotoksisitas, dan perpanjangan interval QT tidak bisa begitu saja dikesampingkan, mengingat efek samping tipe B yang dapat muncul tanpa terduga pada setiap individu. Selain itu, kombinasi DHA bersama dengan piperakuin yang juga mempunyai efek kardiotoxik akan semakin meningkatkan efek sinergis kardiotoxik dari keduanya.³¹ Beberapa hal dapat dilakukan untuk meminimalisasi efek samping maupun toksistas DHA seperti *monitoring* efek samping obat, menurunkan dosis obat, mengganti dengan obat antimalaria lain, serta pemberian obat antiemetik maupun PPI (Proton-Pump Inhibitor) juga dapat dilakukan.

Informasi mengenai peran polimorfisme *UGT2B7* dalam metabolisme maupun farmakokinetik dihidroartemisinin masih sangat terbatas. Terdapat variasi antarindividu yang cukup besar terhadap farmakokinetik DHA. Dasar dari variabilitas farmakokinetik yang besar antarindividu tersebut salah satunya mungkin termasuk akibat polimorfisme enzim pemetabolisme obat. Penjelasan untuk hal ini mungkin akibat dari kontribusi bersama dari kedua polimorfisme, yaitu sitokrom P450 dan *UGT2B7*. Sitokrom P450 adalah enzim yang terlibat dalam metabolisme fase I obat artemisinin.⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Rajeev dkk⁸ menemukan bahwa 33 % dari populasi Afrika Barat dan 42 % dari Papua New Guinea mempunyai kedua polimorfisme, yaitu *CYP2B6* 516G>T dan *UGT2B7* 802C>T. Meskipun konsekuensi fenotip akibat polimorfisme ini belum ditentukan, individu-individu pembawa kedua polimorfisme tersebut mungkin mempunyai farmakokinetik dan efektivitas obat yang berbeda dibandingkan dengan mereka yang hanya mempunyai salah satu polimorfisme.

Keunggulan penelitian ini adalah jumlah sampel yang cukup banyak dan cukup menggambarkan distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* di Indonesia. Penelitian ini juga merupakan penelitian pertama yang melihat frekuensi dan pola distribusi polimorfisme gen *UGT2B7* di Indonesia dengan pengambilan sampel di fokuskan pada 12 daerah endemisitas malaria. Keterbatasan penelitian ini adalah kurangnya data demografis subjek penelitian karena sampel diambil pada saat MBS.

KESIMPULAN

Ditemukan alel 211T sebesar 10,4% dan 802T sebesar 9,4% pada daerah endemik malaria di Indonesia. Tidak ditemukan perbedaan frekuensi dan pola distribusi kedua varian alel tersebut pada daerah hiperendemik maupun hipoendemik malaria di Indonesia. Alel 1192A tidak ditemukan pada penelitian ini. Studi lanjutan untuk penentuan fenotip dihidroartemisinin dan efek implikasi gabungan alel 211T dan 802T gen *UGT2B7* terhadap dihidroartemisinin perlu untuk dilakukan. Perlu juga dilakukan pengawasan efek samping akibat dihidroartemisinin di daerah endemis malaria.

DAFTAR REFERENSI

1. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2012. Available URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html. Download at February 25th, 2013. .
2. World Health Organization (WHO). World malaria report 2008. Switzerland. 2008.
3. Informasi Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan RI. 2013.
4. Pedoman Pelaksanaan kasus malaria di Indonesia. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Kesehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. 2009.
5. Balint GA. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther.* 2001;90:261-5.
6. Ilett KF, Ethell BT, Maggs JL, et al. Glucuronidation of dihydroartemisinin in vivo and by human liver microsomes and expressed UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:1005-1012.
7. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(3):136-58.
8. Rajeev KM, Bockarie MJ, Zimmerman PA. Prevalence of UGT1A9 and UGT2B7 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in West African, Papua New Guinean, and North American Population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:1-8.
9. Hirota T, Ieiri I, Takane H, Sano H, Kawamoto K, Aono H, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy. *Drug Metab Dispos.* 2003;31:677-680. .
10. Saeki M, Saito Y, Jinno H, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos.* 2003;32:1048-54.
11. Saito K, Moriya H, Sawaguchi T, Hayakawa T, Nakahara S, Goto A, et al. Haplotype analysis of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene (UGT2B7) polymorphisms in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem.* 2006;39:303-308.
12. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, et al. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics.* 2000;10:679-85.
13. Lampe JW, Bigler J, Bush AC, Potter JD. Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15 (D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 200;9:329-33.
14. Treuren, R.V. Estimating Null Allele Frequencies at a Microsatellite Locus in the Oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). 1998. *Molecular Ecology* 7: 1413-17.
15. Dakin E.E, Avise J.C. Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis. 2004. *Heredity* 93 : 504-9.
16. Gagneux, P. Boesch C, Woodruff D.S. Microsatellite Scoring Errors Associated with Noninvasive Genotyping Based on Nuclear DNA Amplified from Shed Hair. 1997. *Molecular Ecology* 6: 861-8.
17. Li J, Menard V, Benish R.L. Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implication for HIV/AIDS treatment. *Pharmacogenomics.* 2012;13(5):555-70.
18. Takekuma Y, Takenaka T, Yamazaki K, et al. Stereoselective metabolism of racemic carvedilol by UGT1A1 and UGT2B7, and effect of mutation of these enzyme on glucuronidation activity. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(11):2146-53.
19. Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green MD, Tephly TR, et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). *Drug Metab Dispos.* 2000;28:497-509.
20. Levesque E, Delage R, Biancamano MOB, Caron P, Bernard O, et al. The impact of UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 genetic polymorphism on the pharmacokinetic profile of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy volunteers. *Clin Phar and Ther.* 2007;81(3):392-400.

21. Holthe M, Klepstad P, Zahlsten K, Borchgrevink PC, Hagen L, et al. Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the UGT2B7 H268Y and UGT1A1*28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol.*2002; 58:353–356.
22. Court MH, Krishnaswamy S, Hao Q, Duan SX, Patten CJ, et al. Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31:1125–1133.
23. Brewer TG, Peggins JO, Grate SJ, et al. Neurotoxicity in animals due to arteether and artemether. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(suppl 1):33-6.
24. Price R, Vugt MV, Phaipun L, et al. Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *Am J Trop Med Hyg.*1999;60(4):547-55. .
25. Toovey S, Jamieson A. Audiometric changes associated with the treatment of uncomplicated falciparum malaria with co-artemether. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*2004;98:261-7.
26. Toovey S. Effects of weight, age and time on artemether-lumefantrine associated ototoxicity and evidence irreversibility. *Travel Med Infect Dis.* 2006;4:71-6.
27. Kager PA, Schultz MJ, Zijlstra EE, et al. Arteether administration in human: preliminary studies of pharmacokinetics, safety and tolerance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*1994;88:53-4. .
28. South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT). Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet.* 2005;366:717-25
29. Nettleton G, Jose A, Jamieson A, et al. Haemoglobinuria in a case of falciparum malaria treated with co-artemether. *Travel Med Infect Dis.*2003;1:45-6
30. Hien TT, White NJ. Qinghaosu. *Lancet.* 1993;341:603-8.
31. Karunajeewa H, Lim C, Hung T, et al. Safety evaluation of fixed combination piperazine plus dihydroartemisinin (Artekin) in Cambodian children and adults with malaria. *Br J Clin Pharmacol.*2003;57(1):93-9.
32. Valecha N, Phyo AP, Mayxay M, et al. An open-label, randomised study of dihydroartemisinin-piperazine versus artesunate-mefloquine for falciparum malaria in asia. *Plos one.*2010;5:1-10
33. Eurartesim. Available URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-product. Download at Mei 16th,2013.