

Relationship Between *Pfmdr1* Gene Polymorphisms with Response Therapy Against Artesunate Amodiaquinin Uncomplicated Falciparum Malaria Patients in Puskesmas Hanura, Pesawaran Regency, Lampung

Novita Carolia

Pharmacology Departement, Faculty of Medicine Lampung University

Abstract

Artesunate amodiaquine failure of therapy in chloroquine resistant patients have also been reported in several areas in Indonesia. One of the unexpected resistance mechanisms associated with *pfmdr1* gene polymorphisms. This study aims to determine the frequency of *pfmdr1* polymorphisms and examine the relationship of *pfmdr1* gene polymorphism with clinical and laboratory responses to artesunate-amodiaquine therapy in uncomplicated falciparum malaria patients in Puskesmas Hanura, Pesawaran Regency, Lampung. This study was an observational study with a cohort method has been carried out in the period January-October 2012 at an outpatient of Puskesmas Hanura, Pesawaran Regency, Lampung. Methods used (including inclusion and exclusion criteria) in accordance with the WHO protocol for antimalarial drug efficacy test in uncomplicated falciparum malaria. Combination therapy is given artesunate, amodiaquine and primaquine. Therapeutical response was observed during 28 days of observation. Diagnosis polymorphism by PCR-RFLP technique uses the patient's blood (EDTA and filter paper) were taken at H0. Adequate Clinical and Parasitological Response (ACPR) were 63(85.1%) people, Early Treatment Failure (ETF) were 5(6.8%) people, Late Clinical And Parasitological Failure (LCPF) 2 (2.7 %) people, and Late Parasitological Failure (LPF) 4 (5.4%) people. Seven (13.5%) patients were found N86Y *pfmdr1* gene polymorphism with mix type (mutant type and wild-type) in which 1 (9.1%) people had failed therapy and 6 (14.6%) people were cured. There was no association between *pfmdr1* gene polymorphism with artesunate amodiaquine failed therapy (RR=0.64, 95% CI=0.97-4.27, p=1.000). PCT (Parasite Clearance Time) on *pfmdr1* polymorphism group was 2.14±1.21 days, while in the group without *pfmdr1* polymorphisms was 1.79±1.0 6days and there was no significant difference between the two groups (p =0.434). The frequency of *pfmdr1* N86Y polymorphism in Puskesmas Hanura, Pesawaran Regency, Lampung is 13,5%. There is no significant difference between the rate of treatment failure patients with *pfmdr1* N86Y polymorphism compared with patients without *pfmdr1* N86Y polymorphism. There is no significant difference between PCT patients with *pfmdr1* N86Y polymorphism compared with patients without *pfmdr1* N86Y polymorphism. [JuKeUnila 2014;4(7):106-113]

Keywords: artesunate-amodiaquine, polymorphism, falciparum malaria, *pfmdr1*

Pendahuluan

Malaria merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah kesehatan utama di dunia, terutama di negara-negara tropis seperti Indonesia¹. Lampung merupakan salah satu provinsi yang endemis untuk malaria, salah satunya di Kabupaten Pesawaran. Penyebab malaria tertinggi di Kabupaten Pesawaran adalah *Plasmodium falciparum*. Faktor lingkungan, mobilitas penduduk yang tinggi serta kondisi alam memberi pengaruh terhadap penyebaran malaria. Hal ini dikarenakan banyaknya hutan, lagun, dan tambak terlantar di Kabupaten

Pesawaran yang dapat memungkinkan menjadi tempat perindukan nyamuk².

Salah satu mekanisme resistensi *P. falciparum* terhadap artesunate-amodiaquine secara molekuler diduga adanya polimorfisme pada gen *pfmdr1*. Gen *pfmdr1* menghasilkan protein pgh1 yang merupakan salah satu transporter yang berperan pada proses pengeluaran amodiaquine dari vakuola makanan *P. falciparum*. Polimorfisme pada gen *pfmdr1* menyebabkan peningkatan pengeluaran amodiaquine sehingga amodiaquine tidak dapat

mencegah konversi hem menjadi hemozoin atau mengurangi terjadinya detoksifikasi^{3,4}.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) pada *pfprt* 76T dan *pfmdr1* 86Y diduga berhubungan dengan peningkatan risiko infeksi rekurensi dan rekrudesensi pada terapi artesunat amodiakuin. Mutasi gen *pfmdr1* tidak hanya berperan dalam mekanisme resistensi terhadap klorokuin¹⁴ tetapi juga turut berhubungan dengan resistensi terhadap amodiakuin^{5,6,7}. Hal ini memungkinkan terjadinya resistensi silang antara klorokuin dan amodiakuin yang diperantarai oleh gen *pfmdr1*.

Tujuan Penelitian ini adalah Mengetahui frekuensi polimorfisme *pfmdr1*-1N86Y pada pasien malaria falciparum tanpa komplikasi di Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung, mengkaji hubungan polimorfisme gen *pfmdr1* N86Y dengan

respon klinis dan laboratoris terhadap terapi artesunat-amodiakuin pada pasien malaria falciparum tanpa komplikasi.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan metode *cohort* yang dilakukan pada periode Januari – Oktober 2012 pada pasien rawat jalan Puskesmas Hanura, Kabupaten Pesawaran, Lampung. Respon terapi artesunat amodiakuin dan PCT (*Parasite Clearance Time*) diamati selama 28 hari pengamatan. Diagnosa polimorfisme dengan teknik PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) menggunakan darah pasien (EDTA & kertas saring) yang diambil pada H0.

Bahan untuk amplifikasi gen *pfmdr1*N86Y dengan teknik PCR-RFLP menggunakan 2 pasang primer forward dan reverse untuk Nested I dan Nested II seperti disajikan pada tabel 1⁸.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi *pfmdr1* N86Y

Primer		Sequence (5'-3')
<i>1st amplification</i>		
Pfmder1	M1Fw	AAGAGGTTGAAAAAGAGTTGAAC
	M1Rev	CCGTTAATAATAAATACACGCAG
<i>Nest</i>		
Pfmder1	M2Fw	AGAGTACCGCTGAATTATTTAG
	M2Rev	CCTGAACCTCACTTGTTCTAAAT

Kriteria Inklusi subjek dalam penelitian ini adalah penderita yang bersedia menandatangani surat persetujuan (*informed consent*), bersedia datang ke Puskesmas untuk *followup*, bersedia diambil darahnya, berusia ≥ 18 tahun laki-laki dan perempuan, monoinfeksi plasmodium falciparum, didiagnosa sebagai penderita malaria falciparum tanpa komplikasi dengan kepadatan parasit 100-100.000/ μ L, temperatur aksila $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ atau riwayat demam dalam 1 minggu terakhir, tidak pernah mengonsumsi obat antimalaria dalam 2 minggu terakhir.

Kriteria eksklusi subjek penelitian ini adalah terdapat gejala dan tanda malaria berat, pada pemeriksaan darah tepi ditemukan jenis Plasmodium jenis lain,

selain falciparum, pernah/sedang mendapat pengobatan malaria dalam 2 minggu terakhir, mempunyai riwayat alergi terhadap artesunate-amodiakuin dan munculnya reaksi alergi terhadap obat yang dipakai dalam penelitian selama proses penelitian, adanya gangguan fungsi hati, ginjal dan jantung yang diketahui dari anamnesis, dan pemeriksaan fisik, demam yang disebabkan oleh penyakit lain, ibu hamil dan menyusui, tidak mengikuti prosedur penelitian yang sudah ditetapkan dan mengundurkan diri dari penelitian.

Subjek penelitian ini diterapi dengan artesunate dan amodiakuin yang diberikan secara oral dengan dosis 4 mg/kg and 10 mg/kg berat badan, satu kali sehari pada hari H0, H1 dan H2 dengan

dosis amodiakuin dikurangi menjadi 5 mg/kg pada hari ke 2 (H1). Primakuin diberikan pada H0 dengan dosis 0,75 mg/KgBB. Pemberian obat dilakukan pada hari ke H0, H1, dan H2 dibawah pengawasan, Subjek penelitian diminta untuk datang kembali pada hari ke H1,H2,H3,H7,H14,H21, dan H28, atau kapan saja ketika merasa sakit. Pemeriksaan fisik dan pemeriksaan temperatur aksila dilakukan setiap waktu *follow up*. Jika didapatkan adanya penyakit penyerta maka akan diterapi oleh dokter puskesmas. *Follow up* untuk pemeriksaan laboratorium, termasuk pengambilan darah perifer dengan menusukkan jarum pada ujung jari untuk pemeriksaan apusan darah tebal dan pengambilan sampel darah pada kertas filter dilakukan pada hari keH1, H2, H3, H7, H14, H21,H28 dan pada hari lain ketika temperatur aksila subjek penelitian $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$. Subjek yang tidak datang ke puskesmas untuk *follow up* pada hari yang telah ditentukan akan dilakukan visitasi ke rumahnya pada hari yang sama.

Penderita yang positif malaria falciparum diambil darah tepinya untuk pemeriksaan DNA yang disimpan dalam tabung EDTA serta diteteskan sebanyak 3 tetes ke kertas filter Whatman No 1, untuk isolasi DNA dan analisis PCR.

Isolasi DNA Plasmodium falciparum dilakukan dengan metode Guanidin isotiosianat dari darah dalam tabung EDTA yang diambil dari pasien.

Untuk melihat adanya polimorfisme *pfmdr1* pada kodon N86Y, DNA hasil amplifikasi PCR dipotong dengan enzim restriksi. Enzim ApoI dipakai untuk memotong fragmen DNA sebesar 418 bp. Visualisasi pita DNA yang telah diwarnai dengan etidium bromida dilakukan dengan menggunakan ultra violet pada geldoc 1000 imaging system. Pada *wild type* akan terbentuk satu fragmen pita DNA sebesar 418bp sedangkan pada *mutant type* akan memotong DNA sehingga terbentuk 2 pita dengan DNA sebesar 239 bp dan 179 bp.

Hasil dan Pembahasan

Jumlah total penderita malaria yang memeriksakan diri ke Puskesmas Hanura sebanyak 1426 orang. Semua pasien tersebut dilakukan pemeriksaan fisik dan laboratoris dan dilakukan seleksi menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Hasil pemeriksaan diperoleh 113 orang diantaranya adalah penderita malaria falciparum. Penderita malaria falciparum tanpa komplikasi yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 78 sampel.

Pasien yang keluar dari penelitian sebanyak 4 orang (5,13%), 3 orang diantaranya (subjek no. 35, 46 dan 63) tidak datang pada kontrol hari ke-21 dan hari ke-7 karena keluar kota dalam rangka mudik hari raya iedul fitri. Satu orang pasien lagi (subjek no. 13) tidak hadir pada hari kontrol 14 dikarenakan pergi melaut.

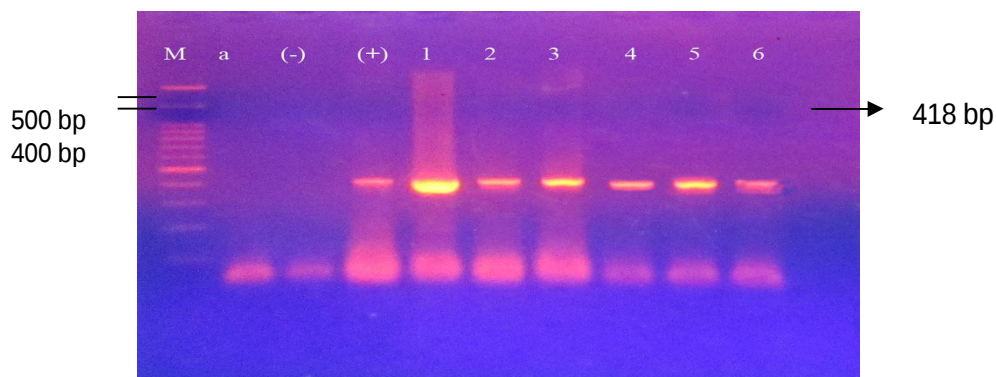
Tabel 2. Karakteristik dasar subjek penelitian pada awal penelitian sebelum pengobatan berdasarkan jenis kelamin, berat badan, usia, dan konsentrasi Hb.

Karakteristik Subjek	Jumlah (%) n=74
Jumlah pasien	74
Jenis Kelamin	
Perempuan	28 (37,8)
Laki-laki	46 (62,2)
Usia	
Median (range)	
18-30	50 (67,6)
31-50	23 (31,1)
≥ 51	1 (1,3)
Berat badan mean $\pm$ SD kg	52,91 $\pm$ 7,63
Konsentrasi Hemoglobin mean $\pm$ SD	10,09 $\pm$ 0,81

Pada penelitian ini subjek dengan jenis kelamin laki-laki dan usia 18 – 30 tahun lebih banyak menderita malaria dibandingkan perempuan dan usia diatas 30 tahun seperti tampak pada tabel 2. Hasil serupa tampak pada penelitian Dasuki (2009) dimana penderita malaria laki-laki sebanyak 67% dan usia 15-60 tahun sebanyak 97,06%⁹. Evanita (2002) mendapatkan frekuensi pria dengan wanita berturut turut 44 (61,1%) pria dan 28 (38,9%) wanita. Insiden dan intensitas infeksi *P. falciparum* dilaporkan pada pria lebih tinggi dari wanita demikian pula dengan manifestasi infeksi yang terjadi. Perempuan lebih sedikit prevalensi terjangkit penyakit malaria, oleh karena perempuan mempunyai respon imun lebih kuat dibanding laki-laki¹⁰.

DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan menggunakan metode *nested* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan

primer M1 untuk amplifikasi pertama dan primer M2 sebagai primer *nested* kedua. Kondisi PCR amplifikasi pertama 94°C selama 3 menit diikuti 45 siklus (denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 56°C 30 detik, dan ekstensi 60°C selama 30 detik), dan *final extension* 60°C selama 3 menit. Produk PCR pertama tersebut diamplifikasi kembali dengan menggunakan primer M2. *Nested* PCR dengan kondisi 94°C selama 3 menit diikuti 40 siklus (denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 50°C 30 detik, ekstensi 68°C selama 1 menit), dan *final extension* 64°C selama 3 menit. Hasil amplifikasi tahap kedua tersebut kemudian di visualisasi pada gel agarose 1,5% selama 30 menit dengan *voltage* 100 volt. Hasil amplifikasi tahap kedua terbentuk pita DNA tunggal berukuran 418 bp yang mengapit kodon 86, seperti tampak pada gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi produk PCR II.
Kolom M = DNA marker ; kolom a = dH₂O; kolom (-) = kontrol negatif;
kolom (+) = kontrol positif; kolom 1,2,3...6 = sampel

Produk PCR sampel terdapat 52 sampel yang positif, yang mana muncul pita tepat pada kontrol positif, selanjutnya dari sampel yang positif kemudian dilanjutkan deteksi polimorfisme dengan RFLP. Pemotongan gen *pfmdr1* dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* menggunakan enzim restriksi *ApoI* dari Fermentas. Pemotongan dengan enzim restriksi *ApoI*

apabila terdapat alel *mutant* akan terbentuk dua pita DNA sebesar 239 bp dan 179 bp yang berarti telah terjadi perubahan pada basa tunggal ke 754 dari adenin (A) menjadi timin (T) sehingga terjadi perubahan asam amino asparagin (N) menjadi tirosin (Y). Sedangkan alel *wild type* terbentuk pita DNA tunggal berukuran 418 bp, seperti tampak pada gambar 2.



Gambar 2. Visualisasi hasil digesti gen *pfmdr-1* dengan enzim restriksi *ApoI* . Kolom M = marker DNA; kolom 9,10,14,...34 = sampel, *mix type (mutant & wild type)* pada kolom 9,10,14,17 ; kolom (-) = kontrol negatif (sampel yang tidak di RFLP)

Pada penelitian ini tidak didapat sampel *mutant* dan ditemukan 7 sampel *mix type (mutant & wild type)*. Sampel *mutant* menunjukkan terbentuknya pita DNA pada 239 bp dan 179 bp. Sampel *mix type* menunjukkan terbentuknya pita DNA pada 418 bp, 239 bp, dan 179 bp pada subjek nomer 3, 6, 9, 10, 14, 17, dan 74. Pada isolat Thailand yang diteliti oleh Price *et al.* (1999) dari 54 isolat 6 (11,1%) diantaranya mengalami polimorfisme *pfmdr1* pada kodon 86¹⁰. Proporsi yang lebih besar lagi diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Grobusch *et al.*, pada tahun 1998 di Lambarene, Gabon, Afrika didapatkan 78,4% isolat dengan *mutant type*, 17% isolat *wild type*, dan 4,5 % dengan *mix type*¹².

Penelitian yang dilakukan oleh Holmgren *et al.*, (2006) terhadap anak-anak penderita malaria di Kenya diperoleh 64% dengan polimorfisme *pfmdr1*, sedangkan pada isolat Bontang yang diteliti oleh Dasuki pada tahun 2009 diperoleh 2 (5,9%) isolat mengalami polimorfisme *pfmdr1*, dimana 1 isolat tipe mutan dan 1 isolat tipe *mix (wild type dan mutant)*¹³.

Setelah dilakukan terapi dengan artesunat amodiakuin (Arsuamoon®) dan monitoring keadaan klinis maupun laboratorium (hitung jumlah parasit)

selama 28 hari didapatkan respon terapi yang beragam. Respon klinis dan parasit memadai (ACPR) sebanyak 63 orang (85,1%), sedangkan kegagalan pengobatan dini (ETF) sebanyak 5 (6,8%) orang, kegagalan klinis dan parasitologis kasep (LCPF) sebanyak 2 (2,7%) orang, serta kegagalan parasitologis kasep (LPF) sebanyak 4 (5,4%) orang (tabel 3).

Tabel 3. Respon Klinis dan Laboratoris

Respon Klinis & Jumlah (%) n=74 laboratoris	
ACPR	63 (85,1)
ETF	5 (6,8)
LCPF	2(2,7)
LPF	4(5,4)

Keterangan: ACPR: Adequate Ckinical and Parasitological Response, ETF: Early Treatment Failure, LCPF: Late Clinical and Parasitological Failure, LPF: Late Parasitological Failure

Kegagalan pengobatan dini (ETF) ditemukan pada pasien dengan nomer 11, 37, 49, 73, dan 74. Pasien dengan nomer 11, 49, 73, dan 74 ditemukan adanya parasit bentuk seksual pada kontrol hari ke-2 dan ke-3 disertai dengan kenaikan suhu $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. Pasien dengan nomer sampel 37 ditemukan adanya parasit bentuk seksual sejak kontrol hari ke-3 sampai hari ke-7 disertai dengan kenaikan

suhu 38,2°C. Kegagalan Klinis dan Parasitologis Kasep (LPCF) ditemukan pada pasien dengan nomer sampel 26 dan 40 karena ditemukan parasit bentuk seksual pada kontrol hari ke 14, 21, dan 28 dengan disertai demam ($\geq 37,5^\circ\text{C}$). Kegagalan Parasitologis Kasep (LPF) ditemukan pada pasien nomer sampel 25,31, 38, dan 45. Pasien dengan nomer sampel 25,31, dan 38 ditemukan adanya parasit bentuk aseksual pada masing masing hari 21, 14 tanpa disertai demam, pasien nomer sampel 45 ditemukan parasit aseksual pada hari 7 pengamatan tanpa disertai demam.

Kelompok sampel dengan polimorfisme *pfmdr1* N86Y dan tanpa polimorfisme memiliki respon terapi berbeda di tiap kelompok. Pasien dengan polimorfisme *pfmdr1* pada kodon 86 yang mengalami kegagalan terapi (ETF, LTF) sebanyak 1 orang (9,1%), dan yang

sembuh (ACPR) sebanyak 6 orang (14,6%). Sedangkan pasien tanpa polimorfisme yang mengalami kegagalan terapi (ETF, LTF) sebanyak 10 orang (90,9%) dan sisanya 35 orang (85,4%) sembuh (ACPR). Analisis statistik dengan uji *Fisher* membandingkan antara respon terapi sembuh dan gagal terapi di kelompok dengan polimorfisme *pfmdr1* N86Y dan kelompok tanpa polimorfisme *pfmdr1* N86Y diperoleh $p = 1,000$ berarti menunjukkan tidak adahubungan antara polimorfisme *pfmdr1* dengan respon terapi, dan diperoleh nilai RR sebesar 0,64 (95% CI 0,97- 4,27). Artinya, pasien dengan polimorfisme *pfmdr1* N86Y memiliki kemungkinan 0,64 kali untuk mengalami gagal terapi dibandingkan dengan pasien yang tanpa polimorfisme *pfmdr1* N86Y (Tabel 4).

Tabel 4. Tabel hubungan antara respon terapi dengan polimorfisme *pfmdr1*N86Y

Variabel	Gagal terapi(ETF,LTF) Jumlah (%)	Sembuh (ACPR) Jumlah (%)	RR	95% CI	p
Polimorfisme <i>pfmdr1</i> N86Y	1 (9,1%)	6 (14,6%)	0,64	0,97- 4,27	1,000
Tanpa Polimorfisme <i>pfmdr1</i> N86Y	10 (90,9%)	35 (85,4%)			

Mengacu kepada protokol pemeriksaan dan pengawasan efikasi pengobatan antimalaria pada terapi malaria falsiparum tanpa komplikasi WHO 2003 tentang perubahan kebijaksanaan pengobatan di suatu wilayah dinyatakan dalam 4 periode yaitu *Grace periode* bila kegagalan terapi klinis antara 0-4%; *Alert* bila angkanya 5-14%; *Action* bila mencapai 15-24%, dan *change* bila $\geq 25\%$ (WHO, 2003). Protokol yang sama dari WHO tahun 2005 dan laporan global efikasi obat dan resistensi obat antimalaria WHO 2010 menetapkan angka 10% untuk kegagalan terapi atau angka kesembuhan kurang dari 90% dalam melakukan perubahan

kebijaksanaan pengobatan di suatu wilayah^{1,14,15}. Dengan demikian penggunaan kombinasi artesunat amodiakuin di Hanura masuk dalam kategori *action* dan harus mulai difikirkan untuk kemungkinan terapi alternatif sebagai pengganti kombinasi ini melalui penelitian klinis, serta harus dilakukan monitoring dan evaluasi pemakain artesunat amodiakuin^{1,15,16}.

Kelompok sampel dengan polimorfisme *pfmdr1* N86Y dan negatif memiliki respon terapi berbeda di tiap kelompok. Analisis statistik dengan uji *Fisher* karena data tidak terdistribusi normal, yang membandingkan antara respon terapi sembuh dan gagal terapi di kelompok polimorfisme *pfmdr1* N86Y dan

kelompok tanpa polimorfisme *pfmdr1* N86Y menunjukkan tidak ada hubungan antara polimorfisme *pfmdr1* dengan respon terapi ($p = 1,000$, RR: 0,64 (95% CI 0,97-4,27)) . Penelitian ini sejalan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian yang dilakukan di Kenya oleh Holmgren *et al.*(2006) dimana diperoleh hasil tidak adanya hubungan antara kegagalan terapi amodiakuin dengan polimorfisme pada *pfmdr1*. Namun, Holmgren *et al.* (2007) kembali menganalisis hubungan mutasi *pfmdr1* dengan kejadian infeksi rekuren setelah terapi amodiakuin tunggal dan kombinasi artesunat amodiakuin di Kenya (2003) dan Zanzibar (2002-2003 dan 2005), menyimpulkan bahwa *pfmdr1* 1246Y bersama 86Y dan 184Y berperan dalam kejadian resistensi dan kegagalan terapi amodiakuin^{17,18}.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Susceptibility of plasmodium falciparum to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996–2004. Geneva: World Health Organization; 2005.
2. Dinas Kesehatan Lampung. Profil kesehatan provinsi Lampung tahun 2009. Lampung: Dinas Kesehatan Lampung; 2010.
3. Koenderink JB, Kavishe RA, Rijpma SR., Russel FG. The ABCs of multidrug resistance in malaria. Trends in Parasitology. 2010; 26:440-6
4. Cowman AF. The p-glycoprotein homologues of plasmodium falciparum: are they involved in chloroquin resistance?. Parasitology Today. 1991; 7(4):70-5
5. Thwing JJ, Odero CO, Odhiambo FO, Otieno KO, Kariuki S, Ord R, Roper C, et al. In-vivo efficacy of amodiaquine-artesunate in children with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in western Kenya. Trop. Med. Int. Health. 2009; 14 (3): 1-7
6. Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. Malaria Journal. 2009; 8:89
7. Ochong EO, van den Broek IV, Keus K, Nzila A. Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003; 69(2): 184–7
8. Veiga MI, Ferreira PE, Bjorkman A, Gil JP. Multiplex PCR-RFLP methods for *pfcr1*, *pfmdr1*, and *pfdhfr* mutations in *Plasmodium falciparum*. Mol. & Cell. Probes. 2006; 20:100- 4
9. Dasuki. Analisis polimorfisme fragmen gen *pfmdr1* pada penderita malaria di RSUD Bontang Kalimantan Timur [Tesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. 2009.
10. Gunawan S. Epidemiologi malaria. Dalam: Harijanto PN (editor). Malaria, epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis, & penanganan. Jakarta: EGC; 2000. hlm. 1-15.
11. Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, et al. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. Antimicrob. Agents. Chemother. 1999; 43:2943-9
12. Grobusch MP, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: invitro chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of *pfmdr1* N86Y polymorphism in Lambarene, Gabon. Parasitology. 1998; 116:211-17
13. Holmgren G, Gil JP, Ferreira PM, Veiga MI, Obonyo CO, Bjorkman A. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfcr1* 76T and *pfmdr1* 86Y. Infection, Genetics and Evolution. 2006; 6: 309-14.

14. World Health Organization. Assesment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization; 2003. hlm. 10-65.
15. World Health Organization. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
16. Adjuik M, Agunamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M. Amodiaquine-Artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in africa children. The Lancet. 2002; 359:1365-72
17. Holmgren G, Hamrin J, Svard J, Martensson A, Gill JP, Bjorkman A. Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. Infect. Gen. and Evol. 2007; 7:562-9
18. Holmgren G, Bjorkman A, Gill JP. Amodiaquine resistance is not related to rare findings of *Pfmdr1* gene amplifications in Kenya. Trop. Med. Int. Health. 2006; 11:1808–12.