IDENTIFIKASI MUTASI GEN *PFATP6 PLASMODIUM FALCIPARUM* PENANDA RESISTENSI TERHADAP ARTEMISININ DI PROVINSI JAMBI

Akhirul Jumaisal Sitompul[1,*] , Dra Asnaily, M.Kes[2]

[1] Poltekkes kemenkes Jambi,Jl.H.Agus Salim, Jambi, Indonesia
[2] Poltekkes kemenkes Jambi,Jl.H.Agus Salim, Jambi, Indonesia
[1]ajumaisaljambi@gmail.com*; [2]dra.asnailym.kes@gmail.com
* ajumaisaljambi@gmail.com

Abstrak

P.*falciparum* merupakan salah satu jenis *plasmodium* paling berbahaya, karena menyebabkan morbilitas dan mortalitas. Penggunaan Obat Anti Malaria (OAM) dalam jangka panjang menyebabkan timbulnya resistensi. Tujuan penelitian untuk mengetahui adanya mutasi pada gen PfATP6 *P. falciparum* pada 74 penderita malaria di Provinsi Jambi. Metode uji molekuler berupa studi deskriptif laboratoris untuk mengidentifikasi mutasi genotip L263E, S769N dan E431K gen PfATP6 *P. falciparum.* Hasil isolat genotip L263E dan E431K tidak dapat di identifikasi, sedangkan genotip S769N gen PfATP6 menunjukan wild type. Isolat-isolat *P. Falciparum* dari Provinsi Jambi pada gen PfATP6 yang terkait dengan penanda resistensi terhadap artemisinin tidak ditemukan mutasi.

Kata Kunci : *P. Falciparum[1], gen PfATP6[2], genotip L263E[3], S769N[4] dan E431K[5].*

Abstract

P. falciparum is one of the dangerous kind of plasmodium, causing morbidity and mortality. The use of Obat Anti Malaria (OAM) in the long term caused the resistance lead. Purpose this study to know the exixtency in the gene PfATP6 P. falciparum on sample which taken from patients74 that already diagnose as malaria sufferer in Jambi Province. Metodes molecular term of descriptive laboratory to identify mutations genotip L263E, S769N and E431K gene PfATP6 P. falciparum. Results isolates genotyped L263E and E431K can not be identified, meanwhile genotyped S769N gene showed wildtype. Isolates P. falciparum from Jambi Province in gene PfATP6 that related as a sign the resistence toward to artemisinincan not be mutated.

Keywords: *P. Falciparum[1], gen PfATP6[2], genotip L263E[3], S769N[4] dan E431[5]*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit tropis yang disebabkan oleh s*porozoa* dari genus *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina[1].

Plasmodium falciparum merupakan salah satu jenis *plasmodium* paling berbahaya, karena menyebabkan morbilitas dan mortalitas yang paling tinggi terutama menyerang bayi, balita dan ibu hamil (*pregnancy-associated malaria/PAM*) serta menyebabkan malaria cerebral[2].

Angka Kasus malariaper seribu penduduk atau *Annual Parasite Incidence* (API) dipakai saat ini karena semakin lengkapnya fasilitas pemeriksaan malaria di pelayanan kesehatan dasar khususnya Puskesmas[3]. Nilai API Provinsi Jambi tahun 2015 sebesar 0,47 dengan sebaran Kabupaten Sarolangun 0,11 per 1000 penduduk, Merangin 0,97 per 1000 penduduk dan Batang Hari per 0,72 per 1000 penduduk[4].

Penanggulangan malaria telah dilakukan sejak lama melalui berbagai upaya, misalnya penanggulangan vektor malaria, pengobatan penderita dan perbaikan lingkungan. Fenomena resistensi terhadap klorokuin dan kombinasi sulfadoksin-pirimetamin yang terjadi di negara-negara endemis malaria, menyebabkan WHO merekomendasikan pengunaan ACT (*Artemisinin Combination Therapyh*)sebagai sebagai OAM (Obat Anti Malaria) bagi penderita *P.falciparum* sejak tahun 2001[5].

Pemerintah Indonesia mengeluarkan kebijakan penggunaan artemisinin berbasis ACT pada tahun 2004[6]. Saat ini terdapat 3 regimen ACT yang digunakan dalam program malaria yaitu *artesunat-amodokuin, artemether-lumefantrine* dan *dihidroartemisinin-piperakuin* khusus untuk daerah Papua[7].

Artemisinin sudah sejak lama dikenal sebagai obat tradisional di Cina untuk penderita demam serta bersifat skizontosida untuk *P. falciparum* dan *P. vivax*[8]. Struktur molekulnya berdasarkan adanya 1,2,4 trioksan (Ikatan endoperoksida), bekerja dengan cara membentuk jembatan peroksida melalui pembentukan radikal bebas atom karbon pusat yang di bantu oleh pemecahan Fe^{2+} / f*erri pro toporphyrin* IX (FPIX) atau melalui alkilasi DNA protein secara kovalen yang dapat merusak membran parasit hingga menyebabkan kematian plasmodium[9].

Mekanisme resistensi terhadap artemisinin terjadi diduga berkaitan dengan mutasi gen *PfATP6*[10]. Mutasi terjadi karena ganguan pompa kalsium untuk memasukan kedalam sitoplasma vakuola makanan pada parasit[11].G en *PfATP6* merupakan protein kalsium *ATPase* tipe *Sarco Endoplasmik Calsium-ATPase* (SERCA) yang berfungsi meregulasi ion kalsium sel sitoplasma *plasmodium*[12].

Berdasarkan kasus resistensi terhadap OAM di masa lalu yang muncul setelah pengobatan jangka panjang, penurunan efikasi OAM harus sering dipantau khususnya pada daerah endemis[13]. Pada isolat *artemether* di Guyana-Francis menunjukan peningkatan nilai IC50 sehingga terjadi polimorfisme gen *PfATP6 pada kodon S769N, L263E dan E431K*[14]. Penelitian pada *P. yoelii* menunjukan tingkat kesembuhan dibawah 75% di sepanjang perbatasan Thailand dan Kamboja setelah pengobatan artemeter-lumefantrine[15]. Hasil penelitian tentang pemberian artemisinin secara tunggal di Cina tahun 2008 belum menunjukkan adanya mutasi pada kodon *S769*[16].

Penelitian tentang gen *PfATP6* pada isolat *P.falciparum* di Indonesia sampai saat ini belum banyak dilakukan. Masih menjadi suatu pertanyaan bagaimana variasi genetik *PfATP6* pada isolat *Plasmodium* di Indonesia. Di Provinsi Jambi belum tersedia data mengenai adanya mutasi pada gen *PfATP6 P. Falciparum* penanda resistensi terhadap *artemisinin*. Identifikasi terhadap mutasi pada gen *P.*

falciparum ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai terjadinya kegagalan atau resistensi pengobatan di daerah endemis malaria di Provinsi Jambi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah uji molekuler berupa studi deskriptif laboratoris untuk mengidentifikasi mutasi *genotip L263E, S769N* dan *E431K gen PfATP6 P.falciparum.* Penelitian dilakukan di daerah endemis malaria di Jambi, yaitu di Kabupaten Sarolangun, Merangin, Muaro Jambi, Tebo, Batang Hari dan Kota Jambi. Penelitian dilakukan mulai bulan Juli sampai dengan bulan Desember 2016. Sampel darah penderita diperiksa di Laboratorium RSUD / Puskesmas setempat dan di Laboratorium Biomolekuler FK Unsri untuk pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Populasi adalah semua tersangka malaria (klinis malaria) yang datang berobat di poliklinik dan atau yang dirawat di bagian rawat inap Puskesmas / RSUD Kabupaten Sarolangun, Merangin, Muaro Jambi,Tebo, Batang Hari dan Kota Jambi. Sampel adalah semua tersangka malaria yang memenuhi kriteria inklusi penelitian. Teknik pengambilan sampel Besarnya sampel tidak terbatas sampai batas waktu yang ditentukan**.** Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *passive case detection* (PCD) yaitu menunggu penderita tersangka malaria datang kelaboratorium untuk pemeriksaan sediaan darah tepi dan atau sampel darah yang dibawa perawat dari ruang rawat inap RSUD/Puskesmas, dan *active case detection* (ACD), yaitu mencari penderita malaria di daerah endemis secara aktif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pengumpulan sampel yang dilakukan dari bulan Juli hingga Desember 2016 secara *passive case detection* (PCD) dan *active case detection* (ACD) pada 74 orang penderita klinis malaria dengan sebaran Kabupaten Merangin 25 (33,78%), Tebo 19 (22,67%), Sarolangun (9,45%), Batang Hari 10 (13,51%), Muaro Jambi 8 (10,81%) dan Kota Jambi 5 (96,75%).

Hasil pemeriksaan preparat apus giemsa didapat 7 (9,45%) sampel positif malaria dengan rincian *P.vivax*2 buah (2,70%) dan *P. falciparum* 5 buah (6,75%). Sampel positif *P.vivax* berasal dari Puskesmas Payo Selincah Kota Jambi 1 (1,35%) dan Puskesmas Singkut Kabupaten Sarolangun 1 (1,35%). Sampel positif *P. falciparum* berasal dari Puskesmas Kebun XI Kabupaten Muaro Jambi 1 (1,35%), Puskesmas Pasir Tuo Mayang Kabupaten Tebo 2 (2,70%) Puskesmas Tembesi Kabupaten BatangHari 1 (1,35%) dan RSUD Abun Jani Kabupaten Merangin 1 (1,35%). Sebanyak 67 (90,54%) sampel negatif *plasmodium* dengan rincian 24 (32,43%) dari Kabupaten Merangin, Tebo 17 (22,97%), Sarolangun 6 (8,10%), Batang Hari 9 (12,16%), Muaro Jambi 7 (9,45%) dan Kota Jambi 4 (5,40%).

Tabel 4.1
Hasil pemeriksaan Preparat Apus Giemsa pada sampel dari Kabupaten Merangi, Tebo, Sarolangun, Batang Hari, Muaro Jambi dan Kota Jambi

Lokasi Pengambilan Sampel (Kab/RSU/PKM)	Hasil Pemeriksaan Preparat Apus Giemsa			Total n (%)
	Positif *P. falciparum* n (%)	Positif *P. vivax* n (%)	Negatif n (%)	
Merangin	1	-	24 (32,43)	25 (33,78)
Tebo	2 (2,70)	-	17 (22,97)	19 (25,67)
Sarolangun	-	1	6 (8,10)	7 (9,45)
BatangHari	1 (1,35)	-	9 (12,16)	10 (13,51)
Muaro Jambi	1 (1,35)	-	7 (9,45)	8 (10,8)
Kota Jambi	-	1 (1,35)	4 (5,40)	5 (6,75)
Total	5 (6,75)	2(2,70)	67 (90,54)	74 (100)

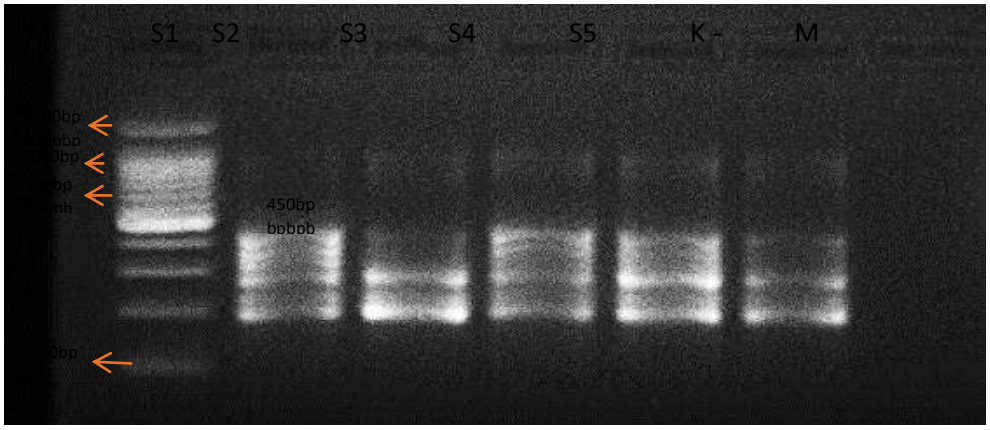
4.1.1. Hasil Amplifikasi dan Digesti Gen *PfATP6* Kodon *L263E* dan *E431K*

Amplifikasi gen *PFATP6* dengan metode nested PCR mengunakan primer yang berbeda-beda. Amplifikasi gen *PfATP6* pada kodon 263,431 dan 769 mengunakan primer 948 menghasilkan produk sebesar 948 bp. Hasil amplifikasi didapatkan sampel nomor satu (S1) memberikan hasil positif pada PCR Nest-1A menghasikan produk sebesar 984 bp (gambar (4.2) dan pada Nest-2A tidak terbentuk pita pada 775 bp (gambar 4.3).



Gel agarosa 2%(b/v; 80V, 30 menit)
Gambar 4.2.Visualisasi Nest-1A

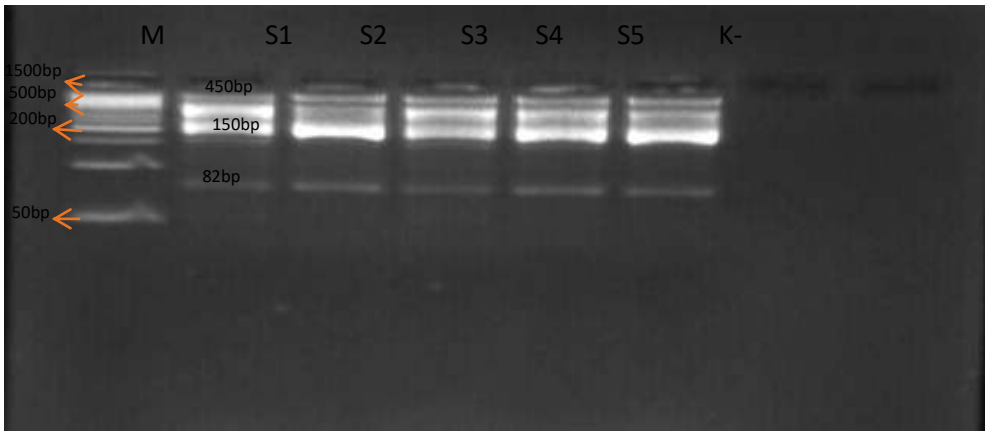
Keterangan:
M : Marker/penanda ukuran DNA
K- : Kontrol negatif
1-5: Sampel isolat *P. falciparum*



(Gel agarosa 2% (b/v; 80V,30 menit)
Gambar 4.3.Visualisasi Nest-2A

Keterangan:
M : Marker/penanda ukuran DNA
K- : Kontrol negatif
1-5: Sampel isolat *P. falciparum*

Hasil amplifikasi tadi kemudian dilanjutkan dengan RFLP untuk mengetahui ada atau tidak nya mutasi serta jenis mutasi yang terjadi pada gen tersebut. Deteksi mutasi kodon *L263E* pada gen *PfATP6* dilakukan dengan menggunakan enzim *Apo* I. *Apo* I akan mengenali dan memotong sekuen alel yang wild type dan menghasilkan potongan fragmen DNA sebesar 775 bp. Adanya pita yang tidak terpotong lengkap menunjukan alel campuran atau mutasi hetero zigot. Apabila ada mutasi akan terbentuk pita pada775 bp dan bila wildty peter bentuk pada pita pada 633 bp dan 142 bp. Hasil visualisasi ke lima sampel tidak terbentuk pita pada 775bp (Gambar 4.4).

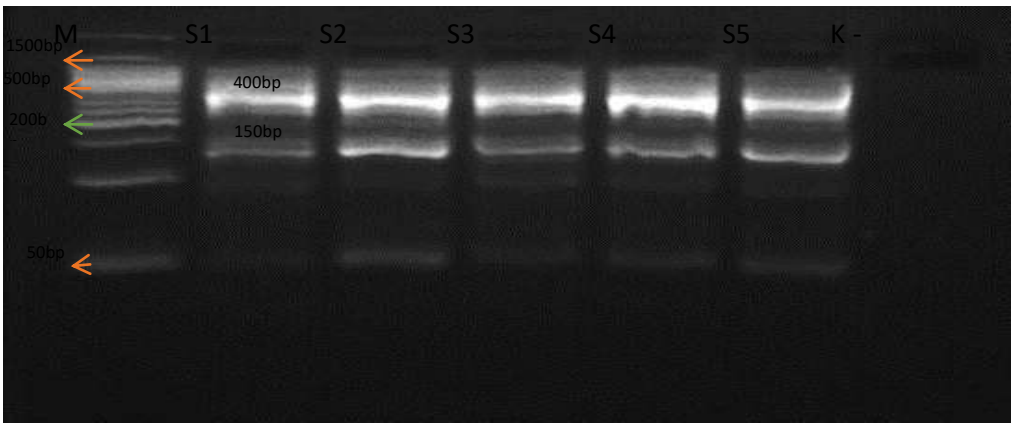


(Gel agarosa 4% (b/v); 80 V, 50menit)
Gambar 4.4.Visualisasi RFLP gen PfATP6 Kodon L263E dengan enzim *Apo* I
Keterangan:

ISSN 2581-026x (print) | ISSN 2716-2486

M : Marker/penandaukuran DNA
K- : Kontrol negatif
1-5: Sampel isolat *P. falciparum*

Untuk mendeteksi alel mutan pada kodon E431K digunakan enzim *Mboo* II. *Mboo* II akan mengenali dan memotong sekuen alel yang wild type dan menghasilkan potongan fragmen DNA sebesar 775 bp. Adanya pita yang tidak terpotong lengkap menunjukan alel campuran atau mutasi hetero zigot. Apabila ada mutasi akan terbentuk pita pada 299 bp, 241 bp, 117 bp, 69 bp, 49bp dan bila wildtype terbentuk pada pita pada416bp, 241bp, 69bp 49bp. Hasil visualisasi ke lima sampel tidak terbentuk pita pada 755bp (Gambar4.5).



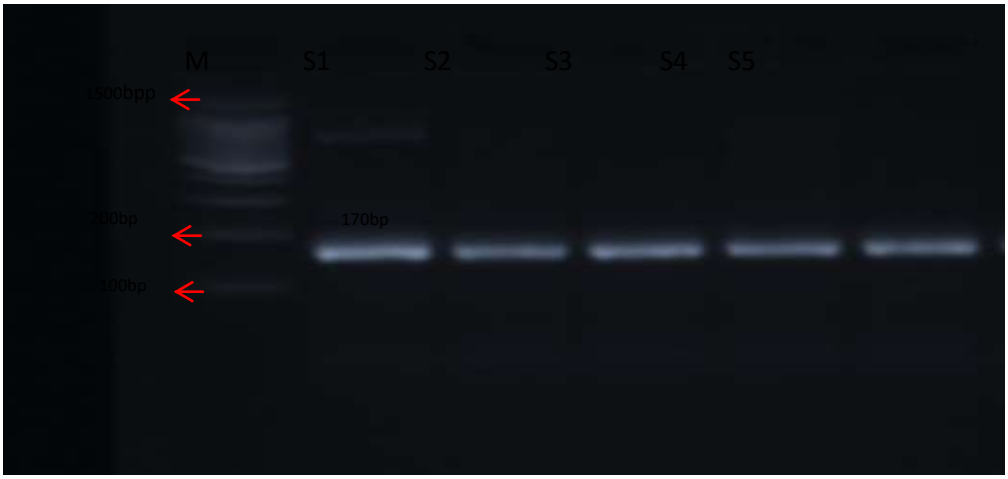
(Gel agarosa 4% (b/v); 80 V, 50menit)
Gambar 4.5.VisualisasiRFLP gen PfATP6 KodonE431K denganenzim*MBoo*I

Keterangan:
M : Marker/penandaukuran DNA
K- : Kontrolnegatif
1-5 :Sampelisolat*P. falciparum*

4.1.2. HasilAmplifikasidanDigesti Gen PfATP6 Kodon S769N

Hasil amplifikasi Nest-1B dilanjutkanke Nest-2Bb pada kodon S769N menunjukan hasil tidak terbentuk pita pada 164 bp (Gambar 4.6).

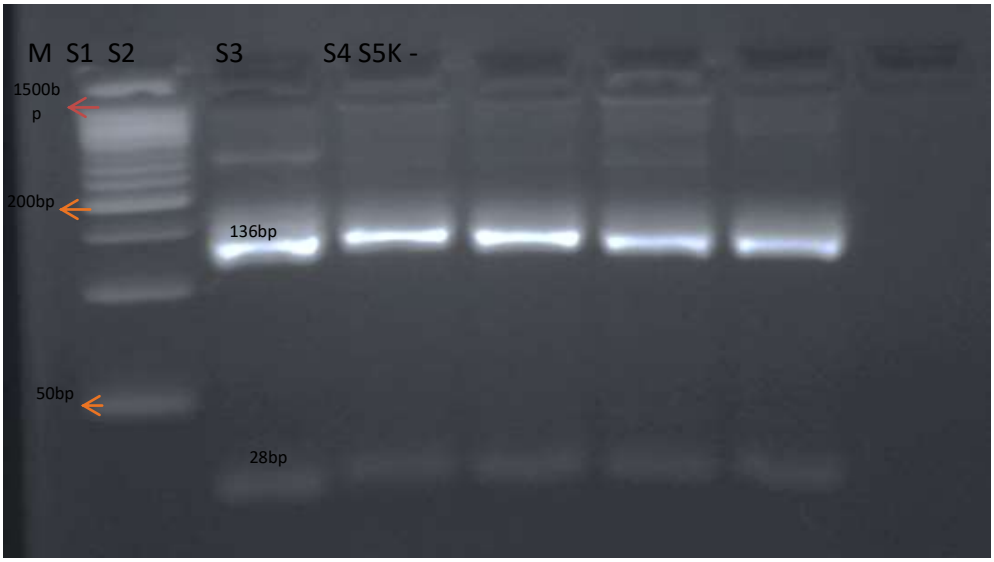
ISSN 2581-026x (print) | ISSN 2716-2486



(Gel agarosa 2% (b/v; 80V, 30 menit)
Gambar 4.6.VisualisasiNest-2Bb

Keterangan:
M : Marker/penanda ukuran DNA
1-5: Sampel isolat *P. falciparum*

Hasil amplifikasi Nest-2Bb kemudian dilanjutkan dengan RFLP untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi serta jenis mutasi yang terjadi pada gen tersebut. Untuk mendeteksi alel mutasi kodon *S769N* pada gen *PfATP6* dilakukan dengan menggunakan enzim *D deI.* Apa bila ada mutasi akan terbentuk pita pada 164 bp dan wildty pepada 136 bp dan 28 bp. Hasil visualisasi pada sampel satu terbentuk pita 136 bp dan 28 bp dan keempat sampel tidak terbentuk pita pada164 bp (Gambar 4.7).



(Gel agarosa 4% (b/v); 80 V, 50menit)
Gambar 4.7.VisualisasiRFLP gen PfATP6 KodonS769Ndenganenzim*DdeI*

ISSN 2581-026x (print) | ISSN 2716-2486

Keterangan:

M : Marker/penandaukuran DNA
K- : Kontrol negatif
1-5 : Sampel isolate *P. falciparum*

4.1.3 Profil Genotip dan Variasi kodon *L263E, E431K* dan *S769N Gen PfATP6 P. falciparum*

Data pada Tabel 4 menunjukkan hasil positif amplifikasi dan frekuensi distribusi munculnya alel mutan pada gen *PfATP6* kodon *L263E, E431K* dan *S769N* yang terkait dengan resistensi terhadap artemisinin di Provinsi Jambi.

Tabel 4.Hasil Positif Amplifikasi dan Frekuensi Distribusi Alel Mutan

Kodon	Jumlah Isolat	Positif Amplifikasi	Jumlah alel mutan	Persentase (%)
L263E	5	0	0	0
E431K	5	0	0	0
S769N	5	1	0	0

Analisis dari 5 isolat gen *PfATP6* kodon 769 hanya satu yang positif diamplifikasi dan tidak ada alel mutan. Sedang pada 263 dan 431 tidak dapat diamplifikasi.

Pembahasan

Pengunaan artemisinin sebagai OAM diberbagai belahan dunia dalam jangka panjang menimbulkan kekhawatiran fenomena resistensi seperti klorokuin. Beberapa penelitian yang dilakukan untuk mengetahi posisi mutasi pada gen PfATP6 sebagai penanda resistensi dengan penghambatan kerja sarkoplasmik endoplasmik retikulum calcium ATPase/*SERCA*[17].

Prevalensi alel mutan yang terkait dengan resistensi terhadap artemisinin di provinsi Jambi belum pernah diteliti sebelumnya. Penelitian di Provinsi jambi menunujkan hasil yang kurang memuaskan. Beberapa kendala teknis saat pengambilan sampel yang dilakukan dari bulan Juli sampai Desember 2016 dari 74 sampel Klinis dari Kabupaten yang ada di Provinsi Jambi setelah diperiksa secara mikroskopis, didapat 5 sampel positif *P. falciparum.* Rendahnya sampel positif disebabkan salah satunya akibat pengambilan sampel yang hanya satu kali langsung menegakan diagnosa[18]. Untuk mendapatkan hasil yang baik harus melakukan pemeriksaan serial darah (3 kali dalam 48 jam) karena pada infeksi *P. falciparum* yang stadium lanjutnya berada di kapiler alat dalam (sekuestrasi) parasit sulit ditemukan dalam darah tepi[19]. Pewarnaan dilakukan sesegera mungkin setelah pengambilan sampel. Parasit dapat berkurang sampai 50 % dan

morfologi berubah setelah 24 jam pada darah EDTA[20]. Kasus asimtomatik pada daerah endemisitas malaria yang tinggi sering terjadi pada anak-anak dan orang dewasa di pulau Sumba Indonesia[21].

Jarak tempat pengambilan, penyimpanan dan tempat pemeriksaan yang sangat jauh menyebabkan perubahan komponen pada darah yang dapat menyebabkan DNA terfragmentasi sehingga DNA sulit diamplifikasi. Hal ini kemungkinan dapat menjelaskan kegagalan amplifikasi gen *PfATP6* yang dilakukan[22].

Program eleminasi malaria yang dilakukan secara nasional berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 293/MENKES/SK/ IV/2009 dan di Provinsi Jambi sejak tahun 2015 mempengaruhi insiden malaria. Pemberiaan kelambu gratis, penyuluhan tentang PSN dan OAM berbasis ACT berjalan dengan lancar yang didukung seluruh *stakeholder* menyukseskan program tersebut[23].

Waktu pengumpul sampel yang dilakukan pada bulan Juli sampai Desember tidak tepat. Kepadatan nyamuk tinggi pada bulan Maret dan kurang pada bulan Juni dan September (musim kering), pengamatan dilakukan pada empat bulan tersebut diatas, dan disimpulkan bahwa curah hujan mempunyai hubungan yang *significant* terhadap kejadian malaria (p = 0,04< 0,05)[24]. Penelitian tentang pengamatan terhadap pola musim penularan malaria di Sumba Timur Provinsi NTT menyimpulkan bahwa parasit malaria (semua spesies) banyak ditemukan pada musim hujan (Maret) dari pada saat musim kemarau (Agustus)[25].

Daerah endemis malaria seperti Kabupaten Merangin dan Tebo sulit dijangkau karena keterbatasan kendaraan operasional. Pada beberapa Puskesmas tidak mempunyai tenaga Laboratorium dan masih di dominasi oleh tenaga kesehatan lain seperti perawat untuk pemeriksaan malaria mengunakan RDT. Penjualan OAM secara bebas membuat masyarakat enggan untuk berobat. Disamping itu dibeberapa daerah, isolat yang gagal diamplifikasi kemungkinan disebabkan rendahnya densitas parasitemia dan prevalensi parasit pada isolat-isolat *P. falciparum* yang diambil pada musim kering[26].

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan isolat genotip *L263E* dan *E431K* gen *PfATP6 P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien penderita malaria di Provinsi Jambi tidak dapat diamplifikasi. Hal ini disebabkan kualitas sampel yang kurang baik dan pada pemeriksaan mikroskopis menunjukan densitas yang rendah pada sampel nomor 2,3,4 dan 5, berbeda dengan sampel nomor 1 dengan denisitas yang tinggi. Menurut Scopel*et et al*., 2004, jumlah rerata parasit yang rendah dapat menyebabkan hasil PCR negatif. Densitas sampel darah kapiler lebih tinggi dari darah vena, karena darah kapiler merupakan penghubung antara pembuluh arteri dan vena. Plasmodium mengalami sekuestrasi yaitu terkumpulnya eritrosit pada pembuluh kapiler[27].

Berbeda dengan hasil positif amplifikasi pada kodon *S769N* dengan menunjukan hasil tidak ada alel mutan. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan di Cina tahun 2008 tentang pemberian artemisinin secara tunggal belum menunjukkan adanya mutasi pada kodon *S769*[28]. Penggunaan ACT dalam waktu lama dapat menyebabkan timbulnya strain-strainyang resisten terhadap ACT khususnyakomponen artemisinin. Hal ini terjadi karenaadanya proses adaptasi

ISSN 2581-026x (print) | ISSN 2716-2486

dari parasit yang berkembang sehingga timbul mutasi-mutasi pada satu atau lebih basa nukleotida pada gen-gen tertentu. Penelitian tentang sebelum pemberian *ACT-rejimen* dan sesudah didaerah endemis malaria di Suriname pada 28 isolat menunjukkan genotipe tipe liar di tiga posisi *; L263 , A623 , S769* . Terjadi mutasi pada 20 posisi kodon di Ghana yangpaling banyak ditemukan yaitu kodon *D639G* (50%), E431K (10,3%), *D443E* (7,4%), dan *M813Q* (7,4%)[29].

Berasarkan hasil penelitian-penelitian tersebut tampak ditemukan banyak titik mutasi.Hal ini sangat membingungkan untuk penentuan prediksi posisi mutasi yang berkaitan dengan resistensi terhadap artemisinin. Penelitian yang telah dilakukan pada 4 kodon 263, 431, 623 dan 769 yang diprediksi berkaitan dengan suseptibilitas terhadap artemisinin tidak menunjukkan hasil yang konsisten. Walaupun demikian Keempat kodon tersebut secara umum masih diprediksi dapat menyebabkan penurunan sensitivitas artemisinin, baik secara bersama-sama atau tunggal[30].

Simpulan

Isolat-isolat *P. falciparum* di Provinsi Jambi pada gen *PfATP6* yang terkait dengan penanda resistensi terhadap artemisinin tidak ditemukan mutasi. Isolat genotip *L263E* dan *E431K* gen *PfATP6 P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien penderita malaria di Provinsi Jambi tidak dapat diidentifikasi. Hasili dentifikasi genotip *S769N* gen *PfATP6 P. falciparum* pada sampel yang diambil dari pasien yang didiagnosis sebagai penderita malaria di Provinsi Jambi menunjukan wildtype.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winzeler, E. A.,dan Manary, M. J., 2014. Genomik Resistensi Obat Obat Antimalarial Artemisinin, Genome Biology. 15:544.
2. Schilke, L. J., 2009. Artemisinin-based Combination Therapy (ACTs) Drug Resistance Trends in plasmodium falciparum Isolates in Southeast Asia, University of South Florida.
3. Kementerian Kesehatan RI, 2016. Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia, Infodatin Kemenkes RI,Jakarta.Departemen Kesehatan Republik Indonesia
4. Dinas Kesehatan Provinsi Jambi, 2015 Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, Profil Kesehatan Provinsi Jambi.
5. Cheng, Q., Dennis, E. K., and Michelle, L. G., 2012.Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*A process linked to dormancy. International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance 2 249–255.
6. Departemen Kesehatan RI, 2007. Pedoman Penemuan Penderita Malaria, Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta. Indonesia.
7. Harijanto, 2011. ACT sebagai Obat Pilihan Malaria Ringan di Indonesia, SMF Ilmu Penyakit Dalam. RSU Bethesda Tomohon, Sulawesi Utara. CDK 183/Vol.38 no.2.

ISSN 2581-026x (print) | ISSN 2716-2486

8. Tina, W., 2010.Tesis, Sintesis Dihidroartemisinin dan Uji Aktivitas Antimalaria Secara in Vitro dengan Proses Hidrogenasi Menggunakan Katalis Ni/TiO2.FMIPA UI.
9. Bousema, J. T., 2003. Treatment failure of Pyrimethamine-Sulphadoxine and Induction of Plasmodium falciparum Gametocytaemia in Children in Western Kenya.The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 80(6): 914–918.; 8: 427–430.
10. Mugittu, K., Blaise, G., Hassan, M., and Hans, P. B., 2006 Molecular Monitoring Of Plasmodium Falciparum Resistance To Artemisinin In Tanzania.Malaria Journal. 5:126. 10.1186/1475-2875-5-126.
11. White, N. J., 1999. Delaying Antimalarial Drug Resistance with Combination Chemotherapy.Parasitologia. 41: 301-308.
12. Simamora, D.,dan Fitri, L. E., 2007. Resistensi obat malaria, mekanisme dan peran obat kombinasi obat Antimalaria untuk mencegah.Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 2.
13. Zakeri, S., Samaneh, H., Sakineh, P., Mandana, A., and Ahmad, R., 2012. Molecular Assessment Of Atpase6 Mutations Associated With Artemisinin Resistance Among Unexposed And Exposed Plasmodium Falciparum Clinical Isolates To Artemisinin-Based Combination Therapy. Malaria Journal. 11:373 Page 2 of 8.
14. Golenser, J., Waknine, J. H., Krugliak, M. H. N., and Grau, H. E., 2006. Current Prespectives on The Mechanism of Action of Arthemisinins. International Journal Parasitology. 36:1427-1441.
15. Adhin, R. M., Mergiory, L. B and Stephen, G. V., 2012. Status of Potential PfATP6 Molecular Markers for Artemisinin Resistance in Suriname.Malaria Journal. 11:322 Page 2 of 5.
16. Zhang, G., Guan, Y., Zheng, B., Wu, S.,and Tang, L, 2008. No PfATPase6 S769N mutation found in *Plasmodium falciparum* isolates from China, Malaria Journal. 7:122.
17. Asih, P. B. S., Dewi, R. M.,Tuti, S., Sadikin, M., Sumarto, W., and Sinaga, B., 2009. 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. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.80(6): 914–918.
18. Kementerian Kesehatan RI, 2014. Pedoman Manajemen Malaria. Direktur Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta. Indonesia
19. Gandahusada, S., Ilahude, H.H .D.,dan Pribadi, W., 1998. Parasitologi Kedokteran. Jakarta. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
20. Harijanto, P. N., Agung, N., danCarta, A. G., 2010. Malaria dari Molekuler ke Klinis. EGC.Jakarta.
21. Syafruddin, D., Bousema, J.T., Baidjoe A., Groot, P.G., Ven, A.J., Fijnheer, R., 2015. Is asymptomatic malaria really Asymptomatic? Hematological, vascular and Inflammatory effects of asymptomatic Malaria parasitemia, Elsevier, Journal of Infection 71, 587e596

22. Sony, P.D., 2007. Perbandingan Efikasi Terapi Kombinasi Sulfadoksin-Pirimetamin + Artesunat dengan Sulfadoksin-Pirimetamin + Amodiakuin pada Penderita Malaria Falciparum Tanpa Komplikasi.Tesis Program Pasca sarjanaUniversitas Sumatera Utara (tidak dipublikasikan).
23. Departemen Kesehatan RI, 2009. Keputusan Menteri Kesehatan No.293/SK/Menkes/IV/2009 tentang Eleminasi Malaria di Indonesia. Jakarta
24. Arsin, A.A., 2012.Malaria di Indonesia.Tinjauan Aspek Epidemiologi. Penerbit.Masagena Press.Makasar.
25. Sutanto, I. Suprianto, S., Widiaty, A., Rukmiyati, Rűckert, P., and Bethmann, A. V., 2012, Good Efficacy of Artemether - Lumefantrine for Uncomplicated Falciparum Malaria in Eastern Sumba, East Nusatenggara, Indonesia. *ActaMedicaIndonesiana*. 44(3): 187-192.
26. Kusriastuti, R., 2008. Kebijakan dan Strategi Tatalaksana Malaria di Indonesia, dalam Proceeding Book KPPIK FKIII.Jakarta hal:78-V2.
27. Dahlstrom, S., Veiga, M. I.,and Ferreira, P. J., 2008.Diversity of the Sarco/Endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase orthologue of Plasmodium Falciparum (PfATP6).Infection, Genetics and Evolution.8: 340 -
28. Suwandi, J. F., 2015. Gen PfATP6 dan Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Golongan Artemisinin, Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Jurnal Kesehatan Universitas Lampung. Volume 5.Nomor 9.
29. Kwansa, B., Ayi, I., Suzuki, T., Otchere, J., Kumagai, T., and Anyan, W. K., 2011. Plasmodium Falciparum Isolates From Southern Ghana Exhibit Polymorphisms In The Serca-Type Pfatpase6 Though Sensitive To Artesunate In Vitro. Malaria Journal. 10(1):187.

30. Menegon, M., Sannela, A. R., and Majorie, G ., 2008. Detection of Novel Point Mutations in the Plasmodium FalcipmumNoedl, Harold, 2008.Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia.The New England Journal of Medicine. 359: 2619-2620.

Daftar referensi hanya berisi sumber yang dirujuk, dan semua sumber yang dirujuk harus tercantum dalam daftar rujukan. Sumber referensi paling sedikitberjumlah 30 dengan 80% dari jurnal yang diterbitkan 5 tahun terakhirdan 20% daribuku, majalahataukoran yang diterbitkan 10 tahunterakhir. Referensi ditulis dengan format **American Psychological Association (APA) 6th Edition**. Disarankan untuk menggunakan aplikasi pengelolaan daftar pustaka misalnya Mendeley.

Petro-Nustas, W., Tsangari, H., Phellas, C., & Constantinou, C. (2013). Health beliefs and practice of breast self-examination among young cypriot women. *Journal of Transcultural Nursing*, *24*(2), 180–188.

https://doi.org/10.1177/1043659612472201

Umeh, K., & Jones, L. (2010). Mutually dependent health beliefs associated with breast self-examination in British female university students. Journal of American College Health , 59 (2), 126-131.

Abolfotouh, M. A., Banimustafa, A. A., Mahfouz, A. A., Al-Assiri, M. H., Al-Juhani, A. F., & Alaskar, A. S. (2015). Using the health belief model to predict breast self examantion among Saudi women. BMC Public Health , 15 (10.1186/s12889-015-2510-y), 1163.

Ahmadian, M., Carmack, S., Samah, A. A., Kreps, G., & Saidu, M. B. (2016). Psychosocial predictors of breast self-examination among female students in Malaysia: A Study to Assess the Roles of Body Image, Self-efficacy and Perceived Barriers . APJCP , 17 (3), 1277-1284.

American Cancer Society. (2016). Cancer facts & figures 2016. Retrived from www.cancer.org

Brain, N. P. (2005). An aplication fo extended HBM to the prediction of BSE among women with family history of BC. BJ .

Kratzke, C., Vilchis, H., & Amatya, A. (2013). Breast cancer prevention knowledge, attitudes, and behaviors among college women and mother-daughter communication. *J Community Health, 38*. doi 10.1007/s10900-01309651-7), 560-568.

Lancet. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. ACP J Club , 360(9328):187-95.

Noroozi, A., Jomand, T., & Tahmasebi, R. (2010). Determinants of breast self-examanation performance among Iranian women: An application of the helath beliaf model. J Canc Educ , 1-10.