

PERBANDINGAN DETEKSI *Plasmodium* spp. ANTARA CARA PEMERIKSAAN MIKROSKOPIK SEDIAAN DARAH TIPIS DENGAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Rilvia Mona Cambey
Josef S. B. Tuda
Angle M. H. Sorisi

COMPARISON OF DETECTION *Plasmodium* spp. USING MICROSCOPIC EXAMINATION THIN BLOOD SMEAR WITH *POLYMERASE CHAIN REACTION*

ABSTRACT

Malaria disease is one of the priority of the health programs because it affects the Human Development Index, which result in increased mortality among infants, toddlers, pregnant woman and adults. WHO noted that in 2010 there was 219 million cases of malaria with mortality rate of 660.0000 annually. Until now, the microscopic method who has many limitation is still the gold standard in malaria examination. On other side, Polymerase Chain Reaction which proved accurate as it can identify *Plasmodium* up to the stage of DNA is not yet use as routine examination of Malaria Disease. The purpose of this study was compare the sensitivity and specificity of detection *Plasmodium* spp. using the gold standard Microscopic examination (thin blood smear) with the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The design of this study is Diagnostic Test with a sample of 30 people whose blood was drawn in malaria patients who come to the RSUD Budi Mulia Bitung and RS Manembo-nembo since September 2013- Januari 2014. Blood taken made into a thin blood smear then extracted and proceeded to PCR. Then from the result of both test, diagnostic test applied to determine the level of sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value.

Results : The level of sensitivity of the PCR was 100%, specificity 60%, positive predictive value 83,33%, and negative predictive value 100%. Conclusion: PCR is more accurate in determining the plasmodium species and produce fewer errors than the diagnosis of Microscopic examination thin blood smears.

Keywords : Microscopic Examination, Thin blood smear, Polymerase Chain Reaction (PCR), sensitivity, specificity

ABSTRAK

Malaria merupakan salah satu prioritas program kesehatan karena mempengaruhi *Human Development Index* yang mengakibatkan meningkatnya angka kematian pada bayi, balita, ibu hamil, dan orang-orang dewasa. WHO mencatat pada tahun 2010 terdapat 219 juta kasus malaria dengan angka kematian 660.000 setiap tahunnya. Sampai sekarang ini, metode mikroskopis yang memiliki banyak keterbatasan masih menjadi standar baku emas dalam pemeriksaan malaria. Di lain pihak *Polymerase Chain Reaction* yang terbukti akurat karena dapat mengidentifikasi *plasmodium* sampai pada tahap DNA belum dijadikan pemeriksaan rutin penyakit malaria. Tujuan : Penelitian ini membandingkan tingkat sensitivitas dan spesifisitas deteksi *Plasmodium* spp menggunakan pemeriksaan baku emas yaitu mikroskopis sediaan darah tipis dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode : Penelitian ini merupakan penelitian uji diagnostik dengan sampel sejumlah 30 orang yang darahnya diambil pada pasien malaria yang datang ke RSUD Budi Mulia dan RS Manembo-nembo sejak bulan September 2013 - Januari 2014. Darah yang diambil, dibuat menjadi hapusan darah tipis, kemudian diekstraksi dan di lanjutkan ke pemeriksaan PCR. Kemudian dari hasil

kedua pemeriksaan, dilakukan uji diagnostik untuk mengetahui tingkat sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif dan nilai duga negatif.

Hasil : Tingkat sensitivitas PCR sebesar 100%, spesifisitas sebesar 60%, nilai duga positif sebesar 83,33% dan nilai duga negatif sebesar 100%.*Simpulan*: PCR lebih akurat dalam menentukan spesies plasmodium dan lebih sedikit menghasilkan kesalahan diagnosis daripada pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis.

Kata Kunci :Pemeriksaan Mikroskopis, Sediaan Darah Tipis,*Polymerase Chain Reaction* (PCR), Sensitivitas, Spesifisitas.

Malaria merupakan salah satu prioritas program kesehatan karena mempengaruhi *Human Development Index* yang mengakibatkan meningkatnya angka kesakitan dan kematian pada bayi, balita, ibu hamil dan orang-orang dewasa terutama pada negara-negara yang belum berkembang.^{1,2,3} Malaria ditemukan hampir di seluruh bagian dunia, tercatat lebih dari 100 negara yang beriklim tropis maupun subtropis beresiko terhadap malaria. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2010 terdapat sekitar 219 juta kasus malaria dengan 660.000 angka kematian setiap tahunnya.⁴

Salah satu indikator keberhasilan *Millennium Development Goal* (MDG) yang harus dicapai negara-negara berkembang khususnya Indonesia, yaitu dengan mengendalikan penyebaran dan menurunkan jumlah kasus malaria menjadi setengahnya pada tahun 2015 nanti. Angka kejadian malaria pada tahun 1990 adalah sebesar 4,68 per 1000 penduduk, yang pada tahun 2015 ditargetkan turun menjadi < 1 per 1000 penduduk (yang berarti telah terjadi penurunan angka kejadian secara nasional sebesar > 50%).³ Data tahun 2012 Indonesia memiliki total 214 juta penduduk dan 113 juta penduduk di antaranya hidup di daerah endemis dan beresiko terhadap malaria. Kasus malaria terbanyak terdapat di kawasan timur Indonesia, antara lain Propinsi Papua, NTT, NTB, Maluku, Maluku Utara, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara.^{5,6}

Data survei Dinas Kesehatan Sulawesi Utara tahun 2012 dilaporkan

total 6.394 kasus positif malaria. Kota Manado tercatat 323 kasus positif, *Annual Parasite Incidence* (API) sebesar 0,74%. Lebih spesifik lagi di kota Bitung dengan 69 kelurahan ditemukan total 825 jiwa yang positif terkena malaria dengan API 4,39%.⁷

Konsep epidemiologi menjelaskan terdapat tiga faktor yang mempengaruhi kejadian penyakit malaria, yaitu *host* (pejamu), *agent* (penyebab penyakit), dan *environment* (lingkungan). *Host* malaria terbagi dua yaitu manusia yang disebut *intermediate host* dan nyamuk anopheles betina yang disebut *definitive host*. Penyebab malaria adalah protozoa dari genus *Plasmodium*. *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia ialah *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*.^{3,5}

Keakuratan dan cepatnya menarik diagnosis sangat penting untuk memerangi malaria. Diagnosis malaria ditegakkan dengan beberapa metode, yaitu pemeriksaan mikroskopis, uji immunoserologis, dan pemeriksaan biomolekuler yang berguna untuk mendeteksi plasmodium di dalam tubuh manusia.⁸ Pemeriksaan secara mikroskopis menjadi gold standar dalam pemeriksaan laboratorium malaria karena pengerjaannya yang relatif cepat dan murah. Pemeriksaan mikroskopis ini terdiri dari dua yaitu pemeriksaan sediaan darah tebal dan pemeriksaan sediaan darah tipis. Pemeriksaan sediaan darah tipis lebih khusus bertujuan untuk menemukan dan menentukan *species* serta stadium plasmodium karena morfologi plasmodium

terlihat jelas pada sediaan darah tipis dibanding sediaan darah tebal. Tapi bila keadaan parasitemia yang rendah (<40 p/μl) dan terdeteksi infeksi campuran (*mix*) maka informasi yang akan didapatkan pemeriksaan mikroskopis sangatlah terbatas. Ditambah pada kasus ragu-ragu dan tidak terlatihnya petugas laboratorium maka pemeriksaan mikroskopik akan memakan waktu yang relatif lama dan menghasilkan keterbatasan hasil.⁹

Polymerase Chain Reaction (PCR) dapat menjadi metode untuk mendeteksi *Plasmodium spp* yang sensitif karena PCR dapat mendeteksi level parasitemia yang sangat rendah sampai dengan 1-3 parasit/μl.⁹ PCR adalah pemeriksaan biomelekuler dengan cara mendiagnosis parasit berdasarkan asam nukleat menggunakan molekul *Deoxyribonucleic acid (DNA) reporter* untuk mendeteksi rangkaian DNA atau RNA spesifik yang dimiliki parasit tertentu. Prinsip kerjanya adalah mengamplifikasi *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* secara sistematis sehingga dapat mengidentifikasi DNA spesifik plasmodium untuk membedakan spesiesnya satu sama lain. Target amplifikasi DNA pemeriksaan ini ialah gen *species-specific-sequences* pada *Small Sub Unit ribosomal Ribonucleic Acid (SSrRNA)*.^{10,11}

Hingga saat ini metode konvensional dengan menggunakan mikroskop masih menjadi standar emas pemeriksaan rutin semua pasien yang terinfeksi malaria. Namun karena keterbatasan yang ada, hasil dari mikroskopik sering terdapat kelemahan. Di lain pihak PCR yang memiliki keakuratan yang sangat tinggi masih belum dijadikan pemeriksaan rutin malaria. Oleh karena itu pada kesempatan ini, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian yang membandingkan hasil dari teknik pemeriksaan mikroskopik sediaan darah dengan teknik pemeriksaan PCR. Dimana pemeriksaan mikroskopik yang peneliti pilih ialah pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis agar

spesies plasmodium terlihat jelas karena morfologi plasmodium dalam eritrosit terlihat utuh pada sediaan darah tipis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan uji diagnostik untuk mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas metode pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis dengan metode PCR. Besar sampel yang digunakan sudah dihitung berdasarkan rumus besar sampel uji diagnostik $N = Z\alpha^2 \text{sen}(1-\text{sen})/d^2P$. Dimana N = Besar sampel, Sen = Sensitivitas Alat, d = Presisi penelitian, α = tingkat kesalahan, dan P = prevalensi penyakit. $1,6^2 \times 0,9,0,1/0,1^2 \times 0,75 = 30,75$. Didapatkan sebanyak 30 sampel. 30 sampel ini didapatkan dari pasien dengan malaria klinis yang datang ke RSUD Budi Mulia dan RS Manembo-nembo sejak bulan September 2013-Januari 2014. Pasien dengan malaria klinis diminta inform consent kemudian diambil darahnya lalu dibuat menjadi sediaan darah tipis di Laboratorium Biomolekuler Bagian Parasitologi Klinik Fakultas Kedokteran Unsrat. Sediaan darah tersebut kemudian dibaca hasilnya kemudian dikerok dan diekstraksi DNA untuk dilanjutkan pada pemeriksaan PCR. Hasil dari PCR dan pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis kemudian diukur dengan jumlah **true positive (TP)**, jumlah **true negative (TN)**, jumlah **false positive (FP)**, dan jumlah **false negative (FN)**. **TP** adalah Jumlah sampel yang dideteksi positif *Plasmodium* pada pemeriksaan darah tipis dan dinyatakan positif pada pemeriksaan PCR. **TN** adalah Jumlah sampel yang dideteksi negatif *Plasmodium* dengan pemeriksaan sediaan darah tipis dan dinyatakan negatif oleh pemeriksaan PCR. **FP** adalah Jumlah sampel yang dideteksi negatif *Plasmodium* dengan pemeriksaan sediaan darah tipis dan digolongkan positif oleh pemeriksaan PCR. **FN** adalah jumlah sampel yang dideteksi positif *Plasmodium*

pada pemeriksaan sediaan darah tipis dan dinyatakan negatif pada pemeriksaan PCR.

		Mikroskopik Sediaan Darah Tipis		Total
		Positif	Negatif	
PCR	Positif	20	4	24
	Negatif	0	6	6
Total		20	10	30

Nilai tersebut kemudian ditabulasikan pada tabel 2 x 2. Untuk mendapatkan besar sensitivitas digunakan rumus $TP/(TP+FN) \times 100\%$, spesifisitas $TN/(TN+FP) \times 100\%$, nilai prediktif positif $TP/(TP+FP) \times 100\%$, dan nilai prediktif negatif $TN/(TN+FN) \times 100\%$.

HASIL PENELITIAN

Pada uji diagnostik ini didapatkan hasil sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif, dan nilai duga negatif dari hasil pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis dan PCR.

Tabel 1. Hasil Uji Diagnostik pada Tabel Nilai Prediktif

Sensitivitas

$$\frac{20}{20 + 0} \times 100\% = 100\%$$

Spesifisitas

$$\frac{6}{6 + 4} \times 100\% = 60\%$$

Nilai Prediktif Positif

$$\frac{20}{20 + 4} \times 100\% = 83,3\%$$

Nilai Prediktif Negatif

$$\frac{6}{6 + 0} \times 100\% = 100\%$$

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan di RS Budi Mulia Bitung dan RS Manembo-nembo terdapat 30 pasien malaria yang diambil sampel darahnya, 24 ditemukan positif plasmodium dan 6 ditemukan negatif plasmodium. Terdapat

juga perbedaan hasil dimana Mikroskopik membaca *P. vivax* dan PCR membaca *P. falciparum* karena DNA hanya teramplifikasi dengan primer dari *P. falciparum*. Ada juga sampel yang dibaca *P. falciparum* pada pemeriksaan mikroskopik tetapi ditemukan infeksi *mix* pada PCR. Pemeriksaan mikroskopik sangat ditentukan oleh keterampilan petugas lab untuk mengidentifikasi jenis plasmodium, dilain pihak level parasitemia yang rendah ($<40 \text{ p}/\mu\text{l}$) membuat pemeriksaan mikroskopik menunjukkan hasil yang negatif padahal dalam sebenarnya belum tentu negatif.

Menjawab keterbatasan pemeriksaan mikroskopik dibutuhkan pemeriksaan PCR sebagai lanjutan untuk mengkonfirmasi hasil dari mikroskopik. Pada penelitian ini PCR terbukti keakuratannya dengan nilai sensitifitas sebesar 100% karena terdapat 20 sampel yang benar-benar positif (TP) dan tidak terdapat sampel *false negative*. Nilai ini sangat baik untuk menilai kemampuan alat diagnostik untuk mendeteksi penyakit. Maksud dari sensitifitas adalah kemungkinan hasil uji diagnostik PCR akan positif bila dilakukan pada sekelompok subjek yang sakit malaria adalah sebesar 100%. Terbukti bahwa PCR benar-benar akurat dan terpercaya untuk mendeteksi pasien yang memang terkena malaria. Berbeda dengan sensitifitas, spesifisitas bertujuan untuk menunjukkan kemampuan alat diagnostik menentukan bahwa subjek tidak sakit malaria.²⁹ Pada penelitian ini, spesifisitasnya menunjukkan presentasi sedang yaitu 60% karena terdapat 4 *False Positive*, 2 sampel masing-masing dinyatakan *P. vivax* dan *P. falciparum* pada mikroskopik tetapi ditemukan *mix* pada PCR kemudian sisanya dinyatakan positif *P. vivax* pada mikroskopik tetapi dinyatakan positif *P. falciparum* pada PCR. Faktor-faktor terjadinya *False Positive* ialah mungkin terdapatnya kesalahan pengerjaan atau pembacaan *slide* sediaan darah tipis atau terjadinya kontaminasi dalam pengerjaan

PCR, penggunaan primer juga berperan dalam penurunan spesifisitas dalam pemeriksaan ini. Didapatkan juga 6 sampel yang benar-benar dinyatakan negatif mikroskopik dan dibuktikan negatif juga pada PCR. Karena pemeriksaannya yang sangat sensitif terkadang walaupun belum mengeluarkan gejala klinis trias malaria, PCR sudah mendeteksi orang sebagai pasien malaria. Itulah yang menyebabkan spesifisitas PCR dalam presentasi sedang. Nilai prediktif positif menunjukkan probabilitas seseorang menderita malaria apabila PCR menunjukkan hasil positif adalah 83,33%. Nilai prediktif negatif PCR menunjukkan angka sempurna 100%, dimana probabilitas seseorang tidak menderita malaria apabila PCR menunjukkan hasil negatif adalah 100%. Ini berarti PCR sangat baik untuk mendiagnosis malaria dibanding pemeriksaan Mikroskopik.

Bila penelitian ini dibandingkan dengan penelitian dari Coleman dan kawan-kawan di Thailand(2006), sensitifitas PCR mencapai 96% dan spesifisitasnya mencapai 98%. Ini dikarenakan jumlah sampel yang mencapai 672 sampel serta terlatihnya tenaga laboratorium mikroskopik dan PCR yaitu di atas 10 tahun masa kerja dan kriteria sampel yaitu di atas 500p/μl sehingga mereka mendapatkan hasil sensitivitas dan spesifisitas yang sama-sama besar.¹² Jika dibandingkan lagi dengan penelitian Reni Herman dan kawan-kawan di Kalimantan, sensitifitas 99% dan spesifisitas 93%. Menurut mereka sensitifitas PCR tergantung juga pada kepadatan parasit. Penelitian mereka menggunakan sampel yang kepadatan parasitnya mencapai 500-4999 p/μl.¹³

Keakuratan PCR memang sudah terbukti, tetapi bukan berarti pemeriksaan ini bisa langsung menggantikan pemeriksaan mikroskopik sebagai *gold standart*. Alasannya ialah karena tingkat sensitivitasnya yang 100% dan spesifisitas 60%, walaupun orang yang tidak menunjukkan trias gejala Malaria tetapi

tinggal di daerah endemik bisa saja dideteksi positif Malaria pada PCR. Terdapat juga kelemahan PCR yaitu tidak dapat mendeteksi stadium seksual dan aseksual dari parasit itu sendiri. Oleh karena itu alangkah baiknya jika pemeriksaan berjalan bersama : gejala trias malaria positif kemudian dilanjutkan pemeriksaan mikroskopik lalu dipastikan kembali dengan PCR. Guna untuk mencapai diagnosis yang tepat, cepat, dan efektif.

KESIMPULAN

Perbandingan deteksi *Plasmodium Spp* antara cara pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis dengan teknik PCR menghasilkan hasil bahwa PCR lebih akurat dan lebih sedikit menghasilkan kesalahan diagnosis dari pemeriksaan mikroskopik yaitu dengan sensitifitas sebesar 100%, spesifisitasnya sebesar 60%, nilai duga positif dan nilai duga negatif masing-masing sebesar 83,33% dan 100%. Dalam penelitian ini spesifisitas dari PCR menurun tetapi bukan PCR tidak layak menjadi alat diagnostik malaria. Mungkin ini terjadi karena keterbatasan-keterbatasan dalam penelitian ini seperti keterbatasan waktu untuk mendapatkan sampel yang lebih banyak lagi, keterbatasan pengetahuan peneliti dalam membaca sediaan darah, ataupun terjadi kontaminasi pada saat pengerjaan. Walaupun spesifisitas dalam presentasi sedang tetapi sensitivitas dan nilai prediktif negatif mendapat presentasi sempurna 100%. PCR terbukti dapat mendeteksi plasmodium sampai level 1 p/μl, berbeda dengan mikroskopik yang hanya dapat mendeteksi plasmodium sampai level 40 p//μl.

SARAN

Pemeriksaan mikroskopik sudah sangat baik, tetapi karena keterbatasan yang ada akan lebih baik jika dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR agar hasil deteksi plasmodium yang didapatkan, dikonfirmasi kembali guna

menghilangkan bias pemeriksaan Mikroskopik yang cepat dan efektif untuk menekan angka rekurensi dan kematian pada penyakit Malaria.

DAFTAR PUSTAKA

1. Laihad FJ, Arbani PR. Situasi Malaria di Indonesia dan Penanggulangannya. Dalam : Harijanto PN, (ed). Malaria dari Molekuler ke Klinis. EGC, 2009.
2. Gandahusada S, Ilahude HD, Prinadi W, Staff Pengajar FKUI : Parasitologi Kedokteran, Edisi Ketiga, Cetakan Ke-6 Bagian Parasitologi FKUI, Jakarta, 2006.
3. Wagey MT, Nugroho A. Siklus Hidup Plasmodium Malaria. Dalam : Harijanto PN, (ed). Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan. ECG, Jakarta, 2000.
4. WHO. World Malaria Report 2012. Geneva, 2013.
5. Depkes RI. Riset Penelitian Dasar (RISKESDAS). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta, 2010
6. Depkes RI, Dinamika Penularan Malaria, Sub Direktorat Malaria, Ditjen PPM dan PL, Jakarta, 2003..
7. Dinas Kesehatan Sulawesi Utara. Data Informasi Angka Kejadian Malaria Kota Bitung. 2012.
8. Safar R. Parasitologi Kedokteran Protozoologi, Helminologi, Entomologi. Yrama Widya, 2010
9. Snounou G et al. High Sensitivity of Detection of Human Malaria Parasites by The Use of Nested Polymerase Chain Reaction. Thailand, 1993.
10. Sutanto I. Diagnosis Mikroskopik dan Serologik Malaria. Dalam : Harianto PN, (ed) Malaria Dari Molekuler ke Klinis. EGC, 2009.
11. Gertsman BB. Epidemiology Kept Simple : An Introduction to Classic and Modern Epidemiology. New York. Wiley-Liss: 1998.
12. Coleman RE, Maneechai N, Yim-Amnuaychok N, Kumpitak C, Soyseng V, Miller RS, Thimasarn K, Sattabongkot J: Field evaluation of the ICT malaria PF/PV immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand, 2009.
13. Herman R, Ariyanti E. Deteksi dan Spesiasi Parasit Malaria Sampel Monitoring Pengobatan Dihydroartemisinin Piperquine di Kalimantan dan Sulawesi: Mikroskopis Vs Polymerase Chain Reaction. Media Litbang Kesehatan Vol.21, 2011.