

Perbandingan deteksi *Plasmodium falciparum* dengan metode pemeriksaan mikroskopik dan teknik *real-time polymerase chain reaction*

Elril T. Langi
Janno B. B. Bernadus
Greta J. P. Wahongan

¹Kandidat Skripsi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

²Bagian Parasitologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

Email: etlangi12083@gmail.com

Abstract: *Plasmodium falciparum* is one of the species of parasites causing tropical malaria disease. *Plasmodium falciparum* was reported as often being the major source of pain and even death in most cases. The data released by WHO shows that, globally, 198 millions of malaria cases occurred in 2013 with 548 thousands as cause of death. Microscopic examination is a gold standard for detecting *Plasmodium falciparum*. Although this method has certain limitations in diagnosing complication infection, phases of parasitemia, and also the capability of laboratory's medical staff factor. Nowadays, there has been innovation in biomolecular department, that is examination using PCR which can accurately detect the plasmodium, due to the DNA amplification. This method however, has not often used by doctors in diagnose malaria disease. The aim of this research is to determine the comparison of malaria detection using microscopic verification of plasmodium falciparum with real-time PCR verification. The method used in this research is diagnostic with 35 blood samples of patient suffering malaria disease. The blood samples from patient's vena were then divided into thick and thin microscopic sample, and some were putted into EDTA tube for DNA extraction in the laboratory using real-time PCR verification. The result of this research shown that sensitivity and specificity rate of PCR is 100% accurate. Conclusion: detection result of plasmodium falciparum using real-time PCR verification produced equal result as microscopic verification.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Microscopic method, *Real-time* Polymerase Chain Reaction (PCR)

Abstrak: *Plasmodium falciparum* adalah salah satu spesies parasit penyebab penyakit malaria, yaitu malaria tropika. *Plasmodium falciparum* dilaporkan sebagai spesies yang paling banyak menyebabkan angka kesakitan dan kematian pada manusia akibat penyakit malaria. *World Health Organization* (WHO) melaporkan secara global, diperkirakan 198 juta kasus malaria terjadi secara keseluruhan pada tahun 2013 dan menyebabkan 584 ribu kematian. Pemeriksaan mikroskopik adalah pemeriksaan *gold standard* untuk mendeteksi *Plasmodium falciparum*. Namun pemeriksaan ini memiliki keterbatasan dalam hal mendiagnosis infeksi campuran, infeksi dengan keadaan parasitemia, dan tidak terlatihnya tenaga kesehatan laboratorium. Saat ini dalam bidang biomolekuler telah dikembangkan pemeriksaan *real-time polymerase chain reaction* (PCR) yang akurat untuk mendeteksi *plasmodium*, karena didasarkan pada amplifikasi DNA *plasmodium*, namun pemeriksaan ini belum rutin digunakan untuk mendiagnosis malaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan deteksi *Plasmodium falciparum* dengan pemeriksaan mikroskopik dan pemeriksaan *real-time* PCR. Metode penelitian ini ialah uji diagnostik. Sampel pada penelitian ini yaitu 35 sampel darah pasien suspek malaria. Sampel darah vena yang diambil langsung dibuat sediaan darah tipis dan sediaan darah tebal untuk diperiksa di mikroskop, sedangkan darah yang tersisa dimasukkan dalam tabung EDTA, dan dibawa ke Laboratorium untuk dibuat ekstraksi DNA dan dilanjutkan dengan pemeriksaan *real-time* PCR. Hasil penelitian menunjukkan tingkat

sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR sebesar 100%. *Simpulan:* Hasil deteksi *Plasmodium falciparum* dengan pemeriksaan *real-time* PCR memiliki efektivitas yang setara dengan metode pemeriksaan mikroskopik sebagai *gold standart*.

Kata kunci: *Plasmodium falciparum*, Pemeriksaan Mikroskopik, *Real-time Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Plasmodium falciparum adalah salah satu spesies parasit penyebab penyakit malaria, yaitu malaria tropika. *Plasmodium falciparum* dilaporkan sebagai spesies yang paling banyak menyebabkan angka kesakitan dan kematian pada manusia akibat penyakit malaria.^{1,2,3}

World Health Organization (WHO) melaporkan secara global, diperkirakan 198 juta kasus malaria terjadi secara keseluruhan pada tahun 2013 dan menyebabkan 584 ribu kematian. Sebagian besar kasus kematian (90%) terjadi di Afrika, dan pada anak-anak (78%) yang berusia di bawah 5 tahun.⁴

Di Indonesia insiden penyakit malaria pada tahun 2013 adalah 1,9%, menurut dibandingkan pada tahun 2007 (2,9%).⁵

Data Riskeddas Provinsi Sulawesi Utara tahun 2013, dilaporkan insiden dan prevalensi malaria di Sulawesi Utara sebesar 2,7% dan 10% kasus, yang didiagnosis berdasarkan gejala klinik dan pemeriksaan darah. Dilaporkan insiden dan prevalensi malaria di kota Manado (1,1% dan 5,3%), dan di kota Bitung (1,6% dan 6,1%).⁶

Salah satu upaya pengendalian malaria ialah dengan menegakkan diagnosis yang tepat. Diagnosis malaria ditegakkan atas dasar adanya gejala klinik, uji imunoserologis, dan ditemukannya plasmodium dalam darah penderita dengan pemeriksaan laboratorium. Pemeriksaan laboratorium malaria antara lain pemeriksaan mikroskopik, *Rapid Diagnostic Test* (RDT), dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).^{2,7}

Pemeriksaan mikroskopik merupakan pemeriksaan *gold standart*, metodenya cepat dan murah. Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan dua metode, yaitu pemeriksaan pada sediaan darah tebal dan sediaan darah tipis. Pemeriksaan

mikroskopik memiliki keterbatasan dalam hal mendiagnosis infeksi campuran, infeksi pada keadaan parasitemia, dan tidak terlatihnya tenaga kesehatan laboratorium.^{8,9}

Pada saat ini telah dikembangkan pemeriksaan biomolekuler dengan teknik PCR. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan yang sensitif untuk mendeteksi *Plasmodium spp.*, yang didasarkan pada amplifikasi DNA *plasmodium*. Salah satu teknik PCR ialah *real-time* PCR. Secara umum PCR memiliki keunggulan dalam hal mendeteksi *plasmodium* pada level parasitemia yang sangat rendah sampai dengan 1-5 parasit/ μ l darah. Selain itu, PCR dapat memperlihatkan infeksi campuran yang kadang sulit dideteksi pada pemeriksaan mikroskopik maupun RDT dengan parasitemia yang rendah.^{8,10}

Dalam pemilihan pemeriksaan penunjang yang tepat sebaiknya tetap memperhatikan efektivitas penggunaan di lapangan, durasi waktu, keterjangkauan harga, keterampilan pengguna, dan keakuratan alat. Pemeriksaan penunjang yang tepat akan membantu dalam menegakkan diagnosis pasti dan pemilihan pengobatan yang tepat agar tidak terjadi masalah resistensi terhadap pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan perbandingan deteksi *Plasmodium falciparum* dengan metode pemeriksaan mikroskopik dan teknik *real-time* PCR. Penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya, yang mana deteksi *plasmodium* hanya difokuskan pada *Plasmodium falciparum* dengan metode pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tebal dan sediaan darah tipis dibandingkan dengan teknik *real-time* PCR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan uji diagnostik untuk mendapatkan sensitivitas, spesifisitas, nilai duga positif dan nilai duga negatif dengan membandingkan pemeriksaan mikroskopik dan pemeriksaan *real-time* PCR dalam mendeteksi *Plasmodium falciparum*. Pengambilan sampel darah dan pemeriksaan mikroskopik dilakukan di Rumah Sakit Budi Mulia Bitung. Pemeriksaan *real-time* PCR dilakukan di laboratorium biomolekuler bagian Parasitologi Klinik Fakultas Kedokteran Unsrat Manado. Sampel pada penelitian ini adalah penderita yang dicurigai ada gejala klinis malaria. Jumlah sampel sebanyak 35. Nilai-nilai uji diagnostik yang diukur dalam penelitian ini meliputi *true positive* (TP), jumlah *true negative* (TN), jumlah *false positive* (FP) dan jumlah *false negative* (FN).¹¹ Analisis data uji diagnostik menggunakan tabel 2 x 2 dengan keluaran berupa sensitivitas, spesifitas, nilai duga negatif dan nilai duga positif.

HASIL PENELITIAN

Tabel. 1. Analisis Tabulasi Silang Pemeriksaan Mikroskopik dan Pemeriksaan *Real-time* PCR

		Mikroskopik		
		Positif	Negatif	Total
<i>Real-time</i> PCR	Positif	18	0	18
	Negatif	0	17	17
Total		18	17	35

Berdasarkan tabel 1, Hasil tabulasi silang antara pemeriksaan mikroskopik dan pemeriksaan *real-time* PCR didapatkan *true positive* sebanyak 18 sampel, *true negative* sebanyak 17 sampel, tidak terdapat sampel *false positive* dan *false negative*.

Sensitivitas

$$= \frac{18}{18} \times 100 \% = 100 \%$$

Spesifisitas

$$= \frac{17}{17} \times 100 \% = 100 \%$$

Nilai Duga Positif

$$= \frac{18}{18} \times 100 \% = 100 \%$$

Nilai Duga Negatif

$$= \frac{17}{17} \times 100 \% = 100 \%$$

BAHASAN

Pada pemeriksaan mikroskopik 35 sampel darah yang diperiksa maka didapatkan 18 sampel positif *Plasmodium falciparum* (51,4%). Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Cambey di RS. Budi Mulia Bitung pada tahun 2014, ditemukan hasil yang positif terhadap *Plasmodium falciparum* lebih sedikit daripada sampel yang negatif terhadap *Plasmodium falciparum*, ataupun yang ditemukan dengan plasmodium lain. Dari 30 jumlah sampel terdapat 5 sampel yang positif terhadap *Plasmodium falciparum*.¹²

Setelah dilakukan pemeriksaan dengan *real-time* PCR pada 35 sampel darah yang sama, didapatkan hasil yang sama dengan hasil dari pemeriksaan mikroskopik, yaitu 18 sampel (51,4%) positif terhadap *Plasmodium falciparum* dan 17 sampel (48,6%) negatif terhadap *Plasmodium falciparum*. Hal ini bisa dikarenakan primer *real-time* PCR yang digunakan adalah primer yang spesifik terhadap *Plasmodium falciparum* sehingga tidak didapatkan plasmodium lain.

Berdasarkan analisis tabulasi silang antara pemeriksaan mikroskopik dan *real-time* PCR diperoleh hasil *true positive* sebanyak 18 sampel, berarti bahwa sampel ini didiagnosis benar dan positif terhadap *Plasmodium falciparum* oleh pemeriksaan mikroskopik dan *real-time* PCR juga mampu menunjukkan hasil yang positif dan benar terhadap *Plasmodium falciparum*. *True negative* sebanyak 17 sampel dan tidak terdapat sampel *false positive* maupun *false negative*. Hal ini menunjukkan bahwa *real-time* PCR mampu menyingkirkan diagnosis malaria *falciparum* terhadap

sampel yang negatif.

Analisis uji diagnostik yang didapatkan melalui perhitungan dengan menggunakan rumus uji diagnostik, diperoleh keluaran sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR sebesar 100%. Hal ini menunjukkan bahwa *real-time* PCR memiliki efektivitas yang sama dengan pemeriksaan mikroskopik.

Hasil pada penelitian ini sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilaksanakan oleh Mangold *et al* pada tahun 2005, diperoleh sensitivitas *real-time* PCR sebesar 94,1% dan spesifisitas *real-time* PCR sebesar 100%.¹³ Perbedaan hasil sensitivitas ini bisa dikarenakan jumlah sampel yang digunakan pada penelitian Mangold *et al* lebih banyak dibandingkan dengan penelitian ini, yaitu sebanyak 358 pasien.

Namun penelitian ini didukung dengan penelitian pada tahun 2013 oleh Khan *et al* yang membandingkan pemeriksaan *real-time* PCR dan pemeriksaan mikroskopik dalam mendeteksi antigen untuk diagnosis malaria, didapatkan hasil sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR yang sama, sebesar 100%.¹⁴ Dengan jumlah sampel yang cukup banyak yaitu 300 sampel darah pasien yang suspek malaria.

Tingginya sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR pada penelitian ini sangat dipengaruhi oleh pemeriksaan mikroskopik sebagai pembanding *gold standart*. Hasil pemeriksaan mikroskopik pada penelitian ini didapatkan atas identifikasi oleh tenaga laboratorium Rumah Sakit Budi Mulia Bitung yang telah terlatih sehingga dapat mendeteksi *Plasmodium falciparum* dengan tepat. Berdasarkan hasil penelitian ini, *real-time* PCR telah mampu mendeteksi *Plasmodium falciparum* dengan tepat menurut pembanding *gold standart*, sehingga dapat menjadi bahan pertimbangan pemeriksaan alternatif lain untuk mendeteksi plasmodium penyebab penyakit malaria, disamping pemeriksaan *gold standart*.

Dalam pelaksanaan penelitian ini terdapat keterbatasan yang mungkin dapat menjadi pengaruh dalam hasil penelitian,

seperti jumlah sampel yang terbatas diakibatkan keterbatasan waktu yang ada.

SIMPULAN

Hasil deteksi *Plasmodium falciparum* dengan pemeriksaan *real-time* PCR memiliki nilai efektivitas yang setara dengan pemeriksaan mikroskopik yang merupakan *gold standart*. Penggunaan *real-time* PCR dapat menjadi pertimbangan dalam memilih pemeriksaan alternatif lain untuk mendeteksi plasmodium malaria, disamping pemeriksaan mikroskopik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian RI. Pusat data dan informasi kesehatan: Epidemiologi malaria di Indonesia. Jakarta, 2011.
2. Gunawan S. Epidemiologi malaria. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria epidemiologi, pathogenesis, manifestasi klinik, dan penanganan. Jakarta: EGC; 2000. hal. 1-26.
3. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI. Hasil riset kesehatan dasar (riskesdas) 2010. Jakarta: 2010.
4. World Health Organization. World malaria report 2014. [home page on the internet]. 2014 [cited 2015 Sep 17]. Available from: www.who.int/malaria/world_malaria_report_2014/en/
5. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI. Hasil riset kesehatan dasar (riskesdas). [home page on the internet]. 2013 [cited 2015 Sep 21]. Available from: www.terbitan.litbang.depkes.go.id
6. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI. Hasil riset kesehatan dasar (riskesdas) Provinsi Sulawesi Utara 2013. [home page on the internet]. c2013 [cited 2015 Okt 8]. Available from: www.terbitan.litbang.depkes.go.id
7. Purwaningsih S. Diagnosis malaria. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria epidemiologi, pathogenesis, manifestasi klinik, dan penanganan. Jakarta: EGC; 2000. hal. 185-93.
8. Sutanto I. Diagnosis mikroskopik dan serologik malaria. Dalam: Harijanto PN, Nugroho A, Gunawan CA, editor. Malaria dari molekuler ke klinis. Edisi ke-2. Jakarta: EGC; 2009. hal. 103-12.

9. Januri MH. Perbandingan hasil pemeriksaan malaria menggunakan metode mikroskopis dengan metode *immunochromatography test/ICT 2* produk. [Karya tulis ilmiah]. [Samarinda]: Stikes Wiyata Husada; 2013.
10. Bio-Rad Laboratories. *Real-time PCR Applications Guide*. [home page on the internet]. 2006 [cited 2015 Okt 26]. Available from: www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf.
11. Bernadus JBB. Diagnosis malaria pada sampel urin dengan teknik *Polymerase chain reaction*. [Tesis]. [Jakarta]: UI; 2009.
12. Cambey RM. Perbandingan deteksi *Plasmodium spp.* antara cara pemeriksaan mikroskopik sediaan darah tipis dengan teknik *Polymerase chain reaction*. [Skripsi]. [Manado]: Unsrat; 2014.
13. Mangold KA, Manson RU, Koay SC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, *et al.* *Journal of Microbiology*. 2005;43:2435-40.
14. Khan SA, Ahmed S, Mushahid N, Anwer M, Saeed S, Khan FA, *et al.* *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2013;23:787-92.