

Diagnosis Laboratorium Malaria

Weny Rinawati, Fify Henrika

Departemen Patologi Klinik, RSUPN Cipto Mangunkusumo
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

Abstrak

Pendahuluan: Malaria adalah penyakit tropik yang disebabkan oleh parasit dan ditularkan melalui nyamuk *Anopheles*. Diagnosis malaria yang cepat dan akurat merupakan bagian integral dari perawatan yang tepat bagi individu yang terkena dampak dan dalam mencegah penyebaran infeksi lebih lanjut di masyarakat. Jika tidak diobati, dapat mengalami komplikasi dan mortalitas. Diagnosis klinis didasarkan pada gejala pasien dan pada temuan fisik saat pemeriksaan. Penderita malaria sering mengalami demam, kedinginan, dan penyakit seperti flu. Temuan klinis harus dikonfirmasi dengan tes laboratorium untuk malaria. Baku emas untuk konfirmasi malaria adalah pemeriksaan mikroskopik. Penentuan spesies dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi dari empat spesies parasit malaria manusia dan eritrosit yang terinfeksi. Namun, pemeriksaan mikroskopik tidak dapat membedakan spesies parasit pejamu primata selain manusia dengan empat spesies parasit pejamu manusia. Penentuan spesies dapat menggunakan teknik molekuler seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dan pengujian mikrosatelit. Tes lain untuk diagnosis adalah *rapid diagnostic test* (RDT), deteksi antibodi malaria menggunakan tes *indirect fluorescent antibody* (IFA) dan *enzyme immunoassays* (EIA).

Kata kunci: EIA, IFA, malaria, PCR, RDT.

Korespondensi: Weny Rinawati
Email: weny.academic@gmail.com

Laboratory Diagnosis of Malaria

Weny Rinawati, Fify Henrika

*Departement of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia/
Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta*

Abstract

Malaria is a mosquito-borne disease caused by a parasite. Rapid and accurate diagnosis of malaria is integral to the appropriate treatment of affected individuals and in preventing the further spread of infection in the community. Left untreated, they may develop severe complications and die. Clinical diagnosis is based on the patient's symptoms and on physical findings at examination. People with malaria often experience fever, chills, and flu-like illness. Clinical findings should always be confirmed by a laboratory test for malaria. Microscopic examination remains the "gold standard" for laboratory confirmation of malaria. Species determination is made based on morphological characteristics of the four species of human malaria parasites and the infected red blood cells. However, many simian species are largely indistinguishable from the four human species by microscopy. Molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and microsatellite testing can assist in definitive species determination. An alternate way of establishing the diagnosis of malaria infection are by rapid diagnostic test (RDT), indirect fluorescent antibody (IFA) test and enzyme immunoassays (EIA).

Keywords: EIA, IFA, malaria, PCR, RDT.

Pendahuluan

Malaria adalah penyakit serius dan terkadang fatal yang disebabkan oleh parasit yang menginfeksi nyamuk *Anopheles* yang menggigit manusia.^{1,2} Parasit tersebut adalah *Plasmodium*, terutama tipe *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* dan *P. knowlesi*.² Penderita malaria biasanya mengalami demam tinggi, menggigil, dan penyakit seperti flu.¹ Pada daerah endemis diagnosis malaria tidak sulit. Umumnya diagnosis ditegakkan berdasarkan gejala dan tanda klinik. Walaupun di daerah bukan endemis malaria, diagnosis banding malaria harus dipikirkan pada riwayat demam tinggi berulang, apalagi disertai gejala trias yaitu demam, splenomegali, dan anemia.³

Meskipun diagnosis malaria merupakan hasil pertimbangan klinik, pemeriksaan laboratorium masih diperlukan untuk diagnosis cepat karena malaria menyebabkan banyak penyulit dan kematian, serta membebani ekonomi nasional. Banyaknya negara dengan malaria merupakan negara miskin, menyebabkan penyakit ini menjadi lingkaran setan penyakit dan kemiskinan.¹ Dengan demikian, diagnosis malaria yang cepat dan akurat merupakan bagian integral dari tata laksana malaria dan bagian dari pencegahan penyebaran infeksi lebih lanjut di masyarakat. Diperlukan anamnesis yang

meliputi riwayat perjalanan pasien, serta gejala dan pemeriksaan fisis.¹

Malaria

Epidemiologi

Malaria merupakan penyakit endemik di lebih dari 100 negara di Afrika, Asia, Oceania dan Amerika Selatan dan Tengah serta di beberapa kepulauan Karibia.³ Secara global, WHO memperkirakan 216 juta kasus klinis malaria pada tahun 2016. Kurang lebih 445.000 orang meninggal, dengan sebagian besar kasus adalah kasus anak di Afrika. Di Amerika Serikat, sekitar 1.700 kasus malaria didiagnosis setiap tahun, dengan sebagian besar kasus adalah pelancong dan imigran yang kembali dari negara tempat penularan malaria, misalnya Afrika Sub-Sahara dan Asia Selatan.¹

Malaria juga merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Pemerintah memandang masalah malaria masih sebagai ancaman terhadap status kesehatan masyarakat terutama pada rakyat miskin yang hidup di daerah terpencil. Malaria memengaruhi angka kesakitan bayi, balita dan ibu melahirkan, serta menimbulkan kejadian luar biasa (KLB). Besarnya angka kasus baru malaria tahun 2009–2010 di seluruh Indonesia adalah 22,9‰. Kalimantan Barat termasuk dalam 10 besar kasus baru malaria dengan angka kejadian 53,1‰.⁴

Penyebab Malaria

Malaria adalah penyakit yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina, yang disebabkan oleh parasit.³ Terdapat 5 macam spesies yaitu: *Plasmodium vivax* menimbulkan malaria tertiana benigna, *Plasmodium falciparum* menimbulkan malaria tropika/tersiana maligna, *Plasmodium malariae* menimbulkan malaria malaria kuartana, *Plasmodium ovale* menimbulkan malaria ovale, dan *Plasmodium knowlesi*.¹ *Plasmodium knowlesi* ditemukan pada kera, dan menyerupai *P. falciparum* dan *P. malariae*. *Plasmodium* ini baru ditemukan pada tahun 2007, dan dilaporkan sudah ditemukan di Kalimantan Selatan.⁴

Faktor yang memengaruhi penularan malaria

Agar penularan malaria terjadi, kondisinya harus sedemikian rupa dengan melibatkan komponen siklus hidup malaria yang terdiri dari: parasit malaria, pejamu nyamuk, dan pejamu manusia. Karakteristik parasit malaria dapat memengaruhi terjadinya malaria dan dampaknya terhadap populasi manusia. Daerah dominasi *P. falciparum*, seperti Afrika selatan Sahara, akan menderita lebih banyak penyakit dan kematian daripada daerah spesies lain, yang cenderung menyebabkan manifestasi yang kurang parah. *P. vivax* dan *P. ovale* memiliki tahap hipnozoit yang dapat tetap aktif di sel-sel hati untuk jangka waktu yang lama (bulan hingga tahun) sebelum reaktivasi dan relaps. Relaps dapat mengakibatkan dimulainya kembali penularan setelah upaya pengendalian yang tampaknya berhasil, atau dapat menyebabkan malaria di daerah yang bebas malaria.

P. falciparum dan beberapa *P. vivax* telah resisten terhadap obat antimalaria. *Strain* semacam tersebut tidak terdistribusi secara seragam. Pemantauan konstan terhadap kerentanan dua spesies parasit ini terhadap obat yang digunakan secara lokal sangat penting untuk memastikan pengobatan yang efektif dan upaya pengendalian yang berhasil. Pelancong ke daerah berisiko malaria harus menggunakan pencegahan hanya obat-obatan yang akan melindungi di daerah yang akan dikunjungi. Spesies malaria tertentu yang disebut *P. knowlesi* telah diakui sebagai penyebab sejumlah besar infeksi manusia. *P. knowlesi* adalah spesies yang secara alami menginfeksi kera yang hidup di Asia Tenggara. Manusia yang tinggal berdekatan dengan populasi kera ini mungkin berisiko terinfeksi parasit zoonosis ini.¹

Malaria ditularkan ke manusia oleh nyamuk betina dari genus *Anopheles*. Darah manusia digunakan untuk produksi telur, dan sebagai akibat

gigitan nyamuk, darah menjadi penghubung antara manusia dan pejamu nyamuk dalam siklus hidup parasit. *Anopheles* yang dapat menularkan malaria ditemukan tidak hanya di daerah endemis malaria, tetapi juga di daerah di mana malaria telah dieliminasi. Dengan demikian daerah-daerah ini berisiko terkena kembali penyakit ini.¹ Perkembangan parasit malaria pada nyamuk (dari tahap gametosit ke tahap sporozoit) tergantung pada beberapa faktor, diantaranya suhu lingkungan dan kelembaban. Suhu yang lebih tinggi mempercepat pertumbuhan parasit pada nyamuk. Umur nyamuk biasanya singkat. Hanya betina yang lebih tua yang dapat menularkan malaria, karena mereka harus hidup cukup lama agar sporozoit berkembang dan pindah ke kelenjar ludah sehingga nyamuk *Anopheles* harus bertahan cukup lama untuk memungkinkan parasit menyelesaikan siklusnya dalam pejamu nyamuk, yang disebut siklus sporogonik atau ekstrinsik. Siklus sporogonik atau ekstrinsik memakan waktu 9–18 hari. Siklus 9 hari umumnya pada saat suhu hangat (30°C atau 86°F) dan akan lebih lama pada suhu yang lebih dingin. Jika suhu terlalu dingin (15°C atau 59°F untuk *P. vivax*, 20°C atau 68°F untuk *P. falciparum*), parasit tidak berkembang dan siklus tidak dapat diselesaikan, sehingga malaria tidak dapat ditularkan. Dengan demikian, penularan malaria jauh lebih intens di daerah yang hangat dan lembab, dengan penularan mungkin di daerah beriklim hanya selama bulan-bulan musim panas.¹

Terdapat beberapa faktor pejamu manusia untuk dapat terjadinya malaria. Faktor genetik telah terbukti penting secara epidemiologis sebagai faktor protektif, yaitu *sickle cell trait* dan golongan darah Duffy. *Sickle cell trait* (heterozigot untuk gen hemoglobin abnormal HbS) bersifat protektif terhadap malaria *P. falciparum*. Oleh karena malaria *P. falciparum* telah menjadi penyebab utama kematian di Afrika sejak masa lalu, sifat sel sabit sekarang lebih sering ditemukan di Afrika dan pada orang keturunan Afrika daripada kelompok populasi lainnya. Untuk golongan darah Duffy negatif, eritrosit bersifat resisten terhadap infeksi *P. vivax*. Oleh karena mayoritas orang Afrika adalah Duffy negatif, *P. vivax* jarang ditemukan di Afrika selatan Sahara terutama Afrika Barat, dan digantikan *P. ovale*, parasit yang sangat mirip dengan parasit yang menginfeksi Duffy negatif. Secara umum, prevalensi gangguan terkait hemoglobin dan diskrasia sel darah lainnya, seperti Hemoglobin C, talasemia, dan defisiensi G6PD, lebih banyak ditemukan di daerah endemis malaria dan dianggap protektif terhadap penyakit malaria. Faktor genetik lain seperti kompleks HLA yang berperan dalam mengendalikan respons imun, dapat sama-sama mempengaruhi risiko seseorang terkena malaria berat. Perilaku manusia juga berpengaruh terhadap kejadian malaria. Malaria akan lebih mungkin terjadi pada

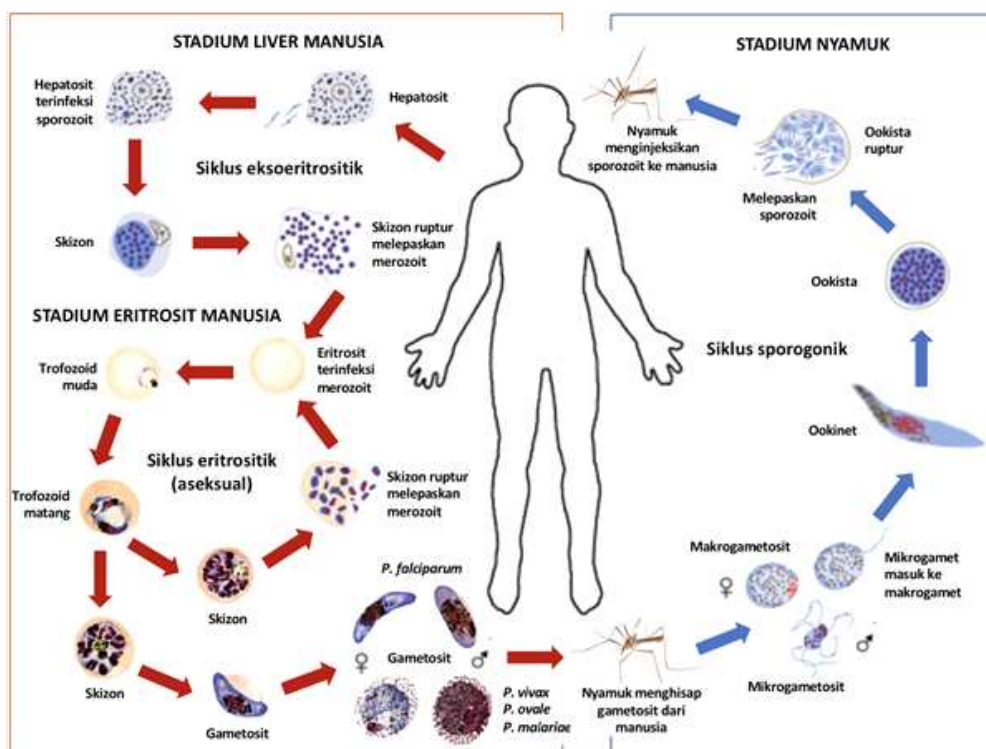
manusia yang tidak memakai kelambu sebagai pelindung dari paparan nyamuk dan tidak menggunakan obat nyamuk atau obat-obatan untuk mencegah malaria. Adanya genangan air di saluran irigasi, lubang, pekerjaan pertanian seperti memanen juga meningkatkan risiko terkena malaria. Sedangkan memelihara hewan piaraan di dekat rumah tangga dapat menjadi sumber makanan alternatif bagi nyamuk *Anopheles* dan karenanya mengurangi paparan pada manusia. Perang, migrasi, dan pariwisata dapat memaparkan individu yang tidak kebal ke lingkungan dengan penularan malaria yang tinggi.¹

Siklus Hidup

Siklus hidup parasit malaria melibatkan dua pejamu, yaitu manusia dan nyamuk *Anopheles* betina. Selama menggigit manusia, nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi malaria menginokulasi sporozoit ke pejamu. Sporozoit kemudian menginfeksi sel hati dan berkembang menjadi skizon. Sel hati yang pecah akan menyebabkan pelepasan merozoit. Jika tidak diobati pada tahap ini, *P. vivax* dan *P. ovale* dapat bertahan di hati (menjadi dorman) dalam hitungan minggu atau bahkan bertahun-tahun kemudian.

Plasmodium yang dorman ini sewaktu-waktu dapat teraktivasi sehingga menyebabkan kekambuhan dengan cara masuk ke dalam aliran darah.⁴ Setelah replikasi awal di hati (ekso-eritrositik skizogoni), parasit akan mengalami multiplikasi aseksual pada eritrosit (eritrositik skizogoni). Merozoit menginfeksi eritrosit. Trophozoit imatur selanjutnya akan matang dan menjadi skizon. Skizon yang pecah akan melepaskan merozoit, dan dapat menginfeksi eritrosit lain. Beberapa parasit berdiferensiasi menjadi tahap eritrositik seksual (gametosit) dan menyebabkan manifestasi klinis penyakit. Gametosit jantan (mikrogametosit) dan betina (makrogametosit), diingesti oleh nyamuk *Anopheles* kembali ketika menggigit pejamu manusia yang terinfeksi.¹

Parasit kemudian mengalami siklus sporogonik pada nyamuk. Di perut nyamuk, mikrogamet menembus makrogamet dan menghasilkan zigot. Zigot menjadi motil dan memanjang (ookinet), kemudian menyerang dinding *midgut* nyamuk tempat mereka berkembang menjadi ookista. Ookista tumbuh, pecah, dan melepaskan sporozoit. Kemudian sporozoit akan menuju ke kelenjar ludah nyamuk. Inokulasi sporozoit di pejamu manusia akan menyebabkan siklus hidup malaria berulang kembali, seperti yang terlihat pada Gambar 1.¹



Gambar 1. Siklus Hidup Malaria

Diagnosis

Diagnosis malaria yang cepat dan akurat merupakan bagian integral dari perawatan yang tepat bagi individu yang terkena dampak

dan dalam mencegah penyebaran infeksi lebih lanjut di masyarakat. Keterlambatan dalam diagnosis dan pengobatan adalah penyebab utama kematian pada pasien malaria. Diperlukan anamnesis yang meliputi

riwayat perjalanan pasien, serta gejala dan pemeriksaan fisis.¹ Inkubasi minimal malaria kurang lebih 6 hari. Infeksi *P. falciparum* umumnya terjadi pada bulan pertama atau beberapa bulan setelah paparan. Infeksi *P. vivax* dan *P. ovale* umumnya muncul > 6 bulan setelah paparan, dan gejala mungkin bisa muncul setelah bertahun-tahun.⁵ Diagnosis klinis harus didasarkan pada gejala pasien dan pada temuan fisik saat pemeriksaan.¹ Gejala pertama malaria sering tidak spesifik dan juga ditemukan pada penyakit lain (seperti flu dan infeksi virus biasa). Gejala yang paling sering adalah demam, menggigil, berkeingatan, sakit kepala, nyeri otot, mual dan muntah. Demikian juga, temuan fisik seringkali tidak spesifik, misalnya suhu tinggi, keringat, kelelahan. Pada malaria berat terutama disebabkan oleh *P. falciparum*, dapat dijumpai kebingungan (*confusion*), koma, tanda neurologis fokal, anemia berat, kesulitan bernafas.^{1,2,7}

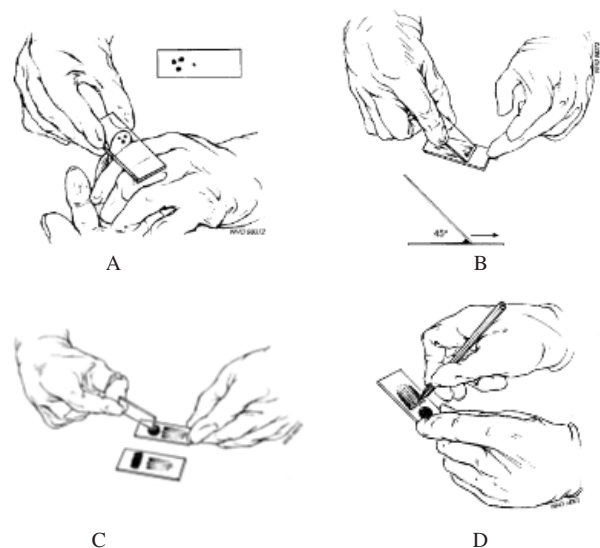
Untuk diagnosis pasti, tes laboratorium harus menunjukkan parasit malaria atau komponennya. Temuan klinis harus selalu dikonfirmasi dengan tes laboratorium untuk malaria. Untuk pemeriksaan awal dapat dilakukan pemeriksaan darah lengkap dan panel kimia rutin. Dalam hal orang tersebut memang memiliki tes malaria positif, tes tambahan ini akan berguna dalam menentukan apakah pasien memiliki manifestasi infeksi malaria yang tidak rumit atau parah. Secara khusus, tes ini dapat mendeteksi anemia berat, hipoglikemia, gagal ginjal, hiperbilirubinemia, dan gangguan asam-basa.¹

Pemeriksaan Laboratorium Malaria

Pemeriksaan Mikroskopik

Dengan pemeriksaan mikroskopik, parasit malaria dapat diidentifikasi dengan memeriksa setetes darah pasien di bawah mikroskop. Sebelum pemeriksaan, spesimen diwarnai untuk memberikan morfologi yang berbeda pada parasit. Teknik ini tetap menjadi baku emas untuk konfirmasi laboratorium malaria.¹ Spesimen untuk diagnosis diambil sebelum pemberian obat antimalaria dan dilakukan saat puncak demam yang merupakan waktu jumlah parasit terbanyak dalam darah.⁸ Spesimen dapat diperoleh dengan menusuk jari atau daun telinga karena densitas perkembangan trofozoit atau skizon lebih besar di daerah kaya kapiler, untuk kemudian dibuat slide tetes darah tipis dan tebal.⁹ Sediaan tetes darah tebal digunakan untuk mendeteksi adanya parasit, sedangkan sediaan tipis untuk menentukan spesiesnya.¹⁰ Pada jari yang ditusuk lancet, ditekan lembut dan dikumpulkan setetes kecil darah kemudian ditempelkan ke bagian tengah kaca objek. Berikan tekanan lebih lanjut untuk memperoleh lebih banyak darah dan dikumpulkan

dua atau tiga tetes lebih besar, sekitar 1 cm dari tetes untuk sediaan tipis (Gambar 2A). Untuk sediaan tipis, *spreader* diletakkan pada sudut 45° di depan tetes darah pada bagian tengah kaca objek, lalu ditarik ke belakang sampai menyentuh tetes darah tersebut. Setelah darah melebar sepanjang tepi kaca *spreader*, kemudian kaca *spreader* didorong hingga terbentuk sediaan tipis (Gambar 2B). Dengan salah satu sudut kaca *spreader*, ketiga tetes darah digabungkan dan dilebarkan sehingga membentuk tetes darah tebal (Gambar 2C). Sediaan diletakkan pada permukaan datar dan rata terlindung dari lalat, debu dan panas, dibiarkan mengering. Pelabelan dilakukan setelah sediaan kering (Gambar 2D). Sebelum pewarnaan, untuk sediaan tipis dilakukan fiksasi dengan metanol absolut sebentar saja agar titik Shuffner dapat terlihat, sedangkan untuk sediaan tebal dilakukan dehemoglobinisasi dengan air sehingga eritrosit larut serta hanya menyisakan parasit dan leukosit.^{7,8} Pewarnaan yang paling sering digunakan adalah pewarnaan Giemsa, Wright, atau Field, dan yang paling sering adalah Giemsa.^{6,9}



A. Pengumpulan spesimen; B. Pembuatan sediaan tipis; C. Pembuatan sediaan tetes tebal; D. Pelabelan

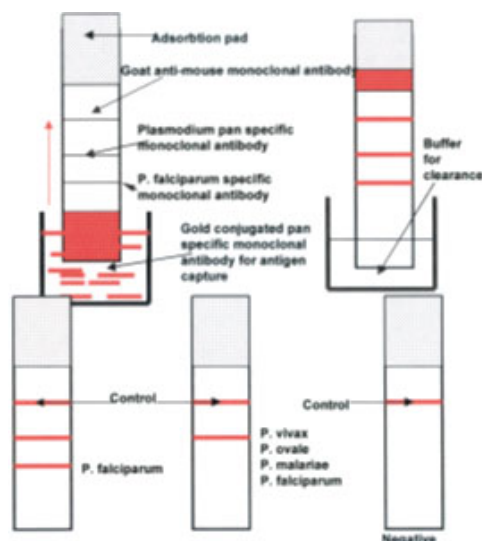
Gambar 2. Pembuatan Sediaan Tipis dan Tetes Tebal⁸

Pemeriksaan mikroskopik dengan lensa objektif 100x dapat dijumpai parasit malaria dalam berbagai stadium.⁶ Jumlah parasit per mikroliter darah dapat dilakukan dengan menghitung jumlah parasit setiap 200 leukosit pada tetes tebal. Bila yang terhitung adalah <10 parasit, maka penghitungan dilanjutkan hingga 500 leukosit. Jumlah parasit/uL dihitung berdasarkan rumus jumlah parasit yang ditemukan dikalikan jumlah leukosit/uL, kemudian dibagi dengan 200 atau 500.^{6,7} Bila tidak ada data jumlah leukosit / uL, WHO menggunakan standar leukosit 8000/uL.⁹ Untuk sediaan tipis, pemeriksaan dimulai dengan lensa objektif 10x dan dilanjutkan 100x, untuk

menentukan spesies parasit malaria. Jumlah parasit dapat dinyatakan dalam persen parasitemia sesuai rumus jumlah eritrosit mengandung parasit malaria dibagi jumlah eritrosit dikalikan 100, atau jumlah parasit per mikroliter sesuai rumus jumlah eritrosit mengandung parasit malaria dikalikan jumlah eritrosit/uL, kemudian dibagi dengan jumlah eritrosit. Bila tidak ada data jumlah eritrosit/uL, menggunakan standar eritrosit 4000 000/uL.⁹ Identifikasi spesies parasit malaria dilakukan dengan memperhatikan perubahan pada eritrosit, bentuk dan stadium parasit. Jumlah gametosit dihitung dan dilaporkan terpisah dari stadium aseksual.⁸

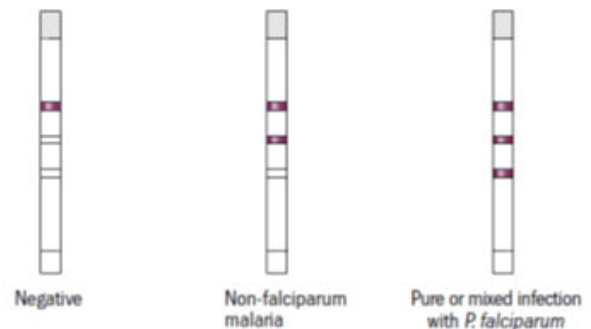
Rapid Diagnostic Test (RDT)

Rapid Diagnostic Test (RDT) adalah cara alternatif untuk menegakkan diagnosis infeksi malaria secara cepat.¹ Penelitian Widijanti menjelaskan bahwa nilai diagnostik RDT parasit malaria untuk *PvpLDH* yaitu sensitivitas 94,7%; spesifitas 100%; nilai duga positif 100%; dan nilai duga negatif 96,7%.¹⁰ Begitu juga penelitian Arum menyimpulkan bahwa secara keseluruhan nilai diagnostik RDT adalah 100% sensitif, 96,7% spesifik dengan nilai duga positif 83,2%, dan nilai duga negatif 100%.¹¹ Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa pemeriksaan RDT memiliki sensitivitas dan spesifitas yang dapat memenuhi kriteria teknis yang diharuskan World Health Organization (WHO).⁴ Tes ini menggunakan prinsip imunokromatografi untuk mendeteksi antigen malaria spesifik dalam darah seseorang.¹⁰ Spesimen darah ditetaskan ke kertas strip yang mengandung emas dilapis antibodi anti malaria (Gambar 3).⁹



Gambar 3. Prinsip Imunokromatografi RDT Malaria⁹

Bila pada darah terdapat parasit malaria, maka terjadi ikatan antara antigen malaria dengan antibodi anti malaria. Antibodi ini akan membentuk kompleks perantara dengan antigen malaria dari spesimen, kemudian kompleks ini akan bergerak melalui zona deteksi akibat daya *capillary*. Pada posisi *test line* akan terbentuk kompleks *sandwich* dengan antibodi kedua (antibodi anti *P. falciparum* atau antibodi anti *Plasmodium* selain *P. falciparum*) bila terdapat antigen malaria, sedangkan spesimen yang tidak mengandung antigen malaria tidak akan membentuk kompleks *sandwich*. Pada posisi *control line* terdapat antibodi berlabel emas berlebih. Penambahan *washing buffer* akan membersihkan hemoglobin dan garis deteksi menjadi tampak. Adanya garis merah di *control line* memastikan tes tersebut valid (Gambar 4).¹⁰



Gambar 4. Hasil Pemeriksaan RDT Malaria¹⁰

Tes Serologi

Metode serologi digunakan untuk deteksi antibodi terhadap stadium aseksual malaria dalam darah.² Deteksi antibodi malaria untuk diagnosis klinis dilakukan dengan menggunakan tes *enzyme immunoassays* (EIA) yang cukup sensitif pada keadaan akut, dengan kemampuan mendeteksi 10 dari 11 kasus malaria dalam waktu kurang dari 4 jam dan berkorelasi baik dengan pewarnaan Giemsa, seperti pada penelitian She *et al.*¹² Oleh karena itu, deteksi malaria menggunakan EIA dapat digunakan sebagai alat diagnostik tambahan bersamaan dengan pewarnaan Giemsa bila dicurigai adanya malaria.¹² Deteksi antibodi juga dapat dilakukan menggunakan tes *indirect fluorescent antibody* (IFA).^{11,13} Prosedur IFA dapat digunakan sebagai alat diagnostik untuk menentukan seorang pasien telah terinfeksi *Plasmodium*. Karena waktu yang diperlukan untuk pembentukan antibodi dan persistensi antibodi, tes serologis tidak praktis untuk diagnosis rutin malaria akut. Namun, deteksi antibodi mungkin berguna untuk: skrining donor darah yang terlibat dalam kasus-kasus malaria yang diinduksi transfusi ketika parasitemia donor mungkin di bawah tingkat yang dapat terdeteksi dari pemeriksaan film darah,

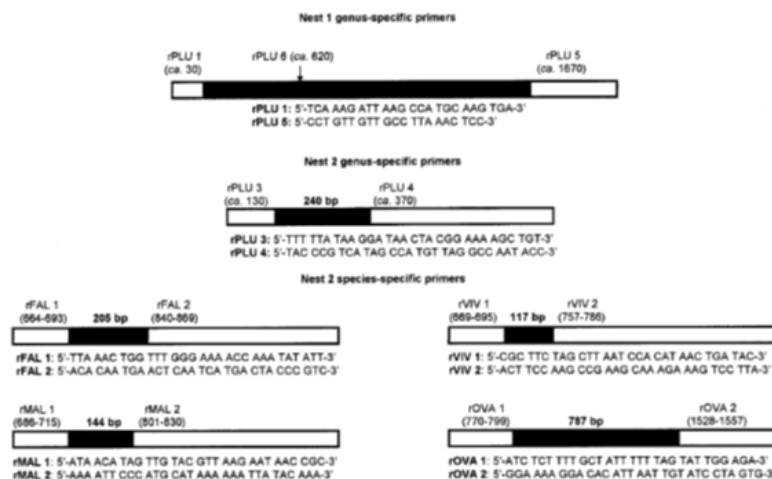
menguji seorang pasien dengan penyakit demam yang diduga menderita malaria sediaan hapus darah tepi berulang hasilnya negatif, serta menguji seorang pasien yang baru saja dirawat karena malaria tetapi diagnosisnya masih belum konklusif. Reagen pengujian spesifik spesies tersedia untuk empat spesies manusia, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale*. Reaksi silang sering terjadi antara spesies *Plasmodium* dan spesies *Babesia*. Untuk antigen menggunakan skizon spesies *Plasmodium* stadium darah. Bila dijumpai antibodi malaria pada serum pasien akan membentuk kompleks antigen antibodi (kompleks Ag-Ab). Antibodi antihuman berlabel fluorescein kemudian ditambahkan, dan berikatan dengan antibodi anti malaria pasien. Pemeriksaan dengan mikroskop fluoresensi akan menghasilkan parasit fluoresensi warna hijau apel bila dijumpai reaksi positif. Pemeriksaan menggunakan prinsip *enzim immunoassays* juga telah digunakan sebagai alat untuk menyaring donor darah, tetapi tidak direkomendasikan untuk diagnosis klinis karena sensitivitas yang terbatas.¹¹

Biologi Molekuler

Selain empat spesies klasik malaria dengan pejamu manusia, ada lebih dari 20 spesies parasit malaria yang secara alami menginfeksi primata non manusia (malaria simian). Diperkirakan infeksi alami malaria simian pada manusia jarang terjadi dan tidak penting bagi kesehatan masyarakat sampai laporan terbaru dari Asia menunjukkan bahwa *P. knowlesi*, spesies malaria simian, muncul sebagai masalah kesehatan masyarakat. Banyak spesies simian sebagian besar tidak dapat dibedakan dari empat spesies manusia dengan mikroskop.¹ Dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopik dan RDT, PCR sangat sensitif untuk deteksi infeksi pada densitas parasit yang rendah dan untuk menentukan

spesies parasit.^{14,15} Kesulitan penentuan spesies ini terutama karena kesamaan morfologi trofozoit, skizon dan gametosit antara *P. knowlesi* dan *P. malariae* serta tahap trofozoit muda antara *P. knowlesi* dan *P. falciparum*, malaria *P. knowlesi* sering salah didiagnosis dengan mikroskop konvensional.¹⁶ Dengan menggunakan prinsip *nested PCR*, DNA parasit diekstraksi dari *dried blood* yang dikumpulkan menggunakan kertas saring. Amplifikasi primer dengan primer spesifik genus diikuti oleh PCR sekunder menggunakan primer spesifik untuk semua lima spesies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi*). Kontrol standar baik positif dan negatif dimasukkan dalam setiap reaksi PCR. Hasil *nested PCR* dianalisis menggunakan elektroforesis dalam gel agarosa 2%, diwarnai dengan etidium bromida, divisualisasikan di bawah sinar UV. Interpretasi hasil dilakukan berdasarkan ukuran band.¹⁷

Tahapan uji *nested PCR* diawali dengan persiapan *template DNA* (Gambar 5).¹⁶ *Template DNA* untuk uji *nested PCR* disiapkan dari *whole blood* menggunakan metode *boiling Chelexy* sederhana. Setiap *spot* direbus dalam 180 ml larutan Chelexy dan akan diperoleh kurang lebih 120 ml *template DNA*. Untuk 0.6 – 1.4 ml spesimen darah, diperlukan 5 uL *template DNA* untuk *nested PCR*.^{15,16} Primer oligonukleotida untuk *nested PCR* dapat diperoleh secara komersial, dan semuanya dimurnikan menggunakan *high performace liquid chromatography*. Primer ini dirancang berdasarkan gen RNA ribosomal subunit kecil (*ssrRNA*) 13 – 16 *Plasmodium* Gen RNA (*ssrRNA*) 13-16 (Gambar 6). Primer spesifik genus rPLU 3 dan 4 digunakan untuk amplifikasi DNA *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, dan *P. malariae*, malaria simian (*P. gonderi*) dan malaria roden (*P. yoelii*, *P. berghei*, *P. chaubadi*, dan *P. v. petteri*) pada *single nest PCR*. Sedangkan untuk *nested PCR* kombinasi, primer spesifik genus dikombinasikan dengan rPLU 1 dan rPLU 2.^{16,17}



Gambar 5. Skema Nukleotida yang Digunakan pada *Nested PCR*¹⁶

Setiap 50 ul reagen untuk amplifikasi *nest 1* mengandung 5 ul *template* DNA, 250 nM dari masing-masing primer (rPLU 1 dan rPLU 5), 4 mM MgCl₂, *buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 200 uM dari masing-masing *deoxynucleoside triphosphate*, dan 1,25 unit Taq DNA polimerase. Kondisi amplifikasi *Nest 1* adalah sebagai berikut: langkah 1, 94°C selama 4 menit; langkah 2, denaturasi pada 94°C selama 30 detik; langkah 3, anil pada 55°C selama 1 menit; langkah 4, ekstensi pada 72°C selama 1 menit; ulangi langkah 2-4 35 kali, dan langkah 4 selama 4 menit. Dua mikroliter dari hasil amplifikasi *nest 1* disajikan sebagai *template* DNA untuk masing-masing 20 ul amplifikasi *nest 2*. Kadar primer *nest 2* dan konstituen lainnya identik dengan amplifikasi *nest 1*, kecuali penggunaan 0,5 unit DNA polimerase Taq. Kondisi amplifikasi *nest 2* identik dengan *nest 1*, kecuali suhu *annealing* pada langkah 3 adalah 58°C untuk primer spesifik spesies (rFAL 1 dan 2, rMAL 1 dan 2, rVIV 1 dan 2, dan rOVA 1 dan 2) dan 62°C untuk primer spesifik genus (rPLU 3 dan 4). Hasil amplifikasi *nest PCR 2* dianalisis menggunakan elektroforesis gel dan pewarnaan dengan etidium bromida.^{16,17}

Tes *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) merupakan tes sederhana dan tidak mahal untuk mendeteksi 18S gen RNA ribosom *P. falciparum*. Penelitian Han *et al* dan Aonuma *et al* seperti yang dikutip oleh Tangpukdee *et al*² menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas tinggi, tidak hanya untuk *P. falciparum*, tetapi juga *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae*. Hal ini menunjukkan bahwa LAMP lebih dapat diandalkan dan berguna untuk skrining di daerah endemik. Pemeriksaan yang sedang dikembangkan adalah *microarrays*, menggunakan teknik *Southern hybridization*. Pada *microarrays*, hibridisasi target berlabel dibagi dari asam nukleat di *test sample* pada probe sehingga dapat mendeteksi gen multipel pada satu pemeriksaan.²

Untuk tes *flowcytometry* (FCM), deteksi dilakukan berdasarkan pada deteksi hemozoin yang dihasilkan intraeritrosit ketika parasit mencerna hemoglobin. Hemoglobin yang dicerna akan mengalami kristalisasi dan bersifat toksik. Hemozoin yang difagositosis dapat dideteksi oleh depolarisasi sinar laser, ketika sel melewati *flowcytometer*. Metode ini dapat memberikan sensitivitas 49-98%, dan spesifisitas 82-97%, dan dapat digunakan untuk skrining malaria tanpa gejala klinis.²

Kesimpulan

Malaria adalah penyebab utama kematian di negara-negara tropis dan sub-tropis. Meskipun ada cara yang efektif untuk tata laksana malaria,

jumlah kasus malaria masih meningkat, karena beberapa faktor. Mengingat hal tersebut, maka diperlukan metode diagnostik yang cepat dan efektif untuk manajemen dan pengendalian malaria. Pemeriksaan mikroskopis sediaan tipis dan tetes darah tebal tetap menjadi standar emas untuk diagnosis malaria. Meskipun metode ini membutuhkan keahlian, sensitivitas dan spesifisitas berbeda dibandingkan dengan teknik lain. Oleh karena itu, teknologi baru telah dikembangkan dan diperkenalkan untuk mengatasi keterbatasan. Untuk pemeriksaan yang cepat dapat menggunakan RDT, meskipun harus ditingkatkan kontrol kualitasnya. Tes serologis berguna untuk survei epidemiologi, tetapi tidak cocok untuk diagnosis malaria akut. Teknik biologi molekuler sesuai untuk laboratorium penelitian, dan berguna untuk identifikasi spesies serta mengukur densitas parasit saat parasitemia minimal.

Daftar Pustaka

1. CDC. Malaria. 2018. Diunduh dari <https://www.cdc.gov/malaria/about/index.html>.
2. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood. Malaria diagnosis. Korean J Parasitol. 2009;47(2):93–102.
3. Halim ID, Rampengan NH, Edwin J, Rampengan TH. Malaria berat pada anak yang mendapat pengobatan kombinasi kina dan primakuin. Maj Kedokt Indon. 2006;56(2):51–5.
4. Natalia D. Peranan trombosit dalam patogenesis malaria. MKA. 2014;37 (3):219–25.
5. Lallo DG, Shingadia D, Bell DJ, Beeching NJ, Whitty CJM, Chiodini PL, et al. UK malaria treatment guidelines 2016. J of Inf. 2016;72:635–49.
6. Fuadzy H, Santi M. Gambaran penggunaan *rapid diagnostic test* parasit malaria di Desa Pasirmukti Kecamatan Cineam Kabupaten Tasikmalaya. Aspirator. 2013;5 (2):55–60.
7. WHO. Manual of basic techniques for health laboratory. Edisi ke-2. Geneva: World Health Organization. 2003.
8. Kumalawati J. Sediaan malaria dan filaria. Dalam: Oesman F, Setiabudy RD, penyunting. Lokakarya Pembuatan, Pewarnaan dan Penilaian Sediaan Darah. Jakarta: Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2009. hal. 10–23.
9. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev. 2002;66–78.
10. WHO. New perspectives malaria diagnosis. Geneva: World Health Organization. 1999.
11. Sulzer AJ, and Wilson M. The fluorescent antibody test for malaria. Crit Rev Clin Lab Sci 1971;2:601–60.
12. She RC, Rawlins BS, Mohl R, Perkins AL, Hill HR, Litwin CM. Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria. J Travel Med. 2007;14(2):105–11.
13. Quan WD, Hua TL, Cheng GZ, Xiang Z, Ni YM. Application of the indirect fluorescent antibody assay in the study of malaria infection in the Yangtze River Three Gorges Reservoir, China. Malaria J. 2009;8:198–204.
14. Siwal N, Singh AS, Dash M, Kar S, Rani S, Rawal C, et al. Malaria diagnosis by PCR reveal differential distribution of mono and mixed species infection by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in India. PLoS ONE. 2018;13(3):1–14.
15. Li P, Zhao Z, Wang Y, Xing H, Parker DM, Yang5 Z, et al. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. Malaria J. 2014;13:175–80.

16. Han TZ, Han KT, Aye HL, Hlaing T, Thant KZ, Vythilingam I. Comparison of microscopy and PCR for the detection of human *Plasmodium species* and *Plasmodium knowlesi* in Southern Myanmar. Asian Pac J Trop Biomed 2017; 7(8): 680–5.
17. Singh B, Bobogare A, Singh JC, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. Am J Trop Med Hyg. 1999;60 (4):687–92.

