

UJI DIAGNOSTIK PLASMODIUM MALARIA MENGGUNAKAN METODE IMUNOKROMATOGRAFI DIPERBANDINGKAN DENGAN PEMERIKSAAN MIKROSKOPIS

(Diagnostic Test of Plasmodium Malaria by Immunochromatographic Method Compared to Microscopic Examination)

Ima Arum L^{***}, Purwanto AP^{*}, Arfi S^{**}, Tetrawindu H^{**}, M Octora^{**}, Mulyanto^{***}, Surayah K^{***}, Amanukarti^{****}

ABSTRACT

Microscopic examination is still a gold standard for malaria diagnostic tests. Immunochromatographic (IC) technique can be used as an alternative examination. The aim is to compare the identification value of immunochromatographic method diagnostic test to microscopic examination of malaria in laboratory examination. Cross sectional diagnostic study approach was applied to those with symptoms of: (1) fever (temperature > 38°C) or intermittent fever lasting for two days or more (2) cephalgia/myalgia, 604 samples were taken consecutively in January to July 2005 from primary health centres of Sukaraja and Keruak, as well as Clinic Nugraha at Lombok Timur district, province of Nusa Tenggara Barat. From these samples, there were 37 samples with *P. vivax*, 45 samples with *P. falciparum*, 5 samples with mixed infection and 517 samples without *Plasmodium* sp. From IC examination, results were reserved for 36 samples with *P. vivax*, 69 samples with *P. falciparum*, 5 samples with mixed infection and 503 samples without *Plasmodium* sp. Diagnostic test data analysis showed that the immunochromatographic test revealed 100% sensitivity, 96.7% specificity, 83.2% positive predictive value and 100% negative predictive value. It can be concluded that malaria IC test is reliable to be used as a routine malaria test.

Key words: plasmodium malaria, immunochromatographic, diagnostic test, microscopic examination

PENDAHULUAN

Malaria masih merupakan masalah penyakit endemik di wilayah Indonesia Timur khususnya Nusa Tenggara Barat. Salah satu masalah yang dihadapi adalah kesulitan mendiagnosis secara cepat dan tepat. Berdasarkan hasil evaluasi Program Pemantapan Mutu Eksternal Laboratorium Kesehatan pada pemeriksaan mikroskopis malaria, yang dilakukan oleh Balai Laboratorium Kesehatan Mataram, dari 19 laboratorium di NTB yang mengevaluasi menggunakan preparat positif malaria, hanya 79% peteknik laboratorium yang dapat membaca preparat dengan benar. Kepentingan untuk mendapatkan diagnosis yang cepat pada penderita yang diduga menderita malaria merupakan tantangan untuk mendapatkan uji/metode laboratorik yang tepat, cepat, sensitif, mudah dilakukan, serta ekonomis.^{1,2}

Peranan keendemikan (endemisitas) malaria, migrasi penduduk yang cepat, serta berpindah-pindah (*traveling*) dari daerah endemis, secara tidak langsung mempengaruhi masalah diagnostik laboratorik

maupun terapi malaria. Perubahan gambaran morfologi parasit malaria, serta variasi galur (*strain*), yang kemungkinan disebabkan oleh pemakaian obat antimalaria secara tidak tepat (irasional), membuat masalah semakin sulit terpecahkan bila hanya mengandalkan teknik diagnosis mikroskopis. Ditambah lagi rendahnya mutu mikroskop dan pereaksi (*reagen*) serta kurang terlatihnya tenaga pemeriksa, menimbulkan kendala dalam memeriksa parasit malaria secara mikroskopis yang selama ini merupakan standar emas (*gold standard*) pemeriksaan laboratoris malaria.²⁻⁵

Penelitian terbaru telah mengembangkan metode diagnostik yang dapat diperbandingkan dengan metode yang lazim (konvensional). WHO bersama para ilmuwan, ahli laboratorik, serta peklinik mengembangkan alat uji diagnostik cepat (*Rapid Diagnostic Test/RDTs*) yang mudah dilakukan, tepat, sensitif, dan sesuai biaya (*cost-effective*).^{1,6-8} Sebagian besar RDTs malaria menggunakan asas imunokromatografi yang menggunakan antibodi monoklonal yaitu HRP-2 (*Histidine Rich Protein*) untuk *Plasmodium falciparum* dan pLDH (*parasite Lactate Dehydrogenase*) untuk mengetahui *Plasmodium vivax* sebagai indikator infeksi.^{8,9}

Ada beberapa antigen malaria yang dapat digunakan sebagai sasaran (*target*) pemeriksaan ini, yaitu:

HRP-2, pLDH, dan *Plasmodium aldolase*. HRP-2 adalah protein larut air yang dihasilkan pada tahap aseksual dan gametosit *Plasmodium falciparum* dan

* Bagian Patologi Klinik FK UNDIP/RS Dr Kariadi Jl. Dr Sutomo 16-18 Semarang, fax&telp. 024-8311485 e-mail. purwanto_ap@hotmail.com

** Staf Pengajar Program Studi Pendidikan Dokter UNRAM,

*** Laboratorium Hepatitis NTB,

**** Klinik Nugraha Lombok Timur

dikeluarkannya (diekspresikan) di membran sel eritrosit. *HRP-2* banyak dihasilkan oleh *Plasmodium falciparum*, sehingga merupakan sasaran (target) antigen utama dalam membuat uji diagnostik cepat malaria. *pLDH* adalah enzim glikolitik di *Plasmodium sp.*, yang dihasilkan pada tahap seksual dan aseksual parasit.⁹⁻¹¹

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil uji diagnostik metode imunokromatografi diperbandingkan dengan pemeriksaan laboratorium mikroskopis malaria. Diharapkan hasil penelitian ini dapat berguna dan memberikan sumbangan serta masukan bagi perkembangan teknologi diagnostik laboratorium malaria.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah studi diagnostik dengan pendekatan kerat lintang, metode pemilihan tempat ialah di daerah endemik dengan waktu kejadian luar biasa.

Cara Mengambil Sampel dan Data

Sampel darah diambil dari penderita yang datang ke Puskesmas Sukaraja, Puskesmas Keruak dan Klinik Nugraha di kabupaten Lombok Timur Propinsi Nusa Tenggara Barat secara berturut-turut (konsekutif), antara bulan Januari 2005 sampai bulan Juli 2005. Diperkirakan pada bulan tersebut terjadi kejadian luar biasa, tanpa melihat jenis kelamin, etnik, pekerjaan, riwayat malaria sebelumnya. Kriteria penderita peserta (inklusi): (1) demam > 38 °C disertai atau tidak disertai menggigil atau demam berkala (intermiten) selama 2 hari atau lebih; (2) cefalgia/mialgia. Kriteria penderita bukan peserta (eksklusi): (1) Uji Rumpel Leede (+); (2) Panas disertai kaku kuduk; (3) Panas disertai otitis media akut. (4) Panas disertai infeksi saluran kemih. Sampel darah vena diambil dari vena siku (cubiti) pada penderita yang memenuhi kriteria penderita peserta, sebanyak 2 ml, dimasukkan ke dalam tabung mikro (*micro tube*) berisi EDTA, sebagian digunakan untuk sediaan darah hapus dan sebagian lainnya untuk uji IC. Pembuatan sediaan darah tebal dan tipis dilakukan di masing-masing puskesmas dan klinik kemudian sampel dikirim ke Laboratorium Hepatitis NTB kota Mataram untuk pembacaan preparat darah tebal dan tipis. Tabung EDTA yang berisi sisa darah secepat mungkin diperiksa dengan metode imunokromatografi di Laboratorium Hepatitis NTB kota Mataram.

Pemeriksaan mikroskopis malaria

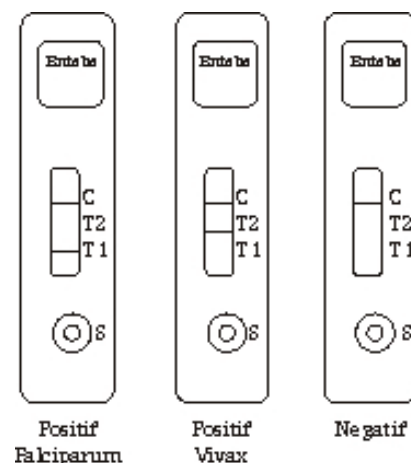
Pengecatan hapusan darah tebal dan tipis dilakukan dengan cat Giemsa sesuai standar

pengecatan mikroskopis laboratorium malaria yang lazim. Pembacaan hapusan darah dilakukan oleh seorang peteknik (teknisi) laboratorium senior dari Laboratorium Hepatitis NTB kota Mataram (berpengalaman lebih dari 10 tahun). Jika terdapat keraguan atau ketidakpastian pembacaan, maka dialihkan kepada pembaca kedua yang lebih senior dengan pengalaman minimal lebih dari 15 tahun, dan hasilnya dianggap yang menentukan. Bila terdapat perbedaan, dilakukan pembacaan oleh peteknik (teknisi) laboratorium yang ketiga, dan yang digunakan bila hasil akhir menghasilkan hasil pembacaan yang sama.

Hasil pembacaan mikroskopis paling sedikit harus menyebutkan jenis parasit. Antar peteknik laboratorium dilakukan uji buta (*blinding*), yaitu tiap peteknik laboratorium tidak mengetahui hasil uji imunokromatografi dari sampel yang sama atau dari hasil uji peteknik laboratorium lainnya ketika terdapat keraguan sebelumnya. Pemeriksaan mikroskopis laboratorium dinyatakan sebagai standar emas/rujukan (*gold standard/reference standard*) pemeriksaan. Hasil yang diperoleh merupakan hasil sebenarnya (*positif sesungguhnya atau negatif sesungguhnya*).

Pemeriksaan imunologis malaria dengan metode imunokromatografi

Metode imunokromatografi yang digunakan berdasarkan asas pemeriksaan imunologis. Pemeriksaan metode imunokromatografi dilakukan di Laboratorium Hepatika. Darah memakai sampel dari tabung mikro (*micro tube*) yang berisi EDTA yang diambil 10 sampai 15 μ l menggunakan mikropipet



Gambar 1. Penafsiran (Interpretasi) hasil uji batang celup (*dipstick*) imunokromatografi Laboratorium Hepatika

Ket: C garis kendali (kontrol), T1 garis untuk *Plasmodium falciparum*, T2 T1 garis untuk *Plasmodium vivax* Analisis hasil penelitian.

dan diletakkan dalam lubang perangkat peralatan (*kit*), hasil akan terlihat sekitar 10 sampai 15 menit kemudian dalam bentuk garis berwarna merah muda. Garis yang paling atas (garis pertama) merupakan garis kendali (kontrol). Garis dibawahnya (garis kedua) merupakan garis uji untuk *Plasmodium vivax*. Garis yang terbawah (garis ketiga) adalah garis uji untuk *Plasmodium falciparum*. Bila hasil uji untuk *Plasmodium falciparum* positif, maka garis kendali (kontrol) dan garis uji terbawah akan berwarna merah muda, sedangkan garis tengah tidak terlihat. Bila untuk *Plasmodium vivax* positif, maka garis kendali (kontrol) dan garis uji kedua saja yang terlihat (Gambar 1). Perangkat peralatan (*kit*), imunokromatografi laboratorium Hepatitis NTB menggunakan anti *HRP-2* untuk mengetahui antigen *HRP-2* yang terdapat di *Plasmodium falciparum* dan anti *pLDH* untuk mengetahui antigen *pLDH* yang terdapat di *Plasmodium vivax*, dengan zat kromogen klorida emas (*gold chloride*) yang memberikan warna merah muda.

Hasil penelitian dijabarkan dalam tabel tabulasi silang dengan perangkat lunak *SPSS 11.0* antara hasil pemeriksaan mikroskopis malaria dengan metode imunokromatografi. Penghitungan sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif dilakukan secara manual.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Distribusi Hasil Pemeriksaan Malaria secara Mikroskopis dan Tes

Hasil Pemeriksaan	Pemeriksaan Mikroskopis	Pemeriksaan Imunokromatografi
<i>Plasmodium vivax</i>	37	36
<i>Plasmodium falciparum</i>	45	60
P. <i>vivax</i> & P. <i>falciparum</i>	5	5
<i>Plasmodium</i> Negatif	517	503
Total	604	604

Didasari hasil penelitian selama bulan Januari 2005 sampai bulan Juli 2005 diperoleh sebanyak 604 sampel yang memenuhi kriteria malaria secara klinis. Pada pemeriksaan mikroskopis diperoleh *Plasmodium vivax* 37 sampel, *Plasmodium falciparum* 45 sampel, sementara sampel tanpa infeksi plasmodium sebanyak 517 dan infeksi campuran antara *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* 5 sampel. Pada pemeriksaan Imunokromatografi diperoleh hasil *Plasmodium vivax* 36 sampel, *Plasmodium falciparum* 60 sampel, sementara plasmodium negatif 503 sampel dan infeksi campuran antara *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* 5 sampel. (Tabel 1)

Pada penelitian ini, metode imunokromatografi dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskopis, dan diperoleh sensitivitas 100%, spesifisitas 96,99%. Nilai prediksi positif 83,2% dan nilai prediksi negatif 100%.

Diagnosis malaria ditetapkan berdasarkan anamnesis, hasil tampilan klinis dan pemeriksaan laboratoriknya. Standar (baku) emas pemeriksaan laboratorium malaria dalam penelitian ini adalah temuan parasit pada pemeriksaan mikroskopik (hapusan darah tebal dan tipis). Pemeriksaan ini mempunyai banyak kelemahan, yaitu memerlukan ketersediaan mikroskop cahaya yang memadai dan tenaga pemeriksa yang terampil. Berdasarkan hasil evaluasi Program Pemantapan Mutu Eksternal Laboratorium Kesehatan, pada pemeriksaan mikroskopis malaria yang dilakukan oleh Balai Laboratorium Kesehatan Mataram, dari 19 laboratorium di NTB yang dinilai (evaluasi) menggunakan sediaan (preparat) positif malaria, hanya 79% peteknik laboratorium yang dapat membaca preparat dengan benar.

Uji imunokromatografi di laboratorium Hepatika merupakan salah satu uji diagnostik cepat malaria yang memiliki kemampuan untuk mengetahui *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* dalam sirkulasi darah. Berbeda dengan uji imunokromatografi lain yang hanya mampu mengetahui *Plasmodium falciparum* saja atau *Plasmodium falciparum* dan panmalaria. ParaSight F (*Becton Dickinson Advanced Diagnostic, Franklin Lakes, N.J*) dan IC *Plasmodium falciparum* (*Amrad-ICT, Sydney, Australia*) adalah contoh uji

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Malaria secara Mikroskopis dan Metode Imunokromatografi

	Mikroskopis Positif	Mikroskopis Negatif	Total
Imunokromatografi Positif	84	17	101
Imunokromatografi Negatif	0	503	503
Total	84	520	604

imunokromatografi yang hanya mampu mengetahui *Plasmodium falciparum*. OneMed Optimal (flow Inc, Portland, Oregon), ICT *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium vivax* (ICT pf/pv). Amrad-ICT dapat mengetahui *Plasmodium falciparum* dan panmalaria.

Berdasarkan penelitian ini, diperoleh hasil bahwa uji imunokromatografi dari Laboratorium Hepatitis NTB mempunyai sensitivitas 100%, spesifisitas 96,99%, nilai prediksi positif 83,2%, nilai prediksi negatif 100%. Penelitian serupa pernah dilakukan oleh Walke dan Playford⁶ dengan menggunakan ICT p.f/p.v dan diperoleh sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 97% dan 90%; sedangkan yang menggunakan perangkat alat (kit) OptiMal, Walker mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 85% dan 96%. Humar dkk¹² yang menguji Para sight F menemukan sensitivitas 88% dan spesifisitas 97%. Di Maesod Thailand, Chansuda Wongsrichanalai, Iraeema, Arevalo dkk¹³ menggunakan uji Now[®] ICT pf/pv dan menemukan sensitivitas dan spesifisitas untuk *Plasmodium falciparum* masing-masing 100% dan 96,2%; sensitivitas dan spesifisitas untuk *Plasmodium vivax* adalah 87,3% dan 97,7%. Farces, Zhong dkk¹⁴ menguji Binax Now[®] ICT dibandingkan dengan PCR dan menemukan sensitivitas 94% untuk *Plasmodium falciparum* dan 84% untuk panmalaria; sedangkan spesifisitas 99% ditemukan untuk *Plasmodium falciparum* maupun panmalaria. Penelitian Tjitra dkk⁷, dengan menggunakan ICT pf dan pv didapatkan sensitivitas 95%, spesifisitas 89,6%, nilai prediksi positif 96,2% dan nilai prediksi negatif 88,1%. Agustini dan Widayanti¹⁴ pada penelitian yang menggunakan NOW[®] ICT pf/pv diperoleh sensitivitas 97%, spesifisitas 100%, nilai prediksi positif 100% dan nilai prediksi negatif 88,6%.

Setelah dilakukan uji mikroskopik dan uji imunokromatografi terhadap 604 sampel yang memenuhi kriteria penderita peserta (inklusi) dalam penelitian ini, diperoleh 17 sampel yang plasmodiumnya tidak ditemukan secara mikroskopis, tetapi diperoleh hasil positif pada uji imunokromatografi. Hal ini disebabkan karena uji imunokromatografi mampu mengetahui antigenemia dalam bentuk fragmen yang masih berlangsung beberapa hari setelah parasitemia hilang akibat terapi yang memadai. Di samping itu mungkin juga dapat disebabkan karena jumlah parasit yang relatif rendah, sehingga tidak diketahui pada pemeriksaan mikroskopis, dan uji imunokromatografi positif tidak selalu menunjukkan infeksi malaria aktif. Oleh karena itu untuk menindaklanjuti hasil ini, perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan, yaitu dengan metode PCR.

Kelemahan ICT dibandingkan cara mikroskopik pada ICT terbatas hanya pada *P. vivax* dan *P. falciparum* yang berlainan dengan plasmodium yang lain

SIMPULAN DAN SARAN

Didasari hasil penelitian ini, maka pemeriksaan dengan metode imunokromatografi yang diperbandingkan dengan uji mikroskopis yang merupakan pemeriksaan standar emas, diperoleh sensitivitas 100%, spesifisitas 96,7%, nilai prediksi positif 83,2% dan nilai prediksi negatif 100%. Di samping itu dasari hasil uji diagnostik dengan menggunakan uji imunokromatografi di Laboratorium Hepatitis NTB, dan memperbandingkannya dengan hasil uji imunokromatografi lainnya, maka dapat disimpulkan bahwa uji yang sama di Laboratorium Hepatitis NTB dapat dijadikan pilihan (alternatif) untuk menetapkan diagnosis malaria secara praktis, yaitu mudah, cepat, serta ekonomis. Di samping itu hasil pengujiannya mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi bila dibandingkan dengan metode mikroskopis yang selama ini merupakan standar emas dalam mendiagnosis malaria. Dengan demikian pemeriksaan imunokromatografis di Laboratorium Hepatitis NTB dapat digunakan untuk mendiagnosis malaria secara praktis. Oleh karena pemeriksaan imunokromatografis yang positif tidak selalu menunjukkan adanya infeksi malaria yang aktif, maka perlu dilakukan penelitian atau tindak lanjut dari hasil ini dengan menggunakan metode PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Akhirnya para peneliti menyampaikan terima kasih kepada Kepala Puskesmas dan Staf Puskesmas Sukaraja dan Keruak Lombok Timur dan para paramedis yang telah membantu pelaksanaan pengambilan sampel; khususnya kepada saudara Hulaimi yang telah membantu pemeriksaan laboratoriknya. Juga ucapan terima kasih disampaikan kepada pimpinan Laboratorium Hepatitis NTB atas bantuan perangkat alat (kit) untuk metode imunokromatografi beserta tenaga teknik laboratorium terkait.

DAFTAR PUSTAKA

1. Moody A., Rapid Diagnostic Tests of Malaria Parasites, Clin Microbiol Rev 15, 2002, 66–78.
2. Kakkilaya BS., *Rapid Diagnostic of Malaria*, Lab. Medicine. Aug 2003, 8(34): 602–8. Available from: www.malariasite.com/malaria/rdts.htm.
3. Warhust DC and Williams JE., *Laboratory Diagnosis of Malaria*, J. Clin. Pathol, 1996, 49:535–8.
4. Gilles H., *Diagnostic Methods in Malaria*, In H.M. Gilles and D.A. Warrell (ed), *Essential malariology*, 3rd ed. London, United Kingdom, P Edward Arnold., 1993, 78.
5. Anonymous., *Central for Disease Control And Prevention (CDC), Diagnosis Procedures for Blood Specimens*, Atlanta, USA, 2004.

6. Iqbal J., Sher A., Hira PR., Al-Owaish R., Comparison of the Optimal® test PCR for diagnosis of malaria in immigrants. J Clin Microbiol, 1999, 39:3644–6.
7. Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Curie BJ., Anstey NM., Field evaluation of the ICT malaria Pf / Pv immunochromatographic test for of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. J Clin Microbiol, 1999, 37:2412–7.
8. Mason DP, Kawamoto E, Lin K., Laoboonchai A., Wongsrichanalai C., A comparison of two expert microscopy in the diagnosis of malaria. Acta Trop, 2002, 82:51–9.
9. Makler MT., RC piper and W. Milhous., *Lactate Dehydrogenase and diagnosis of Malaria*. Parasitol. Today 1998, 14:376–7.
10. Rock EP, K. Marsh., SJ. Saul., TE. Wellem., Dw. Taylor, WL. Maloy and Rj. rd. *Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine-rich proteins P1, HRP 2 and HRP 3 in Malaria diagnosis of Diverse Origin*. Parasitology, 1987, 95:209–27.
11. Piper RC., DL. Vanderjagt., JJ. Holbrook and M. Makler., *Malaria lactate dehydrogenase : target for diagnosis and drug development*. Ann. Trop. Med. Parasitol, 1996, 90:443.
12. Humar A., MA. Harrington., D. Pillai and KC. Kain., *ParaSight-F test compared with the PCR and microscopy for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in travelers*. Am.J.Trop.Med. Hyg. 1997, 56:44–8.
13. Wongsrichanalai C., Arevalo IA., Laoboonchai A., Yingyuen K., Miller RS., Magill AJ., Forney JS and Gasser RA., *Rapid diagnostic devices for malaria : field evaluation of a new prototype immunochromatographic assay for the detection of Plasmodium falciparum and non- falciparum Plasmodium*. Am. J. Trop. Med Hyg. 2003, 69(1):26-30.
14. Agustini SM dan Widayanti A., Nilai diagnostik Uji Imunokromatografi pada infeksi Malaria, Medika 2004, vol. XXX:10, 626–30.