

**KARAKTERISASI PLASMODIUM SPESIES MENGGUNAKAN METODE
KONVENSIIONAL DAN NESTED PCR DI KABUPATEN NIAS SELATAN
PROPINSI SUMATERA UTARA INDONESIA**

DISERTASI



**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
2017**

**KARAKTERISASI PLASMODIUM SPESIES MENGGUNAKAN METODA
KONVENSIONAL DAN NESTED PCR DI KABUPATEN NIAS SELATAN
PROPINSI SUMATERA UTARA INDONESIA**

Oleh :



**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS**

2017

RINGKASAN

Malaria merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia termasuk Indonesia. *World Malaria Report* tahun 2011 menyebutkan bahwa malaria terjadi di 106 Negara bahkan 3,3 milyar penduduk dunia tinggal di daerah berisiko tertular malaria. Jumlah kasus malaria di dunia sebanyak 216 juta kasus, dimana 28 juta kasus terjadi di ASEAN. Setiap tahunnya sebanyak 660 ribu orang meninggal dunia karena malaria terutama anak balita (86%), 320 ribu diantaranya berada di Asia Tenggara termasuk Indonesia. Malaria merupakan penyakit infeksi parasit dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tertinggi di Sumatera Utara. Khususnya Kabupaten Nias Selatan dijumpai kedua jenis malaria yaitu endemis malaria *vivax* dan malaria *falciparum*. Diagnosis malaria berdasarkan penemuan parasit dalam tetes darah tebal dan tipis masih menjadi masalah di daerah endemik karena keterbatasan peralatan dan tergantung ketrampilan petugas sehingga untuk mendiagnosis parasit spesies terbaru terlupakan sehingga diagnosis dan terapi cepat merupakan hal mendasar untuk menghentikan transmisi penyakit malaria. Sebaliknya uji Biomolekuler Nested-2 PCR dapat mendeteksi jumlah parasit sedikit dan plasmodium spesies baru. SD Biline Malaria Antigen P.f/Pan terdiri dari membrane strip, yang disalut ulang dengan *monoclonal antibody* dan 1 *poliklonal antibody* berbentuk dua garis yang terpisah pada permukaan kit tes. Monoklonal antibody pertama (*test line P.f*) spesifik terhadap HRP2 P.falciparum dan Poliklonal antibody kedua (*test line P.Pan*) spesifik untuk lactate dehidrogenase *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*) diadsorbsi ke laktat dehidrogenase manusia. Sehingga SD Biline Malaria Antigen P.f/Pan didesain untuk mendiagnosa *Plasmodium falciparum* dan spesies Plasmodium yang lain secara terpisah. Pemeriksaan dengan mikroskop merupakan gold standard (standar baku) untuk diagnosis pasti malaria. Pemeriksaan mikroskop dilakukan dengan membuat sediaan darah tebal dan tipis. Pemeriksaan sediaan darah (SD) tebal dan tipis di rumah sakit/Puskesmas/lapangan untuk menentukan : Ada tidaknya parasit malaria (positif atau negatif); Spesies dan stadium Plasmodium; Kepadatan parasite. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas dari uji diagnostik terhadap infeksi *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale*, *P.knowlesi* didaerah endemik malaria. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat menjadi kontribusi dalam penanganan kasus malaria berat maupun malaria otak agar deteksi dini dalam mendiagnosis malaria secara cepat dan akurat sehingga pengobatan sesegera mungkin dilakukan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas kedokteran Universitas Prima Medan. Sampel penelitian didapat dari Puskesmas Pulau Tello Kecamatan Pulau-Pulau Batu Kabupaten Nias Selatan, mulai November 2014 sampai dengan November 2016. Populasi penelitian adalah

pasien malaria yang berkunjung ke Puskesmas Pulau Tello kecamatan Pulau-Pulau Batu Kabupaten Nias Selatan. Pasien dengan diagnosa Malaria Klinis dan yang diambil adalah semua golongan umur. Seluruh peserta yang ikut dalam penelitian ini diberikan informed-consent dan telah mendapat penjelasan tentang prosedur penelitian dan kemungkinan efek yang kurang menyenangkan yang mungkin timbul meskipun kecil. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif terhadap semua populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian. Bahan dan Cara Sembilan puluh delapan sampel darah dari pasien suspek malaria di Puskesmas Pulau Tello, Kabupaten Nias Selatan Propinsi Sumatera Utara. Penelitian dilakukan dengan tiga metoda yaitu Metoda RDT SD Bioline Malaria-Ag/Pan, Metoda Mikroskop , Metoda Nested Polimerase Chain Reaktion ada dua yang dilakukan Nested 1 Polimerase Chain Reaktion dan Nested 2 Polymerase Chain Reaktion. Jumlah sampel dalam penelitian ini 98 orang. Jumlah perempuan 50 pasien (51%) lebih banyak dari pada laki-laki 48 orang (49%). Umur yang terbanyak adalah umur 15 tahun sampai dengan 59 tahun yaitu 41 pasien (41,8%) dan Umur 5 tahun sampai dengan 14 tahun yaitu 36 pasien (36,7) dan paling sedikit umur diatas 60 tahun yaitu 6 pasien (6,1%). Gejala terbanyak adalah Demam yaitu 73 orang (74,5%) dan Sakit kepala yaitu 71 pasien (72,4%). Splenomegali ditemukan pada 30 pasien (30,6%). Populasi yang diambil adalah populasi dengan kriteria inklusi berdasarkan gejala klinis seperti demam, sakit kepala, sakit otot, mual, diare, sakit perut, nafsu makan, anemia, dan limpa membesar, positif dengan RDT, Makroskopis *P. falciparum* dan *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Dari hasil temuan dengan Nested PCR ditemukan jenis baru yakni *P. Knowlesi*. Hasil pemeriksaan dengan RDT, Mikroskopis, dan Nested PCR pada parasit *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Sensitivitas pemeriksaan yang tertinggi (100%) pada pemeriksaan parasit adalah antara RDT Pv dengan Nested PCR Pv. Spesifisitas tertinggi (100%) pada pemeriksaan parasit adalah antara RDT Pf dengan Nested PCR Pf dan Mikroskopik Pf dengan Nested PCR Pf. Nilai Duga (+) terbesar (95,83%) adalah pada RDT Pf dengan Nested PCR Pf dan antara Mikroskopis Pf dengan Nested PCR Pf. Nilai Duga (-) terbesar (100%) adalah RDT Pv dengan Nested PCR Pv. Rasio Kemungkinan positif terbanyak tak terhingga adalah antara RDT Pf dengan Mikroskopik Pf. Sedangkan Rasio Kemungkinan Negatif terbanyak (0,31%) yakni antara RDT Pf dengan Nested PCR Pf dan Mikroskopis Pf dengan Nested PCR Pf. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan ditemukan *Plasmodium knowlesi* dengan jenis baru di kepulauan Nias Sumatera Utara. Temuan ini didapatkan setelah uji konfirmasi dengan Nest 2 PCR dengan prevalensi yang sangat kecil yakni 0,97%. Temuan ini merupakan suatu kemajuan dalam pencarian spesies baru penyebab malaria khususnya di sumatera dan umumnya di Indonesia. Meskipun kejadiannya kecil, tetapi dapat terdeteksi karena menggunakan marker primer sebanyak dua kali atau Nest 2 PCR. Hal ini dimungkinkan karena primer dapat melacak spesies baru sampai ke dalam gen atau genotip (sifat yang tidak tampak secara morfologi). Kesimpulan: Nested PCR dapat digunakan sebagai diagnostik untuk malaria *falciparum*, *vivax*, *knowlesi*, mix infeksi dan telah ditemukan *Plasmodium Knowlesi* dikabupaten Nias Selatan Propinsi Sumatera Utara meskipun prevalensinya masih rendah.

SUMMARY

Malaria is one of the most contagious diseases that are still a public health problem in the world including Indonesia. *World Malaria Report 2011* mentions that malaria occurs in 106 countries, even 3.3 billion people live in areas at risk of contracting malaria. The number of malaria cases in the world is 216 million cases, of which 28 million cases occur in ASEAN. Each year as many as 660 thousand people died of malaria, especially toddlers (86%), 320 thousand of which are in Southeast Asia including Indonesia. Malaria is a parasitic infectious disease with the highest morbidity and mortality rates in North Sumatra. Particularly in South Nias district, there are two types of malaria: malaria vivax endemic and malaria falciparum. The diagnosis of malaria based on the discovery of parasites in thick and thin blood smears is still a problem in endemic areas due to equipment limitations and skill-dependent skills so as to diagnose newly forgotten species parasites so that rapid diagnosis and therapy are fundamental to stopping the transmission of malaria. In contrast, the Nested-2 PCR Biomolecular test can detect small amounts of parasites and new species *Plasmodium*. SD Bioline Malaria P.f / Pan antigen consists of a strip membrane, which is re-coated with monoclonal antibody and 1 polyclonal antibody in the form of two separate lines on the surface of the test kit. The first monoclonal antibody (P.f test line) specific to HRP2 *P.falciparum* and the second polyclonal antibody (P.Pan test line) for lactate dehydrogenase *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) adsorbed to human lactate dehydrogenase. Bi SDH Bioline Malaria P.f / Pan is designed to diagnose *Plasmodium falciparum* and other *Plasmodium* species separately. Microscopy is a gold standard (standard) for the exact diagnosis of malaria. Microscopic examination is done by making blood thick and thin. Blood and thin blood sample (SD) examination at hospital / Puskesmas / field to determine: The presence or absence of malaria parasites (positive or negative); Species and stages of *Plasmodium*; Parasite density. The purpose of this study was to investigate the sensitivity and specificity of diagnostic tests of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* infection in malaria endemic areas. So from the results of this study can be a contribution in the handling of cases of severe malaria and malaria of the brain for early detection in diagnosing malaria quickly and accurately so that treatment as soon as possible. The research was conducted at the Biomolecular Laboratory Faculty of Medicine, Prima University, Medan. The research sample was obtained from Puskesmas Pulau Tello Kecamatan Pulau-Pulau Batu, South Nias District, from November 2014 until November 2016. The study population was malaria patients who visited Toso Island Community Health Center, Pulau Batu Island, South Nias District. Patients with a diagnosis of Clinical Malaria and Taken are all age groups. All participants who participated in the study were given informed consent and have been briefed on the research procedure and possible unpleasant effects that may arise even if small. Sampling is conducted consecutively against all affordable populations that meet the study

criteria. Materials and Methods Ninety-eight blood samples from malaria suspect patients at Tello Island Community Health Center, South Nias District of North Sumatra Province. The research was conducted with three methods, namely RDT SD Bioline Malaria-Ag / Pan Method, Microscope Method, Nested Polymerase Chain Reaction Method, two of which are Nested 1 Polymerase Chain Reaktion and Nested 2 Polymerase Chain Reaktion. The number of samples in this study 98 people. The number of women 50 patients (51%) more than in men 48 people (49%). The most ages were aged 15 years to 59 years, 41 patients (41.8%) and 5 years to 14 years old were 36 patients (36.7) and at least age above 60 years ie 6 patients (6.1 %). The most symptom is a fever that is 73 people (74,5%) and headache that are 71 patient (72,4%). Splenomegaly was found in 30 patients (30.6%). Population taken were a population with inclusion criteria based on clinical symptoms such as fever, headache, muscle aches, nausea, diarrhea, abdominal pain, appetite, anemia, and enlarged spleen, positive with RDT, Macroscopic *P. falciparum*, and *P. vivax*, *P. Ovale*, *P. malaria*. From the findings with Nested PCR found a new type of *P. Knowles*. Results of examination with RDT, Microscopic, and Nested PCR in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. The highest sensitivity of examination (100%) on parasite examination was between RDT Pv and Nested PCR Pv. The highest specificity (100%) on parasitic examination was between RDT Pf with Nested PCR Pf and Microscopic Pf with Nested PCR Pf. The greatest predictive value of a positive test (+) (95.83%) was in RDT Pf with Nested PCR Pf and between Microscopic Pf and Nested PCR Pf. The largest predictive value of a negative test (-) (100%) is RDT Pv with Nested PCR Pv. The most infinitely predictable value of a positive test is between RDT Pf and Microscopic Pf. While the Predictive value of a test e most (0.31%) ie between RDT Pf with Nested PCR Pf and Microscopic Pf with Nested PCR Pf. Based on the results of research conducted found *Plasmodium* knowledge with new species in the Nias Islands of North Sumatra. These findings were obtained after confirmatory tests with Nest 2 PCR with a very small prevalence of 0.97%. This finding is an improvement in the search for new species of malaria causes especially in Sumatra and generally in Indonesia. Although the incidence is small, it can be detected because it uses the primary marker twice or Nest 2 PCR. This is possible because the primer can track new species down into genes or genotypes (properties that do not appear morphologically). Conclusions: Nested PCR can be used as a diagnostic for malaria *falciparum*, *vivax*, knowledge, mix infection and has been found *Plasmodium Knowlesi* in Nias Selatan District of North Sumatra Province although the prevalence is still low.