

# 3.5

*By* JHONS SUWANDI

2

## Identifikasi *Plasmodium knowlesi* menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

### Pendahuluan

3 Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia. Indonesia menggunakan *Annual Parasite Incidence* (API) untuk menilai tingkat malaria pada suatu daerah. Nilai API digunakan sebagai indikator dalam penilaian morbiditas malaria pada suatu wilayah. Nilai API didapatkan dari nilai pada jumlah kasus positif terhadap malaria per 1.000 penduduk dalam satu tahun. Pada tahun 2013 Papua memiliki nilai API dengan peringkat tertinggi, diikuti oleh Papua Barat,

NTT, Maluku, Maluku Utara, dan Lampung menduduki peringkat ke-12 dari seluruh provinsi di Indonesia.<sup>1</sup>

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina. Selama ini dikenal ada empat jenis plasmodium yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, dan *Plasmodium oval*.<sup>2</sup> Selain empat jenis *Plasmodium* yang telah disebutkan

sebelumnya, telah dilakukan eksperimen oleh Knowles dan Des Gupts mengenai jenis *Plasmodium* yang biasa menginfeksi kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dapat menginfeksi manusia melalui infeksi buatan.<sup>3</sup>

Kasus infeksi alami *Plasmodium knowlesi* mulai banyak dilaporkan pada tahun 2000- 2004 di Kapit-Serawak-Malaysia. *Plasmodium knowlesi* biasanya menginfeksi kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*), kera ekor babi (*Macaca nemestrina*), dan langur (*Presbytis melalophos*) tetapi dapat juga menginfeksi manusia.<sup>4</sup>

Kejadian infeksi malaria *P. Knowlesi* sudah mulai ditemukandi beberapa wilayah di Indonesia. Sejak tahun 2010 hingga 2012 sudah dilaporkan empat kasus infeksi *Plasmodium knowlesi*. Keempat kasus tersebut ditemukan di sekitar hutan di Kalimantan Selatan. Tidak hanya di Kalimantan Selatan, kasus malaria *Plasmodium knowlesi* juga terjadi di Kalimantan Utara. Sejumlah kasus positif *Plasmodium knowlesi* tersebut ditegakkan melalui pemeriksaan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yakni tiga kasus pada tahun 2014<sup>5</sup> dan satu kasus terbaru pada tahun 2016.<sup>6</sup> Penyebaran *Plasmodium knowlesi* tidak hanya terbatas pada Provinsi Kalimantan saja, melainkan telah ditemukan juga di Sumatera Utara.<sup>7</sup>

Penegakkan diagnosis untuk penyakit malaria selama ini menggunakan pemeriksaan mikroskopis sebagai standar emas. Tetapi pemeriksaan secara mikroskopis tidak dapat digunakan untuk mendeteksi kasus malaria akibat infeksi *Plasmodium knowlesi*.<sup>4</sup> Metode pemeriksaan yang akurat untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR merupakan salah satu metode biomolekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme penyebab infeksi sampai pada tingkatan DNA. Metode PCR bekerja dengan memperbanyak suatu sekuens gen yang diinginkan dan kemudian dibaca pada jarose gel yang telah dielektroforesis. Metode ini terbukti sensitif dan spesifik dibandingkan dengan metode mikroskopis.<sup>8</sup>

## Isi

Malaria merupakan infeksi yang menyerang sel darah merah penderita. Saat awal terjadinya infeksi, penderita akan

mengalami gejala-gejala awal atau disebut juga gejala prodormal yang tidak begitu spesifik, yaitu sakit kepala, lesu, malaise, perut tidak enak, anoreksia, diare ringan, nyeri tulang dan otot. Setelah itu penderita akan merasakan gejala klasik malaria yang biasa disebut sebagai trias malaria, yaitu demam, anemia dan splenomegali. Demam akibat malaria memiliki tiga periode yang khas, yaitu:

### a. Periode dingin

Pada periode ini pasien mulai merasakan kedinginan hebat diikuti dengan menggigil seluruh tubuh, gigi gemeretak, kulit dingin, kering, pucat dan sianosis. Pasien berusaha membungkus diri dengan selimut. Periode ini berlangsung selama 15 menit sampai satu jam.

### b. Periode panas

Pada periode ini suhu tubuh meningkat sampai 40°C atau lebih, kulit panas dan kering, dan muka memerah. Periode ini berlangsung selama dua jam bahkan bisa mencapai enam jam.

### c. Periode berkeringat

Periode ini pasien mulai berkeringat, mulai dari temporal diikuti seluruh tubuh. Suhu tubuh menurun dengan cepat dan penderita merasa tubuhnya sehat kembali.

Periode ini berlangsung 2-3 jam.<sup>9</sup> Gejala-gejala yang timbul pada

penderita malaria disebabkan oleh parasit, yaitu protozoa dari genus *Plasmodium*. *Plasmodium* penyebab malaria pada manusia memiliki empat spesies, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, dan *Plasmodium ovale*.<sup>10</sup> Beberapa dekade terakhir ditemukan adanya jenis *Plasmodium* baru yang biasa menginfeksi kera dan ternyata dapat menginfeksi manusia. Spesies parasit tersebut adalah *Plasmodium knowlesi*.<sup>4,5</sup>

*Plasmodium knowlesi* merupakan parasit alami yang menginfeksi kera atau monyet. Jenis monyet yang sering terinfeksi adalah monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*). Selain menginfeksi kera, *Plasmodium knowlesi* dapat menginfeksi manusia. Manusia yang beresiko tinggi terinfeksi *P. knowlesi* adalah manusia yang bekerja dipinggiran hutan atau bekerja di dalam hutan. Infeksi akibat *Plasmodium knowlesi* yang terjadi pada manusia telah dilaporkan baik secara insidental alami maupun secara eksperimen.<sup>5,11</sup>

*Plasmodium knowlesi* pertama kali ditemukan pada tahun 1927 oleh Giuseppe Franchiti saat menga<sup>6</sup>ati darah *Macaca fascicularis*. Kemudian pada tahun 1932, dr. Knowles dan dr. Das Gupta mengamati dan menggambarkan dengan detail *Plasmodium knowlesi* dari <sup>9</sup>keras rhesus macaca (*Macacamulata*) dan menunjukkan bahwa spesies ini dapat menginfeksi manu<sup>6</sup> melalui darah dengan infeksi buatan.<sup>3</sup> Kemudian Sinton dan Mulligan memberinya nama sesuai penemunya yaitu *Plasmodium knowlesi*.<sup>12</sup>

Pada tahun 1965 ditemukan infeksi *Plasmodium knowlesi* secara alami pertama kali pada manusia. Infeksi ini menyerang pria asal Amerika Serikat setelah kunjungan ke Semenanjung Malaysia.<sup>11</sup> Infeksi *Plasmodium knowle*<sup>1</sup> ditemukan banyak terjadi pada negara-negara di Asia Tenggara. Kasus terbanyak ditemukan di Malaysia, terutama di negara bagi<sup>1</sup> yang terletak di dekat pulau Kalimantan. Selain di Malaysia, negara di Asia Tenggara yang juga dilaporkan memiliki kasus infeksi *Plasmodium knowlesi* antara lain adalah Indonesia, Thailand, Kamboja, Vietnam, Filipina dan Singapura.<sup>4</sup>

Pemeriksaan yang menjadi standar emas dalam diagnosis positif malaria adalah pemeriksaan mikroskopis. Sampel yang digunakan dalam pemeriksaan mikroskopis adalah darah tepi penderita malaria. Pada pemeriksaan ini setiap jenis *Plasmodium* dapat dibedakan melalui morfologinya. Tetapi, pemeriksaan secara mikroskopis belum dapat memastikan infeksi akibat *Plasmodium knowlesi* secara tepat, karena morfologi *Plasmodium knowlesi* sering tumpang tindih dengan *Plasmodium* lainnya. *Plasmodium knowlesi* memiliki tingkat kemiripan yang tinggi dengan *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae*. Pemeriksaan lain yang dapat dilakukan untuk membedakan ketiga spesies *Plasmodium* d<sup>10</sup>an menggunakan pemeriksaan molekuler, salah satunya dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).<sup>4,7,3,14</sup>

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mer<sup>4</sup>plifikasi segmen DNA target. Teknik ini melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Selama dilakukannya PCR dalam waktu

beberapa jam dapat dihasilkan segmen DNA dalam jumlah jutaan kali lebih banyak dari fragmen aslinya. Teknik PCR banyak digunakan di laboratorium untuk penelitian maupun kebutuhan medis, seperti untuk identifikasi suatu organisme infeksius dan deteksi gen yang berperan dalam perkembangan kanker.<sup>15</sup>

Prinsip dari PCR adalah memperbanyak suatu segmen DNA dari dua menjadi empat, kemudian delapan dan seterusnya hingga terbentuk ribuan bahkan jutaan salinan. Proses pelipatgandaan segmen DNA ini terjadi dengan menggunakan suatu enzim yang disebut polimerase. Proses pelipatgandaan terjadi dalam tiga tahap, yaitu *denaturation*, *annealing* (peleburan/penempelan), dan *elongation* atau *extension* (pemanjangan). Ketiga tahapan tersebut dikatakan sebagai satu siklus amplifikasi. Proses PCR dilakukan pengulangan hingga didapatkan jumlah yang diinginkan, misalnya pengulangan dilakukan sebanyak 30 siklus. Setiap tahap memiliki perbedaan suhu dalam melaksanakan prosesnya, yaitu:

1. *Denaturation*

Awalnya DNA untai ganda atau *double-stranded* DNA didenaturasikan pada suhu 90-97°C menjadi sebuah DNA untai tunggal atau *single-stranded* DNA.

2. *Annealing*

Pada tahap ini DNA tersebut “dilebur” (*annealing*) pada suhu 50-60°C dengan dua *primer*. *Primer* adalah sebuah fragmen DNA yang akan menempel pada gen yang ditarget dan berperan sebagai dasar (*template*) untuk pembentukan untai baru.

3. *Elongation*

Enzim DNA polimerase memanjangkan (*elongation*) *primer* dengan deoksinukleotida trifosfat (dNTP) sebagai substrat sehingga diperoleh DNA salinan dari DNA aslinya.<sup>16</sup>

Terdapat beberapa metode PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Plasmodium knowlesi*. Pada tahun 2004 Singh telah mengembangkan suatu pemeriksaan dengan metode *nested* PCR untuk mendeteksi perbedaan spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia, termasuk *Plasmodium knowlesi*. Penelitian ini dilakukan di Kapit Serawak Malaysia. Penelitian ini menggunakan dua pasang primer, untuk amplifikasi pertama menggunakan rPLU1 dan rPLU5, sedangkan

untuk *nested* menggunakan primer spesifik Pmk8 dan Pmkr9 yang dirancang berdasarkan rangkaian gen SSU rRNA isolat *Plasmodium knowlesi*. Urutan primer yang digunakan dijelaskan pada tabel 1. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat yang awalnya teridentifikasi sebagai *Plasmodium malariae* melalui pemeriksaan mikroskopis disanggah dengan hasil positif *Plasmodium knowlesi* dengan pemeriksaan *nested* PCR yang menggunakan primer tersebut.<sup>17</sup>

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Singh telah disanggah oleh Imwong pada tahun 2009. Imwong mengatakan bahwa, primer set yang dibuat oleh Singh menghasilkan positif palsu karena terdapat hasil yang tumpang tindih dengan *Plasmodium vivax*. Pada penelitiannya, Imwong mendesain dua primer set baru, yaitu PkF1060-PkR1550 dan PkF1040-PkR1050 dengan target gen SSU rRNA pada *Plasmodium*. Urutan primer dijelaskan pada tabel 1. Hasil penelitian ini menunjukkan identifikasi spesifik terhadap *Plasmodium knowlesi* tanpa adanya tumpang tindih dengan spesies lain.<sup>18</sup>

Selain Imwong, pada tahun 2009 Putaporntip melakukan penelitian tentang identifikasi *Plasmodium knowlesi* Thailand menggunakan metode *nested* PCR. Pada penelitiannya, primer yang digunakan adalah PK18SF dan PK18SR yang dirancangnya sendiri. Primer yang digunakan tersebut dijelaskan pada tabel 1.<sup>19</sup>

Metode lain yang digunakan dalam mendeteksi *Plasmodium knowlesi* adalah dengan metode *Single Step* PCR yang diteliti pada tahun 2012 oleh Lucchi. Pada penelitiannya, Lucchi merancang tiga set primer yang digunakan untuk mendeteksi *Plasmodium knowlesi*, yaitu Pkr140-3, Pkr140-4, dan Pkr140-5. Urutan primer yang digunakan dijelaskan pada tabel 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Pkr140-5 dapat mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* secara spesifik dengan panjang basa 200 bp. Sedangkan, Pkr140-3 dan Pkr140-4 menunjukkan hasil yang tumpang tindih dengan parasit simian malaria.<sup>8</sup>

Tabel 1. Urutan primer *Plasmodium knowlesi* untuk pemeriksaan PCR

Primers	Sequence	References
rPLU1	5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3'	Singh <i>et al.</i> , 2004
rPLU5	5'-CCTGTTGTTGCCTTAACTCC-3'	
Pmk8	5'-GTTAGCGAGAGCCACAAAAAGCGAA-3'	
Pmkr9	5'-ACTCAAAGTAACAAAATCTTC CGTA-3'	
PkF1140	5'-GATTCATCTATTAATAATTGCTTC-3	Imwong <i>et al.</i> , 2009
PkF1160	5'-GATGCCTCCGCGTATCGAC-3	
PkR1150	5'-TCTTTTCTCTCCGGAGATTAGAACTC-3'	
M18SF0	5'-CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGG-3'	Putaporntip <i>et al.</i> , 2009
M18SR0	5'-CAAGGAAGTTAAGGCAACAACA-3'	
PK18SF	5'-GAGTTTTCTTTCTCTCCGGAG-3	
PK18SR	5'-ACGTTAAATGTGATTCCTTTCCC-3	
Pkr140-5F	5'-CAGAGATCCGTTTCATGATTTCCATGG-3	Lucchi <i>et al.</i> , 2012
Pkr140-5R	5'-CTAACACCTCATGTCGTGGTAG-3'	

Setiap penelitian yang telah dijelaskan sebelumnya melakukan PCR dengan kondisi yang berbeda beda. Kondisi PCR merupakan suatu keadaan suhu serta waktu yang digunakan dalam proses PCR itu sendiri. Pada proses PCR dibutuhkan kondisi yang sesuai dengan target gen yang akan di amplifikasi, agar didapatkan ptingan gen yang sesuai

dengan target. Kondisi PCR dalam setiap prosesnya terbagi sesuai dengan tahapan yang terjadi dalam metode PCR, seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Kondisi PCR yang digunakan pada setiap penelitian dalam mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* dijelaskan pada tabel 2.<sup>8,17-19</sup>

**Tabel 2. Kondisi PCR pada setiap penelitian**

Kondisi PCR	Singh <i>et al.</i> , 2004	Imwong <i>et al.</i> , 2009	Putaporntip <i>et al.</i> , 2009	Lucchi <i>et al.</i> , 2012
Kondisi 1	40 siklus	30 siklus	35 siklus	35 siklus
Predenaturasi	94°C; 4 menit	95°C; 5 menit		95°C; 2 menit
Denaturasi	94°C; 30 detik	94°C; 1 menit	94°C; 40 detik	95°C; 30 detik
Anneling	55°C; 1 menit	55°C; 1 menit	60°C; 30 detik	57°C; 30 detik
Extension	72°C; 2 menit	72°C; 1 menit	72°C; 1 menit	72°C; 45 detik
Kondisi 2		35 siklus	25 Siklus	
Predenaturasi	94°C; 4 menit	95°C; 5 menit		
Denaturasi	94°C; 30 detik	94°C; 1 menit	94°C; 40 detik	
Anneling	60°C; 1 menit	50°C; 1 menit	60°C; 30 detik	
Extension	72°C; 2 menit	72°C; 1 menit	72°C; 1 menit	

Metode yang digunakan pada penelitian sebelumnya, baik *nested* ataupun *single step* PCR memiliki kelebihan dan kekurangannya. Pada *nested* PCR diperlukan bahan yang lebih banyak dibandingkan dengan *single step* PCR, karena pada *nested* PCR dibutuhkan dua pasang primer sedangkan pada *single step* PCR hanya membutuhkan satu pasang primer. Pengerjaan *nested* PCR akan memakan waktu dua kali lipat lebih banyak dibandingkan dengan *single step* PCR. Karena pada *nested* PCR akan dilakukan dua kali tahapan PCR dengan pasangan primer lain. Tetapi, jika hasil *nested* PCR dibandingkan dengan *single step* PCR, *nested* PCR akan mendapatkan hasil yang lebih spesifik dari *single step* PCR. Hal tersebut dikarenakan penggunaan primer kedua pada *nested* yang lebih spesifik pada gen yang ditargetkan.

Setelah proses PCR tersebut hasilnya dapat digunakan menggunakan cara elektroforesis. Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Prinsip kerja elektroforesis adalah molekul (hasil PCR) ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul yang digunakan adalah molekul DNA yang bermuatan negatif karena mengandung gugus O. Molekul DNA akan bermigrasi menuju kutub positif. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA strandar (marker) yang telah diketahui ukurannya.<sup>20</sup>

Elektroforesis membutuhkan gel sebagai media dalam pembacaan hasil PCR, gel yang biasa digunakan adalah gel agarose. Gel agarosa yang digunakan dalam identifikasi *Plasmodium knowlesi* digunakan

dengan konsentrasi 2%. Gel agarose dibuat dengan perbandingan agarose 2 gr dengan buffer 100 ml. Gel agarose akan diletakkan di dalam baki elektroforesis dan baki tersebut akan diisi dengan buffer hingga gel agarose terendam. Setelah itu hasil PCR akan dicampurkan dengan *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur yang ada di gel agarose. Kemudian, alat elektroforesis dihubungkan dengan aliran listrik selama 45 menit pada 70 Volt. Setelah itu, gel agarose akan di visualisasikan dibawah sinar ultraviolet, untuk melihat segmen DNA dari PCR yang telah dilakukan. Uji suatu sampel dikatakan positif jika panjang basa dari fragmen DNA hasil PCR sesuai dengan panjang basa molekul yang sesuai dengan *gene marker Plasmodium knowlesi*.<sup>8,20,21</sup>

### Ringkasan

Kesalahan diagnosis *Plasmodium knowlesi* dengan menggunakan metode mikroskopis telah banyak dilaporkan oleh negara-negara yang terletak di Asia Tenggara akibat kemiripan morfologi *Plasmodium knowlesi* dengan plasmodium lain sehingga dibutuhkan pemeriksaan berbasis molekuler untuk mendeteksi malaria *knowlesi* secara spesifik yakni dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Terdapat dua metode PCR yang tersedia untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*, yaitu *nested* PCR dan *single step* PCR. Baik *nested* maupun *single step* memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Metode *nested* PCR yang ditemukan oleh Singh pada tahun 2004 dianggap lebih akurat dan spesifik untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*.

### **Simpulan**

Terdapat dua metode PCR yang tersedia untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*, yaitu *nested* PCR dan *single step* PCR. Metode *nested* PCR yang ditemukan oleh Singh pada tahun 2004 dianggap lebih akurat dan spesifik untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*.

# 26%

SIMILARITY INDEX

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://media.neliti.com">media.neliti.com</a> Internet	242 words — 10%
2	<a href="http://repository.lppm.unila.ac.id">repository.lppm.unila.ac.id</a> Internet	59 words — 2%
3	<a href="http://digilib.unila.ac.id">digilib.unila.ac.id</a> Internet	53 words — 2%
4	<a href="http://fr.scribd.com">fr.scribd.com</a> Internet	42 words — 2%
5	<a href="http://www.scribd.com">www.scribd.com</a> Internet	36 words — 2%
6	<a href="http://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a> Internet	36 words — 2%
7	<a href="http://grisellarambitan.wordpress.com">grisellarambitan.wordpress.com</a> Internet	22 words — 1%
8	<a href="http://andre4088.blogspot.com">andre4088.blogspot.com</a> Internet	20 words — 1%
9	<a href="http://id.scribd.com">id.scribd.com</a> Internet	20 words — 1%
10	<a href="http://adietcandra.files.wordpress.com">adietcandra.files.wordpress.com</a> Internet	16 words — 1%
11	Tia Sabrina, Erizka Rivani, Venny Patricia. "Analisis Gen Blavim, Blandm dan Blaimp Carbapenemase	14 words — 1%



dengan Alat Otomatis Vitek-2 dan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) pada Isolat Bakteri Enterobacteriaceae di RSUP Dr. Moh. Hoesin Palembang", SRIWIJAYA JOURNAL OF MEDICINE, 2018

Crossref

---

12 Antinori, Spinello, Laura Galimberti, Laura Milazzo, and Mario Corbellino. "Plasmodium knowlesi: The emerging zoonotic malaria parasite", Acta Tropica, 2013. 12 words — 1%

Crossref

---

13 ojs.uho.ac.id 11 words — < 1%

Internet

---

14 webicdn.com 11 words — < 1%

Internet

---

15 docplayer.info 8 words — < 1%

Internet

---

16 wwwpetersampricom.blogspot.com 8 words — < 1%

Internet

---

EXCLUDE QUOTES OFF

EXCLUDE MATCHES OFF

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY OFF