

JURNAL TEKNOLOGI LABORATORIUM

(www.teknolabjournal.com)

Vol.6, No.2, September 2017, pp. 75 ~ 82

ISSN: 2338 – 5634 (print); ISSN: 2580-0191 (online)

Received : 08-09-2017; Revised : 02-10-2017 ; Accepted : 14-10-2017

Pengembangan Mikroskop dengan Mikrokontroler dan Cahaya Monokromatis untuk Mendeteksi Parasit Malaria

Ida Susanti¹, Sarwo Handayani¹, Riyanti Ekowatiningsih¹, Budi Prasetyorini¹,
Endah A Yusnita¹, Donni Agus Ardianto², Sastra K Widjaya²

¹ Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan Jl. Percetakan Negara no. 23A, Jakarta Pusat

² Program Magister Teknologi Biomedis, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya 4, Kampus UI, Salemba
Email: idasusanti.tbm@gmail.com

ABSTRACT

Malaria still become one of major health burden in Indonesia especially in remote areas of east Indonesia. Golden standard of malaria parasite detection is still microscopic technique using polichromatic light source whether from halogen or natural light source. Microscopic technique have alot of benefit but still have weakneses, such as time consuming and bias on the reading by microscopist, because of artifact in the image. Aims of this study was to designed malaria parasites detection tool that is robust, fast, convenient and clear by minimizing artifact on slide. Design of this study was laboratory experimental which modified simple microscope into automatic microscope with table movement and webcam recording using microcontroller and monochromatic light source. Wavelength of the light sources were 402nm(blue), 532 nm (green) and 650 nm (red), intensity of each sources were differ. The reading of the slide image was conducted by two certified microscopist, whom read 60 images of thick and thin slide with three different live stage of Plasmodium falciparum live, which werering, trophozoit and schizont. This study showed that modification of microscope was succeeded with automatic movement and webcam recording, process time in one step movement and recording approximately 10 seconds or 17minutes for 100 field of view as confirmation process. Monochromatic light source has proven to give a clear and contrast field of view when the intensities were higher than 40 mW and the certified microscopist able to identified Plasmodium falciparum parasites. Data analysis of microscopist reading used non parametric statistic friedman by SPSS showed that correlation between images using monocromatics and polichromatic lights have meaningless differences in a thick and thin slide. However, hemozoin as marker of plasmodium falciparum parasite was less detected by monochromatic light used in this study.

Key words: malaria detection, monocromatic microscope, Microcontroler.

© 2017 Jurnal Teknologi Laboratorium

ABSTRAK

Malaria masih menjadi salah satu masalah kesehatan di Indonesia terutama di daerah bagian timur Indonesia. *Gold standard* pemeriksaan malaria sampai saat ini adalah teknik pemeriksaan mikroskop dengan cahaya putih (polikromatis) bersumber dari lampu halogen atau

sumber cahaya lainnya. Kelemahan dari teknik mikroskop adalah kurang efisien waktu dan adanya *artefak* pada gambar apusan darah dikarenakan objek dalam darah ataupun kotoran saat pembuatan apusan darah, hal ini sangat berpengaruh terhadap hasil analisis gambar. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan alat deteksi malaria yang cepat, nyaman dan lebih jelas dengan mengurangi artefak pada slide malaria. Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratorium dengan memodifikasi mikroskop sederhana menjadi mikroskop otomatis dengan pergerakan meja preparat dan perekaman webcam menggunakan mikrokontroler serta modifikasi pencahayaan menggunakan cahaya monokromatis dari cahaya Laser dengan panjang gelombang 402nm (violet), 532nm (hijau) dan 650nm (merah) dengan kekuatan intensitas yang berbeda, pembacaan dilakukan oleh tenaga mikroskopis untuk membaca hasil rekaman sebanyak 60 gambar slide parasite malaria apusan tebal dan tipis dalam beberapa tahap hidup parasit, yaitu tahap *ring* 20, tahap *trophozoid* 20, dan tahap *schizont* 20. Modifikasi mikroskop yang dilakukan berhasil membaca dan merekam gambar sesuai protokol dalam waktu respon per titik rekam dan geser adalah $\pm 10-15$ detik, sehingga dalam 100 kali lapang pandang estimasi waktu yang diperlukan adalah ± 1500 detik atau 25 menit. Penggunaan cahaya Laser hijau dan laser biru dengan rentang intensitas diatas 40 mW dapat menghasilkan gambaran parasit yang cukup baik dan dapat dibaca oleh analis mikroskopis. Hasil pembacaan gambar oleh mikroskopis dianalisa menggunakan statistic non parametric uji friedman dengan SPSS dan didapatkan bahwa tidak ada perbedaan cukup bermakna dalam pembacaan oleh mikroskopis, baik pada hapusan darah tebal ataupun tipis, namun marker parasite malaria berupa *hemozoin* kurang terdeteksi dengan baik pada cahaya monokromatis yang digunakan.

Kata kunci : Deteksi malaria, Mikroskop monokromatik, Mikrokontroler.

1. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang ditularkan oleh parasit plasmodium dari nyamuk *Anopheles sp* betina. Gejala klinis akibat infeksi parasit malaria ada yang tanpa gejala (*asintomatik*) biasanya terdapat di daerah-daerah endemis tinggi, dengan gejala klasik seperti demam, menggigil, berke^{ringat}, dan gejala berat (*severe*) seperti hilang kesadaran, nafas sesak dan perdarahan.[1] Sampai saat ini penyakit malaria masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat karena dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok resiko tinggi yaitu bayi, balita dan ibu hamil.

Badan Kesehatan Dunia (*World Health Organization, WHO*) menyatakan bahwa malaria merupakan penyakit dengan asumsi kematian satu anak meninggal setiap menit di Afrika, di Indonesia sendiri menurut data dari Riset Kesehatan Dasar berbasis komunitas yang dilakukan oleh Kementerian Kesehatan pada tahun 2013 prevalensi malaria menunjukkan sebesar 6,0%, sebagian besar wilayah di bagian timur Indonesia masih menjadi daerah endemik malaria.[2] Penyebaran penyakit malaria menjadi semakin luas dengan mobilitas penduduk dari dan ke daerah endemis.[3] Malaria pada manusia dapat didiagnosis dengan menggunakan beberapa cara yaitu antara lain dengan pemeriksaan mikroskopis, pemeriksaan serologis menggunakan monoclonal antibody dengan *Rapid Diagnosis Test (RDT)* dan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* ataupun menggunakan *third harmonic generation imaging* [4].

Diagnosis mikroskopis masih merupakan *gold standard* dalam pemeriksaan malaria.[5] Keuntungan dari metode mikroskopis selain murah, dapat mengidentifikasi spesies parasit dengan tepat, namun pemeriksaan menggunakan mikroskop yang dilakukan untuk pemeriksaan malaria manual menimbulkan ketidak nyamanan saat bekerja selain itu penggunaan cahaya lampu halogen atau cahaya polikromatis (putih) untuk mendeteksi parasit malaria saat ini, semua bentuk dan warna yang dapat direkam sehingga menimbulkan banyak terlihat gangguan atau *artefak* pada lapang pandang dan penentuan objek menjadi bias. Pemeriksaan mikroskopis manual juga sangat ditentukan oleh keahlian dari tenaga laboratorium karena penentuan keadaan tidak terjangkau malaria di buktikan dengan pendeteksian minimum 100 lapang pandang[6], sehingga kemungkinan kesalahan deteksi lebih besar tergantung pengalaman tenaga

laboratorium tersebut kadang kegiatan pemeriksaan menjadi sangat lama dan tidak efisien.

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Seungjun Lee dan Wei Lue, 2012 diketahui bahwa perbedaan intensitas parasit *plasmodium falciparum* dapat terlihat pada panjang gelombang 450-500nm dan diatas 700nm[7], sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Makkapati, 2011 diketahui bahwa untuk menghilangkan *artefak* dan mendapatkan gambar dengan kontras adalah dengan menggunakan cahaya monokromatis yang mempermudah proses segmentasi dengan perangkat lunak.[8] Sumber cahaya monokromatik memiliki daya masukan rendah namun tingkat keterangan cahaya atau intensitas cahaya tinggi, serta tahan lama.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan mikroskop otomatis dengan cahaya monokromatik sebagai alat deteksi parasit malaria yang cepat, nyaman, serta akurat.

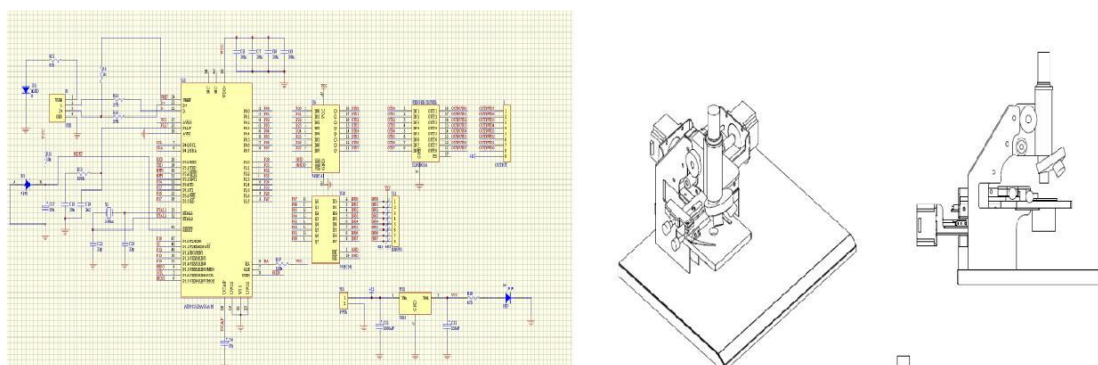
2. METODE PENELITIAN

Desain Penelitian merupakan experimental laboratorium yang terdiri dari dua tahap yaitu pertama adalah modifikasi alat mikroskop dengan perancangan menggunakan mikrokontroler untuk otomatisasi pergerakan dan perekaman gambar, yang kedua adalah dengan modifikasi pencahayaan monokromatis dari beberapa cahaya laser untuk mendapatkan gambar parasit. Sampel yang digunakan adalah parasit malaria *plasmodium falciparum* yang diperoleh dari bahan biologi tersimpan yaitu stok sampel darah terinfeksi malaria *Plasmodium falciparum* (W2pf dan 3D7pf) pada Laboratorium parasitologi Badan Litbang Kesehatan, Kemenkes RI. Sampel di biakan ke dalam 3 tahapan hidup parasit yaitu tahap *ring*, *trophozoid* dan *schizont*, kemudian dibuat hapusan darah tebal dan tipis serta diwarnai dengan *giemsa*, masing masing tahapan hidup parasit dibaca dan direkam secara acak sebanyak masing-masing 10 titik lapang pandang sehingga total sampel gambar adalah 60 gambar lapang pandang. Pengambilan data sampel dilakukan secara acak, sampel yang diambil untuk acuan adalah sepuluh titik dalam tiap-tiap apusan darah. Gambar mikroskop yang dihasilkan dibaca oleh dua orang analis mikroskopis yang terpisah dan tidak saling mengetahui. Hasil pembacaan dianalisis dengan menggunakan SPSS 17 analisis non parametrik uji friedmann,

Modifikasi mikroskop

1. Otomatisasi pergerakan meja preparat.

Meja preparat di buat dari plat dan batang besi untuk *shaft*. Pengukuran *shaft* dihitung berdasarkan pergerakan sumbu x dan y yaitu $\sim 0,1\text{mm}$ pertitik. *Shaft* yang digunakan untuk menggeser sumbu x dan y dibuat dengan panjang 130,5 mm dengan diameter 6,3 mm dan jarak ulir ± 0.05 mm. *Shaft* dihubungkan dengan motor stepper dengan resolusi sebesar 400x sehingga didapat langkah putaran 360° dibagi dengan panjang langkah sebesar 0.9° . Motor stepper digerakan dengan menggunakan rangkaian mikrokontroler C8931 dan program C++.

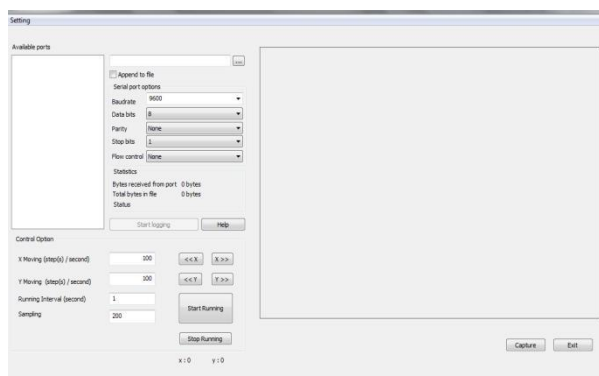


Gambar 1. Rangkaian mikrokontroler dan meja preparat mikroskop

Mikrokontroler mengatur *logic sequence* dari transistor ULN 28003 untuk menggerakkan motor *stepper*, perintah motor *stepper* dilakukan melalui program serial data logging yang dibuat menggunakan bahasa pemrograman C++[9].

Pergerakan meja preparat merujuk pada pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia yaitu dengan melakukan pengamatan mikroskop per lapang pandang besar (LPB) sebanyak 100 LPB untuk mendiagnosa parasit malaria [10].

Pergerakan diatur melalui komputer dengan menghubungkan mikrokontroler C8931 dengan port USB dan driver motor yang digunakan adalah transistor *type Darlington ULN 28003*. Mikrokontroler mengatur *logic sequence* dari ULN untuk menggerakkan motor *stepper*, dan perintah pergerakan motor *stepper* dilakukan melalui program *serial data logging*. Program untuk mengirimkan perintah ke mikrokontroler melalui protokol serial dengan konfigurasi pada gambar.



Gambar 2. konfigurasi protokol serial pergerakan meja x-y dan perekaman gambar webcam

Start logging berfungsi sebagai pembuka port serial komputer untuk memulai komunikasi *serial*, sedangkan *start running* adalah perintah memulai pergerakan dan perekaman gambar *webcam*. pengambilan sample dilakukan mengikuti jumlah minimal penarikan gambar dalam satu apusan darah yaitu 100-200 gambar. Pergerakan sumbu x dan y serta perekaman gambar dibuat sebanyak 100-200 langkah dengan arah zigzag. Pergerakan sumbu x ditentukan dalam langkah 10 kali kekanan kemudian pergerakan sumbu y ditentukan 1 kali setiap 10 langkah sumbu x, dan sumbu x bergerak ke kiri sebanyak 10 langkah kembali. Perekaman gambar oleh webcam diatur dengan menentukan *running interval* pada konfigurasi diatas. Interval antara proses perekaman satu dengan yang lainnya lebih besar dari kecepatan putaran motor stepper

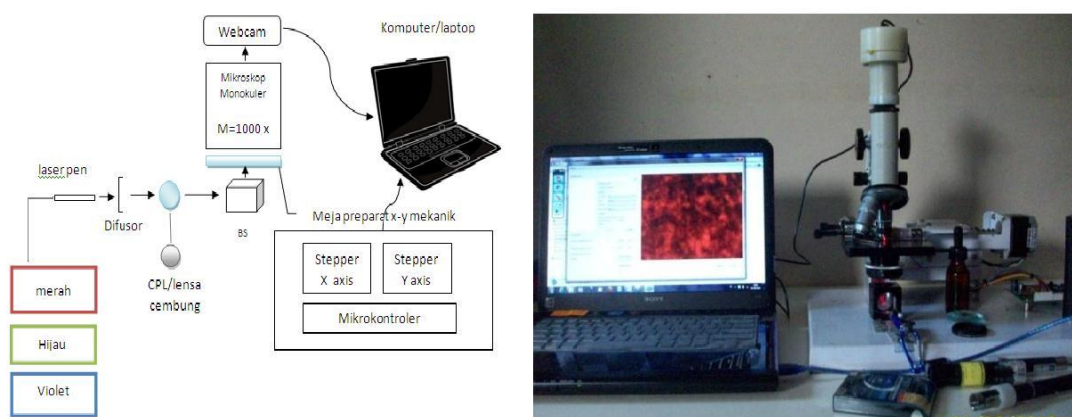
Resolusi yang dihasilkan pada konfigurasi ini adalah 640 x 480 pixel, karena keterbatasan library dari data sumber sehingga untuk mendapatkan gambar yang cukup optimal saat ini gambar direkam dengan menggunakan konfigurasi dari webcam sampai dengan 3264x2448 pixel. Perbesaran optik menggunakan mikroskop adalah sebesar 1000x, dengan penggunaan lensa obyektif 100x dan lensa okuler 10x, dan perbesaran digital sebesar 2x, sehingga perbesaran gambar sampai dengan ~70 μm .

2. Modifikasi pencahayaan monokromatis

Penggunaan peralatan dalam modifikasi mikroskop adalah dengan membuat meja preparat pergerakan mekanik sumbu x-y rakitan dengan pergerakan *saft* di hitung sebesar 0.1 mm menggunakan mikrokontroler yang di kendalikan melalui computer atau laptop dan perangkat lunak menggunakan pemograman bahasa C++, untuk mendapatkan gambar parasit digunakan Monokuler mikroskop®,China dengan perbesaran 1000-1250x dengan bantuan minyak imersi dan sebagai pencahayaan mikroskop digunakan 6 buah lampu led putih dengan daya sebesar 31 lumen, Laser merah diode® 650nm, 5mW, Jerman; laser hijau

diode® 532nm,200mW, China; laser violet diode® 402 nm,30mW, China; Webcam Pro 9000 Logitech, China.

Cahaya laser ditembakkan melewati kertas putih yang berfungsi sebagai diffuser cahaya sehingga cahaya menjadi homogen sekaligus sebagai pengurang intensitas tergantung kerapatan kertas (difusor) [11]. Berkas cahaya yang tembus dari kertas dikumpulkan oleh lensa cembung dan diteruskan ke kubus pembagi berkas (*beam splitter*). *Beam Splitter* yang digunakan mempunyai perbandingan intensitas 50:50 yaitu cahaya terbagi sebesar lima puluh persen dari cahaya masuk ke dua sudut yang berbeda, salah satunya adalah permukaan sampel. Berkas sinar yang melalui permukaan sample akan dilihat melalui mikroskop dan gambar bisa ditangkap oleh sensor kamera webcam Pro9000 untuk diubah menjadi sinyal listrik sehingga dapat di lihat sebagai gambar pada layar komputer.



Gambar 3. Desain perancangan dan modifikasi sistem optik

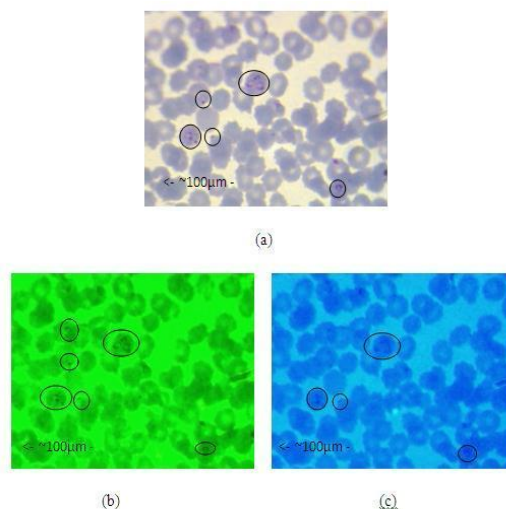
3. Persiapan sampel

Sampel di biakan ke dalam 3 tahapan hidup parasit yaitu tahap *ring*, *trophozoid* dan *schizont*, kemudian dibuat hapusan darah tebal dan tipis serta diwarnai dengan *giemsa*, Pembuatan sediaan darah tebal dan tipis yaitu dengan meneteskan darah yang sudah di kultur sebanyak 3 tetes untuk sediaan darah tebal (kira-kira 20 μ l) dan satu tetes untuk sediaan darah tipis (kira-kira 2 μ l) dari masing-masing darah diambil sepuluh titik gambar yang kemudian akan di lihat oleh analis mikroskopis dan dibandingkan dengan gambar dari cahaya led.

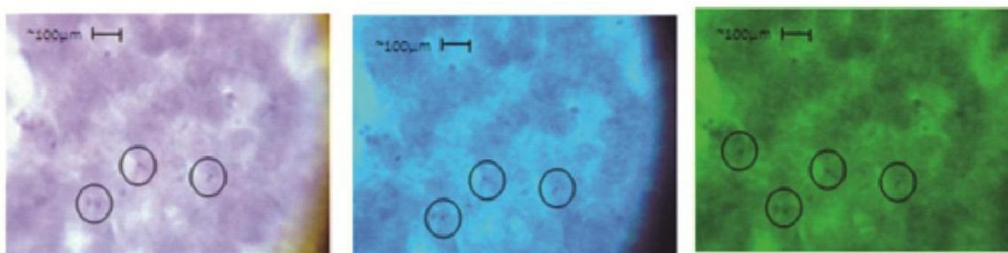
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroskop yang dibuat mempunyai kemampuan sebesar 1000x pembesaran secara optikal dan 2x pembesaran digital. Pergerakan sumbu x-y dapat dilakukan secara manual untuk posisi awal dan pergerakan secara otomatis. Pergerakan sumbu x dan y diatur oleh mikrokontroler, Sumbu x akan bergerak ke arah kanan sebanyak sepuluh langkah lalu sumbu y bergerak turun sebanyak satu langkah lalu sumbu x akan bergerak ke kiri sebanyak sepuluh langkah dan sumbu y bergerak turun satu langkah. Jika pergerakan sumbu x dan y dilakukan sebanyak 100 langkah maka pergerakan $x \times y = 10 \times 10$. Setiap langkah yang dilakukan oleh sumbu x dan y, webcam akan merekam gambar sampel. Waktu disesuaikan dengan waktu respon webcam yaitu: ± 10 detik. Resolusi gambar webcam sampai dengan 3264 \times 2448 pixel namun asil resolusi gambar yang terintegrasi dengan mikrokontroler masih rendah yaitu 640 \times 480 pixel karena keterbatasan *library*.

Gambar.4 dan gambar 5 merupakan hasil gambar dari apusan darah tipis dan tebal pada tahap cincin muda dan hasil pembacaan dari mikroskopis dalam mengenali gambar parasit *Plasmodium falciparum* tahap ring.



Gambar 4. Hapusan darah tipis campuran pada stadium *ring* dengan perbedaan identifikasi lebih banyak dari cahaya LED putih (a) hijau (b), dan violet (c).



Gambar 5. Perbedaan deteksi oleh mikroskopis pada gambar pada cahaya hijau terbaca bentuk parasit yang lebih banyak dari cahaya putih dan biru

Penelitian ini menghasilkan gambaran kontras yang sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu pengembangan mikroskop dengan menggunakan cahaya *multispectral* menggunakan cahaya monokromatik yang dapat memberikan gambaran parasite *Plasmodium falciparum* yang tersembunyi dalam darah dengan kontras yang baik pada cahaya biru (467 nm) dan hijau (390 nm) .[12] Namun, observasi cahaya pada penelitian ini terbatas pada hasil pembacaan gambaran parasit yang dilakukan oleh analis mikroskopis dan diuji menggunakan uji non parametrik friedman untuk mengetahui perbedaan dan korelasi antar cahaya.

Tabel 1. Hasil Uji perhitungan perbedaan deteksi Hapusan darah tebal stadium <i>ring</i>							
Test	Hasil Uji			Test	Hasil Uji		
	Putih	Biru	Hijau		Putih	Biru	Hijau
Rank	2,1	2,05	1,85	Coef Korelasi	-	0,710	0,905
N	10			Sig.	-	0,021	0,000
Chi Square	0,875						
Df	2						
Sig.	0,646						

Berdasarkan perhitungan diatas dapat disimpulkan bahwa dengan derajat kesalahan penarikan kesimpulan sebesar $\alpha \leq 0,05$, tiga cahaya pada masing-masing

gambar tidak berpengaruh terhadap pendeteksian parasit malaria tebal *ring*. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil test sig (0,646) yang lebih besar dari 0,05 dan nilai hitung Chi kuadrat sebesar 0,875 yang lebih kecil dari chi kuadrat tabel dengan df 2 sebesar 5,591. Dengan P value < 0,05 disimpulkan bahwa dari cahaya laser biru dan hijau yang diuji bisa digunakan untuk mendeteksi parasit malaria pada apusan darah tebal saat stadium ring dimana laser hijau paling mendekati nilai optimal

Tabel 2. Hasil uji hasil perhitungan perbedaan deteksi hapusan darah tipis campuran bentuk stadium ring

Test	Hasil Uji			Test	Hasil Uji		
	Putih	Biru	Hijau		Putih	Biru	Hijau
Rank	2,6	1,35	2,00	Coef Korelasi	-	0,549	0,413
N	10			Sig.	-	0,100	0,236
Chi Square	11,267						
Df	2						
Sig.	0,004						

Berdasarkan perhitungan diatas dapat disimpulkan bahwa dengan derajat kesalahan penarikan kesimpulan sebesar $\alpha \leq 0,05$, tiga cahaya pada masing-masing preparat sangat berpengaruh secara signifikan terhadap pendeteksian parasit malaria (Ring). Hal tersebut dapat dilihat yaitu dari hasil test signifikan (0,004) yang lebih kecil dari 0,05 dan nilai hitung Chi kuadrat sebesar 11,267 yang lebih besar dari chi kuadrat tabel dengan df 2 sebesar 5,591. Dengan P value < 0,05 disimpulkan bahwa uji hasil perbedaan dan korelasi terhadap cahaya putih, cahaya biru dan hijau belum bisa mendeteksi parasit dalam bentuk ring pada hapusan darah tipis.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini telah berhasil memodifikasi mikroskop sederhana menjadi mikroskop otomatis dengan menambahkan mikrokontroler untuk pergerakan meja dan perekaman gambar dengan waktu yang relatif cepat dan juga memberikan kenyamanan pada tenaga laboratorium, karena pembacaan bisa dilakukan kapan saja dan akurasi bisa didapatkan dari hasil konfirmasi pembacaan antar mikroskopis untuk mengurangi bias dan kesalahan dalam penentuan diagnosa *false positif* ataupun *false negatif*. Cahaya monokromatis menghasilkan gambar kontras antara sel darah, parasit dan latar belakang sehingga mengurangi artefak. Morfologi dari parasit masih terlihat nyata, namun pada tahap *ring* pada hapusan darah tipis mikroskopis belum bisa mengenali morfologi secara baik, begitu juga dengan jejak *hemozoin* sebagai salah satu marker dari parasit *Plasmodium falciparum* kurang dapat terlihat dengan jelas menggunakan sumber cahaya monokromatis yang digunakan pada penelitian ini.

Penelitian ini memerlukan banyak pengembangan untuk mendeteksi parasit malaria, dan perlu pola pengenalan otomatis dengan identifikasi gambar menggunakan perangkat lunak. Penggunaan pewarnaan pada sampel dan proses persiapan slide juga sangat mempengaruhi hasil gambar, sehingga perlu penelitian dan perekayasa lebih lanjut untuk mengembangkan alat deteksi malaria dengan teknik miroskopis yang lebih mudah, handal dan akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Arsin and A. Arsunan, *Malaria Di Indonesia*. Jakarta. 2012.
- [2] Kemenkes RI, "Riset Kesehatan Dasar 2013," 2013.
- [3] WHO, "International Travel and Health - ITH," 2012.
- [4] J. M. Bélisle *et al.*, "Sensitive Detection of Malaria Infection by Third Harmonic Generation Imaging," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 4, pp. L26–L28, 2008.
- [5] "CONTEMPORARY," vol. 3, no. 1, 2015.

- [6] M. Microscopy and S. Operating, "Microscopy Examination of Thick and Thin Blood Films for Identification of Malaria Parasites," 2016.
- [7] S. Lee and W. Lu, "Using elastic light scattering of red blood cells to detect infection of malaria parasite," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 59, no. 1, pp. 150–155, 2012.
- [8] V. V. Makkapati and V. Pathangay, "Adaptive color illumination for microscopes," *2011 Natl. Conf. Commun. NCC 2011*, pp. 1–5, 2011.
- [9] P. P. Kalatiku and Y. Y. Joefrie, "Pemrograman Motor Stepper Dengan Menggunakan Bahasa Pemrograman C," no. 20 September 2015, 2011.
- [10] Kemenkes, *Buku saku penatalaksanaan kasus malaria*. 2012.
- [11] J. I. Trisnadi, "Speckle contrast reduction in laser projection displays," *Proc. Soc. Photo-Optical Instrum. Eng.*, vol. 4657, no. 2002, pp. 131–137, 2002.
- [12] E. al Zoueo, Jeremy, "Optical_Microscope_Based_on_Multispectral_Imaging_.pdf." Asian network for scientific indormation, 2008.