

**DETEKSI *Plasmodium knowlesi* PADA PENDERITA MALARIA DI
KABUPATEN LAHAT SUMATERA SELATAN DENGAN MENGGUNAKAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

(Skripsi)

Oleh
Devi Aprilani Suhandi



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2018**

**DETEKSI *Plasmodium knowlesi* PADA PENDERITA MALARIA DI
KABUPATEN LAHAT SUMATERA SELATAN DENGAN
MENGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION***

Oleh

Devi Aprilani Suhandi

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Lulus Sarjana Kedokteran

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

ABSTRACT

***Plasmodium knowlesi* DETECTION ON MALARIA PATIENTS IN SOUTHERN SUMATERA DISTRICT BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD**

By

DEVI APRILANI SUHANDI

Background: The incidence of malaria *knowlesi* in 2004 began to be widely reported in Southeast Asia country such as Malaysia, Singapore, Thailand, including Indonesia. The frequent misdiagnosis of malaria *knowlesi* are due to the similar morphology of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* which makes microscopic examination not sensitive and specific in identifying *Plasmodium knowlesi*. Molecular biology-based examination has been developed specifically and accurately in diagnosing malaria *knowlesi* by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Method: Descriptive method is used in this research. The sample of this study was 34 samples from BBT which taken in 2012 from *Plasmodium falciparum* malaria patients by microscopic examination in Lahat regency, South Sumatera Province. The identification of *Plasmodium knowlesi* was performed by PCR single step method at Biomolecular Laboratory of Lampung University. The results of this study were processed using computer software.

Result: 32 out of 34 samples can be amplified, another 2 samples can't be amplified because they weren't qualified for inclusion and exclusion criteria. From all the samples, no results of band in 200bp were found in all samples tested.

Conclusion: No *Plasmodium knowlesi* was found in malaria patients in Lahat regency, South Sumatra.

Keywords: *Plasmodium knowlesi*. Polymerase Chain Reaction (PCR)

ABSTRAK

DETEKSI *Plasmodium knowlesi* PADA PENDERITA MALARIA DI KABUPATEN LAHAT SUMATERA SELATAN DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*

Oleh

DEVI APRILANI SUHANDI

Latar Belakang :Kejadian malaria *knowlesi* pada tahun 2004 mulai banyak dilaporkan negara-negara yang terletak di Asia Tenggara seperti Malaysia, Singapur, Thailand, termasuk Indonesia. Seringnya terjadi kesalahan diagnosis malaria *knowlesi* dikarenakan morfologi yang mirip dengan *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae* membuat pemeriksaan mikroskopis tidaklah sensitif dan spesifik dalam mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*. Pemeriksaan berbasis biologi molekuler sudah banyak dikembangkan dalam mendiagnosis malaria *knowlesi* secara spesifik dan akurat yaitu dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode : Metode deskriptif digunakan dalam penelitian ini. Sampel penelitian berjumlah 34 sampel berasal dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) yang telah diambil pada tahun 2012 dari penderita malaria *falciparum* di Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan. Identifikasi *Plasmodium knowlesi* dilakukan dengan metode *single step* PCR di Laboratorium Biomolekuler FK Unila. Hasil dari penelitian ini diolah menggunakan perangkat lunak komputer.

Hasil : Dari 34 sampel, hanya 32 sampel yang berhasil diamplifikasi karena 2 sampel yang tidak memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Hasil dari keseluruhan sampel tidak ditemukan adanya *band* pada pembacaan elektroforesis.

Kesimpulan : Tidak ditemukan adanya *Plasmodium knowlesi* pada penderita malaria di Kabupaten Lahat, Sumatera Selatan

Kata Kunci : *Plasmodium knowlesi*. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Judul Skripsi : **DETEKSI *Plasmodium knowlesi* PADA
PENDERITA MALARIA DI KABUPATEN
LAHAT SUMATERA SELATAN DENGAN
MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION***

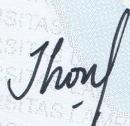
Nama Mahasiswa : **Devi Aprilani Suhandi**

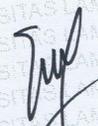
Nomor Pokok Mahasiswa : 1418011054

Fakultas : Kedokteran

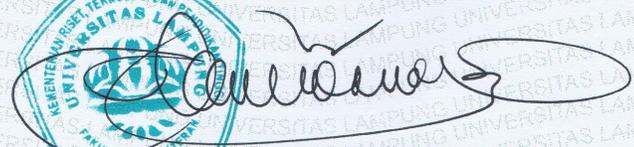
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes
NIP 19760831 200312 1 003

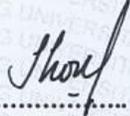

dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc
NIP 19760120 200312 2 001

2. Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

MENGESAHKAN

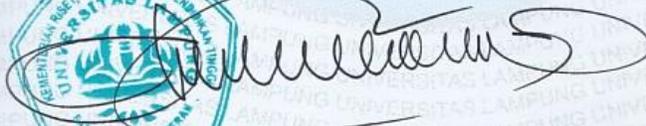
1. Tim Penguji

Ketua : Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes


Sekretaris : dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc

**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes**

2. Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 22 Januari 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Bahwa dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa :

1. Skripsi ini dengan judul "DETEKSI *Plasmodium knowlesi* PADA PENDERITA MALARIA DI KABUPATEN LAHAT SUMATERA SELATAN DENGAN MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION*" adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiatisme
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Januari 2018
Membuat Pernyataan,



Devi Aprilani Suhandi

NPM. 1418011054

Riwayat Hidup

Penulis dilahirkan di kota Tangerang pada tanggal 17 April 1995, sebagai anak kedua dari tiga bersaudara. Penulis merupakan anak dari Bapak Adiawan Suhandi dan Ibu Yeni Purnamah.

Pendidikan Taman kanak-kanak ditempuh selama tiga tahun di TK Kristen Kanaan dan diselesaikan pada tahun 2001. Pendidikan Sekolah Dasar penulis dijalani di SD Strada Santo Fransiskus Tangerang dan diselesaikan pada tahun 2007. Pendidikan dilanjutkan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Santa Maria 1 Tangerang serta dapat diselesaikan pada tahun 2010. Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Tarsisius Vireta Tangerang pada tahun 2013.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) dan hingga saat ini penulis masih terdaftar sebagai mahasiswa aktif di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji Tuhan, puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan yang Maha Esa yang senantiasa mencurahkan segala nikmat-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan tepat waktu.

Skripsi dengan judul “Deteksi *Plasmodium knowlesi* Pada Penderita Malaria Di Kabupaten Lahat Sumatera Selatan Dengan Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Universitas Lampung. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M. Kes., Sp. PA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, S.Ked., M.Kes, selaku Pembimbing Utama atas kesediaannya untuk memberikan nasihat, bimbingan, saran, dan kritik yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;

4. dr. Evi Kurniawaty, S. Ked, M. Sc., selaku Pembimbing Kedua atas kesediaan memberikan nasihat, bimbingan, saran, dan kritik yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;
5. Dr. dr. Betta Kurniawan, S.Ked., M.Kes., selaku Penguji Utama pada Ujian Skripsi. Terima kasih atas waktu, ilmu dan saran-saran yang telah diberikan;
6. dr. TA Larasati, S.Ked., M.Kes., selaku Pembimbing Akademik atas motivasi, waktu, ilmu, serta saran-saran yang telah diberikan;
7. Kami juga berterima kasih kepada relawan yang telah bersedia ikut serta dalam penelitian ini dengan memberikan darahnya untuk dijadikan sampel penelitian;
8. Bu Nuriah dan Mbak Yani yang telah memberikan waktu dan tenaganya dalam proses penyelesaian penelitian ini, membantu dalam proses pengerjaan sampel di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung
9. Seluruh staf pengajar dan karyawan FK Unila atas ilmu, waktu, dan bimbingan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan;
10. Seluruh staf TU, Administrasi dan Akademik FK Unila yang turut membantu dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini;
11. Terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Papiku dan Mamiku atas kiriman do'anya setiap saat, kerja kerasnya, kesabarannya, keikhlasannya, kasih sayangnya, dan atas segala sesuatu yang telah dan akan selalu diberikan kepada penulis agar tak pernah putus asa dalam meraih harapan dan cita-cita;

12. Teruntuk kakakku tercinta, Deasy Febrianti yang tak henti-henti selalu memberikan motivasi, dorongan, semangat, dan do'a bagi penulis;
13. Teruntuk teman saya Aurick Owen yang selalu memberikan semangat, bantuan, dan dorongan yang tak henti-henti bagi penulis,
14. Teruntuk teman, sahabat, orang yang terkasih tersayang Dhita Dwi Nanda, Okta Della, Aninda Nur Kumalasari, Nadia Rosmalia, Anggita, Putri Okta, Karine Meynda, Rifda, Restu, Sisi, dan Haula yang tak henti-henti selalu memberikan motivasi, dorongan, semangat, dan do'a bagi penulis;
15. Terima kasih teman satu tim penelitian Ade Triajayanti dan Rachman Aziz atas bantuan dan kerjasama mulai dari awal hingga skripsi ini selesai;
16. Terima kasih kepada keluarga seminung, Aprina Adha Widiastini, Sarah Nabila Istiqomah, Diva Iole Humaira, Desti Diana Sari, Firdha Yossi Chani, Dhita Dwi Nanda, Tiffani Dinda Ashar, dan Fahma Azizaturrahmah atas segala doa, perhatian, dukungan serta semangat yang telah diberikan selama ini;
17. Seluruh teman Angkatan 2014 yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu atas kebersamaan, keceriaan, kekompakan, kebahagiaan selama 3,5 tahun perkuliahan;
18. Seluruh kakak-kakak 2011, 2012, dan 2013 serta adik-adik tingkat 2015, 2016, dan 2017 yang selalu memberikan motivasi dan semangatnya dalam satu kedokteran;

19. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan pengetahuan baru kepada setiap orang yang membacanya. Terima kasih.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis

Devi Aprilani Suhandi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	iiv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang.....	1
1.2.Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Malaria	7
2.1.1. Definisi	7
2.1.2. Epidemiologi.....	8
2.1.3. Etiologi	11
2.1.4. Siklus Hidup	11
2.1.5. Morfologi	14
2.1.6. Patogenesis	14
2.1.7. Patofisiologi.....	17
2.1.8. Manifestasi Klinis	18
2.1.9. Diagnosis	19
2.2. <i>Plasmodium knowlesi</i>	21
2.2.1. Definisi	21
2.2.2. Sejarah	21

2.2.3. Epidemiologi.....	22
2.2.4. Karakteristik dan Penelitian Terkait <i>Plasmodium knowlesi</i>	24
2.2.5. Genetik <i>Plasmodium knowlesi</i>	25
2.2.6 Siklus Hidup	25
2.2.7 Hospes Reservoir dan Hospes Perantara	26
2.2.8 Diagnosis	27
2.2.9. Tanda dan Gejala	28
2.2.10. Tatalaksana	30
2.2.11. Komplikasi.....	31
2.3. PCR.....	32
2.3.1. Definisi	32
2.3.2. Bahan yang diperlukan dalam PCR.....	33
2.3.3. Metode	34
2.3.5. Manfaat	37
2.3.6. Kelebihan dan kekurangan PCR.....	38
2.4. Kerangka Teori	39
2.4.1 Kerangka Teori	39
2.4.2 Kerangka Konsep.....	40
BAB III METODE PENELITIAN	41
3.1. Rancangan Penelitian.....	41
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	41
3.3. Populasi dan Subjek Penelitian.....	41
3.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	42
3.5. Definisi Operasional	42
3.6. Alat dan Bahan.....	43
3.6.1. Ekstraksi DNA	43
3.6.2. Amplifikasi DNA (PCR).....	43
3.6.3. Elektroforesis.....	44
3.7. Cara Kerja	44
3.7.1. Ekstraksi DNA	44
3.7.2. Amplifikasi DNA (PCR).....	46
3.7.3 Elektroforesis	47
3.8. Alur Penelitian	50
3.9. Analisis Data.....	50
3.10. Aspek Etik Penelitian.....	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
4.1. Hasil.....	51
4.2. Pembahasan	52

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1. Kesimpulan	60
5.2. Saran	60
 DAFTAR PUSTAKA.....	 62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Morfologi <i>Plasmodium sp.</i>	14
2. Definisi Operasional	42
3. Primer set dari novel Pkr140-5	44
4. Distribusi frekuensi hasil pemeriksaan PCR	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Annual Parasite Incidence</i> (API) tahun 2015	9
2. Endemisitas malaria di Indonesia tahun 2012-2015.....	10
3. Siklus Hidup Plasmodium.....	13
4. Siklus amplifikasi DNA.....	37
5. Kerangka Teori.....	39
6. Kerangka Konsep	40
7. Alur Penelitian.....	50
8. Morfologi Plasmodium.....	56

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Hasil optimasi kondisi PCR *Plasmodium knowlesi*
- Lampiran 2 Surat Etik Penelitian
- Lampiran 3 Surat Izin Peminjaman Laboratorium
- Lampiran 4 Surat Izin Peminjaman Alat
- Lampiran 5 Foto Hasil Identifikasi *Plasmodium knowlesi*
- Lampiran 6 Hasil Ampflikasi Pada Pembacaan Elektroforesis
- Lampiran 7 Foto Kegiatan Selama Penelitian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu penyakit penting yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium spp.* Malaria mempunyai jangkauan penyebaran yang luas dan mampu menghasilkan gejala yang dapat membahayakan nyawa manusia. Pada tahun 2015, World Health Organization (WHO) memperkirakan ada sekitar 214 juta kasus malaria dan 438.000 kematian di seluruh dunia. Indonesia sendiri, terdapat 343.527 kasus terkonfirmasi dan 45 kematian oleh karena malaria.

Menurut Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), insiden malaria pada penduduk Indonesia tahun 2013 adalah 1,9%, lebih rendah dibanding tahun 2007 (2,9%), dengan prevalensi 6,0%. Sumatera Selatan sendiri pada tahun 2014 berdasarkan data Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan dilaporkan terdapat 42.062 kasus malaria dan sekitar 27.616 kasus yang dikonfirmasi laboratorium, dengan nilai *Annual Parasite Incidence* (API) sebesar 0,36 per 1000 penduduk. Kabupaten Lahat sendiri menduduki peringkat pertama endemisitas malaria dengan nilai API 2,94 per 1000 penduduk.

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh Plasmodium yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina. Terdapat empat jenis plasmodium yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, dan *Plasmodium ovale* (Depkes, 2008). Tetapi pada tahun 1932, Knowles dan Das Gupta melakukan eksperimen dengan melakukan infeksi secara buatan terhadap 3 orang relawan untuk mengkonfirmasi adanya jenis plasmodium yang biasanya menginfeksi kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*) ternyata dapat menginfeksi manusia (Knowles and Gupta, 1932).

Kasus malaria knowlesi yang terjadi secara alami dilaporkan pertama kali pada tahun 1965 menginfeksi pria berusia 37 tahun yang bekerja di hutan di Pahang, Peninsular Malaysia (Chin *et al.*, 1965). Kejadian infeksi malaria knowlesi mulai banyak dilaporkan pada tahun 2000-2004 di Serawak, Malaysia, dari penelitian yang dilakukan oleh Singhet *al* didapatkan 120 kasus malaria knowlesi dari 208 total kasus malaria secara keseluruhan.

Di Indonesia sendiri hingga saat ini sudah cukup banyak kasus malaria knowlesi dilaporkan. Di Kalimantan Selatan terdapat 4 kasus pada tahun 2010-2012, Kalimantan Tengah terdapat 3 kasus tahun 2014 (Ompusunggu *et al.*, 2015) dan 1 kasus tahun 2016 (Setiadi *et al.*, 2016), serta ditemukan juga di Sumatera Utara sebanyak 377 kasus (Lubis *et al.*, 2017).

Kera ekor panjang (*Macaca fascicularis Raffles*) adalah primata yang merupakan hospes reservoir dari malaria knowlesi yang jumlahnya terbanyak dan tersebar luas di Asia Tenggara. Di Sumatera Selatan, kera ekor panjang banyak ditemukan di hutan konservasi (Hafsari, & Hastiana, 2014). Adanya hospes reservoir tersebut maka tidak menutup kemungkinan *Plasmodium knowlesi* ditemukan di Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan. Hingga saat ini belum ada kasus malaria knowlesi yang dilaporkan di kabupaten tersebut.

Pemeriksaan mikroskopis yang menjadi standar emas pemeriksaan malaria tidak dapat digunakan untuk mendeteksi *Plasmodium knowlesi* (Paisal, & Liestiana, 2014). Hal ini dikarenakan morfologi *Plasmodium knowlesi* mirip dengan *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae*. Pada stadium ring atau trofozoit muda *Plasmodium knowlesi* memiliki kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* dan stadium trofozoit tua memiliki kemiripan dengan *Plasmodium Malariae* (Lee, Cox-Singh and Singh, 2009). Menurut Ompusunggu *et al.*, morfologi *Plasmodium knowlesi* stadium trofozoit dewasa dan skizon mirip dengan *Plasmodium vivax*.

Mengingat banyaknya kemiripan morfologi dengan *Plasmodium* lain maka membuat *Plasmodium knowlesi* tidak dapat ditegakkan hanya dengan pemeriksaan dengan metode mikroskopis. Pemeriksaan yang sesuai untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* adalah *Polymerase Chain Reaction*

(PCR). Metode ini merupakan salah satu metode biomolekuler untuk mengidentifikasi mikroorganisme penyebab infeksi, metode ini terbukti sensitif dan spesifik dibandingkan dengan metode mikroskopis (Singh and Daneshvar, 2013).

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka peneliti tertarik untuk mengkaji dan mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* pada penderita malaria yang telah didiagnosis sebagai *Plasmodium falciparum* di Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan dengan menggunakan metode PCR.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah ditemukan *Plasmodium knowlesi* pada penderita malaria yang telah didiagnosis sebagai *Plasmodium falciparum* di Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi* pada penderita malaria yang telah didiagnosis sebagai *Plasmodium falciparum* di Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini dapat menjadi penerapan bagi ilmu kedokteran, khususnya dibidang parasitologi dan biomolekular mengenai deteksi *Plasmodium knowlesi* menggunakan *single step* PCR dan mengetahui validitas dari primer yang ditemukan dalam mendeteksi *Plasmodium knowlesi*, serta menambah referensi pustaka dalam hal tersebut.

1.4.2. Manfaat Praktis

Berikut adalah manfaat praktis dalam penelitian ini.

a. Bagi Penulis

Penelitian ini dapat melatih keterampilan dalam pelaksanaan penelitian dan dapat menjadi pengalaman yang berguna dalam menerapkan ilmu yang didapat selama perkuliahan.

b. Bagi Penulis Lain

Penelitian ini dapat menjadi sumber informasi dan bahan referensi bagi peneliti lain

c. Bagi Masyarakat Kabupaten Lahat

Penelitian ini dapat menjadi sumber informasi bagi masyarakat terkait jenis malaria *knowlesi* yang dapat ditularkan dari kera ke manusia melalui gigitan nyamuk di wilayah tersebut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Malaria

2.1.1. Definisi

Menurut sejarah kata “malaria” berasal dari bahasa Italia yang terdiri dari dua suku kata, “*mal* dan *aria*” yang berarti udara yang jelek. Mungkin orang Italia pada masa dahulu mengira bahwa penyakit ini penyebabnya ialah musim dan udara yang jelek. Penyakit malaria sudah dikenal sejak 4000 tahun yang lalu yang mungkin sudah mempengaruhi populasi dan sejarah manusia (Miller et al., 1994).

Dalam sejarah peradaban umat manusia, penyakit malaria disebabkan oleh protozoa genus plasmodium merupakan penyakit yang paling banyak mengakibatkan penderitaan dan kematian sampai saat ini. Pembesaran limpa akibat penyakit malaria, telah ditemukan pada mummi Mesir lebih dari 3000 tahun yang lalu. Antigen malaria telah dideteksi pada sampel

kulit dan paru-paru dari malaria mummy tahun 3200 dan 1304 SM (Miller et al., 1994).

Penyakit malaria menurut *World Health Organization* (WHO) adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit malaria (*Plasmodium*) bentuk aseksual yang masuk ke dalam tubuh manusia yang ditularkan oleh nyamuk malaria yaitu *Anopheles spp* betina (WHO, 2015).

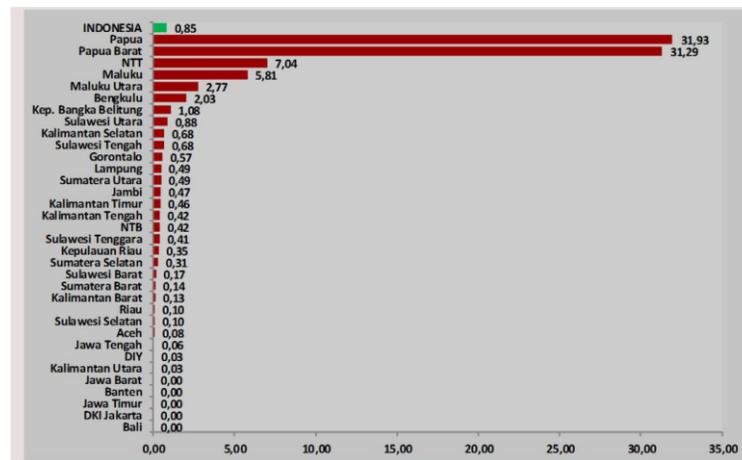
2.1.2. Epidemiologi

Malaria ditemukan di daerah-daerah yang terletak pada posisi 64° Lintang Utara sampai 32° Lintang Selatan. Penyebaran malaria pada ketinggian 400 meter di bawah permukaan laut dan 2600 meter di atas permukaan laut. Malaria merupakan penyakit endemik di lebih dari 100 negara di Afrika, Asia, Oceania, Amerika Selatan, dan Amerika Tengah serta di beberapa kepulauan Karibia (Natalia, 2014).

Pada tahun 2013 *World Health Organization* (WHO) memperkirakan ada sekitar 198 juta kasus malaria dan 584.000 kematian di seluruh dunia. Di Indonesia terdapat 343.527 kasus terkonfirmasi dan 45 kematian oleh karena malaria. Morbiditas malaria pada suatu wilayah ditentukan oleh API. API merupakan jumlah kasus positif malaria per 1.000 penduduk dalam satu tahun. Berdasarkan API, secara nasional tingkat kejadian

malaria di Indonesia terus mengalami penurunan dari tahun 2011 hingga 2015 (Kemenkes RI, 2016).

Menurut API tahun 2015 berdasarkan provinsi menunjukkan bahwa wilayah Indonesia Timur masih memiliki nilai API yang tertinggi sama seperti survey API pada 2013, yakni Papua, Papua Barat, Nusa Tenggara Timur, Maluku, Maluku Utara, masih memiliki nilai API yang cukup tinggi bila di bandingkan dengan provinsi lain di Indonesia seperti Banten, Jawa Barat, Jakarta, dan Bali yang angka API nya nol dan sudah masuk dalam daftar provinsi yang bebas dari malaria (Kemenkes RI, 2016).



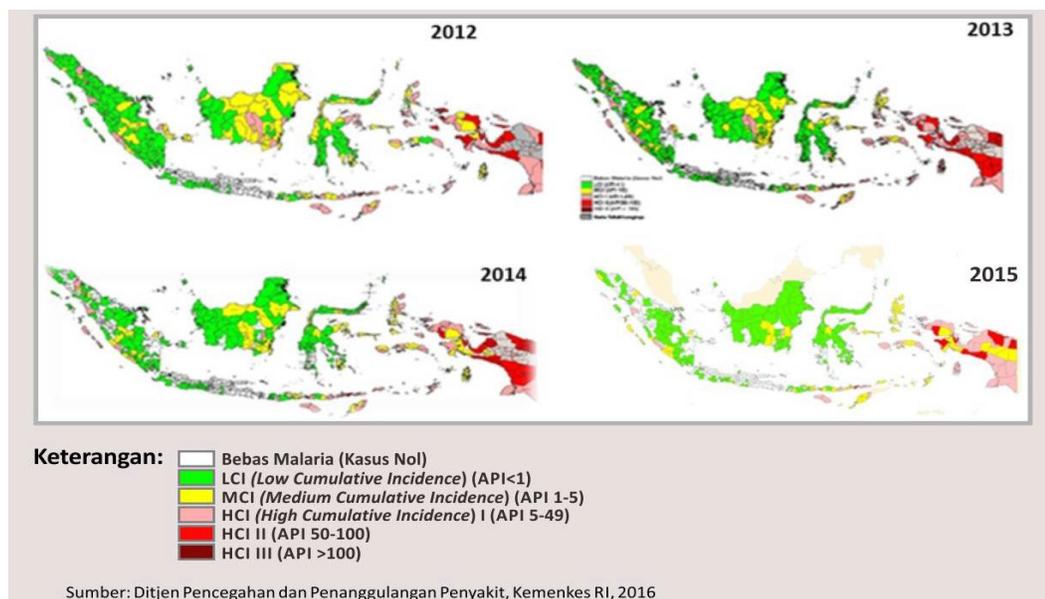
Sumber: (Kemenkes RI, 2016)

Gambar 1. Annual Parasite Incidence (API) tahun 2015 menurut provinsi

Sebaran kasus malaria juga dilihat lokasi endemisitasnya berdasarkan dari jumlah dan persentase kabupaten/kota endemis yang disajikan dalam bentuk peta endemisitas oleh kemenkes RI. Dari gambar tersebut diketahui

bahwa kasus malaria lebih banyak berkonsentrasi pada wilayah Indonesia bagian Timur. Kabupaten/kota endemis di wilayah Kalimantan dan Sulawesi mengalami penurunan endemisitasnya dalam 4 tahun terakhir (Kemenkes RI, 2016).

Tingkat endemisitas dapat dilihat dari warna yang terdapat dalam gambar peta dibawah yang mana warna putih melambangkan bebas malaria, hijau (*Low Cumulativ Incidence*) untuk API < 1, kuning (*Medium Cumulativ Incidence*) untuk nilai API 1-5, merah muda (*High Cumulativ Incidence*) I untuk nilai API 5-49, merah untuk HCI II dengan nilai API 50-100, dan warna coklat untuk HCI III dengan nilai API >10 (Kemenkes RI, 2016).



Gambar 2 Endemisitas malaria di Indonesia tahun 2012-2015.

2.1.3. Etiologi

Malaria disebabkan oleh protozoa dari genus plasmodium, pada manusia terdapat 4 spesies yaitu *Plasmodium falcifarum* (menyebabkan infeksi paling berat dan angka kematian yang tertinggi), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (Arsin and Arsunan, 2012). Selama ini diketahui hanya ada 4 jenis plasmodium yang dapat menginfeksi manusia, namun beberapa dekade terakhir menemukan adanya jenis plasmodium baru yang biasa menginfeksi kera dan ternyata dapat menginfeksi manusia juga. Beberapa parasit malaria kera telah dilaporkan dapat menginfeksi manusia baik secara insidental alami maupun secara eksperimen (Ompusunggu *et al.*, 2015). Spesies tersebut adalah *Plasmodium knowlesi*, spesies ini dianggap sebagai parasit Plasmodium kelima yang dapat menginfeksi manusia (Paisal and Indriyati, 2014).

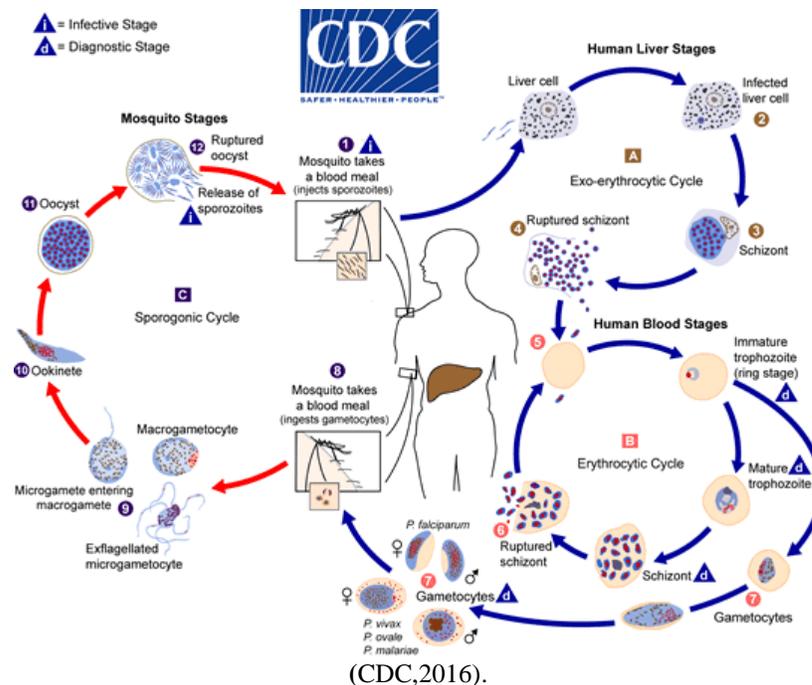
2.1.4. Siklus Hidup

Parasit darah dari genus plasmodium pada dasarnya ada sekitar 156 nama spesies yang dapat menginfeksi spesies vertebrata. Namun hanya ada empat yang dianggap parasit sejati manusia karena mereka memanfaatkan secara eksklusif hospes perantara, yakni *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium*

malariae. Namun, ditemukan parasit baru yang dapat menginfeksi manusia yang berasal dari parasit malaria monyet yaitu *Plasmodium knowlesi* (CDC, 2016).

Siklus plasmodium melibatkan dua host yakni manusia dan nyamuk *Anopheles* betina. Pada awalnya nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi sporozoit *inoculates* menggigit manusia dan akan melepaskan sporozoit ke dalam pembuluh darah dimana dalam waktu 45 menit akan menuju ke hati dan menginfeksi sel hati serta tumbuh menjadi skizon hati yang bila pecah akan melepaskan 10.000 – 30.000 merozoit ke sirkulasi darah (Harjianto, 2014).

Plasmodium vivax dan *Plasmodium ovale* terdapat tahap hipnozoit yang dapat bertahan dalam hati selama berminggu-minggu bahkan bertahun-tahun dan menyebabkan kambuh dengan menginvasi aliran darah. Setelah replikasi awal ini dalam hati (*skizogoni exo-erythrocytic*), plasmodium akan menyerang eritrosit dan mengalami perkawinan aseksual dalam eritrosit (*erythrocytic schizogony*). Merozoit yang menginfeksi sel darah merah akan berubah menjadi trofozoit tahap cincin dan tumbuh menjadi skizon, yang mana bila pecah melepaskan merozoit dan dapat menginfeksi sel darah merah lain. Beberapa parasit berdiferensiasi menjadi tahapan *erythrocytic* seksual/gametosit (CDC, 2016).



Gambar 3. Siklus Hidup Plasmodium.

Pada tahap Gametosit yakni jantan (*microgametocytes*) dan betina (*macrogametocytes*) didalam darah tertelan oleh nyamuk *Anopheles* selama menghisap darah, perkawinan parasit di nyamuk dikenal sebagai siklus sporogoni. Sementara di perut nyamuk, mikrogamet yang menembus makrogamet menghasilkan zigot. Zigot tersebut nantinya akan menjadi motil dan memanjang (ookinet) yang menyerang dinding midgut nyamuk, di mana mereka berkembang menjadi ookista. Ookista yang masak/matang akan mengeluarkan sporozoit yang akan bermigrasi ke kelenjar ludah nyamuk dan siap menginfeksi manusia (CDC, 2016).

2.1.5. Morfologi

Morfologi parasit malaria sangat beragam dan memiliki ciri khas masing-masing. Hal ini disebabkan bukan saja karena perbedaan spesies, melainkan juga oleh berbagai perubahan bentuk dan komposisi yang terjadi dalam berbagai fase perkembangannya dalam hospes vertebrata ataupun pada vektor nyamuk (CDC, 2016).

Pada *Plasmodium vivax*, stadium trofozoit mudanya tampak seperti cincin dengan titik kromatin pada satu sisi dan cenderung menginfeksi retikulosit. Gametositnya berbentuk lonjong dan mikrogametositnya mempunyai inti yang besar berwarna merah muda pucat dengan sitoplasma yang berwarna biru pucat. Dibandingkan dengan *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* mempunyai ukuran merozoit yang lebih kecil, jumlah merozoit eritrosit lebih sedikit, memerlukan lebih sedikit hemoglobin, bentuknya tersusun *rossete*, gametosit mirip *Plasmodium vivax*, tetapi jumlah pigmennya lebih sedikit (Sutanto 2008).

Plasmodium ovale dengan eritrosit yang lonjong serta bergerigi pada satu ujungnya merupakan tanda yang spesifik untuk tipe parasit ini. Sedangkan bentuk cincin yang menempel pada pinggir membran eritrosit merupakan ciri yang khas adanya infeksi oleh *Plasmodium falciparum*. Dua titik kromatin di dalam satu bentuk cincin sering ditemukan pada infeksi

dengan *Plasmodium falciparum*, sedangkan pada infeksi dengan *Plasmodium vivax* atau *Plasmodium malariae* jarang ditemukan (Tooy, Bernadus and Sorisi, 2013).

Tabel 1. Karakteristik Morfologi *Plasmodium sp.*

Karakteristik	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
Skizogoni hati	5,5 hari	8 hari	9 hari	10-15 hari
Ukuran skizon hati	60 µm	45 µm	70 µm	55 µm
Hipnozoit	-	-	+	-
Eritrosit yang dihinggapi	Muda, tua, dan normosit	Retikulosit, normosit	Retikulosit, normosit muda	Tua
Jumlah merozoit eritrosi	8-24	12-18	8-10	8
Skizogoni eritrosit	<48 jam	48 jam	50 jam	72 jam
Bintik Eritrosit	Maurer	Schuffner Coklat	James	Ziemann
Pigmen parasit	Hitam	kekuningan	Coklat gelap	Coklat gelap

Sumber : (Gandahusada, 2003)

2.1.6. Patogenesis

Bentuk aseksual parasit dalam eritrosit yang berpotensi (EP) yang bertanggung jawab dalam patogenesis terjadinya malaria pada manusia. Patogenesis malaria dipengaruhi oleh faktor parasit dan faktor pejamu (*Host*). Yang termasuk dalam factor parasit adalah intensitas transmisi, densitas penyakit, dan virulensi penyakit. Sedangkan yang masuk dalam

faktor pejamu adalah tingkat endemisitas daerah tempat tinggal, genetik, usia, status nutrisi, dan status imunologi (Cyrus Daneshvar *et al.*, 2009)

Permukaan EP stadium cincin akan menampilkan antigen RESA (*Ring-erythrocyte surface antigen*) yang menghilang setelah parasit masuk stadium matur. Permukaan membran EP stadium matur akan mengalami penonjolan dan membentuk knob dengan *Histidin Rich-protein- 1* (HRP-1) sebagai komponen utamanya. Selanjutnya, bila EP tersebut berubah menjadi merozoid, akan dilepaskan toksin malaria berupa GPI atau glikosilfosfatidilinositol yang merangsang pelepasan TNF- α dan interleukin-1 (IL-1) dari makrofag (Harjianto, 2014).

Sitoaderensi adalah perlekatan antara EP stadium matur pada permukaan eritrosit vaskular. Perelekatan terjadi molekul adhesif yang terletak dipermukaan knob EP melekat dengan molekul-molekul adhesif yang terletak di permukaan endotel vaskular. Sekuenstrasi adalah sitoaderen menyebabkan EP matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. Parasit dalam eritrosit matur tinggal dalam jaringan mikrovaskular disebut EP matur yang mengalami sekuenstrasi. Sedangkan *Rosetting* adalah berkelompoknya EP matur yang diselubungi 10 atau lebih eritrosit yang tidak mengandung parasit(Natalia, 2014).

Rosetting menyebabkan obstruksi aliran darah lokal dalam jaringan sehingga mempermudah terjadinya sitoadheren. Sitokin terbentuk dari endotel, monosit, dan makrofag setelah mendapat stimulasi dari malaria. Nitrit Oksida (NO) dapat menimbulkan malaria berat terutama malaria serebral. Produksi NO berlebih di otak dapat mengganggu fungsi organ tersebut (IPD UI, 2006).

2.1.7. Patofisiologi

Demam adalah manifestasi klinis yang tentunya sering terjadi pada penderita akibat infeksi malaria. Biasanya, demam mulai timbul bersamaan dengan pecahnya skizon darah yang mengeluarkan bermacam-macam antigen. Antigen ini akan merangsang sel-sel makrofag, monosit, atau limfosit yang mengeluarkan berbagai macam sitokin, antarlain TNF. TNF akan dibawa aliran darah ke hipotalamus yang merupakan pusat pengatur suhu dan terjadi demam. Proses skizogoni pada keempat plasmodium memerlukan waktu yang berbeda-beda, *Plasmodium falciparum* memerlukan waktu 36-48 jam, *Plasmodium vivax/ovale* 48 jam, dan *Plasmodium malariae* 72 jam. Demam pada *Plasmodium falciparum* dapat terjadi setiap hari, *Plasmodium vivax/ovale* selang waktu satu hari, dan *Plasmodium malariae* demam timbul selang waktu 2 hari (Tooy, Bernadus and Sorisi, 2013).

Sebagian pasien malaria mengalami anemia, anemia terjadi karena pecahnya sel darah merah yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi. *Plasmodium falciparum* menginfeksi semua jenis sel darah merah, sehingga anemia dapat terjadi pada infeksi akut dan kronis. *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* hanya menginfeksi sel darah merah muda yang jumlahnya hanya 2% dari seluruh jumlah sel darah merah, sedangkan *Plasmodium malariae* menginfeksi sel darah merah tua yang jumlahnya hanya 1% dari jumlah sel darah merah. Sehingga anemia yang disebabkan oleh *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* umumnya terjadi pada keadaan kronis (C Daneshvar *et al.*, 2009).

Splenomegali kadang terjadi pada pasien malaria, limpa merupakan organ retikuloendothelial, dimana plasmodium dihancurkan oleh sel-sel makrofag dan limfosit. Penambahan sel-sel radang ini akan menyebabkan limpa membesar (Depkes, 2008).

2.1.8. Manifestasi Klinis

Gejala-gejala awal atau disebut juga gejala prodormal, tidak begitu spesifik, yaitu sakit kepala, lesu, malaise, perut tidak enak, anoreksia, diare ringan, nyeri tulang dan otot. Gejala-gejala prodormal kemudian diikuti oleh gejala klasik malaria, atau biasa disebut dengan trias malaria (demam,

anemia, dan splenomegali) yang memiliki karakteristik demam sebagai berikut :

- 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 (Tooy, Bernadus and Sorisi, 2013).

2.1.9. Diagnosis

Diagnosis malaria ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium. Diagnosis pasti malaria harus ditegakkan dengan pemeriksaan darah secara mikroskopik atau *Rapid Diagnostik Test* (RDT). Anamnesis keluhan utama malaria berupa demam, menggigil, berkeringat, dan dapat disertai sakit kepala, mual, muntah, diare, dan nyeri otot atau pegal-pegal. Anamnesis riwayat pribadi juga dapat ditanyai

berupa riwayat pasien berkunjung dan bermalam 1-4 minggu lalu ke daerah yang endemik malaria, riwayat tinggal di daerah endemik malaria, riwayat sakit malaria sebelumnya, riwayat minum obat malaria satu bulan terakhir, ataupun riwayat mendapat transfusi darah. Adapun gejala klinis yang sering ditemui pada pemeriksaan fisik pasien malaria adalah dijumpai adanya demam, konjungtiva atau telapak tangan pucat, splenomegali, dan hepatomegali (Depkes, 2008).

Ada beberapa pemeriksaan laboratorium yang dapat digunakan untuk mendiagnosis malaria, antara lain pemeriksaan mikroskopik, *Quantitative buffy coat*, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, serta *Rapid Diagnostic Tests (RDT)*. Pemeriksaan mikroskop sediaan darah tipis dan tebal serta RDT lebih sering digunakan dibandingkan PCR dan *Quantitative buffy coat*. Kedua pemeriksaan ini memberikan harapan besar untuk diagnosis yang akurat yang merupakan komponen kunci dalam keberhasilan pengendalian malaria, namun PCR memiliki tingkat spesifitas, efisiensi dan keakuratan yang tinggi dibandingkan dengan pemeriksaan lainnya (Kusuma *et al.*, 2006).

2.2. *Plasmodium knowlesi*

2.2.1. Definisi

Plasmodium knowlesi adalah parasit malaria yang bereplikasi dengan siklus hidup 24 jam. Karena siklus hidupnya yang singkat, jumlah parasit dalam tubuh dapat cepat meningkat, sehingga infeksi *Plasmodium knowlesi* berpotensi menjadi penyakit yang berat. *Plasmodium knowlesi* adalah parasit dari genus *Plasmodium* yang secara alami merupakan hospes reservoir monyet ekor panjang (Nelwan *et al.*, 2013).

Infeksi *Plasmodium knowlesi* adalah penyakit infeksi yang biasanya dianggap sebagai parasit dari kera. Manusia yang bekerja di pinggiran hutan atau masuk hutan hujan untuk bekerja memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terkena infeksi *Plasmodium knowlesi*. Pemeriksaan penunjang dengan apusan darah tidak cukup untuk mengkonfirmasi apakah pasien terinfeksi *Plasmodium malariae* atau *Plasmodium knowlesi* karena morfologi yang tumpang tindih (Tang *et al.*, 2010).

2.2.2. Sejarah

Plasmodium knowlesi pertama kali ditemukan pada tahun 1927 oleh Giuseppe Franchiti saat mengamati darah *Macaca fascicularis*. Kemudian pada tahun 1932, Knowles dan Das Gupta mengamati dan

menggambarkan dengan detail *Plasmodium knowlesi* dari kera rhesus macaca (*Macacamulata*) dan menunjukkan bahwa spesies ini dapat menginfeksi manusia melalui darah dengan infeksi buatan (Knowles, 1932). Kemudian Sinton dan Mulligan memberinya nama sesuai penemunya yaitu *Plasmodium knowlesi* (Nelwan *et al.*, 2013).

Infeksi alami pertama kali pada manusia dilaporkan pada tahun 1965 dalam diri seorang pria asal Amerika Serikat setelah kunjungan ke Semenanjung Malaysia. Dan tidak ada laporan lain yang diterbitkan terkait infeksi *Plasmodium knowlesi* pada manusia sampai tahun 2000-2004 (Chin *et al.*, 1965)

2.2.3. Epidemiologi

Infeksi *Plasmodium knowlesi* ditemukan banyak terjadi pada negara-negara di Asia Tenggara. Kasus terbanyak ditemukan di Malaysia, terutama di negara bagian yang terletak di dekat pulau Kalimantan. Selain di Malaysia, negara di Asia Tenggara yang juga dilaporkan terjadi kasus malaria akibat infeksi *Plasmodium knowlesi* antara lain adalah negara Indonesia, Thailand, Kamboja, Vietnam, Filipina, dan Singapura (Paisal and Indriyati, 2014).

Di Indonesia hingga tahun 2012 telah ditemukan empat kasus malaria knowlesi dan semua penularannya terjadi secara lokal di hutan atau di sekitar hutan di Kalimantan Selatan. Kasus pertama yang dilaporkan pada tahun 2010 yang merupakan warga negara Australia yang mendapat infeksi ketika berada di hutan. Tiga kasus berikutnya adalah infeksi alami yang menyerang penduduk asli yang dilaporkan terdapat satu kasus pada tahun 2010, dan dua kasus pada tahun 2012 (Setiadi *et al.*, 2016).

Pada tahun 2015 Ompusunggu *et al.* melaporkan suatu penemuan baru terkait *Plasmodium knowlesi* yakni ditemukannya kasus malaria *knowlesi* di provinsi lain di Indonesia. Penelitian yang dilakukan berupa sampel darah yang berasal dari provinsi Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah, dan ditemukan tiga kasus baru yakni satu kasus berasal dari Kalimantan Selatan dan dua kasus berasal dari Kalimantan Tengah. Maka total keseluruhan kasus malaria *knowlesi* yang terjadi di Kalimantan berjumlah 7 kasus (Ompusunggu *et al.*, 2015).

Pada tahun 2015 Lubis *et al.* melakukan survey parasit di Batubara, Langkat, Nias, Provinsi Sumatera Utara dengan mengkombinasikan pemeriksaan aktif dan pasif dalam pengambilan sampel darah. Pemeriksaan tersebut menggunakan metode mikroskopis dan *nested* PCR yang mendapatkan hasil bahwa *Plasmodium knowlesi* menyumbang satu

dari sepuluh total kasus malaria di provinsi tersebut. Dari seluruh sampel yang berjumlah 3635 partisipan didapatkan hasil positif 1169 kasus berdasarkan pemeriksaan PCR dan ditemukan 377 kasus malaria knowlesi (Lubis *et al.*, 2017).

2.2.4. Karakteristik dan Penelitian Terkait *Plasmodium knowlesi*

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cox-Singhyang mengevaluasi sampel darah dari 960 pasien yang terdiagnosis malaria di Serawak, Sabah dan Pahang ditemukan 4 pasien terdiagnosis infeksi *Plasmodium knowlesi* yang meninggal. Keempat pasien tersebut mengalami hiperparasitemia dan mengalami gangguan hati dan ginjal. Malaria yang disebabkan oleh infeksi alamiah *Plasmodium knowlesi* terdistribusi secara luas dan banyak didiagnosis sebagai infeksi *Plasmodium malariae* serta berpotensi menyebabkan penyakit berat yang dapat berakibat kematian (Cox-Singh *et al.*, 2008).

Perbedaan utama *Plasmodium knowlesi* dengan spesies *Plasmodium* manusia lainnya adalah siklus replikasi pada eritrosit. Jika *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax* adalah 48 jam, *Plasmodium malariae* adalah 72 jam, dan *Plasmodium ovale* adalah 50 jam, maka *Plasmodium knowlesi* memiliki siklus terpendek yaitu 24 jam. Oleh karena itu,

Plasmodium knowlesi disebut juga malaria quotidian (Jongwutiwes *et al.*, 2011).

2.2.5. Genetik *Plasmodium knowlesi*

Metode molekular memberikan keuntungan serta kemudahan dengan diferensiasi yang sangat spesifik dalam mengidentifikasi spesies *Plasmodium*. Sasaran gen yang paling banyak digunakan untuk deteksi *Plasmodium* dan diagnosis malaria adalah gen rRNA18S. *Plasmodium knowlesi* sendiri terletak pada strain H (Lucchi *et al.*, 2012).

2.2.6. Siklus Hidup

Plasmodium knowlesi adalah parasit malaria yang bereplikasi dengan siklus hidup 24 jam. Karena siklus hidupnya yang singkat, jumlah parasit dalam tubuh dapat cepat meningkat, sehingga infeksi *Plasmodium knowlesi* berpotensi menjadi penyakit yang berat. Siklus hidup *Plasmodium knowlesi* juga menyerupai spesies *Plasmodium* lainnya. Siklus hidup terbagi menjadi dua, yaitu fase seksual eksogen (sporogoni) yang terjadi pada tubuh nyamuk *Anopheles*, dan fase aseksual endogen (skizogoni) yang berlangsung di dalam tubuh inang vertebrata (Nelwan *et al.*, 2013; Paisal and Indriyati, 2014).

Vektor utama *Plasmodium knowlesi* adalah nyamuk *Anopheles*. Penularan dapat terjadi dari kera ke kera, kera ke manusia, manusia ke manusia atau manusia ke kera. Manusia dapat terinfeksi *Plasmodium knowlesi* yang ditularkan dari kera atau dari manusia lain melalui perantara gigitan nyamuk *Anopheles cracens* dan *Anopheles maculatus*. Di dalam tubuh nyamuk, *Plasmodium Knowlesi* mengalami siklus hidup gametosit → mikrogamet atau makrogamet → zigot → ookinet → ookista → sporozoit (Lee, Cox-Singh and Singh, 2009).

Saat nyamuk *Anopheles* menghisap darah manusia penularan terjadi melalui saliva. Di dalam hati manusia akan terjadi siklus sporozoit → skizon → merozoit *Plasmodium knowlesi* tidak memiliki bentuk hipnozoit di hati. Setelah menjadi merozoit, parasit akan menginfeksi eritrosit melalui siklus merozoit → trophozoit → skizon → merozoit. Sebagian skizon dari eritrosit akan berkembang menjadi gametosit dan dapat ditularkan kembali oleh nyamuk *Anopheles* (Nelwan *et al.*, 2013).

2.2.7. Hospes Reservoir dan Hospes Perantara

Hospes alami dari *Plasmodium knowlesi* pada awalnya ditemukan pada kera ekor panjang dan kera ekor babi. Kedua spesies kera terdistribusi luas di seluruh Asia Tenggara dan merupakan satwa primata yang paling umum di wilayah tersebut, maka tak heran bila banyak sejumlah kasus ditemukan

pada negara-negara di Asia Tenggara. Vektor malaria *knowlesi* adalah nyamuk yang tinggal di hutan dari kelompok *Anopheles leucosphyrus*, dan nyamuk tersebut sebagian besar terdistribusi tumpang tindih dengan kera ekor panjang dan kera ekor babi di Asia Tenggara (Ng Teket *al.*, 2008).

Kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*) adalah primata terbanyak dan tersebar luas di Asia Tenggara, dapat ditemukan di seluruh bagian Asia Tenggara. Monyet ini juga dapat hidup pada hutan primer dan sekunder mulai dari dataran rendah sampai sekitar 1000 mdpl. Pada dataran tinggi, jenis monyet ini biasanya dijumpai di daerah pertumbuhan sekunder atau pada daerah perkebunan penduduk bahkan sampai ke tebing curam (Hafsari and Hastiana, 2014).

2.2.8. Diagnosis

Selama ini pemeriksaan mikroskopis yang menjadi standar emas pemeriksaan malaria tidak dapat mendeteksi *Plasmodium knowlesi* karena sering tumpang tindih dengan plasmodium lain. Pada pemeriksaan mikroskopis, *Plasmodium knowlesi* sering disimpulkan sebagai *Plasmodium falciparum* atau *Plasmodium vivax* karena kemiripan morfologinya. Setelah digunakannya pemeriksaan molekuler untuk mendeteksi *Plasmodium knowlesi*, ketiga jenis Plasmodium ini baru dapat dibedakan secara jelas (Paisal and Indriyati, 2014).

Diagnosis dengan apusan darah sajatidak memadai untuk mengkonfirmasi apakah pasien memiliki *Plasmodium malariae* atau infeksi *Plasmodium knowlesi*. Gejala klinis dan diagnostik dengan laboratorium harus ditunjang dengan adanya validasi mendeteksi *Plasmodium knowlesi* menggunakan PCR (Tang et al, 2010).

Cara diagnosis malaria knowlesi sebenarnya sama dengan cara diagnosis malaria akibat spesies lainnya yaitu dengan gejala dan tanda klinis disertai pemeriksaan apusan darah tebal. Akan tetapi karena morfologinya yang serupa dengan *Plasmodium malariae*, untuk infeksi *Plasmodium knowlesi* dibutuhkan deteksi molekular seperti PCR (Zaw & Lin, 2014).

2.2.9. Tanda dan Gejala

Gejala paling khas malaria akibat infeksi *Plasmodium knowlesi* adalah demam yang berlangsung setiap 24 jam atau setiap hari, disebut juga *quotidian fever*. Selain itu gejala malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium knowlesi* meliputi nyeri kepala, demam, menggigil dan keringat dingin. Pada sebagian pasien juga disertai nyeri perut, sesak napas dan batuk berdahak. Gejala lain yang juga banyak terjadi adalah takipnea dan takikardi (Singh and Daneshvar, 2013).

Pada Malaria Journal tahun 2010 melaporkan kasus infeksi *Plasmodium knowlesi* seorang pria Spanyol berusia 39 tahun dengan gejala demam dengan suhu hingga 40 °C, artralgia, mialgia, nyeri pinggang, menggigil dan malaise. Dengan beberapa hasil pemeriksaan laboratorium yang dibawah normal seperti trombosit, leukosit, dan beberapa enzim hati (Tang *et al.*, 2010).

Daneshvar sejak tahun 2006 sampai 2008 mengevaluasi gejala klinis dan tanda pada pasien dengan malaria akibat infeksi *Plasmodium knowlesi* di Rumah Sakit Kapit, Serawak, Malaysia. Pada penelitian ini terdiagnosis 107 pasien terinfeksi *Plasmodium knowlesi* dengan cara PCR. Secara umum, gejala penyakit malaria akibat infeksi *Plasmodium knowlesi* tidak khas yaitu demam dan menggigil. Pada sebagian pasien juga disertai nyeri perut, sesak napas, dan batuk berdahak (C Daneshvar *et al.*, 2009).

Gejala lain yang juga banyak terjadi adalah takipnea dan takikardi. Kelainan yang paling banyak terjadi adalah trombositopenia yang tercatat pada 104 pasien (98%) dan 31 (29%) dengan hitung trombosit kurang dari 50.000 *platelet*/μL. Limfopenia terjadi pada 7 kasus (6,5%) dan anemia pada 5 kasus (4,6%) (C Daneshvar *et al.*, 2009).

2.2.10. Tatalaksana

Karena *Plasmodium knowlesi* bereplikasi setiap 24 jam sehingga jumlah parasit bertambah dengan cepat, maka diagnosis dan pengobatan secara cepat harus dilakukan untuk menghindari komplikasi fatal. Infeksi *Plasmodium knowlesi* tanpa komplikasi dapat diobati dengan obat malaria yang ada saat ini. Obat yang paling sensitif adalah artemisin, dan pilihan keduanya adalah klorokuin. Sedangkan meflokuin terbukti kurang sensitif. Pengobatan dengan primakuin tidak diperlukan, karena *Plasmodium knowlesi* tidak mempunyai bentuk residual di hepar, seperti halnya malaria vivax atau ovale. Infeksi *Plasmodium knowlesi* dengan komplikasi sebaiknya ditangani sesuai dengan panduan pengobatan malaria berat dari WHO. Komplikasi biasanya terjadi jika jumlah parasit $\geq 35,000/\mu\text{l}$ atau jumlah trombosit $\leq 45,000/\mu\text{l}$ (Paisal and Indriyati, 2014).

Saat ini belum tersedia panduan pengobatan infeksi *Plasmodium knowlesi* dari WHO. Beberapa penelitian menggunakan cara pengobatan *Plasmodium malariae* yaitu kombinasi klorokuin dan primakuin dengan respons yang baik (Nelwan *et al.*, 2013).

Di Malaysia, kombinasi klorokuin dan primakuin direkomendasikan untuk pengobatan *Plasmodium malariae* dan efektif untuk 82 pasien di

Rumah Sakit di Kapit Serawak. Ternyata setelah rumah sakit melakukan identifikasi diantara pasien tersebut secara retrospektif ditemukan adanya infeksi malaria knowlesi, 2 pasien menerima kina dan 10 pasien menerima kombinasi klorokuin, primakuin, dan sulfadoksin-pirimetamin (Fansidar) dari kasus tersebut tidak ditemukan adanya kematian atau kegagalan terapi yang dilaporkan. Laporan kasus menunjukkan bahwa klorokuin sendiri dan atovaquone dengan proguanil, meflokuin, artemisinin, kina, dan doksisisiklin dapat berhasil digunakan untuk mengobati malaria knowlesi (Singh and Daneshvar, 2013).

2.2.11. Komplikasi

Plasmodium knowlesi dapat menyebabkan malaria berat yang berakibat kematian. Berbeda dengan *Plasmodium falciparum* yang parasitnya bereplikasi selang sehari, *Plasmodium knowlesi* mengalami replikasi setiap hari menyebabkan hiperparasitemia berat dan cepat menyebabkan kematian (Nelwan *et al.*, 2013).

Kasus fatal terkait *Plasmodium knowlesi* dilaporkan pertama kali terjadi pada pasien berusia antara 39 dan 69 tahun, dengan riwayat demam 3- 7 hari yang di sertai dengan gejala tidak spesifik seperti sesak napas, perut nyeri, dan muntah. Terdapat empat kasus yang dilaporkan dan ke-empat kasus tersebut memiliki angka parasitemia yang tinggi (75.000, 112.000

dan 764.720 parasit per μ L) disertai trombositopenia, gagal ginjal, hipotensi, *jaundice*, dan penurunan enzim hati yang ekstrem.

Keadaan malaria berat dapat dilihat berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium dengan melihat beberapa penanda prognosis, diantaranya hitung sel leukosit >12.000 sel/ μ l, konsentrasi kreatinin serum > 265 μ mol/liter, konsentrasi urea $>21,5$ mmol/liter, konsentrasi hemoglobin <7.1 g/dl, dan kadar glukosa darah <2.2 mmol/liter. Peningkatan 3 kali lipat dari enzim aminotransferase serta serum laktat dan rendahnya konsentrasi bikarbonat juga berkaitan dengan kasus yang berat dari malaria. Relevansi ambang dan aplikasi terkait malaria knowlesi memerlukan evaluasi lebih lanjut meskipun malaria knowlesi memiliki hasil yang baik terhadap pengobatan dan selesai tanpa komplikasi, namun kasus yang sulit dan fatal akhir-akhir ini banyak di laporkan (Singh and Daneshvar, 2013).

2.3. PCR

2.3.1. Definisi

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk

mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo and Rudiretna, 2001).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. PCR adalah reaksi polimerase berantai, yaitu reaksi yang melibatkan enzim polimerase yang dilakukan secara berulang-ulang. Yang diulang-ulang adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polimerase, untuk melakukan kegiatan ini dibutuhkan tabung PCR yang bersifat responsif dengan perubahan suhu dan mesin *thermal cycle*, suatu mesin yang mampu menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat, dan bahan-bahan untuk membuat reaksi PCR (Zuhriana, 2010).

2.3.2. Bahan yang diperlukan dalam PCR

Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); *buffer* PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA (Handoyo and Rudiretna, 2001).

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama yang dibutuhkan untuk melakukan amplifikasi yaitu:

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA.
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- d. Enzim DNA Polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
- e. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 ; 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin).

2.3.3. Metode

Prinsip dari PCR adalah memperbanyak suatu DNA dari dua menjadi empat, kemudian delapan, dan seterusnya hingga terbentuk jutaan salinan. Hal ini dapat dicapai dengan menggunakan suatu enzim yang disebut

polimerase. Proses pelipatgandaan ini dicapai dalam tiga tahap : *denaturation*, *annealing* (peleburan/penempelan), dan *elongation* atau *extension* (pemanjangan). Ketiga tahap ini membentuk satu siklus amplifikasi (Gambar 4).

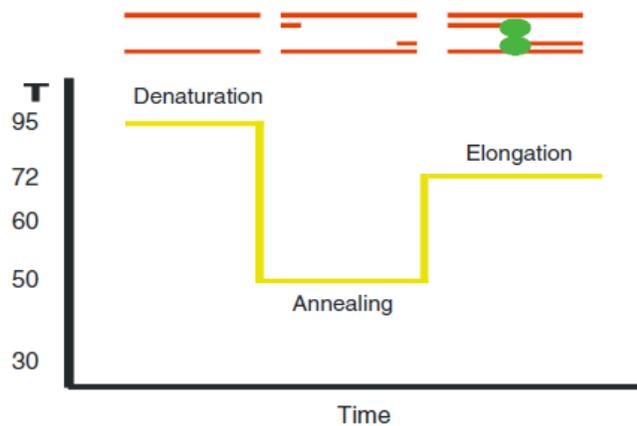
- a. *Denaturation*: DNA untai ganda atau *double-stranded* DNA didenaturasikan pada suhu 90-97°C menjadi sebuah DNA untai tunggal atau *single-stranded* DNA.
- b. *Annealing*: DNA tersebut “dilebur” (*annealing*) pada suhu 50-60°C dengan dua *primer*. *Primer* adalah sebuah fragmen DNA yang akan menempel pada gen yang ditarget dan berperan sebagai dasar (*template*) untuk pembentukan untaian baru.
- c. *Elongation*: enzim DNA polimerase memanjangkan (*elongation*) *primer* dengan deoksinukleotida trifosfat (dNTP) sebagai substrat sehingga diperoleh DNA salinan dari DNA aslinya.

Ketiga tahap ini terus diulang sampai diperoleh jumlah salinan yang diinginkan. Sebagai contoh amplifikasi dengan 30 siklus akan menghasilkan lebih dari satu miliar salinan DNA (Kubista *et al.*, 2006).

Hasil PCR konvensional nantinya akan dibaca dengan menggunakan elektroforesis. Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarose.

Prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat molekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul yang digunakan dalam praktikum elektroforesis adalah molekul DNA yang bermuatan negatif. Molekul akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya. Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) DNA memiliki muatan negatif karena mengandung gugus O.

Oleh karena itu, arah migrasi DNA adalah dari kutub negatif ke kutub positif. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (marker) yang telah diketahui ukurannya. Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dulu gel direndam di dalam larutan etidium bromide (Kusuma *et al.*, 2006).



(Kubista *et al.*, 2006).

Gambar 4. Siklus amplifikasi DNA.

2.3.5. Manfaat

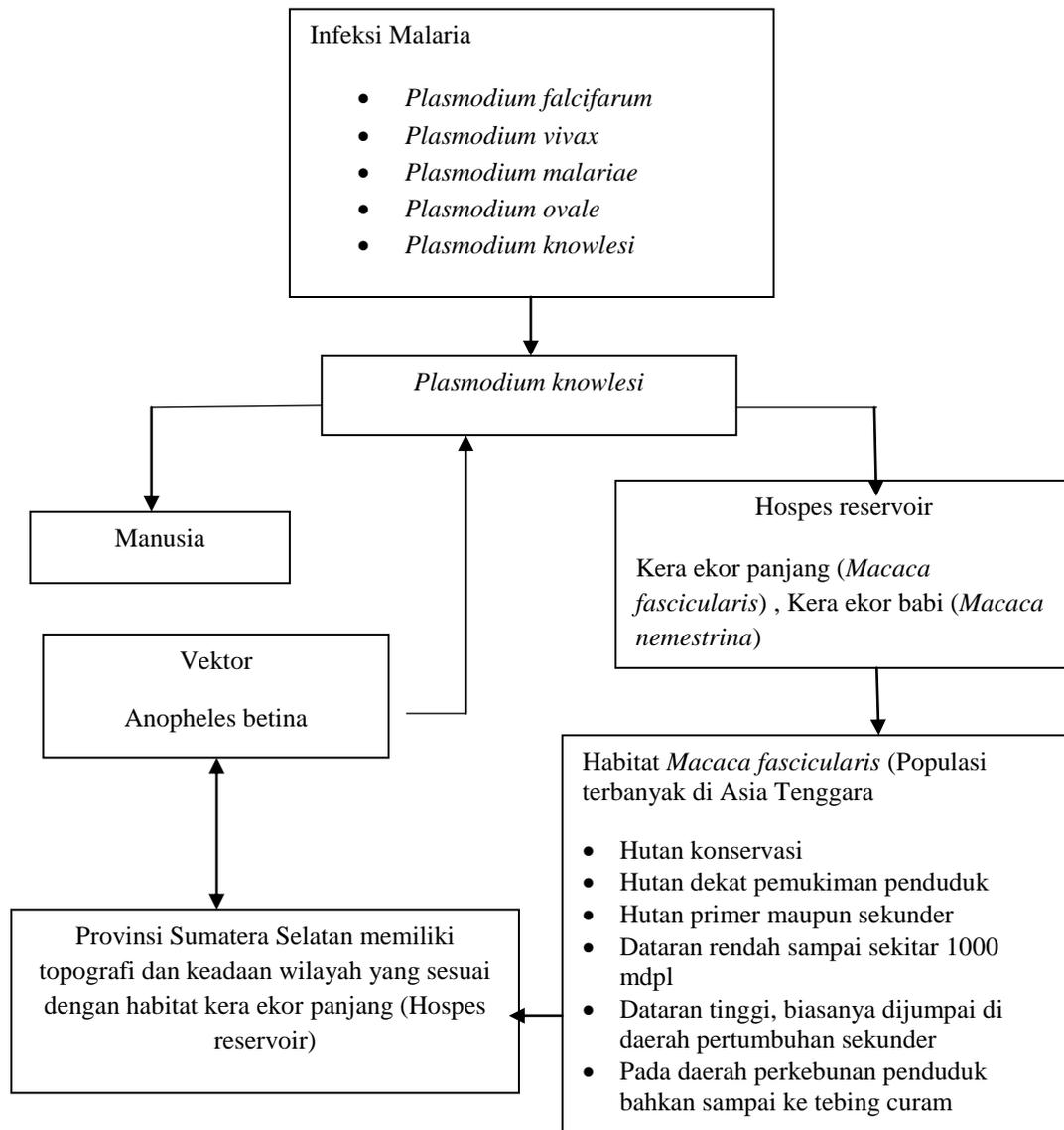
Penggunaan PCR dalam bidang kesehatan maupun kedokteran sudah banyak dirasakan. Selain memfasilitasi analisis gen, PCR juga banyak dikembangkan dalam aplikasi praktis. Sebagai contoh teknik dan aplikasi PCR dapat disebutkan sebagai berikut: kloning hasil PCR, sekuensing hasil PCR, kajian evolusi molecular, deteksi mutasi (penyakit genetik; determinasi seks pada sel prenatal), kajian forensik (tersangka kriminal, tersangka ayah pada kasus paternal), dan masih banyak lainnya. Dengan demikian, penemuan dan manfaat teknik PCR ini berdampak sangat luas terhadap kemajuan sains dan teknologi secara umum (Darmo Handoyo, 2002).

2.3.6. Kelebihan dan kekurangan PCR

PCR adalah teknologi canggih yang dapat mendeteksi DNA dengan cara amplifikasi DNA. Hasil pemeriksaan PCR dapat membantu untuk menegakkan diagnosa sepanjang pemeriksaan tersebut dikerjakan dengan cara yang benar dan sesuai. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi dan ketersediaan alat yang masih terbatas hanya di fasilitas-fasilitas kesehatan tertentu saja serta memerlukan keterampilan khusus untuk membaca PCR karena tidak semua tenaga medis dapat memahami PCR.

2.4. Kerangka Teori

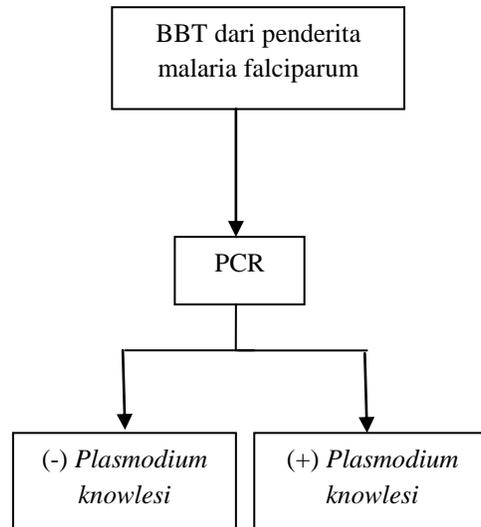
2.4.1 Kerangka Teori



Sumber: (Pemerintah Kab. Lahat, 2012; Singh and Daneshvar, 2013; Hafsari and Hastiana, 2014)

Gambar 5 Kerangka Teori.

2.4.2 Kerangka Konsep



Gambar 6 Kerangka Konsep

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif untuk mendeteksi adanya *Plasmodium knowlesi* pada sampel darah positif malaria di Kabupaten Lahat Provinsi Sumatera Selatan menggunakan metode pemeriksaan PCR.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan dilaksanakan pada bulan Agustus 2017 sampai November 2017.

3.3. Populasidan Subjek Penelitian

Subjek adalah warga Kabupaten Lahat, Provinsi Sumatera Selatan yang menderita malaria (positif malaria) yang telah dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskopis. Pengambilan sampel darah telah dilakukan dilakukan pada tahun 2012 – 2013. DNA dari sampel telah diisolasi dan saat ini tersimpan sebagai

Bahan Biologi Tersimpan (BBT). Jumlah BBT yang tersedia sebanyak 34 sampel DNA, semua BBT yang tersedia akan dilakukan pemeriksaan PCR untuk mengidentifikasi *Plasmodium knowlesi*.

3.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

BBT yang akan digunakan pada penelitian ini adalah BBT yang telah memenuhi kriteria inklusi berupa DNA sampel yang masih dapat digunakan untuk PCR dan volume darah yang mencukupi, serta kriteria eksklusi berupa DNA sampel yang terkontaminasi bahan kimia lain.

3.5. Definisi Operasional

Tabel 2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
Deteksi <i>Plasmodium knowlesi</i>	Suatu jenis plasmodium baru yang dulunya menginfeksi kera ekor panjang, kera ekor babi, ternyata diketahui dapat menginfeksi manusia	Elektroforesis <i>Device</i> PCR <i>Device</i>	Pemeriksaan PCR	Positif jika ditemukan garis pita pada 200bps saat pembacaan Hasil negatif bila tidak terdapat garis pita pada pembacaan	Kategorik

3.6. Alat dan Bahan

3.6.1. Ekstraksi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan QIAamp DNA Mini Kit dari QIAGEN. Adapun bahan-bahan yang diperlukan dalam isolasi DNA adalah, sampel darah yang ingin diekstraksi, aquabidest, etanol (96-100%). Adapun alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah; *spindown*(TOMY); *pulse-vortexing* (Biosan); *centrifuge*; *microcentrifuge tube*; mikropipet 100-1000 μ l (Eppendorf); mikropipet 10-100 μ l (Eppendorf); *blue tips*; *yellow tips*; *stopwatch*; dan *waterbath 56°C*.

3.6.2. Amplifikasi DNA (PCR)

Pada penelitian ini amplifikasi DNA yang dilakukan menggunakan MyFi DNA Polymerase® dari (Bioline), Aquadest, *Primers Forward*, *Primer Reverse* dan DNA template. Adapun alat yang dibutuhkan dalam proses amplifikasi ini adalah sebagai berikut; mesin PCR Qiagen Rotor Gene (Qiagen); mikropipet 0,5-10 μ l (Eppendorf); mikropipet 10-100 μ l (Eppendorf); *small tips*; *yellow tips*; *microcentrifuge tube*; nampan; *vortex*(Biosan); dan *spindown* (TOMY).

3.6.3. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses pembacaan hasil PCR, berikut adalah bahan yang digunakan untuk elektroforesis dalam penelitian ini adalah; *aquabidest*; TBE 1× (1st BASE); agarose 1% (Fermentas); Loading dye (Geneaid); Gel *Red*(Geneaid); DNA Marker (Geneaid). Dan alat yang digunakan adalah; tabung Erlenmeyer; lampu UV; pemanas (Nouva); mikropipet 0,5-10 µl (Eppendorf) berikut *small tips*; sarung tangan; kertas parafilm atau solatip; seperangkat alat elektroforesis (SCIE-PLAS); dan stabilizer.

Tabel 3. Primer set dari novel Pkr140-5

Primers	Sequence
Forward (Pkr140-5F)	5'-CAGAGATCCGTTCTCATGATTTCCATGG-3'
Reverse (Pkr140-5R)	5'-CTRAACACCTCATGTCGTGGTAG-3'

Sumber: (Lucchi *et al.*, 2012)

3.7. Cara Kerja

3.7.1. Ekstraksi DNA

Mengikuti protokol yang tertera pada buku panduan Qiagen Mini Kit DNA dengan mengikuti prosedur berdasarkan sampel yang tersedia (Qiagen, 2003)

1. Masukkan 20µl QIAGEN Protease (atau Proteinase K) ke dalam 1.5 ml *microcentrifuge tube*;
2. Tambahkan 200µl sampel ke *microcentrifuge tube*. Untuk 200µl PBS gunakan 200µl sampel darah, plasma, serum, cairan tubuh, atau 5×10^6 limfosit;
3. Tambahkan 200µl buffer AL ke dalam sampel, aduk menggunakan *pulse-vortexing* selama 15 detik;
4. Inkubasi selama 10 menit dalam suhu 56°C;
Hasil DNA mencapai titik maksimum setelah lisis 10 menit dalam suhu 56°C. Apabila lebih dari 10 menit, tidak ada pengaruh atau efek terhadap hasil dan kualitas DNA.
5. *Centrifuge* 1.5ml *microcentrifuge tube* untuk menghilangkan cairan yang ada ditutup;
6. Tambahkan 200µl etanol (96-100%) ke dalam sampel, dan aduk menggunakan *pulse-vortexing* selama 15 detik. Setelah itu, *centrifuge* kembali 1.5ml *microcentrifuge tube* untuk menghilangkan cairan yang ada di tutup;
7. Hati-hati dalam mengaplikasikan campuran dari step ke-6 sampai *QIAamp Spin Column* (2ml *collection tube*) tanpa membasahi pinggiran *tube*, tutup *tube*, lalu *centrifuge* dalam 6000 x g (8000 rpm) selama 1 menit. Letakkan *QIAamp Spin Column* dalam 2ml *collection tube*, dan singkirkan tabung yang terdapat filter.

8. Buka *QIAamp Spin Column* secara perlahan dan berhati-hati, lalu tambahkan 500µl Buffer AW1 tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam 6000 x g (8000rpm) selama 1 menit. Letakkan *QIAamp Spin Column* dalam 2ml *collection tube*, dan singkirkan tabung yang terdapat filter.
9. Buka *QIAamp Spin Column* secara perlahan dan berhati-hati, lalu tambahkan 500µl Buffer AW2 tanpa membasahi pinggiran tabung. Tutup, lalu lakukan *centrifuge* dalam kecepatan penuh 20000 x g (14000rpm) selama 3 menit.
10. Letakkan *QIAamp Spin Column* kedalam 1.5ml *microcentrifuge tube*, dan singkirkan *collection tube* yang terdapat filter. Buka *QIAamp Spin Column* dengan hati-hati dan tambahkan 200µl Buffer AE atau air murni (*purified water*). Inkubasi dalam suhu ruangan (15-25°C) selama 1 menit, lalu lakukan *centrifuge* dalam 6000 x g (8000rpm) selama 1 menit.

3.7.2. Amplifikasi DNA (PCR)

Amplifikasi DNA ini menggunakan Novel *prime* yang ditemukan oleh Lucchi *et al.* sebagai *single-step* PCR pertama yang berhasil ditemukan untuk mendeteksi *Plasmodium Knowlesi* (Lucchi *et al.*, 2012). Adapun rincian volume yang dibutuhkan untuk satu kali amplifikasi, yaitu 5 µL 5X MyFi Reaction Buffer, 0,5 µL Forward Primer 20 µM, 0,5 µL Reverse

Primer 20 μM , 1 μL DNA Tamplate, 1 μL MyFi DNA Polymerase, 17 μL *Aqua for Injection* (DDH_2O).

Proses amplifikasi diawali dengan mencampurkan setiap bahan dengan volume sesuai dengan perhitungan total reaksi ke dalam *microcentrifugetube*, kecuali DNA tamplate. Selama pengerjaan, seluruh bahan diletakkan pada nampan dan rak dingin, untuk menjaga suhu, lalu menambahkan DNA tamplate sebanyak 1 μL pada setiap *tube*. Kemudian tempatkan *tube* ke dalam *cycler* dan menjalankan reaksi PCR sesuai dengan kondisi PCR yang telah ditentukan.

Tube PCR yang berisi campuran tersebut ditaruh dalam instrumen PCR pengaturan sebagai berikut: denaturasi inisial 95°C selama 2 menit; denaturasi 95°C selama 30 detik; *annealing* 57°C selama 30 detik; *elongation* 72°C selama 45 detik, sebanyak 35 kali siklus dan selanjutnya *Final extension* 72°C selama 5 menit.

3.7.3 Elektroforesis

Hasil PCR kemudian dibaca dengan gel elektroforesis (1% gel agarose) dengan cara sebagai berikut :

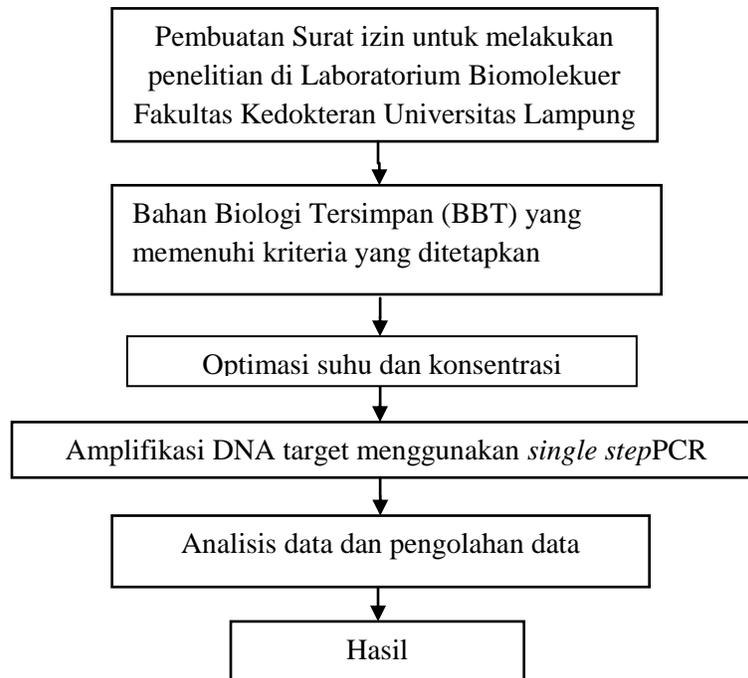
1. Buat larutan *buffer* TBE $1\times$
2. Buat gel agarosa 1% dengan cara memasukkan gel agarose sesuai takaran untuk 1% yaitu 1gr agarose dilarutkan ke dalam 100ml *buffer*

TBE 1× dalam tabung Erlenmeyer dan dididihkan hingga larut sempurna (± 80 derajat Celcius, sampai mendidih).

3. Masukkan Gel Red ke dalam larutan agarose yang suhunya sudah tidak terlalu panas sebagai pengganti EtBr
4. Siapkan baki elektroforesis, lekatkan selotip di tiap ujung baki elektroforesis (Pastikan bahwa selotip melekat kuat dan tidak ada lubang pada masing-masing ujung baki).
5. Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki dengan posisi hampir menyentuh dasar baki.
6. Periksa suhu larutan agarosa dengan cara menempelkan erlenmeyer ke tangan; jika suhunya sudah turun hingga sekitar 60°C , tuangkan larutan agarosa ke dalam baki elektroforesis, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
7. Ambil sisir dengan hati-hati, lepaskan selotip dari ujung-ujung baki.
8. Masukkan baki yang telah berisi gel agarosa ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan sisa larutan buffer TBE 1× (Pastikan bahwa gel terendam seluruhnya dalam TBE).
9. Siapkan sekitar 5 cm kertas parafilm di dekat tangki elektroforesis.
10. Masukkan 3 μL sampel DNA dan 2 μL *loading dye* 6x ke dalam sumuran gel dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut terlebih dahulu secara merata pada kertas parafilm.

11. Buatlah catatan mengenai nomor sumuran dan jenis sampel DNA yang dimasukkan.
12. Hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (Pastikan bahwa kabel yang tersambungkan ke kutub negatif berada di dekat sumuran, sedang kabel yang tersambung ke kutub positif berada jauh dari sumuran; jika tidak demikian, ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).
13. Nyalakan sumber arus, aturlah voltase dan waktu *running* hingga diperoleh angka 100 V dan 45 menit dengan cara menekan tombol yang sesuai pada sumber arus.
14. Jalankan elektroforesis (lakukan *running*) dengan cara menekan tombol *run* pada sumber arus.
15. Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai oleh adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus dan angkatlah baki dari tangki elektroforesis.
16. Keluarkan gel dan letakkan di atas UV transiluminator (Letakkan selubung kaca hitam di atas UV transiluminator).
17. Nyalakan UV transiluminator, amati pita-pita DNA yang tervisualisasi (Pratiwi, 2001; Lucchi *et al.*, 2012).

3.8. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian.

3.9. Analisis Data

Analisis dan pengolahan data dilakukan menggunakan perangkat lunak komputer.

3.10. Aspek Etik Penelitian

Etik penelitian ini telah disetujui oleh bagian etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat No. 3663 /UN26.8/DL/2017. Bukti etik penelitian terlampir pada lampiran 2.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah tidak ditemukan adanya *Plasmodium knowlesi* dari seluruh sampel yang diujikan.

5.2. Saran

Pada penelitian ini terdapat beberapa saran yaitu :

1. Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya lebih mempertimbangkan dalam pemilihan metode PCR yang digunakan karena antara *nested* maupun *single step* PCR memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing, sehingga dapat disesuaikan dengan kondisi dan situasi peneliti agar didapatkan hasil yang optimal.
2. Apabila sampel berasal dari BBT yang berasal dari kertas saring sebaiknya dilakukan uji kualitas dan kuantitas DNA terlebih dahulu untuk melihat kualitas sampel

3. Untuk optimasi dibutuhkan kontrol positif untuk menilai keberhasilan dari amplifikasi yang sudah dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsin, Arsunan A. 2012. Malaria di Indonesia tinjauan aspek epidemiologi. Makasar: Masagena Press.
- Bioline. 2017. MyFi DNA polymerase. Singapore: Bioline
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Malaria. CDC: Georgia.
- Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. 1965. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferrable to monkeys. Maryland: National Institute of Allergy and Infection Disease.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. 2008. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis.46:165–71.
- Daneshvar C, Davis TME, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PCS, et al. 2009. Clinical and Laboratory Features of Human Plasmodium knowlesi Infection. Clin Infect Dis. 49(6):852-60
- Depkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Depkes RI. 2008. Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan;
- Dinas Kabupaten Lahat. 2011. Data Kabupaten Lahat. Lahat: Dinas Kabupaten Lahat.
- Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Selatan. 2015. Profil kesehatan Provinsi Sumatera Selatan tahun 2014. Palembang : Dinkes Povinsi Sumatera Selatan
- Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Macker-tich S, Cheng Q, et al. 2010. Plasmodium knowlesi in Human, Indonesian Borneo. Emerg Infect Dis. 16(4):672-4.

- Hafsari D, Hastiana Y, Windarti. 2014. Studi Pakan Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis raffles*) di Taman Wisata Alam Punti Kayu Palembang Sumatera Selatan. *izzue*. 3(1):7–11.
- Handoyo D, Rudiretna A. 2001. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*. 9(1):17–29.
- Harijanto PN. 2014. Malaria. Dalam Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, Simadibrata M, Setiyohadi B, Syam AF. Buku ajar ilmu penyakit dalam. Edisi ke-6. Jakarta: InteraPublishing. hlm. 595–612.
- Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, et al. 2011. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*. 17(10):1-13.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Infodatin malaria. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI.
- Knowles RM, Das Gupta B. 1932. A study of monkey–malaria and its experimental transmission to man. *Ind Med Gaz*. 67:301-20.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27:95-125.
- Kusuma W, Lestari A, Herawati S, Putu IW, Yasa S. 2006. Pemeriksaan mikroskop dan tes diagnostik cepat dalam menegakkan diagnosis malaria. Denpasar: Universitas Udayana..
- Kusuma SAF. 2010. Polymerase chain reaction,[skripsi]. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Lubis IN, Wijaya H, Lubis M, Lubis CP, Divis PC, Beshir KB. et al. 2017. Contribution of *Plasmodium knowlesi* to multi-species human malaria infections in North Sumatera, Indonesia. *The Journal of Infectious Diseases*. (3(1) eisz):1-21.
- Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, DeBarry J, Srinivasamoorthy G, Goldman I, et al. 2012. A new single-step PCR assay for the detection of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *PLoS ONE*. 7(2):1–7.
- Natalia D. 2014. Peranan trombosit dalam patogenesis malaria. 37(3):219–25.

- Nelwan R, Subbagian A. 2013. Malaria *Plasmodium knowlesi*. Continuing Medical Education. 40(5), 327–9.
- Ng OT, Eng E, Cheng CL, Piao JL, Lee CN, Pei SW, et al. 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. Emerging Infectious Diseases. 14(5):814–6.
- Ompusunggu S, Yuliawaty R, Adventus Sihite, Sri Utami. 2015. First finding of human *Plasmodium knowlesi* malaria cases in Central Kalimantan. Buletin Penelitian Kesehatan. 73812(2):63–76.
- Ottay, RI. 2011. Profil penyakit malaria pada penderita rawat inap di Rumah Sakit Umum Daerah Kota Bitung. Jurnal Biomedik. 3(3):172–8.
- Paisal LI. 2014. Gambaran *Plasmodium knowlesi* pada manusia. Jurnal Buski. 5(2): 87–94.
- Pemerintah Kabupaten Lahat. 2012. Laporan akuntabilitas kinerja instansi pemerintah (LAKIP) tahun 2012. Lahat: Pemerintah Kabupaten Lahat.
- Putaporntip C, Hongsrimumang T, Seethamchai S. 2009. Differential prevalence of plasmodium infections and cryptic *Plasidium knowlesi* malaria in human in Thailand. J Infect DIs. 16:672-4
- Rianta P. 2001. Mengenal metode elektroforesis. Oseana. 26(1):25-31.
- Setiadi W, Sudoyo H, Trimarsanto H, Sihite B A, Saragih R J, Juliawaty R, Syafruddin D. 2016. A zoonotic human infection with simian malaria, *Plasmodium knowlesi*, in Central Kalimantan, Indonesia. Malaria Journal. 15(218):1-6.
- Singh B, Daneshvar C. 2013. Human infections and detection of plasmodium knowlesi. Clinical Microbiology Reviews. 26(2):165–84.
- Sutanto I, Ismid IS, Sjarifuddin PK, Sungkar S. Parasitologi kedokteran. Edisi ke-4. Jakarta: Balai Penerbi FK UI;2008
- Tang TT, Salas A, Ali-tammam M, Martínez C, Lanza M, Arroyo E, et al. 2010. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by real time PCR in a traveller from Southeast Asia. Malaria Journal. 9(219):1–6.
- Tooy DJ, Bernadus JB, Sirosi A. 2013. Deteksi *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan metode real-time polymerase chain reaction di daerah Likupang dan Bitung [kandidat Skripsi]. Manado: Universitas Sam Ratulangi Manado.

- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. 2014. Malaria. *Lancet*. 383:723–35
- World Health Organization. 2015. World Malaria Report. Geneva: WHO Press.
- Depkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- World Health Organization. 2014. World Malaria Report. Geneva: WHO Press.
- Yusuf ZK. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). 5(6):5-10.
- Zaw M, Lin Z. 2014. Methods for detection and identification of *Plasmodium knowlesi*: A review article. *International Journal of Collaboration Research on Internal Medicine & Public Health*. 6(1):11–22.