

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Etiologi dan Epidemiologi Malaria

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi parasit *Plasmodium sp.* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi. Penyakit ini dapat menyebabkan gejala seperti demam, menggigil, sakit kepala, mual, muntah, nyeri otot, dan kelelahan. Jika tidak diobati, malaria dapat menyebabkan komplikasi serius dan bahkan kematian (Varo et al., 2021).

Plasmodium adalah parasit intraseluler obligat. Ada beberapa spesies *Plasmodium* yang dapat menyebabkan malaria pada manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (*P. ovale curtisi* dan *P. ovale wallikeri*), dan *Plasmodium knowlesi* (CDC, 2022).

Plasmodium falciparum merupakan spesies yang paling berbahaya dan paling sering ditemukan di daerah endemik malaria di Afrika Sub-Sahara dan Asia Tenggara. Infeksi *Plasmodium falciparum* dapat menyebabkan komplikasi serius, termasuk anemia berat, malaria serebral, gangguan fungsi organ, dan bahkan kematian (Lardo, 2020). *Plasmodium vivax* adalah salah satu spesies yang umum di daerah endemik malaria Asia Tenggara dan sering ditemukan di daerah dengan iklim sedang. Infeksi *Plasmodium vivax* cenderung tidak seberat infeksi *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium vivax* memiliki kemampuan untuk masuk ke dalam fase dorman (hipnozoit) di dalam hati dan dapat menimbulkan episode kambuhnya malaria sewaktu-waktu (*relaps*). *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium ovale* jarang ditemukan, tetapi dapat menyebabkan malaria kronis yang bersifat lebih persisten. *Plasmodium knowlesi*, sebelumnya diidentifikasi sebagai parasit pada primata (*zoonosis*), namun kini

juga dapat ditemukan sebagai penyebab malaria pada manusia, namun lebih jarang terjadi (WHO, 2022).

Berdasarkan laporan terbaru dari *World Health Organization* (WHO) mengenai malaria di seluruh dunia pada tahun 2022, diperkirakan terjadi sekitar 247 juta kasus malaria dan 729.000 kematian akibat penyakit tersebut (WHO, 2016). Sekitar dua pertiga dari kasus kematian ini, disebabkan oleh gangguan dalam pencegahan, diagnosis, dan pengobatan malaria selama masa pandemi. Beban malaria terberat masih ditanggung oleh wilayah Afrika Sub-Sahara, dengan sekitar 95% dari semua kasus malaria dan 96% dari semua kematian pada tahun 2022 terjadi di wilayah ini. Lebih dari 80% kematian di wilayah tersebut terjadi pada anak-anak di bawah usia 5 tahun (WHO, 2022).

Malaria masih merupakan masalah kesehatan yang signifikan di Indonesia, terutama di beberapa wilayah tertentu. Beberapa provinsi di Indonesia memiliki kejadian malaria yang lebih tinggi dibandingkan dengan wilayah lainnya. Salah satu wilayah dengan beban malaria yang signifikan adalah Provinsi Papua (Fransisca et al., 2015). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, melaporkan terdapat 415.140 kasus malaria di Indonesia pada tahun 2022. Jumlah ini mengalami peningkatan sebesar 36,29% dibandingkan dengan tahun sebelumnya yang mencatatkan 304.607 kasus. Setelah mengalami penurunan yang konsisten hingga tahun 2015, kasus malaria kemudian menunjukkan tren peningkatan hingga tahun lalu (Kemenkes, 2022). Angka *Annual Parasite Incidence* (API), yaitu jumlah kasus positif malaria per 1.000 penduduk, mencapai angka 1,51 pada tahun 2022. Angka ini meningkat sebesar 0,39 poin dibandingkan dengan tahun sebelumnya yang tercatat sebesar 1,12 (Berzosa et al., 2018).

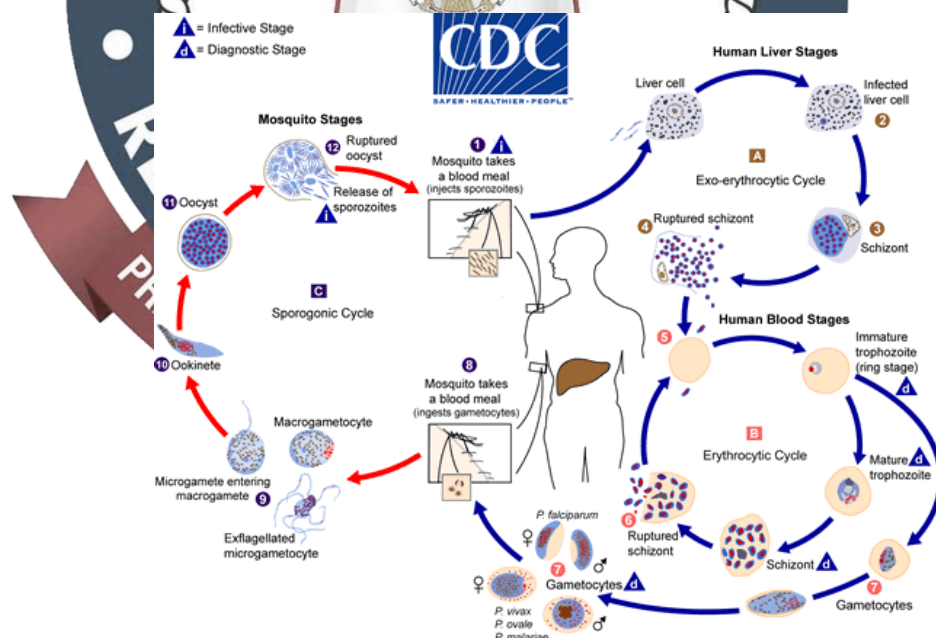
Papua Barat dan Papua memiliki beban malaria tertinggi di Indonesia, dengan *Annual Parasite Incidence* (API) tingkat provinsi baru-baru ini sebesar 60,6% dan 52,3% di masing-masing provinsi

(Fransisca et al., 2015). Berdasarkan laporan kasus tahun 2021, keempat spesies parasit *Plasmodium* terdapat di Indonesia, dengan infeksi sebagian besar disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* (50%) dan *Plasmodium vivax* (38%) kemudian, diikuti dengan frekuensi jauh lebih sedikit oleh *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan infeksi *Plasmodium* campuran (12%)(WHO, 2022).

Prevalensi malaria di Indonesia bervariasi tergantung pada wilayah dan waktu tertentu. Faktor-faktor seperti iklim, lingkungan, aksesibilitas, dan upaya pengendalian yang dilakukan memengaruhi tingkat kejadian penyakit ini. Hingga saat ini, program pengendalian malaria di Indonesia mencakup distribusi kelambu berinsektisida, pengobatan yang tepat, dan pengendalian vektor (Fransisca et al., 2015).

2.1.2

Siklus Hidup *Plasmodium* sp.



Gambar 2. 1 Siklus hidup *Plasmodium* penyebab malaria

Siklus alami malaria melibatkan infeksi berulang pada manusia dan nyamuk betina *Anopheles*. Pada manusia, parasit tumbuh dan bereproduksi terlebih dahulu di dalam sel-sel hati

(*hepatocyte*), kemudian di dalam sel-sel darah merah (*erythrocyte*) (CDC, 2022). Di dalam darah, parasit terus-menerus tumbuh dan berkembang di dalam sel-sel darah merah dan menghancurkannya, melepaskan parasit muda yang disebut "merozoit" yang melanjutkan siklus dengan menginvasi sel-sel darah merah lainnya (Kemenkes, 2020).

Infeksi parasit didalam darah (*parasitemia*) adalah penyebab timbulnya gejala malaria. Ketika infeksi parasit mencapai sel darah merah tepatnya pada fase seksual tahapan gametosit (terdapat dalam bentuk jantan dan betina) tertelan oleh nyamuk betina *Anopheles* saat nyamuk tersebut menghisap darah, gametosit berpasangan menuju saluran pencernaan nyamuk dan memulai siklus pertumbuhan dan perkembangan di dalam tubuh nyamuk. Setelah 10-18 hari, bentuk parasit yang disebut sporozoit bermigrasi ke kelenjar saliva nyamuk. Ketika nyamuk *Anopheles* menghisap darah dari manusia lain, nyamuk menyuntikkan saliva yang mengandung sporozoit bersama dengan zat antikoagulan, dan sporozoit ini bermigrasi ke hati manusia, memulai siklus baru *Plasmodium* (Kemenkes, 2019).

Nyamuk yang terinfeksi berperan sebagai pembawa penyakit dari satu manusia ke manusia lainnya (sebagai "vektor"), sementara manusia yang terinfeksi mengirimkan parasit ke nyamuk. Berbeda dengan manusia yang menjadi inang, nyamuk sebagai vektor tidak mengalami penyakit akibat kehadiran parasit tersebut (Kandun.N, 2008). Siklus hidup *Plasmodium sp* terdiri atas dua siklus, yakni siklus hidup di tubuh manusia dan siklus hidup pada nyamuk *Anopheles* betina.

2.1.2.1 Siklus Hidup *Plasmodium* di Manusia

Pada tahap infeksi, nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi memasukkan sporozoit *Plasmodium* ke dalam tubuh manusia saat menggigit dan menghisap darah. Sporozoit beredar di dalam aliran darah selama kurang lebih 30 menit, kemudian bermigrasi menuju

organ hati manusia akibat pengikatan reseptor hepatosit dengan protein serum thrombospondin dan properdin. Menginfeksi hepatosit dan berubah menjadi tropozoit. Tropozoit berkembang menjadi bentuk aseksual (schizont) di dalam sel-sel hati. Schizont mengalami reproduksi aseksual dan menghasilkan banyak merozoit yang berjumlah berkisar antara 5.000 hingga 30.000 (Lardo.s, 2020).

Siklus ini dikenal sebagai siklus eksoeritrositik yang terjadi selama kurang lebih selama dua minggu. *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae*, siklus skizogoni berlangsung lebih cepat, sedangkan pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale*, kecepatan siklus menjadi lebih bervariasi baik cepat maupun lambat. Beberapa tropozoit hati tidak langsung berkembang menjadi skizon, tetapi ada yang memasuki bentuk dorman yang disebut hipnozoit. Hipnozoit dapat bertahan dalam sel hati selama berbulan-bulan atau bahkan bertahun-tahun. Pada suatu saat, jika kekebalan tubuh penderita menurun, parasit akan menjadi aktif dan menyebabkan (relaps) kambuhnya penyakit (Kandun.N, 2008).

Pada tahap aseksual di dalam darah, merozoit yang dilepaskan dari hati memasuki aliran darah dan menginfeksi sel-sel darah merah. Di dalam sel darah merah, merozoit berkembang menjadi trofozoit. Trofozoit tumbuh dan membelah diri menjadi banyak merozoit yang merusak dan memecah sel darah merah hingga parasit menyebar dan menginfeksi sel darah merah lainnya. Siklus ini disebut dengan siklus intraeritrosit. Proses ini menyebabkan timbulnya gejala malaria dan pembentukan siklus aseksual baru dalam darah (Lardo.s, 2020).

Memasuki fase seksual, selama tahap infeksi, merozoit tumbuh dan berkembang menjadi gametosit (bentuk seksual *Plasmodium*). Gametosit dapat berpindah ke nyamuk *Anopheles* betina saat nyamuk menghisap darah dari manusia yang terinfeksi malaria (Kemenkes, 2020).

2.1.2.2 Siklus Hidup *Plasmodium* di Nyamuk *Anopheles*

Nyamuk *Anopheles* menghisap darah yang mengandung gametosit *Plasmodium* dari manusia yang terinfeksi. Gametosit di dalam perut nyamuk berkembang menjadi gamet atau sel-sel reproduktif. Dalam perut nyamuk, gamet jantan dan betina bereproduksi membentuk zigot. Zigot berkembang menjadi ookineta dan menembus dinding perut nyamuk. Ookineta berkembang menjadi oosista, kemudian pecah dan menghasilkan sporozoit. Sporozoit bermigrasi ke kelenjar saliva nyamuk. Saat nyamuk menggigit manusia untuk menghisap darah, sporozoit akan bermigrasi ke dalam tubuh manusia, memulai siklus hidup *Plasmodium* pada manusia yang baru (Kemenkes, 2020).

2.1.3 Periode Inkubasi *Plasmodium*

Masa inkubasi adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk ke tubuh manusia sampai timbulnya gejala klinis yang ditandai dengan demam. Masa inkubasi bervariasi tergantung spesies *Plasmodium* (lihat Tabel 2.1)(Kemenkes, 2019).

Tabel 2. 1 Masa Inkubasi Penyakit Malaria

Jenis <i>Plasmodium</i>	Masa Inkubasi (Hari)	Rata-rata (Hari)
<i>Plasmodium falciparum</i>	9-14 hari	12 hari
<i>Plasmodium vivax</i>	12-17 hari	15 hari
<i>Plasmodium ovale</i>	16-18 hari	17 hari
<i>Plasmodium malariae</i>	18-40 hari	28 hari
<i>Plasmodium knowlesi</i>	10-12 hari	11 hari

Gejala malaria terjadi ketika sel darah merah yang mengandung parasit pecah. Demam mulai muncul bersamaan dengan pecahnya bentuk muda sel darah yang mengeluarkan berbagai macam antigen. Antigen ini merangsang sistem imun seperti makrofag, monosit, atau limfosit untuk melepaskan berbagai jenis sitokin, termasuk *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan

interleukin-6 (IL-6) . TNF dan IL-6 yang beredar dalam aliran darah, akan merangsang dan memodulasi *hipothalamus* yang berfungsi sebagai pusat pengatur suhu tubuh manusia, untuk meningkatkan suhu sehingga menyebabkan terjadinya demam (Lardo.s, 2020).

Proses pecahnya skizon (skizogoni) pada empat spesies *Plasmodium* memerlukan durasi yang berbeda. *Plasmodium falciparum* memerlukan waktu 36-48 jam, *Plasmodium vivax/ovale* memerlukan waktu 48 jam, dan *Plasmodium malariae* memerlukan waktu 72 jam. Demam pada *Plasmodium falciparum* dapat terjadi setiap hari, sedangkan pada *Plasmodium vivax/ovale* terjadi setiap dua hari, dan pada *Plasmodium malariae*, demam terjadi setiap dua hari (Kandun.N, 2008).

2.1.4 **Diagnosis Malaria**

Keluhan utama malaria adalah demam akut yang ditandai dengan gejala klinis yang umumnya muncul tujuh hari atau lebih (biasanya 10-15 hari) Setelah mendapatkan gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi. Gejala awalnya tidak spesifik dapat meliputi demam, menggigil, sakit kepala, ketidaknyamanan, nyeri perut, nyeri otot, dan peningkatan suhu tubuh yang mirip dengan infeksi virus. Gejala ini mungkin ringan dan sulit diidentifikasi sebagai malaria, tetapi dalam beberapa kasus, dapat berakibat fatal. Dalam situasi tertentu, gejala juga dapat disertai dengan sakit kepala parah, nyeri dada, nyeri perut, nyeri sendi, nyeri otot, atau diare yang menyerupai penyakit lain, meskipun gejala sakit kepala pada malaria cenderung lebih parah (Kemenkes, 2020).

Pada anamnesis juga perlu ditanyakan: (1) Riwayat berkunjung ke daerah endemik malaria; (2) Riwayat tinggal di daerah endemik malaria; (3) Riwayat sakit malaria/riwayat demam; (4) Riwayat minum obat malaria satu bulan terakhir; (5) Riwayat mendapat transfusi darah.

Secara umum gejala malaria klasik tanpa komplikasi dapat timbul selama 6-10 jam dan terjadi dalam tiga tahap: (1) Tahap dingin (*cold stage*) , ditandai dengan sensasi kedinginan dan menggigil; (2) Tahap panas (*hot stage*), yang meliputi demam, sakit kepala, muntah, dan pada anak-anak kecil dapat menyebabkan kejang; (3) Tahap berkeringat (*sweating stage*), dimana keringat meningkat, suhu tubuh kembali normal, dan terjadi kelelahan.

Secara klasik, serangan malaria dengan parasit "tertian" (*P. falciparum*, *P. vivax*, dan *P. ovale*) terjadi setiap dua hari, sementara dengan parasit "kuartan" (*P. malariae*) terjadi setiap tiga hari. Secara umumnya, pasien mengalami kombinasi gejala berikut: demam, kedinginan, berkeringat, sakit kepala, mual dan muntah, serta nyeri sendi (Varo et al., 2021).

Di negara-negara dimana kasus malaria jarang terjadi, gejala ini sering kali dianggap sebagai gejala influenza, pilek, atau infeksi umum lainnya, terutama jika tidak dicurigai sebagai malaria. Penduduk di negara-negara dengan kasus malaria yang umum terjadi, sering dapat mengenali gejala penyakit malaria dan mengobati diri sendiri tanpa mencari konfirmasi diagnostik ("*presumptive treatment*") (Amaral et al., 2019).

Beberapa temuan fisik yang mungkin ditemukan meliputi: peningkatan suhu tubuh, berkeringat, kelemahan, pembesaran limpa (splenomegali) , ikterus ringan, pembesaran hati (hepatomegali), dan peningkatan laju pernapasan. Diagnosis malaria bergantung pada identifikasi parasit dalam darah, yang biasanya dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis. Temuan laboratorium tambahan mungkin termasuk anemia ringan, penurunan jumlah trombosit darah (trombositopenia) yang ringan, peningkatan bilirubin, dan peningkatan aminotransferase (Daily et al., 2022).

Tanda dan gejala klinis harus menjadi perhatian khusus apabila penderita mulai menunjukkan adanya gejala malaria berat.

Malaria berat terjadi ketika infeksi disertai dengan kegagalan organ yang serius atau kelainan pada darah atau metabolisme pasien.

Manifestasi malaria berat meliputi hal-hal berikut:

- 1) Malaria serebral, ditandai dengan perilaku abnormal, gangguan kesadaran, kejang, koma, atau kelainan neurologis lainnya.
- 2) Anemia berat akibat hemolisis (penghancuran sel darah merah).
- 3) Hemoglobinuria (keberadaan hemoglobin dalam urin) akibat hemolisis.
- 4) Sindrom distres pernapasan akut (ARDS), reaksi peradangan pada paru-paru yang menghambat pertukaran oksigen, yang dapat terjadi bahkan setelah jumlah parasit telah berkurang sebagai respons terhadap pengobatan.
- 5) Kelainan pada pembekuan darah.
- 6) Tekanan darah rendah akibat kegagalan sistem kardiovaskular.
- 7) Gagal ginjal akut (*Acute Kidney Injury*)
- 8) Hiperasitemia, di mana lebih dari 5% sel darah merah terinfeksi oleh parasit malaria.
- 9) Asidosis metabolik (keasaman berlebihan dalam darah dan cairan jaringan), sering kali terkait dengan hipoglikemia (WHO, 2012).

2.1.5 Pemeriksaan Laboratorium

Diagnosis malaria dapat ditegakkan berdasarkan pada gejala klinis dan pemeriksaan laboratorium. WHO telah menetapkan pemeriksaan mikroskopis sebagai *gold standart* untuk identifikasi parasit malaria melalui pemeriksaan mikroskopis dari sampel darah tepi menggunakan metode apusan darah tebal dan tipis. Namun, masih banyak kekurangan dalam penerapannya (WHO, 2016).

Diagnosis yang tepat dan akurat untuk deteksi parasit malaria telah menjadi tantangan lama khususnya dalam bidang skrining dan surveilans epidemiologi untuk memberikan informasi tentang strategi pengendalian malaria untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas. Untuk menjawab tantangan tersebut, tes diagnostik

malaria yang andal sangat diperlukan. Harus melewati beberapa kriteria seperti uji diagnostik harus mampu mengidentifikasi parasit sampai ke tingkat spesies, memiliki kemampuan untuk mengukur tingkat kepadatan parasit dalam darah (parasitemia), memiliki sensitivitas tinggi untuk mendeteksi parasitemia tingkat rendah, dapat mengkonfirmasi ada tidaknya infeksi dan memungkinkan pemantauan respon terhadap terapi antimalaria (Hopkins & Cunningham, 2019).

Berbagai teknik skrining sekarang tersedia untuk mendiagnosis malaria mulai dari metode konvensional menggunakan mikroskop hingga teknik terbaru menggunakan metode molekuler. Pemeriksaan diagnostik cepat atau *Rapid Diagnostik Test* (RDT) malaria untuk mendeteksi *Plasmodium sp.* sering dilakukan pada daerah endemis. Metode molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berupa Isothermal PCR dan PCR Konvensional mulai banyak digunakan dalam penelitian dan diagnosis malaria.

2.1.5.1 Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis merupakan pemeriksaan baku emas (*gold standart*) yang digunakan untuk mengidentifikasi parasit malaria dalam sampel darah tepi pasien menggunakan metode apusan darah tebal dan tipis. Sensitivitas pemeriksaan mikroskopis pada apusan darah tipis hanya 50 par/ml = parasitemia 0.001 % atau 1/10 dari apusan darah tebal. Parasitemia pada apusan darah tebal adalah jumlah parasit per 200 leukosit, sedangkan pada apusan darah tipis adalah jumlah parasit per 1000 eritrosit (Lardo.s, 2020).

Pemeriksaan mikroskopis memiliki banyak keuntungan, seperti dapat mengidentifikasi spesies parasit malaria dengan akurasi tinggi, sehingga dapat membantu dalam penentuan pengobatan yang tepat. Metode ini relatif murah dibandingkan dengan beberapa teknik diagnostik lainnya seperti PCR. Pemeriksaan mikroskopis malaria dapat dilakukan di fasilitas

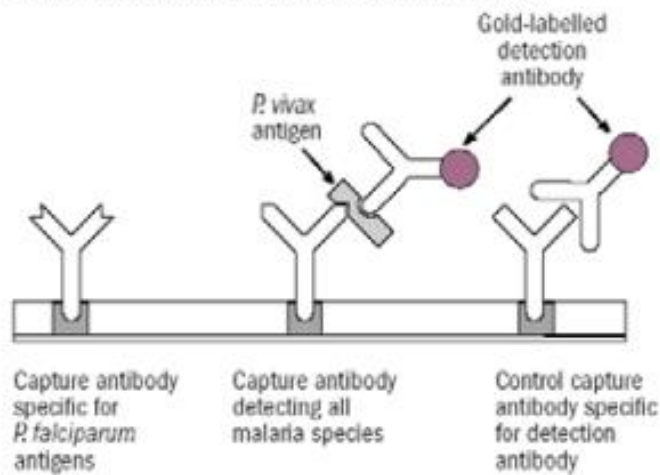
kesehatan yang lebih umum dan tersedia di banyak negara, terutama di daerah dengan sumber daya terbatas. Kemudian, metode ini memungkinkan deteksi lebih dari satu spesies parasit malaria dalam satu sampel, sehingga berguna dalam kasus infeksi campuran. Selain itu, Pemeriksaan mikroskopis memungkinkan identifikasi morfologi parasit malaria, seperti bentuk sel dan strukturnya, yang dapat memberikan informasi tambahan tentang infeksi dan terapi (Hopkins & Cunningham, 2019).

Sensitifitas pemeriksaan mikroskopis sangat bergantung pada kemampuan serta pengalaman operator (*operator dependent*) dan kadar parasitemia. Jika parasitemia kurang 0.01 % atau adanya sekuesterasi dan sitoaderen *P. falciparum* yaitu parasit berada di deep vein (*sequestered* di otak, limfa, hati, plasenta). Hasil pemeriksaan mikroskopis dapat menjadi (negatif palsu) (Lardo.s, 2020).

2.1.5.2 **Rapid Diagnostic Test (RDT)**

Prinsip dasar *Rapid Diagnostic Test* (RDT) atau *Immunochromatography Test* (ICT) , melibatkan migrasi larutan melalui membran nitroselulosa, selama migrasi larutan antigen parasit dapat terdeteksi dengan menggunakan antibodi monoklonal yang telah dilabeli menggunakan pewarnaan selenium. Cara kerja RDT dimulai ketika tetesan darah jatuh pada area sampel dan bercampur dengan buffer yang diberikan, maka larutan akan bermigrasi disepanjang membran. Jika antigen parasit terdeteksi di dalam sampel, Antibodi (Ab) berlabel pewarna akan berikatan dengan antigen, kemudian membentuk kompleks ikatan antigen-antibodi yang akan ditampilkan pada garis uji. Kelebihan ikatan kompleks akan terperangkap dan menumpuk pada garis kontrol. Intensitas warna garis yang muncul dapat mencerminkan jumlah antigen parasit yang terdeteksi dalam sampel (Howard et al., 1986).

SCHEMATIC REPRESENTATION OF IMMUNOLOGIC REACTION ON A POSITIVE STRIP (EXAMPLE *P. VIVAX* INFECTION)



Gambar 2. 2 Representasi Reaksi Immunologis pada RDT

RDT/ICT dapat mendeteksi antigen yang dihasilkan oleh *Plasmodium*, seperti *Histidin-Rich Protein 2* (HRP-2) yang spesifik pada *P. falciparum* atau enzim seperti *Pan-Plasmodium Lactate Dehydrogenase* (pLDH) (spesifik *P. falciparum* pLDH, pan specific pLDH, spesifik *P. vivax* pLDH dan Aldolase (pan spesifik) untuk mendeteksi *Plasmodium sp.* Metode pemeriksaan ini telah banyak digunakan dan dianggap sebagai alternatif untuk pemeriksaan malaria (Daily et al., 2022)(Fransisca et al., 2015).

Keuntungan menggunakan RDT adalah waktu pemrosesan dan tes yang cepat. Selain itu, RDT tidak bergantung pada teknisi atau operator yang andal dan tidak memerlukan peralatan khusus atau listrik sehingga cocok untuk digunakan dalam situasi dan keadaan minim sumber daya listrik. Menjadikan RDT sebagai metode diagnostik malaria yang sangat berguna di daerah endemik (Mayxay et al., 2001).

RDT/ICT memiliki beberapa kelemahan, yakni dari hasil pemeriksaan RDT/ICT kadang tidak sesuai dengan hasil mikroskopis dan hasil pemeriksaan RDT dapat positif palsu /negatif palsu. Parasit yang *sequestered* di *deep vein* atau organ akan memberikan hasil RDT/ICT positif tetapi mikroskopis negatif. Hasil

positif palsu juga dapat diakibatkan oleh antigen yang persisten tetap berada dalam sirkulasi pasien pasca malaria . Sensitivitas RDT juga dapat menurun karena kepadatan parasit yang rendah dan fenomena *prozona* (hiperparasitemia/malaria berat/kelebihan antigen). Fenomena ini akan menyebabkan habisnya antibodi, yang menyebabkan hilangnya sinyal (negatif palsu) (Krause et al., 2017).

2.1.6 Teknik Diagnostik Molekular

Penemuan struktur DNA menjadi alasan kuat berkembang pesatnya ilmu biomolekuler, salah satunya dalam bidang pengembangan teknik biologi molekuler penting yang disebut teknologi *Nucleic Acid Amplification Tests* (NAATs). NAATs sangat sensitif karena kemampuannya untuk mengamplifikasi fragmen DNA atau RNA target yang sangat spesifik. Ada banyak jenis pembagian NAATs , beberapa diantaranya adalah *Real-Time* PCR, PCR Konvensional, *Nested* PCR dan Isothermal PCR.

PCR adalah teknik genotipe yang paling sering digunakan di laboratorium karena metodologi siklus termal yang spesifik, sederhana, dan sensitif. PCR telah memberikan kesempatan dan potensi untuk merancang metode deteksi parasit yang sangat sensitif dan spesifik hingga memungkinkan identifikasi genom parasit pada tingkat spesies (Berzosa et al., 2018).

PCR telah dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan dan kelemahan metode diagnostik malaria konvensional. Semua sampel yang ditemukan positif malaria dengan metode konvensional dapat divalidasi menggunakan PCR. PCR telah digunakan tidak hanya untuk identifikasi penyakit tetapi juga untuk identifikasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) dan metilasi pada DNA (Berzosa et al., 2018).

Tabel 2. 2 Perbandingan antara metode konvensional dan molekuler untuk diagnosis malaria

Parameter	Pemeriksaan Mikroskopis	PCR
Prinsip	Identifikasi dan Interpretasi morfologis	Amplifikasi DNA
Sasaran Diagnosis	Semua tahap parasit (trofozoit awal, trofozoit dewasa, skizon, dan gametosit)	Subunit kecil rRNA/ssrRNA, SICAvan gen
Sensitivitas	Hingga 5 parasit/ μ l (pakar mikroskopis) 50–100 parasit / μ l (mikroskop rata-rata)	Di bawah lima parasit/ μ l
Spesifisitas	Tinggi (kecuali untuk <i>P.knowlesi</i>), sulit untuk membedakan infeksi tunggal dan campuran	Tinggi, dapat mengidentifikasi dan membedakan di antara spesies
Waktu Pengerjaan	Hingga 60 mnt	2–8 jam
Hasil	Kuantitatif	Kuantitatif dan kualitatif

Pemeriksaan mikroskopis memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah biaya pemeriksaan yang lebih murah dibandingkan PCR, hasil pemeriksaan yang dapat disimpan untuk waktu yang lama, dan dapat digunakan untuk memantau efektivitas terapi. Kelemahan pemeriksaan mikroskopis terletak pada hasil pemeriksaan yang bergantung pada pengalaman dan kemampuan pemeriksa (*operator dependent*) dan memerlukan mikroskop (Puspa Wardhani et al, 2020)(Fitri et al., 2019).

PCR memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah jumlah sampel yang diperlukan lebih sedikit dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Kelemahan PCR terletak pada biaya

pemeriksaan yang lebih mahal serta hasil yang lebih lama (Fransisca et al, 2018).

2.1.6.1 PCR Konvensional

PCR Konvensional adalah metode diagnostik molekuler yang menggunakan konsep amplifikasi gen yang dilakukan pada suatu siklus termal yang berubah-ubah. Proses amplifikasi terdiri dari beberapa tahapan yakni *denaturation*, *annealing*, dan *extention*, dalam setiap proses tersebut dipengaruhi waktu dan suhu yang tepat (Ponce et al., 2017).

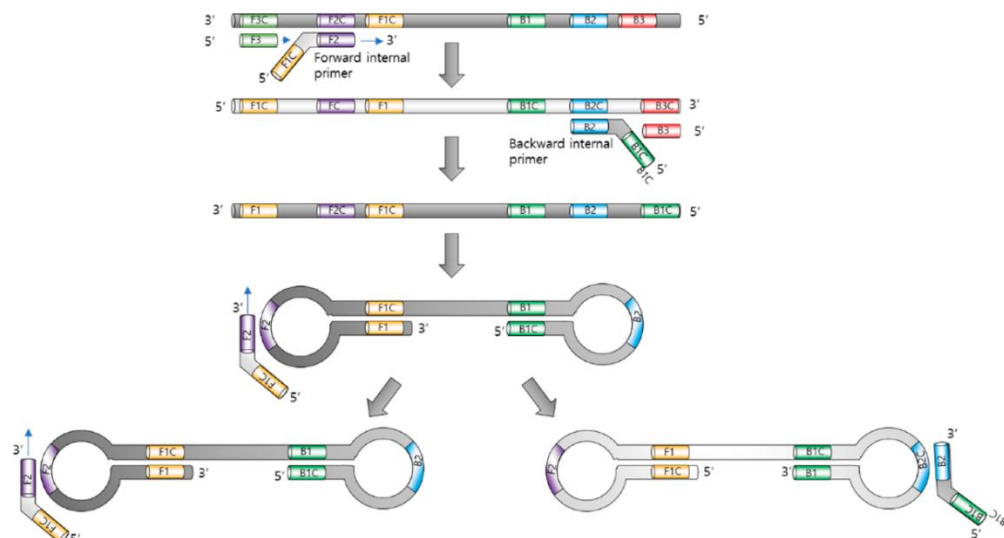
Tahapan *denaturation* adalah tahapan pelepasan ikatan hidrogen untai DNA agar terjadi tahapan *annealing* yakni, penempelan *forward* dan *reverse* primer pada situs perlekatan spesifik yang dikehendaki dan beralih pada tahap *extention* dimana untai DNA baru akan disintesis. Amplikon DNA hasil sintesis dapat disimpan di dalam *freezer* atau langsung divisualisasikan menggunakan elektroforesis dan *UV transluminator* (Cook et al., 2015).

2.1.6.2 Isothermal PCR

Isothermal PCR adalah metode diagnostik molekuler yang menggunakan teknik amplifikasi DNA pada siklus suhu yang konstan. Isothermal PCR berkembang menjadi berbagai macam teknik seperti : *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA), *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), dan sebagainya (Siswanto, 2017).

LAMP merupakan salah satu jenis *Isothermal PCR* yang dapat digunakan untuk pemeriksaan diagnosis malaria. LAMP menggunakan DNA polimerase *Bacillus stearothermophilus* sehingga proses amplifikasi dapat dilakukan dalam suhu yang konstan (isothermal). LAMP memberikan efisiensi tinggi, dengan DNA yang dapat diamplifikasi hingga 10⁹–10¹⁰ kali dalam 15-60 menit dan memungkinkan visualisasi menggunakan mata telanjang

dengan pewarna SYBR Green I. Metode LAMP untuk diagnosis malaria menargetkan genom mitokondria *Plasmodium sp.* dengan memerlukan 6 set primer (Cuadros et al., 2017).



Gambar 2. 3 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

LAMP memiliki keuntungan besar amplifikasi asam nukleat (RNA dan DNA) pada suhu konstan (isotermal), biasanya sekitar 62–65°C tanpa denaturasi awal yang membutuhkan lebih sedikit waktu. Penggunaan *waterbath* pada LAMP dapat digantikan menggunakan termos dan tidak memerlukan *thermocycler* seperti pada PCR Konvensional. Proses amplifikasi LAMP menggunakan untai-pengganti DNA polimerase, dan dua dari empat sampai enam primer menggunakan struktur berbentuk loop untuk membuat putaran amplifikasi selanjutnya menjadi lebih mudah (Cook et al., 2015)(Park, 2022)

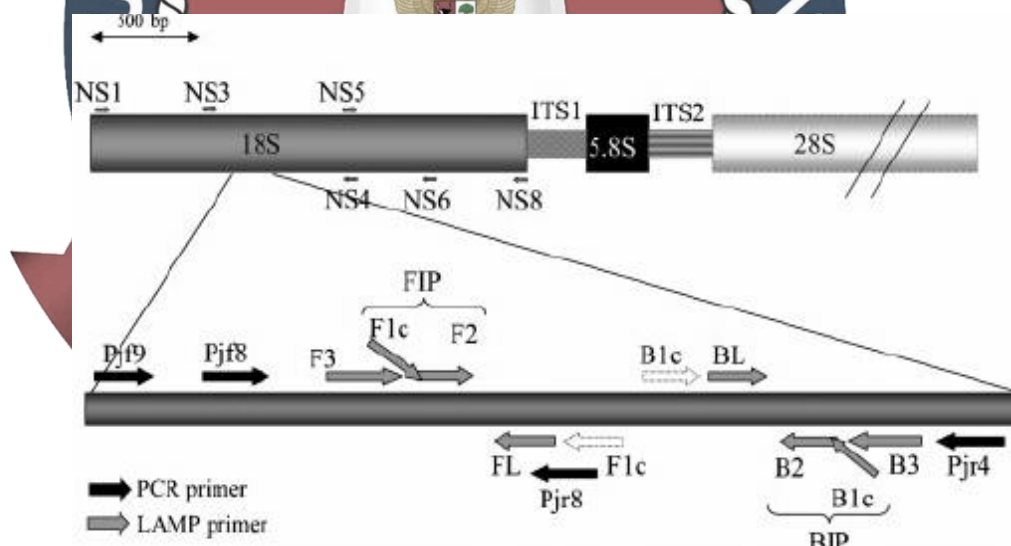
Prinsip dasar desain primer LAMP adalah dengan mendesain primer pada enam regio pada sekuens target yang terdiri atas F3, F2, F1, B1, B2, dan B3. *Primer Inner Forward (FIP)* terdiri dari primer F2 (di ujung 3') yang komplementer dengan region F2c, dan primer F1c (di ujung 5'). *Backward Inner Primer (BIP)* terdiri dari primer B2 pada ujung 3' dan primer B1c (primer dengan sekuens complement) pada ujung 5'. Selain itu, *Primer Loop Forward*

dirancang menggunakan strand komplementer yang menghubungkan sekuens antara primer F1 dan F2, sementara *Primer Loop Backward* dirancang menggunakan strand komplementer yang menghubungkan sekuens primer B1 dan B2.

LAMP juga memiliki toleransi terhadap zat non-uji yang ada dalam sampel darah (seperti hemoglobin dan imunoglobulin) dan dapat dilakukan dengan jumlah sampel darah yang sedikit (Cook et al., 2015) Tes berbasis LAMP cocok untuk mendeteksi infeksi malaria parasitemia rendah di lapangan dan mungkin menjadi metode yang berguna dalam program pengendalian dan eliminasi malaria. Studi sampel yang lebih luas tentang evaluasi LAMP dalam surveilans pasif malaria diperlukan di masa mendatang (Piera et al., 2017).

2.1.7 Kandidat Gen Target *Plasmodium sp.*

2.1.7.1 Gen 18S rRNA



Gambar 2. 4 Primer LAMP dan 18S rRNA

Gen 18S rRNA adalah bagian dari ribosomal RNA (rRNA) pada sel eukariotik dan merupakan salah satu komponen dasar dari penyusunan sel-sel tersebut. Gen ini sering digunakan dalam studi filogenetik dan sebagai penanda penting untuk berbagai aplikasi di bidang biologi molekuler, termasuk dalam deteksi parasit malaria *Plasmodium*. Selain itu, gen 18S rRNA memiliki keunggulan dalam

hal sensitivitas dan keberadaannya yang melimpah dalam genom, sehingga menyediakan jumlah DNA cetakan yang cukup untuk reaksi PCR, bahkan pada organisme terkecil sekalipun (Zhang et al., 2010).

Gen 18S rRNA sering digunakan dalam deteksi malaria dengan LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) karena keberhasilannya dalam mengamplifikasi gen *Plasmodium*. Studi telah menunjukkan bahwa LAMP assay untuk 18S rRNA *Plasmodium* sensitif dan berguna untuk mendeteksi malaria, terutama pada kasus pre-klinis dan sampel negatif setelah pemeriksaan mikroskopis dan RDT.

2.1.7.2 Gen CoX 3

Gen COX-III pada parasit penyebab malaria *Plasmodium sp* adalah gen yang kode untuk subunit kecil dari enzim *cytochrome oxidase* yang terdapat dalam geno, mitokondria parasit *Plasmodium*. Enzim ini berfungsi dalam proses dekomposisi oksida di mana karbon monoksida (KM) diubah menjadi karbon dioksida (KO₂) dengan menggunakan kalium (K⁺). Gen COX-III, seperti gen lainnya yang terkait dengan enzim ketombas, memiliki peran penting dalam metabolisme parasit *Plasmodium* dan dapat digunakan sebagai target untuk penelitian dan diagnosis malaria (Domingues et al., 2022).

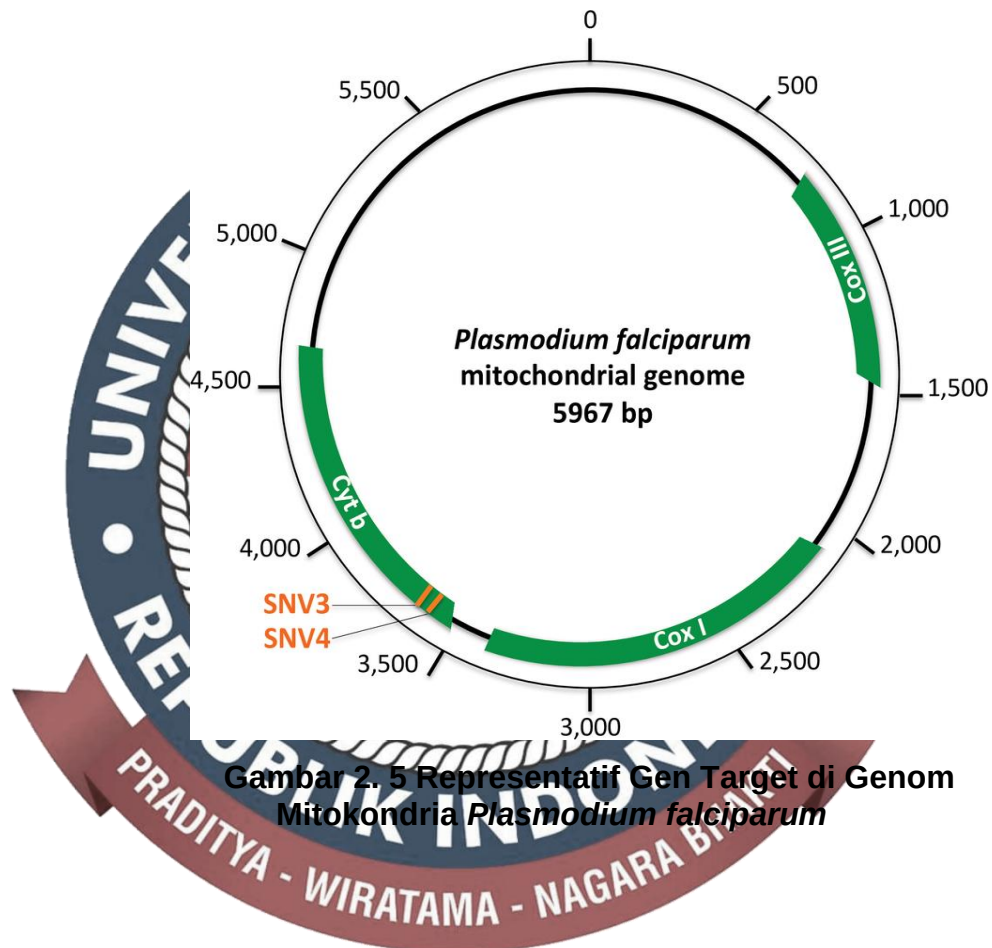
2.1.7.3 Gen COX-I

Gen COX-I adalah salah satu gen yang terdapat dalam genom mitokondria *Plasmodium sp* yang mengkode subunit 1 dari enzim sitokrom oksidase, yang terlibat dalam rantai transpor elektron di dalam mitokondria parasit. Gen ini pernah digunakan dalam penelitian untuk mendeteksi *Plasmodium sp* (Imwong et al., 2009).

2.1.7.4 Gen Cyt b

Gen Cyt b (*cytochrome b*) *Plasmodium* memiliki peran penting dalam penyakit malaria. Gen ini terlibat dalam rantai transpor elektron di dalam mitokondria *Plasmodium*, yang merupakan

proses kunci dalam metabolisme dan respirasi sel. Selain itu, gen Cyt b juga telah menjadi subjek penelitian yang signifikan dalam upaya untuk memahami variasi genetik dan resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap berbagai antimalaria. Variasi sekuens gen Cyt b pada isolat *Plasmodium falciparum* di Indonesia telah menjadi fokus penelitian untuk memahami polimorfisme genetik dan resistensi terhadap obat antimalaria (Délicat-Loembet et al., 2015).



Gambar 2. 5 Representatif Gen Target di Genom Mitokondria *Plasmodium falciparum*

Hasil Penelitian Terdahulu

Tabel 2. 3 Tinjauan literatur penelitian sebelumnya

No	Penulis dan Tahun	Judul	Tujuan & Metode	Hasil
1	(Imai et al., 2017)	A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer	Tujuan Mengaplikasikan prosedur diagnostik baru untuk malaria pada manusia menggunakan loop mediated isothermal amplification (LAMP) dan sequencer nanopore MinION™. Metode Desain primer LAMP spesifik yang menargetkan gen 18S-rRNA dari kelima spesies <i>Plasmodium</i> manusia termasuk dua subspecies <i>P. ovale</i> (<i>P.</i>	LAMP Primer (5'-...-3'): F3 GAAATTCTAAGATTTTCTGGAGAC B3 AGTTTTCCCGTGTTGAGT FIP TATGGTTAAGATTACGACGGTATCTG- RCAACTGCCAAGGCATW BIP TCGGTTCTGGGGCGAGTATT- CAAATTAAGCCGCAAGCT LF CAATCCCTTAACTTTCGTTCTTGAT LB CGCGCAAGCGAGAAAGTTA

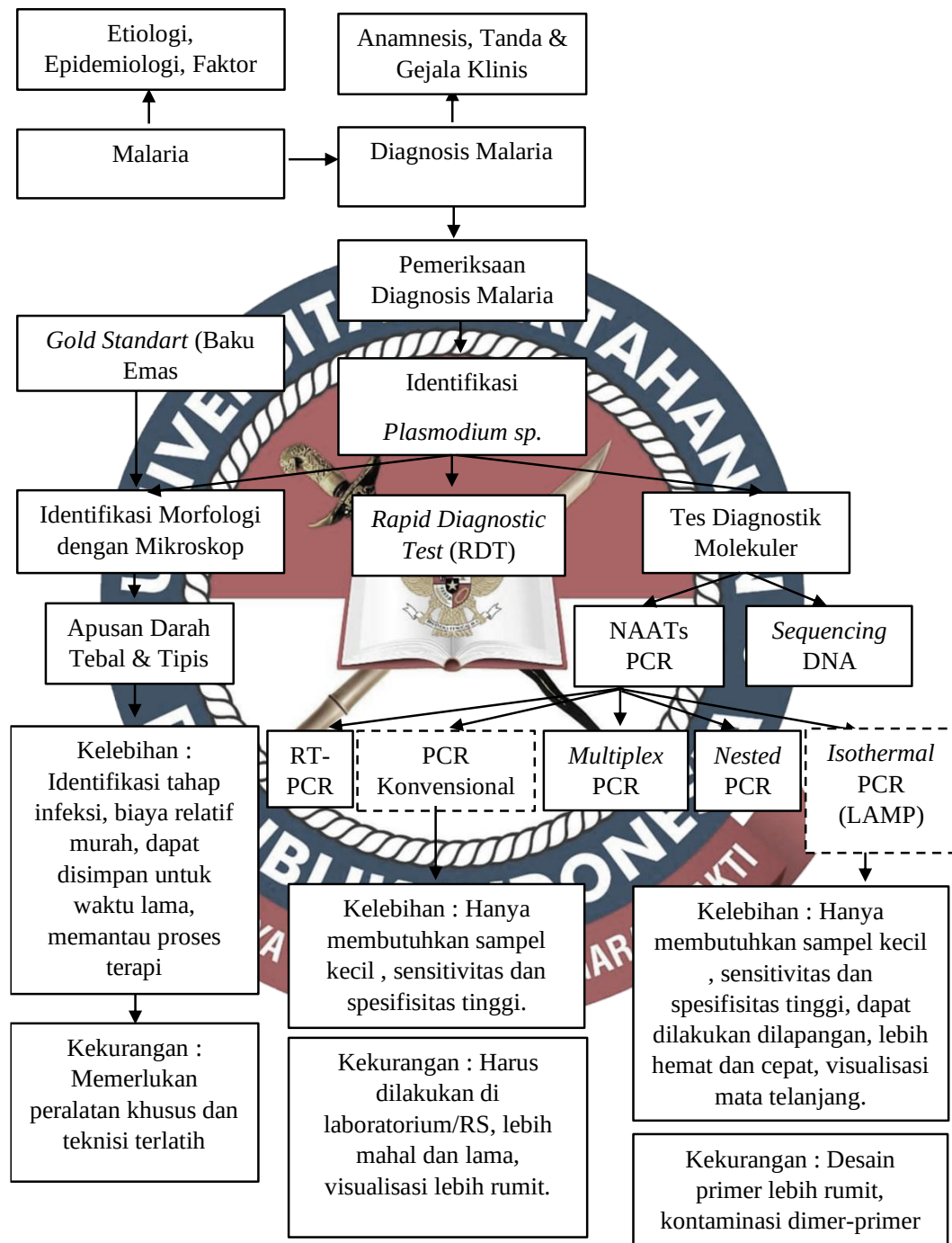
			<i>falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale wallikeri</i>, <i>P. ovale curtisi</i>, <i>P. knowlesi</i> dan <i>P. malariae</i>) dan uji menggunakan LAMP PCR dan sequencer nanopore MinION™.	
2	(Han et al., 2007)	<i>Detection of Four Plasmodium Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis</i>	Tujuan LAMP untuk deteksi klinis dan identifikasi <i>Plasmodium</i> sp. Teknik ini dievaluasi dengan sampel darah yang diperoleh dari pusat kesehatan primer. Metode Primer LAMP spesifik genus dan spesies <i>Plasmodium</i> yang tersisa dirancang berdasarkan urutan nukleotida spesifik genus dan spesies dari gen 18S rRNA	Primer LAMP genus <i>Plasmodium</i> yang di desain dalam penelitian ini (5'-....-3'): F3 GTATCAATCGAGTTTCTGACC B3c CTTGTCACCTCTCTTCT FIP(F1cF2) TCGAACTCTAATTCCCCGTTACCTATCAGCTTTTGA TGTTAGGGT BIP(B1B2c) CGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGAATTGGGTAAT TTACGCG LPF CGTCATAGCCATGTTAGGCC LPB AGCTACCACATCTAAGGAAGGCAG

3	(Pohua ng & Junnu, 2019)	<i>Molecular characterization of Plasmodium juxtannucleare in Thai native fowls based on partial cytochrome C oxidase subunit I gene</i>	Tujuan Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi parasit malaria yang menginfeksi unggas asli Thailand dengan menggunakan teknik molekuler berdasarkan gen parsial COX-I. Metode Analisis sekuens nukleotida gen COX-I dan filogenetik untuk struktur homolog.	Desain Primer PCR <i>Plasmodium sp</i> yang didapatkan oleh peneliti memiliki kemampuan deteksi <i>Plasmodium sp</i> hingga 100% yang divalidasi dengan penggunaan teknik PCR. Target gen yang digunakan adalah gen partial COX-I dengan panjang 588(bp) : Primer forward CoxI-F1 (5'-GCGTACTTTGGACCGAAAAA-3') dan Primer reverse CoxI-R1 (5'-CATCCAGTACCACCACCAAA -3')
4	(Echeverry et al., 2017)	<i>Fast and robust single PCR for Plasmodium</i>	Tujuan Menyediakan alat diagnostik molekuler baru peningkatan deteksi infeksi malaria pada	Uji Primer PCR COX-I yang cepat memerlukan waktu 1 jam untuk mendeteksi DNA parasit serendah 0,043 pg (setara dengan dua parasit) dalam satu reaksi PCR

		<i>sporozoite detection in mosquitoes using the cytochrome oxidase I gene</i>	nyamuk dalam segi sensitivitas dan bisa digunakan untuk studi entomologi malaria. Metode Primer PCR <i>Plasmodium</i> dengan gen target sitokrom oksidase I (COX-I) dibandingkan dengan PCR dengan primer dari gen target 18S-rRNA menggunakan pengenceran serial (330–0,0012 pg) DNA dari <i>Plasmodium vivax</i>, <i>Plasmodium falciparum</i> dan <i>Plasmodium knowlesi</i>	dengan primer <i>Plasmodium sp</i> : COX-IF (5' AGAACGAACGCTTTTA ACGCCTG 3') and COX-IR (3' ACTTAATGGTGGAT ATAAAGTCCATCCwGT 5') sedangkan analisis dengan <i>Nested PCR</i> 18S-rRNA memerlukan waktu 4 jam untuk menyelesaikannya.
--	--	--	---	---

Sumber: diolah oleh peneliti

2.2 Kerangka Berpikir



Gambar 2. 6 Bagan Kerangka Teori

Sumber: diolah oleh peneliti

