

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Malaria

Malaria merupakan salah satu penyakit yang penularannya melalui gigitan nyamuk *Anopheles* (Marni, 2016). Sedangkan menurut Poespoprodjo dalam (Harijanto, 2018) mengemukakan bahwa Infeksi Malaria disebabkan oleh 5 (lima) spesies Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi*). (Najmah, 2016) juga mengemukakan bahwa Plasmodium malaria akan hidup dan berkembang biak dalam sel darah merah manusia dan dapat ditularkan dari manusia ke manusia lain melalui gigitan nyamuk *Anopheles* yang terinfeksi.

Malaria masih menjadi masalah besar dalam dunia kesehatan di masyarakat karena dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, balita, dan ibu hamil. Angka kesakitan penyakit ini relatif masih cukup tinggi terutama di kawasan Indonesia bagian timur. Oleh karena itu upaya pengendalian malaria perlu kita tingkatkan terus antara lain dengan meningkatkan kemampuan, keterampilan para pelaksananya disemua lini pelayanan kesehatan yang ada fasilitas laboratoriumnya. Peran tersebut terutama sangat ditentukan oleh tenaga laboratorium/ mikroskopis, karena mikroskopis berada digaris depan pelayanan kesehatan (Puskesmas, Rumah Sakit) (Kemenkes RI, 2017).

2. Pemeriksaan Malaria

Secara umum pemeriksaan malaria dibagi menjadi dua yaitu pemeriksaan pemeriksaan mikroskopis dan non mikroskopis (uji imunologi terhadap antigen dari parasit malaria/ RDT dan Biomolekuler/ PCR). Sebagai baku emas pemeriksaan malaria adalah pemeriksaan mikroskopis untuk menemukan adanya parasit di dalam darah penderita. Uji imunologis digunakan untuk membantu diagnosis pada tempat dengan sumber daya terbatas (Rachmawati, B., dkk, 2021).

a. Pemeriksaan Non Mikroskopis

1) RDT (Rapid Diagnostic Test/ Tes diagnostic cepat) Malaria

Uji Diagnostik Cepat atau *Rapid Diagnostic Test* (RDT) ini menggunakan metoda imunokromatografi. Prinsip uji Imunokromatografi adalah teknik untuk memisahkan dan mengidentifikasi antigen atau antibodi yang terlarut dalam sampel. Pada uji RDT malaria, antigen dari parasit malaria yang lisis dalam darah akan terdeteksi. Pada strip RDT terdapat antibodi yang mampu menangkap antigen yang akan membedakan garis kontrol (goat anti-mouse monoclonal antibodi) yang akan memastikan fase bergerak uji RDT bermigrasi dengan benar, garis umum yang dimiliki semua spesies *Plasmodium*, dan garis spesifik *P. falciparum* (Kemenkes RI, 2020).

2) Pemeriksaan Biomolekuler

Pemeriksaan biomolekuler digunakan untuk mendeteksi DNA spesifik parasit dalam darah penderita malaria. Tes ini menggunakan DNA lengkap, caranya dengan melisis eritrosit untuk mendapatkan ekstrak DNA. DNA yang didapat difiksasi pada membran filter, kemudian didenaturasi untuk selanjutnya diinkubasikan dengan pelacak yang berlabel enzim atau radioaktif (Rachmawati, B., dkk, 2021).

b. Pemeriksaan Mikroskopis

Diagnosis definitif demam malaria ditegakkan dengan ditemukannya parasit *Plasmodium* dalam darah penderita. Pemeriksaan mikroskopis satu kali dengan hasil negatif tidak menyingkirkan diagnosis demam malaria pada daerah endemis. Diperlukan pemeriksaan serial dengan interval 1 hari.

Pemeriksaan mikroskopis membutuhkan syarat-syarat tertentu untuk mempunyai nilai diagnostik yang baik, yaitu waktu pengambilan yang tepat, volume darah yang cukup, kualitas preparat yang baik, kemampuan dalam mengidentifikasi spesies malaria yang baik. Waktu pengambilan yang tepat adalah pada akhir periode demam hingga awal periode berkeringat. Pada periode tersebut jumlah tropozoit yang memasuki sirkulasi mencapai jumlah maksimal dan cukup matur sehingga

memudahkan proses identifikasi. Volume sampel darah yang dibutuhkan adalah sampel kapiler sebanyak 3-4 uL untuk sediaan darah tebal dan 1-1,5 uL untuk sediaan darah tipis. Kualitas pembuatan preparat yang baik akan menjamin identifikasi spesies plasmodium yang tepat.

Preparat yang diperlukan untuk pemeriksaan mikroskopis adalah sediaan darah tebal dan tipis. Sediaan darah tebal tidak menggunakan cairan fiksasi, sedangkan sediaan darah tipis menggunakan metanol absolut sebagai cairan fiksasinya. Sediaan darah tebal cukup baik untuk mengetahui ada tidaknya parasit malaria dalam sampel, sedangkan sediaan darah tipis baik digunakan untuk mengidentifikasi spesies plasmodiumnya. Untuk mendapatkan preparat yang baik memerlukan penanganan yang baik, mulai dari proses pengeringan, pemilihan cat dan buffer.

Pembuatan preparat sediaan darah tebal dan tipis dapat dilakukan pada satu objek glass. Pemilihan cat sangat penting untuk identifikasi. Giemsa merupakan pewarna yang paling sering digunakan karena murah, mudah didapat dan prosedur penggunaannya yang sederhana. Buffer yang digunakan pada pengecatan Giemsa adalah buffer pospat dengan pH 7,2. Kemampuan pemeriksa dalam mengidentifikasi sangat berpengaruh, pengetahuan dasar mengenai morfologi parasit, jam terbang yang tinggi, tersedianya peralatan yang baik sangat mendukung ketepatan diagnosis spesies plasmodium. Identifikasi morfologi sangat penting sebagai dasar pemilihan pengobatan. Pembacaan preparat dilakukan pada perbesaran objektif 100x dengan bantuan minyak emersi (Rachmawati, B., dkk, 2021).

1) Sediaan Darah Malaria

Sediaan darah yang diperlukan untuk pemeriksaan mikroskopis adalah sediaan darah tebal dan tipis. Sediaan darah tebal tidak menggunakan cairan fiksasi, sedangkan sediaan darah tipis menggunakan metanol absolut sebagai cairan fiksasinya. Sediaan darah tebal cukup baik untuk mengetahui ada tidaknya parasit malaria dalam sampel, sedangkan sediaan darah tipis baik digunakan

untuk mengidentifikasi spesies plasmodium nya. Untuk mendapatkan preparat yang baik memerlukan penanganan yang baik, mulai dari proses pengeringan, pemilihan cat dan buffer. Pembuatan preparat sediaan darah tebal dan tipis dapat dilakukan pada satu objek glass (Rachmawati, B., dkk, 2021).

Sediaan darah harus dibuat sesegera mungkin, idealnya sebelum terapi antimalaria dimulai. Baik darah kapiler maupun darah vena yang diambil melalui pungsi vena cukup untuk diagnosis malaria. Metode finger stick (kapiler) sering digunakan karena antikoagulan dalam darah pungsi vena dapat mengubah morfologi parasit. Namun, di daerah malaria tidak endemik, darah biasanya diambil melalui pungsi vena, dan ketika metode ini digunakan, antikoagulan yang dipilih adalah EDTA. Untuk menghindari paparan EDTA yang berkepanjangan, apusan darah harus dibuat sesegera mungkin setelah pengambilan darah (Mathison and Pritt, 2017). WHO (2015) menegaskan bahwa sediaan darah tebal dan tipis sebaiknya dibuat dalam waktu kurang dari 1 jam sejak pengambilan darah, terutama jika darah mengandung EDTA, guna menghindari perubahan morfologi parasit yang dapat mengganggu interpretasi mikroskopis.

2) Kriteria Sediaan Darah yang Berkualitas Baik

- a) Latar belakang pandangan (background) di mikroskop tampak jernih. Pada sediaan darah tebal, proses hemolisis harus berlangsung sempurna.
- b) Pewarnaan pada inti parasit merah dan sitoplasmanya biru. Warna-warna merah, ungu, biru dan hitam harus kontras sehingga mudah dibedakan.
- c) Sediaan darah harus bersih, waktu pengambilan sediaan darah tidak tercemar debu, daki, lemak, minyak, jasad renik/ mikroba/ jamur.
- d) Volume darah yang diambil harus cukup yaitu 0,5 ml (2-3 tetes).

- e) Ketebalan sediaan darah harus baik, tampak transparan bila sediaan darah yang masih basah diletakkan di atas kertas bertulis.
- f) Sediaan darah tidak boleh terfiksasi, hal ini akan menyebabkan proses pewarnaan terhambat dan berwarna kehitaman. Fiksasi terjadi karena terkena alkohol, spiritus atau uapnya, panas, sinar matahari langsung atau terlambat mewarnai sampai beberapa hari (Rachmawati, B., dkk, 2021).

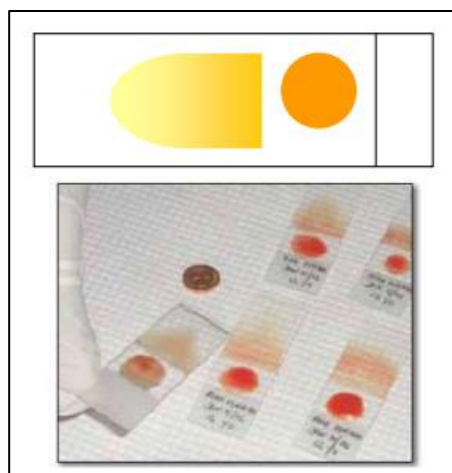
3) Cara Pengambilan Sediaan Darah

- a) Ambil gelas obyek, tulis kode penderita sesuai dengan pada format pendaftaran dan tanggal pengambilan sediaan darah. Penulisan kode menggunakan pensil (bukan bolpoin) karena akan luntur bila kena larutan fiksasi atau minyak emersi.
- b) Pegang jari manis atau tengah tangan kiri pasien (ibu jari, jari telunjuk dan kelingking) tidak dianjurkan pada orang dewasa 23 karena bila terjadi infeksi akan mudah menjalar. Pada bayi umur 6 – 12 bulan dapat digunakan ibu jari kaki, sedangkan bayi dibawah 6 bulan pada tumit kaki. Gosok ujung jari dengan kapas beralkohol sambil dipijat untuk menstimulasi sirkulasi darah dan keringkan dengan kapas kering.
- c) Tusuk ujung jari menggunakan lancet steril dengan gerakan cepat pada bagian pinggir (kulit tipis) dan menyilang garis sidik jari (lihat gambar). Lancet bekas harus dibuang dan tidak boleh digunakan lagi untuk penderita yang lain.
- d) Tetesan darah pertama diusap menggunakan kapas kering. Tetesan darah yang pertama bercampur dengan cairan limfatik dan kemungkinan alkohol (Rachmawati, B., dkk, 2021).

4) Cara Pembuatan Sediaan Darah Tipis dan Tebal

- a) Ambil gelas obyek yang bersih dan sudah dilabel/ dikode, kemudian koleksi sediaan darah sebagai berikut :

- b) Tekan ujung jari sampai tetesan darah kedua keluar dan kumpulkan satu tetes darah pada salah satu permukaan bagian tengah kaca sediaan, ini untuk sediaan darah tipis.
- c) Tekan kembali untuk mendapatkan darah dan kumpulkan sebanyak 2-3 tetes sebesar pada kaca sediaan didekat etiket (kode) untuk sediaan darah tebal.
- d) Buat hapusan tipis terlebih dahulu dengan menggunakan gelas obyek yang lain (spreader). Letakkan ujung spreader pada tetesan darah dengan posisi datar sampai darah rata dari ujung ke ujung. Gesekkan spreader sepanjang gelas obyek dengan sudut kemiringan 45° .
- e) Buat sediaan darah tebal menggunakan sudut spreader, dengan gerakan melingkar dari luar ke dalam (3-6 putaran) sehingga membentuk bulatan berdiameter 1 cm.
- f) Letakkan kaca sediaan di tempat datar sampai darah kering oleh udara dan dijaga dari gangguan lalat dan debu. Masukkan sediaan darah yang sudah kering dalam kotak slide, dan segera diwarnai selambat-lambatnya 24 jam (Rachmawati, B., dkk, 2021).



Sumber: Rachmawati, 2021

Gambar 2.1. Pembuatan sediaan tipis dan tebal yang baik.

3. Pewarnaan Giemsa

Pemeriksaan parasit malaria dapat dilakukan dengan berbagai cara, paling sering dan merupakan standart yang ditetapkan oleh WHO adalah

pewarnaan Giemsa. Keuntungan pewarnaan Giemsa adalah murah , mudah dan tidak memerlukan peralatan mahal/ canggih. Namun memerlukan waktu lama dan pengalaman dalam menentukan parasit. Pewarnaan Giemsa, merupakan campuran eosin (warna merah muda), metilen biru dan metilen azuur. Parasit malaria mempunyai berbagai stadium dalam perkembangannya, bila diwarnai dengan pewarna Giemsa berbagai bagian parasit akan memberi warna yang sama yaitu warna merah pada kromatin (inti) dan biru pada sitoplasma (Rachmawati, B., dkk, 2021).

a. Kriteria Pewarnaan yang Baik

- 1) Secara makroskopis : Sediaan darah tampak jernih dan transparan. Warna sediaan darah merupakan kombinasi warna merah, ungu dan biru.
- 2) Secara mikroskopis : Latar belakang berwarna jernih, biru pucat atau pucat kemerahan.
- 3) Benda-benda/ sel-sel berwarna kontras dan jelas : merah, ungu, biru, hitam.
- 4) Sebagian besar leukosit, dinding sel dan sitoplasma dapat dilihat.
- 5) Bersih dari partikel-partikel/ endapan zat warna Giemsa.

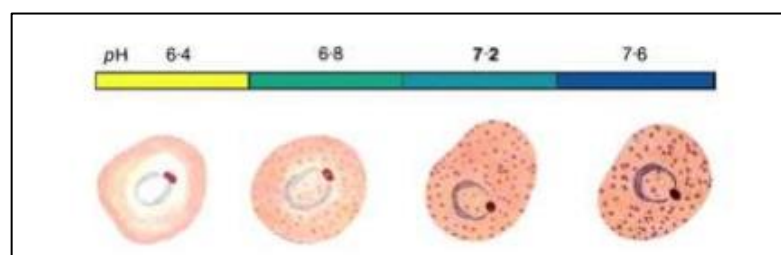
b. Faktor-Faktor yang Menentukan Mutu Pewarnaan

- 1) Kualitas zat pewarna Giemsa

Stok Giemsa tidak tercemar air dan komposisinya terdiri dari eosin, metilin biru dan azuur masih aktif. Parasit malaria di dalam darah tidak dapat dilihat apabila bagian-bagian parasit tidak bereaksi dengan zat warna Giemsa.

- 2) Kualitas larutan buffer

Larutan buffer pengecer Giemsa, mempunyai pH 7,2- 7,4.



Sumber: Rachmawati, 2021

Gambar 2.2 Pengaruh pH pada pewarnaan parasit malaria dengan Giemsa

- 3) Kepekatan larutan Giemsa Pewarnaan sediaan darah malaria adalah proses osmose, sebab itu dibutuhkan kepekatan tertentu dari larutan Giemsa dan waktu tertentu agar parasit menyerap zat warna. Jika kepekatan larutan dan waktu berlebihan atau kurang hasil pewarnaan kurang baik.
- 4) Kualitas pembuatan sediaan darah Ketebalan dan kerekatan (fiksasi) sediaan darah tebal akan mempengaruhi kualitas pewarnaan. Fiksasi yang berat menghambat pewarnaan dan proses hemolisis.
- 5) Kebersihan sediaan darah Endapan Giemsa dan golden scum yang mengambang di permukaan dapat tertinggal setelah proses pencucian, hal ini akan mengotori sediaan darah. Hindari membuang larutan Giemsa terlebih dahulu sebelum dibilas dengan air dan zat warna Giemsa mengalir keluar dari gelas obyek selama proses pengecatan (Rachmawati, B., dkk, 2021).
- 6) Suhu penyimpanan larutan buffer
Stabilitas pH buffer tidak hanya bergantung pada komposisi kimianya, tetapi juga pada suhu penyimpanan. Buffer yang disimpan pada suhu terlalu tinggi ($>30^{\circ}\text{C}$) dapat mengalami penguapan dan perubahan ionik yang menurunkan kestabilan pH, sementara suhu terlalu rendah dapat menyebabkan pengendapan zat terlarut. Oleh karena itu, buffer Giemsa sebaiknya disimpan pada suhu ruang yang stabil, yaitu sekitar 25°C , agar pH tetap konsisten dan tidak mengganggu hasil pewarnaan mikroskopis (Rachmawati et al., 2021).

c. Cara Pengecatan

- 1) Sediaan darah tipis yang akan dicat harus sudah difiksasi dengan methanol dan kering.
- 2) Larutan Giemsa stok diencerkan dengan buffer pelarut pH 7,2 menjadi larutan 3%.
- 3) Tuangkan larutan Giemsa hingga memenuhi seluruh kaca sediaan.

- 4) Bila satu kaca sediaan terdapat tetes tebal dan hapusan tipis, harus diwarnai pada waktu yang bersamaan setelah 18-24 jam pembuatan sediaan darah .
- 5) Waktu pengecatan 45 - 60 menit (konsentrasi Giemsa 3%)
- 6) Bilas dengan air mengalir (kran) sampai endapan Giemsa dan golden scum bersih, larutan Giemsa jangan dibuang dulu sebelum dibilas dengan air dan keringkan (WHO, 2016).

4. Pemeriksaan Morfologi *Plasmodium vivax* di Mikroskop

a. Morfologi Parasit Malaria

1) Pengenalan Parasit Malaria

Parasit malaria terdiri dari :

- a) Inti/ kromatin; bentuknya bulat dan berwarna merah.
- b) Sitoplasma; bentuknya seperti cincin sampai bentuk yang tidak beraturan, umumnya berwarna biru.

2) Stadium Parasit Malaria

Stadium parasit malaria yang dapat dilihat dalam SD sebagai berikut

a) Stadium Trofozoit

Merupakan stadium yang paling umum ditemukan, seringkali disebut sebagai stadium cincin. Meskipun tidak selalu terlihat berbentuk cincin yang sempurna.

Trofozoit merupakan stadium pertumbuhan, sehingga dapat ditemukan dalam berbagai ukuran dari kecil sampai besar. Pigmen merupakan hasil pertumbuhan/ metabolisme parasit, warnanya bervariasi dari kuning pucat sampai coklat kehitaman atau hitam.

b) Stadium Skizon

Pada stadium skizon terlihat inti membelah secara aseksual menjadi 2, 4, 8 dan seterusnya secara aseksual tanpa melibatkan sel kelamin jantan dan betina. Stadium skizon mempunyai beberapa fase mulai dari parasit dengan inti dua sampai parasit dengan banyak inti yang masing-masing intinya disertai dengan sitoplasma.

c) Stadium Gametosit

Merupakan stadium seksual yang akan menjadi sel kelamin jantan dan betina, berkembang lebih lanjut di dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina.

Gametosit dapat berbentuk bulat atau seperti pisang tergantung spesies. Warna dari sitoplasma parasit dapat digunakan untuk membedakan sel kelamin jantan (mikrogametosit) dan sel kelamin betina (makrogametosit).

3) Gambaran spesies parasit pada SD tipis.

Petunjuk yang paling sederhana untuk membedakan keempat spesies malaria adalah perubahan yang terlihat pada sel darah merah yang terinfeksi. Ukuran sel darah merah yang terinfeksi dapat terlihat membesar atau normal. Pada sitoplasma eritrosit yang terinfeksi dapat ditemukan titik Schuffner atau Maurer.

Disamping itu, petunjuk yang lainnya adalah keteraturan sitoplasma parasit. Sitoplasma yang teratur dapat berupa cincin, koma, tanda seru dan sayap burung terbang. Secara umum, pada infeksi *Plasmodium falciparum* dapat ditemukan satu stadium (trofozoit atau gametosit). Pada infeksi spesies lainnya dapat ditemukan berbagai stadium.

4) Gambaran spesies parasit pada SD tebal

Pada SD tebal tidak terlihat sel darah merah (karena lisis). Walaupun demikian parasit malaria tetap terlihat, meskipun ukurannya lebih kecil dibandingkan pada SD tipis.

Parasit malaria harus dicari dengan lebih teliti. Setiap berpindah lapang pandang, mikrometer digunakan untuk memfokuskan objek yang dilihat. Pada SD tebal, parasit dapat berada pada lapisan yang berbeda.

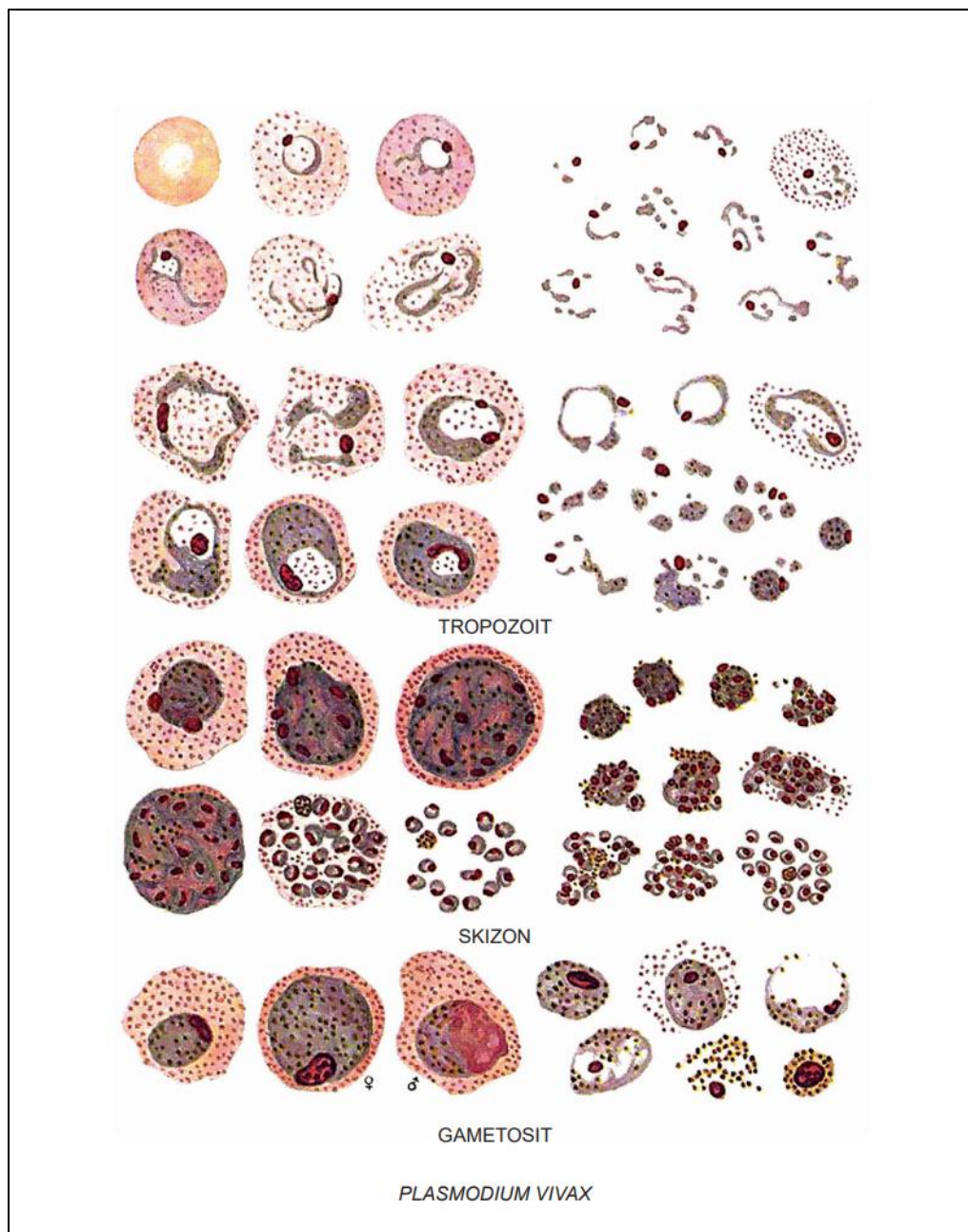
Sitoplasma trofozoit yang berbentuk cincin halus, dapat terlihat terputus putus atau tidak sempurna. Dengan lisisnya sel darah merah, titik Schuffner sulit dilihat demikian juga dengan titik Maurer. Walaupun demikian, masih terlihat sisa-sisa sel darah merah yang

mengelilingi parasit (zona merah/ bayangan merah). Kunci untuk identifikasi spesies parasit pada SD tipis dan SD tebal dapat dilihat pada gambar sketsa parasit 1-4 (Kemenkes RI, 2017).

b. *Plasmodium vivax*

Tropozoit muda tampak seperti cincin, dengan titik kromatin pada satu sisi. Pada stadium cincin yang tua, eritrosit yang diinfeksi membesar dan menjadi pucat, karena kekurangan hemoglobin. *Plasmodium vivax* mempunyai kecenderungan menginfeksi sel darah merah muda atau retikulosit (mempunyai ukuran yang lebih besar dibandingkan sel darah merah matur). Tropozoit yang tumbuh bentuknya bertambah besar dan tidak beraturan, mempunyai pigmen yang halus dan menunjukkan gerakan amoeboid yang jelas. Setelah 36 jam, tropozoit itu memenuhi lebih dari separuh eritrosit yang membesar, intinya mulai membelah menjadi skizon. Pada fase skizon, gerak parasit menjadi minimal, parasit memenuhi eritrosit yang besar, pigmen banyak berkumpul dalam sitoplasma. Setelah 48 jam, skizon mencapai ukurannya yang maksimal dan mengalami segmentasi yang maksimal juga. Pigmen berkumpul di pinggir, dan terdapat 16-18 merozoit yang berbentuk bulat atau lonjong, berdiameter 1,5-2 mikron.

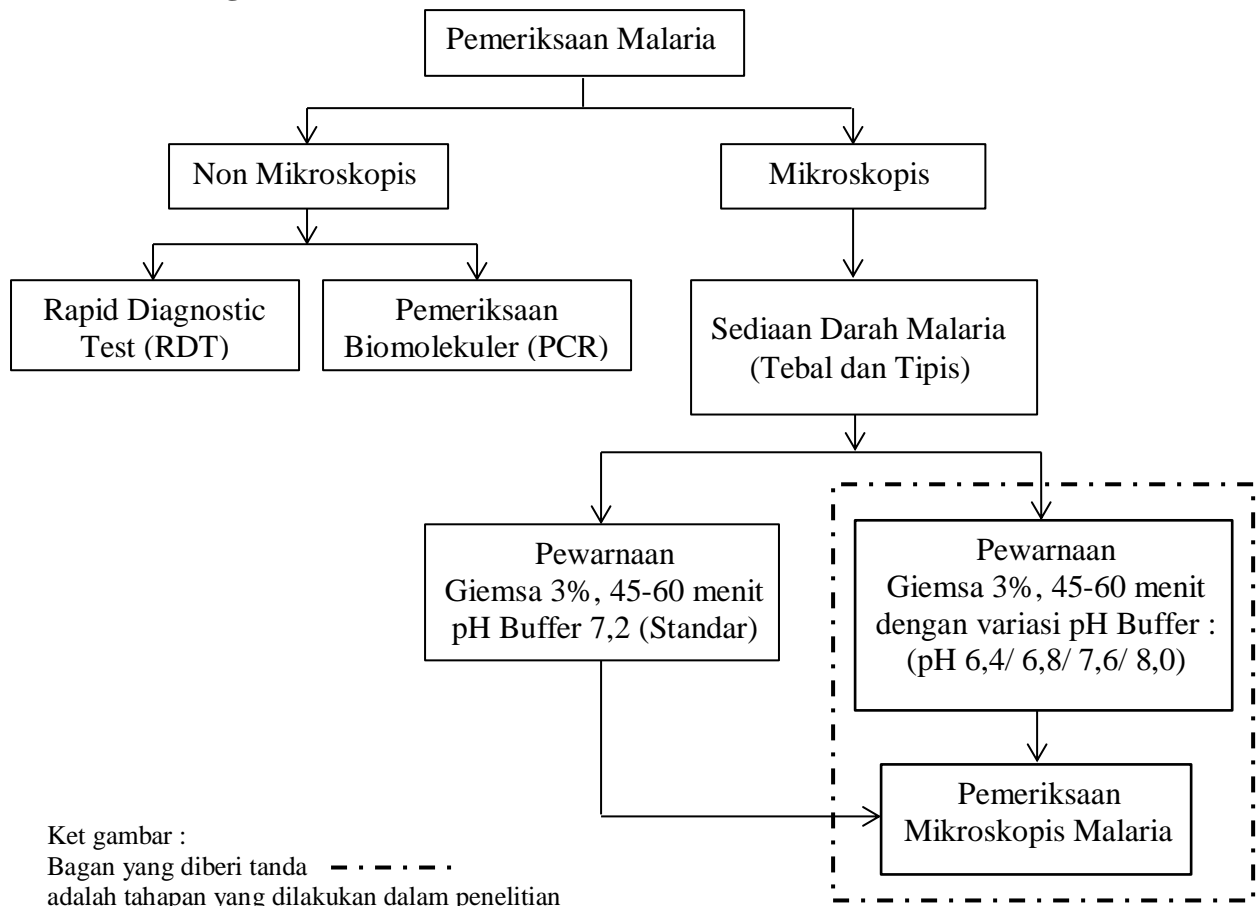
Gametosit berbentuk lonjong, mengisi hampir seluruh eritrosit. Mikrogametosit mempunyai inti yang besar, berwarna merah muda yang pucat, dan sitoplasmanya berwarna biru pucat. Makrogametosit mempunyai sitoplasma yang lebih biru, intinya tampak padat, berwarna merah, terletak di pinggir Plasmodium. Dengan pewarnaan yang kuat, tampak titik-titik halus, bulat, homogen, berwarna merah muda atau kemerah-merahan di dalam sitoplasma eritrosit. Butir-butir ini disebut titik Schuffner, yang ditemukan pada semua fase perkembangan *P. vivax* kecuali bentuk cincin (Rachmawati, B., dkk, 2021).



Sumber: Kemenkes RI, 2017

Gambar 2.3. *Plasmodium vivax*

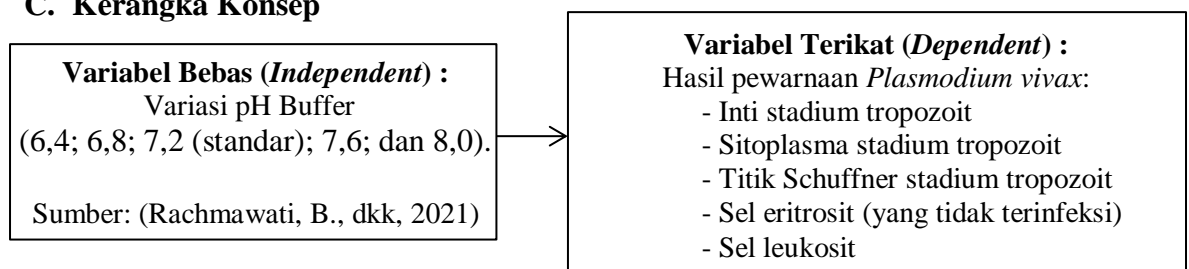
B. Kerangka Teori



Sumber: (Kemenkes RI, 2017; Kemenkes RI, 2020; Rachmawati, B., dkk, 2021; WHO, 2016)

Gambar 2.4. Kerangka Teori Pemeriksaan Malaria

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.5. Kerangka Konsep Variabel Penelitian