

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

##### **1. Malaria**

Kata *malaria* berasal dari bahasa Italia pada Abad Pertengahan, yaitu *mala* dan *aria* yang berarti “udara buruk”. Penyakit ini dahulu dikenal sebagai *demam rawa* (*marsh fever*) karena sering ditemukan di daerah rawa dan lahan basah yang diyakini menjadi sumber udara buruk penyebab penyakit. Malaria hingga kini masih menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang signifikan dan dapat menyebabkan kematian, terutama pada kelompok berisiko tinggi seperti bayi, balita, dan ibu hamil (World Health Organization, 2023; *Centers for Disease Control and Prevention*, 2022).

Malaria merupakan salah satu penyakit menular yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia terutama di daerah Papua, karena dapat menyebabkan angka kesakitan dan kematian serta menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) (Kemenkes RI, 2020a). Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh *Plasmodium* yang hidup dan berkembang biak dalam sel darah manusia. Malaria pada manusia disebabkan oleh empat spesies protozoa genus *Plasmodium* yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *plasmodium malariae* dan *plasmodium ovale*.

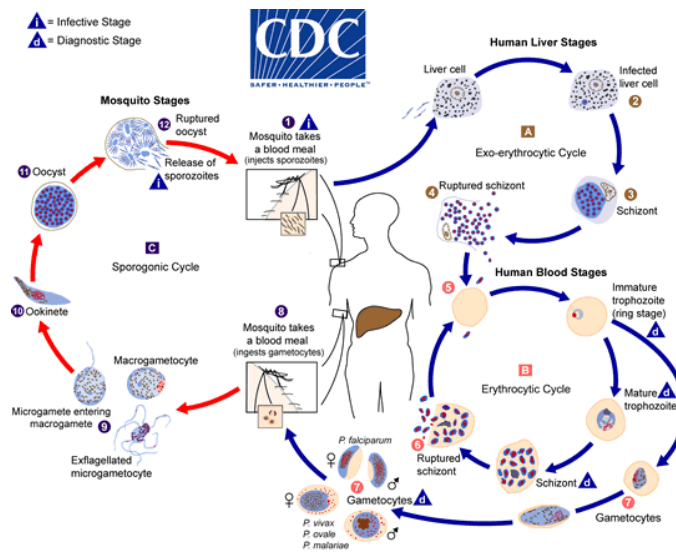
Malaria merupakan penyakit yang disebarkan melalui gigitan nyamuk betina jenis *Anopheles*. Orang yang terinfeksi malaria akan merasakan gejala awal yang mirip seperti flu. Penyakit ini dapat mempengaruhi semua kalangan usia. *Plasmodium vivax* merupakan plasmodium yang sering dijumpai tetapi *Plasmodium falciparum* yaitu spesies yang paling banyak menimbulkan kematian pada penderita (Rachmawati, dkk., 2021).

Menurut World Health Organization (WHO), malaria masih menjadi salah satu penyakit infeksi paling mematikan di dunia. Pada tahun 2023, WHO melaporkan terdapat sekitar 249 juta kasus malaria secara global dengan sekitar 608.000 kematian. Selain itu, WHO mencatat bahwa terdapat lebih dari 400 spesies nyamuk *Anopheles* di seluruh dunia, namun hanya sekitar 40 spesies yang berperan sebagai vektor penular malaria pada manusia. Faktor lingkungan seperti dominasi spesies *Anopheles* di suatu wilayah dan kondisi musim, terutama musim hujan di negara-negara tropis, berkontribusi terhadap meningkatnya risiko penularan malaria karena populasi nyamuk yang berkembang pesat.

## 2. Siklus Plasmodium

Siklus hidup plasmodium terdiri dari dua fase utama yaitu fase seksual didalam vektor dan fase aseksual di dalam manusia. Dalam siklusnya nyamuk betina menggigit manusia dan menyuntikkan sporozoit ke dalam peredaran darah. Sporozoit memasuki hepatosit dan

berkembang menjadi skizon yang kemudian melepaskan merozoit ke dalam aliran darah. Merozoit menginfeksi eritrosit dan berkembang melalui bentuk cincin (ring), trophozoit dan schizont. Schizont pecah sehingga menghasilkan merozoit baru yang menginfeksi eritrosit lain. Beberapa merozoit berkembang menjadi gametosit yang ketika dihisap oleh nyamuk akan menyelesaikan siklus seksual di nyamuk dan menghasilkan sporozoit untuk menginfeksi manusia berikutnya (WHO, 2023).



GAMBAR 1. SKLUS *PLASMODIUM*  
Sumber : Centers For Disease Control And Prevention, 2015

### 3. Morfologi jenis- jenis *Plasmodium* dan jenis plasmodium

#### a. Morfologi Jenis-jenis *plasmodium*

##### 1) Fase Trophozoit

- a) *Plasmodium falciparum* → menunjukkan bentuk cincin dengan dua titik kromatin, sering terdapat lebih dari satu parasit di dalam eritrosit (CDC, 2024).

- b) *Plasmodium vivax* → memperlihatkan bentuk trofozoit menyerupai amoeba dengan sitoplasma yang luas dan tidak beraturan (WHO, 2021)
- c) *Plasmodium malariae* → tampak beerbentuk non-ameboid seperti pita melintang dalam eritrosit (WHO, 2021).
- d) *Plasmodium ovale* → menampilkan bentuk cincin dengan morfologi non-ameboid (Collins et al., 2021).
- e) *Plasmodium knowlesi* → bentuk cincin menyerupai *P.falciparum* pada fase awal, terkadang lebih dari satu dalam eritrosit, pada fase lanjut menyerupai *P.malariae* dengan bentuk pita (Cox-Singh dkk., 2008; Centers For Disease Control And Prevention, 2024).

## 2) Fase skizon

- a) *Plasmodium falciparum* → berukuran  $\pm 6 \mu\text{m}$ , menghasilkan 8–24 merozoit (CDC., 2024).
- b) *Plasmodium vivax* → berukuran  $\pm 45 \mu\text{m}$ , menghasilkan 12–24 merozoit dengan rata-rata 16 (WHO., 2021).
- c) *Plasmodium malariae* → berukuran  $\pm 70 \mu\text{m}$ , menghasilkan 6–12 merozoit yang tersusun seperti roset (CDC., 2020).
- d) *Plasmodium ovale* → berukuran  $\pm 55 \mu\text{m}$ , menghasilkan 8–12 merozoit yang juga membentuk roset (Collins et al., 2021).

- e) *Plasmodium knowlesi* → dapat menghasilkan hingga 16 merozoit, morfologinya mirip *P.malariae* namun jumlah merozoitnya lebih banyak (Cox-Singh dkk., 2008; Singh & Daneshvar, 2013).

### 3) Fase gametosit

- a) *Plasmodium falciparum* → berbentuk pisang atau bulan sabit
- b) *Plasmodium vivax* → berbentuk bulat atau oval dengan kromatin eksentrik
- c) *Plasmodium malariae* → menyerupai *P.vivax*, tetapi pigmen lebih kasar dan berwarna gelap.
- d) *Plasmodium ovale* → berbentuk oval, ukuran sedikit lebih besar dibandingkan dengan *P.vivax*.
- e) *Plasmodium knowlesi* → berbentuk oval atau bundar, menyerupai *P.malariae*, dengan pigmen yang halus dan sitoplasma lebih padat.

### 4) Fase eritrosit yang terinfeksi

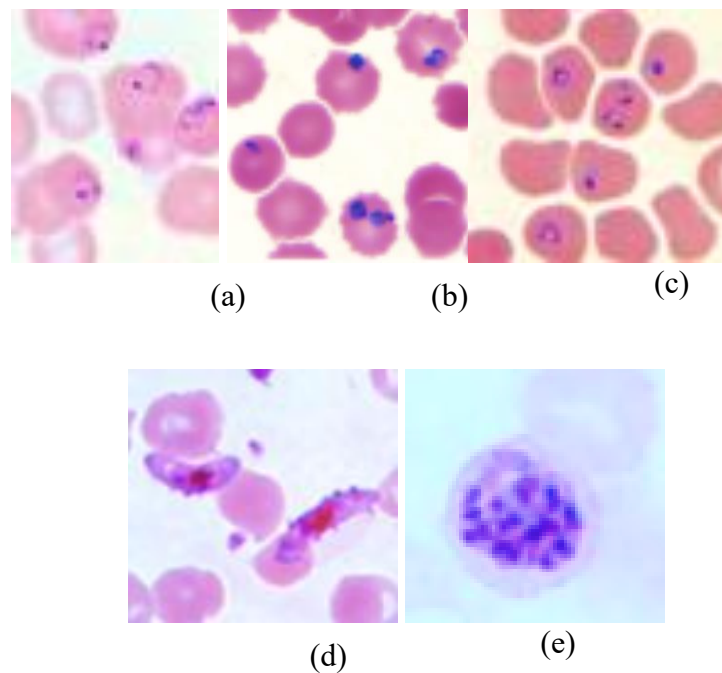
- a) *Plasmodium falciparum* → ukuran eritrosit normal, tampak pucat, bentuk tidak teratur, terdapat titik Maurer
- b) *Plasmodium vivax* → ukuran membesar 1,5 – 2 kali ukuran normal, tampak pucat, terdapat titik Schuffner.
- c) *Plasmodium malariae* → ukuran normal atau sedikit mengecil, sitoplasma merah muda, terdapat titik Ziemann.

- d) *Plasmodium ovale* → bentuk lonjong atau oval, sedikit membesar, tampak pucat, dengan titik Schuffner yang jelas.
- e) *Plasmodium knowlesi* → Ukuran normal, tidak menunjukkan titik Schuffner yang khas, sulit dibedakan dari *P. falciparum* dan *P. malariae* secara mikroskopik (CDC, 2024)

b. Jenis – jenis plasmodium

1) *Plasmodium falciparum*

*Plasmodium falciparum* merupakan spesies paling berbahaya penyebab malaria karena mampu menginfeksi eritrosit pada semua umur sel, sehingga sering menimbulkan anemia berat dan komplikasi seperti malaria serebral. Masa inkubasinya berkisar 9–14 hari setelah gigitan nyamuk infektif (CDC, 2022). Infeksi *P. falciparum* biasanya ditandai dengan demam tidak teratur, anemia berat, ikterus, dan dapat menyebabkan kegagalan multi-organ (WHO, 2021). Spesies ini tersebar luas di Afrika, Asia Tenggara, dan Amerika Selatan, dan masih menjadi penyebab utama kematian terutama pada anak-anak dan ibu hamil (Kementerian Kesehatan RI, 2023).



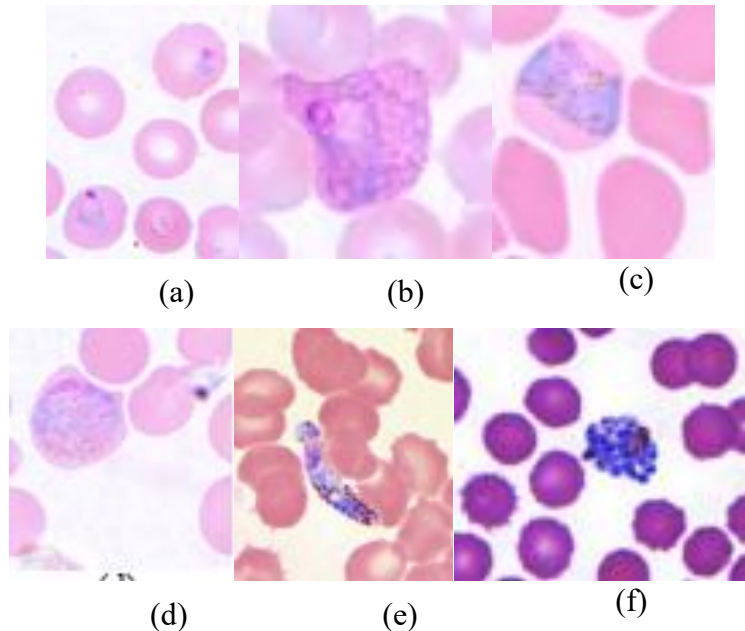
Gambar 2. Morfologi *Plasmodium falciparum*  
 (a)Tropozoit muda, (b)Tropozoit dengan titik Maurer  
 pada eritrosit (c)Tropozoit matang (d)Gametosit  
 (e)Skizon

Sumber : Swart, dkk., 2014.

## 2) *Plasmodium vivax*

*Plasmodium vivax* merupakan penyebab malaria tertiana dengan siklus demam 48 jam dan menjadi spesies yang paling luas penyebarannya di Asia, Amerika Selatan, dan Oseania. Parasit ini dapat membentuk hipnozoit di hati yang bersifat dorman dan dapat reaktif kembali sehingga menimbulkan relaps berulang. Secara klinis, infeksi *P. vivax* cenderung lebih ringan dibandingkan *P. falciparum*, namun dapat menyebabkan anemia kronis akibat relaps yang berulang (Hartati dkk., 2024). Masa inkubasinya berkisar 12–17 hari, dan meskipun jarang berakibat fatal, infeksi *P. vivax* tetap dapat menimbulkan kelelahan berat dan anemia persisten. Spesies

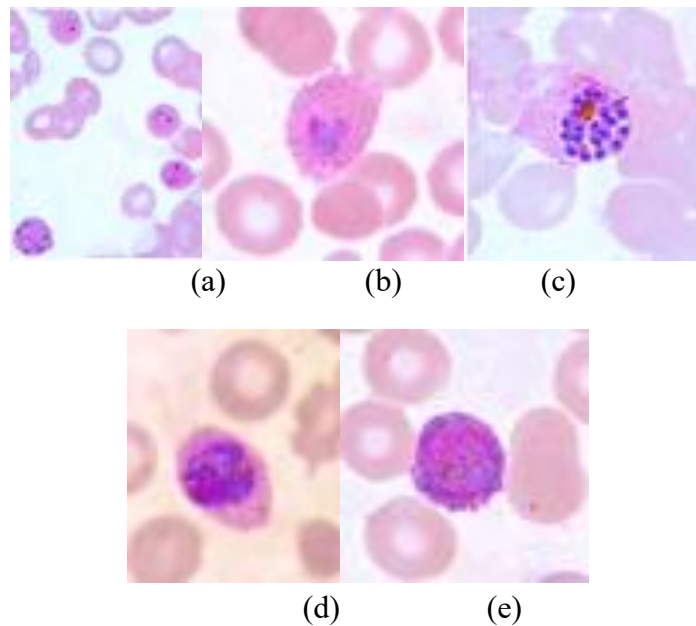
ini tersebar luas di wilayah tropis dan subtropis, termasuk Indonesia bagian timur (Kemenkes RI, 2023).



Gambar 3. Morfologi *Plasmodium vivax*  
 (a) Trophozoit (b) Trophozoit amoeboid dengan titik *Schuffner*  
 (c) Trophozoit berbentuk seperti pita (d) Makrogametosit  
 (e) Ookinet (f) Skizon  
 Sumber :Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020.

### 3) *Plasmodium ovale*

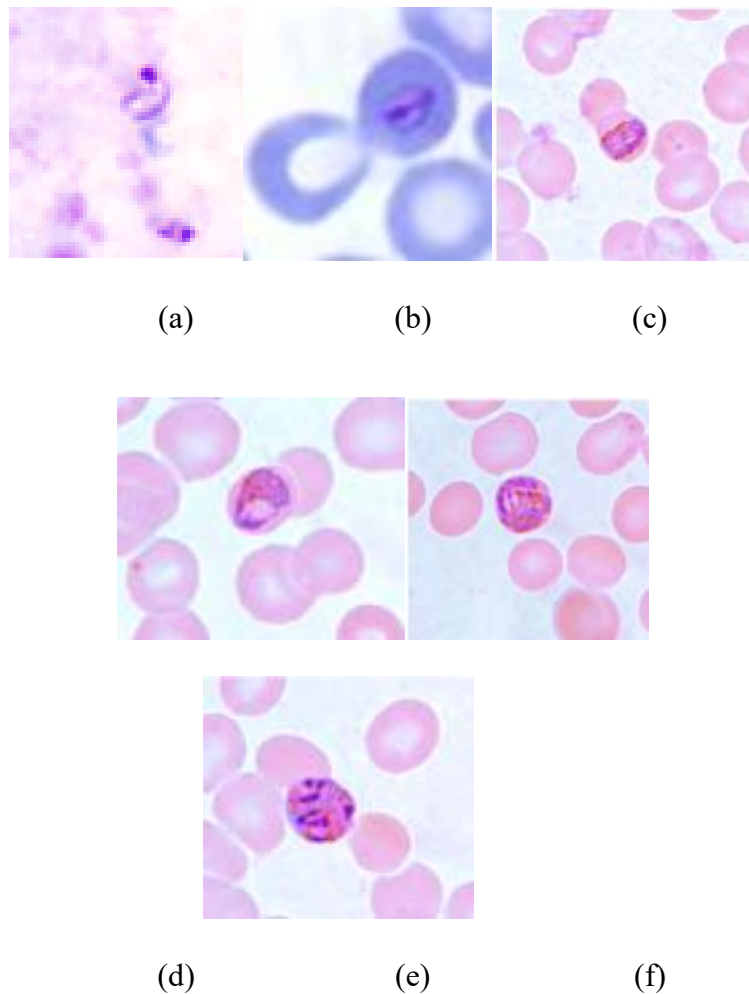
*Plasmodium ovale* memiliki karakteristik biologis yang mirip dengan *P. vivax*, termasuk kemampuan membentuk hipnozoit di hati yang menyebabkan relaps. Masa inkubasi *P. ovale* berkisar antara 12–20 hari. Penyakit yang ditimbulkan umumnya ringan dan jarang berakibat fatal (Collins dkk., 2021). Spesies ini lebih banyak ditemukan di wilayah Afrika Barat, namun juga dilaporkan di Asia Tenggara dan Pasifik. Di Indonesia, kasus *P. ovale* relatif jarang dilaporkan (Kemenkes RI, 2023).



Gambar 4. Morfologi *Plasmodium ovale*  
 (a) Tropozoit muda (b) Tropozoit dengan titik *Schuffner*  
 pada eritrosit (c) Skizon (d) Mikrogametosit  
 (e) Makrogametosis  
 Sumber : CDC. 2020.

#### 4) *Plasmodium malariae*

*Plasmodium malariae* adalah penyebab malaria kuartan (demam setiap 72 jam). Spesies ini berkembang lebih lambat dibanding jenis lainnya. Infeksinya dapat bertahan bertahun-tahun dalam tubuh manusia dan menyebabkan nefropati malaria kronik (WHO, 2023). Karena tingkat parasitemianya rendah, sering kali tidak menimbulkan gejala berat, namun tetap penting dalam surveilans malaria kronik.

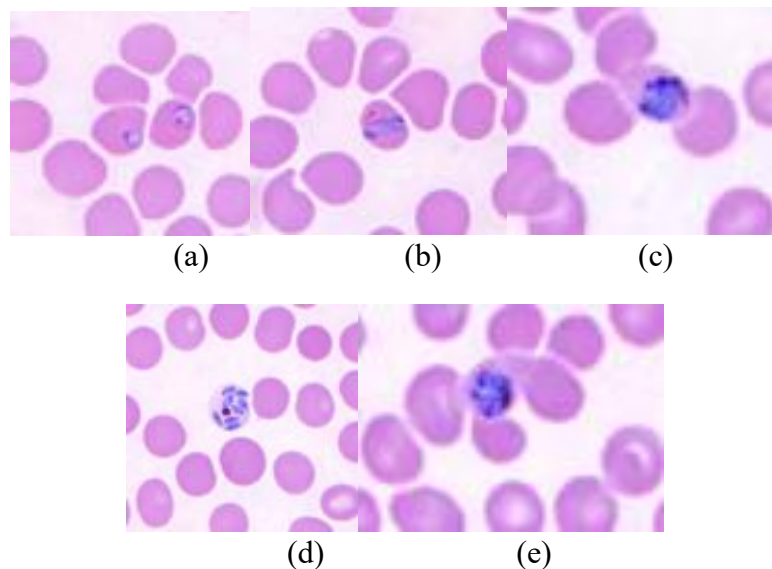


Gambar 5. Morfologi *Plasmodium malariae*  
 (a) Trophozoit (b) Trophozoit berebentuk seperti mata burung  
 (c) Trophozoit berbentuk seperti pita (d) Trophozoit  
 berbentuk keranjang (e) Gametosit (f) Skizon  
 Sumber : CDC, 2020

##### 5) Plasmodium Knowlesi

*Plasmodium knowlesi* merupakan jenis malaria zoonotik yang berasal dari kera (*Macaca fascicularis*) dan kini banyak menginfeksi manusia, terutama di Asia Tenggara termasuk Indonesia bagian barat dan Malaysia. Siklus eritrositiknya sangat cepat, hanya 24 jam, sehingga gejala demam dapat muncul setiap

hari dan infeksi berkembang cepat menjadi berat. Secara morfologi, bentuknya menyerupai *P. falciparum* pada stadium muda dan *P. malariae* pada stadium tua, sehingga sering salah diidentifikasi. Identifikasi laboratorium memerlukan ketelitian tinggi atau bantuan metode molekuler seperti PCR (Vu dkk., 2021). Distribusinya terutama ditemukan di Asia Tenggara, termasuk Malaysia, Filipina, dan beberapa wilayah Kalimantan (Cox-Singh, 2021).



Gambar 6. Morfologi *Plasmodium knowlesi*  
 (a) Trophozoit (b) Trophozoit berbentuk seperti pita (c)  
 Gametosit (d) Skizon dewasa (e) Skizon  
 Sumber : CDC, 2020.

#### 4. Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopis merupakan tahap awal dalam evaluasi kualitas sediaan darah tepi sebelum dilakukan pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan ini bertujuan untuk menilai tampilan umum hasil pewarnaan, seperti warna sediaan, pemerataan pewarnaan,

kebersihan permukaan kaca objek, dan kejernihan warna. Tahap ini penting karena hasil makroskopis yang baik akan mendukung interpretasi mikroskopis yang akurat terhadap keberadaan parasit seperti *Plasmodium sp.* (WHO, 2021).

Pemeriksaan makroskopis dilakukan dengan pengamatan langsung terhadap sediaan tanpa bantuan mikroskop, di bawah cahaya putih alami atau lampu terang. Sediaan yang diwarnai menggunakan Giemsa 10% idealnya menunjukkan warna ungu kebiruan merata pada seluruh lapisan apus. Warna tersebut menandakan bahwa reaksi antara komponen pewarna asam (eosin) dan basa (metilen biru serta azur) berlangsung seimbang, sehingga struktur sel darah dapat terwarnai dengan kontras dan jelas (Syapitri et al., 2023).

Kemerataan warna dipengaruhi oleh kestabilan pH pelarut; aquades yang tidak stabil sering menghasilkan warna tidak merata, sedangkan buffer fosfat pH 7,2 menjaga kestabilan warna (Rachmawati & Wibowo, 2022). Kebersihan kaca objek penting agar tidak muncul artefak yang mengganggu pembacaan, sehingga kaca harus bersih dari minyak atau noda (CDC, 2022). Kejernihan warna menunjukkan proses pencucian dan fiksasi yang baik; sediaan yang jernih memudahkan pengamatan (Syapitri et al., 2023).

Penilaian makroskopis biasanya menggunakan kategori *baik*, *cukup*, atau *buruk* berdasarkan keempat aspek tersebut. Sediaan dengan hasil baik kemudian digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis.

Pemeriksaan ini penting untuk menjamin kualitas diagnostik malaria dan ketepatan hasil pewarnaan (WHO, 2021).

## 5. Diagnosis Malaria

Diagnosis malaria merupakan langkah penting untuk memastikan adanya infeksi *Plasmodium* dan menentukan spesies penyebabnya sebelum pemberian terapi antimalaria. Diagnosis yang akurat membantu menghindari pengobatan yang tidak perlu serta mendukung program eliminasi malaria. Menurut pedoman WHO (2023), setiap kasus demam yang dicurigai malaria harus dikonfirmasi melalui pemeriksaan berbasis parasit menggunakan metode *Rapid Diagnostic Test* (RDT), mikroskopis, atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

### a. *Rapid Diagnostic Test*

*Rapid Diagnostic Test* (RDT) malaria adalah metode imunokromatografi yang mendeteksi antigen spesifik *Plasmodium* seperti HRP2, pLDH, atau Aldolase dalam darah secara cepat. Prinsip kerjanya memanfaatkan ikatan antigen–antibodi pada membran nitroselulosa yang menghasilkan garis berwarna sebagai hasil positif (WHO, 2023).

RDT memiliki keunggulan berupa kemudahan penggunaan, hasil yang cepat dalam 10–20 menit, serta tidak memerlukan mikroskop atau tenaga ahli, sehingga sangat bermanfaat di daerah terbatas sumber daya. Namun, kelemahannya meliputi sensitivitas yang menurun pada parasitemia rendah, positif palsu akibat

persistensi HRP2 setelah terapi, dan negatif palsu karena mutasi atau penghapusan gen HRP2 pada *P. falciparum* (Zelege et al., 2023).

Studi Kavanaugh et al. (2021) menunjukkan bahwa sensitivitas RDT dibandingkan PCR atau mikroskopis berkisar 70–95% bergantung pada jenis kit dan beban parasit. Meski memiliki keterbatasan, WHO tetap merekomendasikan RDT sebagai alat diagnosis cepat lini pertama dengan syarat validasi dan pengawasan mutu yang optimal.

#### b. Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis darah perifer merupakan metode standar emas (*gold standard*) dalam diagnosis malaria karena memungkinkan deteksi langsung parasit *Plasmodium*, identifikasi spesies, serta penentuan stadium dan kepadatan parasit. Metode ini dilakukan dengan dua jenis sediaan: sediaan darah tebal dan sediaan darah tipis.

Sediaan darah tebal digunakan untuk mendeteksi keberadaan parasit karena memiliki volume darah yang lebih banyak sehingga sensitivitasnya tinggi. Sementara itu, sediaan darah tipis digunakan untuk identifikasi spesies *Plasmodium* dan menilai morfologi parasit secara detail. Pewarnaan yang paling sering digunakan adalah pewarnaan Giemsa, karena dapat memperlihatkan struktur parasit dengan jelas, termasuk inti dan sitoplasma (Maturana et al., 2022).

Penghitungan kepadatan parasit dilakukan dengan menghitung jumlah parasit per 200 atau 500 leukosit, kemudian dikonversi ke jumlah parasit per mikroliter darah menggunakan rumus:

Jumlah parasit/ $\mu\text{L}$  = (Jumlah parasit  $\times$  Jumlah leukosit pasien) / Jumlah leukosit yang dihitung. Jika jumlah leukosit pasien tidak diketahui, maka digunakan asumsi 8.000 leukosit/ $\mu\text{L}$  (CDC, 2023).

Kelebihan metode mikroskopis adalah kemampuannya untuk memberikan informasi kuantitatif (tingkat parasitemia), mendeteksi semua spesies *Plasmodium*, serta memantau respons terhadap pengobatan. Namun, metode ini memerlukan tenaga laboratorium yang terlatih, peralatan mikroskop yang baik, dan waktu pemeriksaan yang lebih lama dibandingkan RDT. Kesalahan dapat terjadi akibat teknik pewarnaan yang tidak tepat, kualitas sediaan yang buruk, atau kelelahan analis (Opoku Afriyie et al., 2023). Meskipun demikian, mikroskopis tetap menjadi metode utama dalam laboratorium rujukan dan penelitian, karena keakuratannya yang tinggi dan biaya yang relatif rendah bila dibandingkan dengan metode molekuler.

#### c. PCR (*Polymeraase Chain Reaction*)

Pemeriksaan PCR merupakan metode molekuler yang digunakan untuk mendeteksi DNA *Plasmodium* dengan sensitivitas yang sangat tinggi. PCR mampu mendeteksi parasitemia rendah ( $<5$

parasit/ $\mu\text{L}$ ), mengidentifikasi spesies *Plasmodium* secara pasti, serta menemukan infeksi campuran yang tidak terdeteksi oleh mikroskopis atau RDT (Mediavilla et al., 2024).

PCR menjadi metode yang sangat penting dalam penelitian dan surveilans malaria, terutama di daerah yang sedang menuju eliminasi, karena dapat mendeteksi kasus tanpa gejala dengan kepadatan parasit rendah. Selain itu, PCR juga digunakan untuk mendeteksi gen resistensi obat dan penghapusan gen *pfhrp2/pfhrp3* yang menyebabkan kegagalan deteksi pada RDT (WHO, 2024).

Kelemahan PCR adalah biaya yang relatif mahal, membutuhkan peralatan laboratorium molekuler dan reagen khusus, serta waktu analisis yang lebih lama.

## 6. Sediaan apusan darah

### a. Sediaan apusan darah tipis

Menurut Kemenkes (2020), Apusan darah tipis dibuat dengan satu lapisan sel darah merah yang menyebar dan digunakan untuk membantu mengidentifikasi parasit malaria setelah ditemukan pada sediaan apusan darah tebal karena morfologi parasit dapat dilihat dengan jelas di dalam sel darah merah (Damayanti, 2023). Sediaan darah tipis harus difiksasi dahulu menggunakan methanol sehingga sel-sel terutama sitoplasma tidak mengalami kerusakan dan parasit dapat diameati dalam keadaan utuh sebelum dilakukan pewarnaan (Rachmawati et al., 2021).

Sediaan apusan darah tipis memungkinkan untuk mengidentifikasi spesies malaria, mengukur parasitemia, dan menilai keberadaan schizont, gametosit dan pigmen malaria dalam neutrofil dan monosit. Volume sampel darah yang sesuai untuk sediaan apus darah tipis adalah sebanyak 1-1,5  $\mu\text{L}$ . Sediaan ini digunakan untuk mengidentifikasi spesies *Plasmodium* (Rachmawati, dkk., 2021).

b. Sediaan apusan darah tebal

Apusan darah tebal dibuat dengan lapisan darah yang lebih banyak dibandingkan apusan tipis. Pada sediaan ini, sel darah merah akan mengalami hemolisis selama proses pewarnaan, sehingga parasit yang terdapat di dalamnya menjadi lebih terkonsentrasi dan mudah diamati di bawah mikroskop. Tujuan utama dari pembuatan apusan darah tebal adalah untuk meningkatkan sensitivitas pemeriksaan dalam mendeteksi parasit malaria, terutama pada kasus dengan parasitemia rendah (World Health Organization, 2021). Selain itu, karena jumlah darah yang diperiksa lebih banyak, apusan darah tebal memungkinkan deteksi dini infeksi malaria bahkan pada tahap awal sebelum muncul gejala klinis yang jelas (WHO, 2021).

Apusan darah tebal untuk mengidentifikasi spesies *Plasmodium* menjadi lebih sulit karena morfologi parasit dapat berubah akibat proses hemolisis. Oleh karena itu, pemeriksaan apusan darah tebal umumnya digunakan untuk mendeteksi

keberadaan parasit, sedangkan apusan darah tipis digunakan untuk menentukan spesies dan stadium parasit (WHO, 2023)

## 7. Fiksasi

Fiksasi merupakan tahap awal yang sangat penting dalam pembuatan preparat mikroskopis, termasuk sediaan darah, jaringan, dan sel. Proses ini bertujuan untuk mengawetkan struktur seluler agar tidak mengalami perubahan morfologi akibat autolisis, osmosis, atau degradasi enzimatik setelah pengambilan sampel. Menurut Kementerian Kesehatan RI (2021), fiksasi dilakukan segera setelah pembuatan preparat untuk mencegah kerusakan atau deformasi sel. Fiksatif berfungsi menghentikan aktivitas metabolisme dan mempertahankan struktur sel serta warna yang baik pada saat pewarnaan.

Pemeriksaan malaria, fiksasi hanya dilakukan pada sediaan darah tipis, sedangkan sediaan tebal tidak difiksasi agar eritrosit dapat lisis saat pewarnaan sehingga parasit lebih mudah diamati. Metanol berperan sebagai fiksatif yang cepat dan efektif karena mampu mendenaturasi protein, mengeraskan membran sel, serta mencegah pelarutan komponen sitoplasma pada saat pewarnaan dengan Giemsa (WHO, 2023).

Kualitas proses fiksasi dipengaruhi oleh jenis bahan fiksatif, lama waktu fiksasi, dan kondisi lingkungan seperti suhu serta kelembapan udara. Fiksasi yang terlalu lama dapat menyebabkan perubahan warna atau kerusakan sel, sedangkan fiksasi yang terlalu singkat

mengakibatkan preparat mudah rusak saat pencucian dan pewarnaan. Oleh karena itu, waktu fiksasi harus sesuai prosedur standar yaitu, 1–2 menit menggunakan metanol absolut untuk sediaan darah tipis. Preparat yang sudah difiksasi harus segera dikeringkan di udara dan disimpan dalam wadah tertutup untuk menghindari kontaminasi debu dan kelembapan (Sari dkk., 2023).

Fiksasi juga berperan penting dalam meningkatkan hasil pewarnaan. Fiksasi yang optimal akan membantu pewarna menempel secara selektif pada struktur sel, menghasilkan kontras yang jelas antara inti, sitoplasma, dan parasit dalam pemeriksaan malaria. Sebaliknya, jika fiksasi tidak dilakukan dengan benar, warna dapat menjadi pudar, tidak merata, atau menyebabkan artefak yang mengganggu pembacaan mikroskopis (Putri & Hamidah, 2024).

Penelitian terbaru, penggunaan metanol murni dibandingkan etanol 95% menghasilkan hasil pewarnaan yang lebih stabil, terutama pada pemeriksaan darah tepi untuk identifikasi parasit malaria dan morfologi eritrosit. Hal ini disebabkan metanol memiliki laju penguapan yang lebih lambat dan daya penetrasi yang lebih baik terhadap protein sel (Rahmawati dkk., 2025).

## 8. Pewarnaan Giemsa

Pewarnaan giemsa merupakan jenis pewarnaan yang biasa digunakan dalam pewarnaan malaria karena memiliki harga relatif murah, mudah didapat dan memiliki prosedur penggunaan yang sederhana. Buffer yang digunakan dalam pewarnaan giemsa yaitu buffer fosfat dengan pH 7,2. Pengamatan pada sediaan apusan darah tipis menggunakan mikroskop perbesaran objektif 100x menggunakan minyak imersi (Hartati, dkk., 2024). Prinsip dasar pewarnaan Giemsa adalah terjadinya interaksi antara komponen zat warna yang bersifat asam dan basa dengan struktur sel darah. Komponen Giemsa terdiri dari Azur B yang bersifat basa berperan mewarnai komponen sel yang bersifat asam, sedangkan eosin yang bersifat asam berperan mewarnai komponen sel yang bersifat basa (Hartati dkk., 2024). Larutan Giemsa merupakan campuran dari eosin berwarna merah, metilen biru berwarna biru, dan metilen azur berwarna ungu. Eosin berperan memberikan warna merah pada eritrosit, sedangkan kombinasi antara eosin dan metilen azur menghasilkan warna merah pada inti parasit. Metilen biru berfungsi memberi warna biru pada sitoplasma parasit (Riyadi dkk., 2021). Inti parasit yang bersifat basa akan menyerap pewarna eosin yang bersifat asam, sementara sitoplasma yang bersifat asam akan menyerap pewarna basa (Riyadi dkk., 2021).

WHO (2016) merekomendasikan dua standar metode pewarnaan Giemsa, yaitu metode cepat (rapid) dan metode lambat (slow). Metode cepat biasanya digunakan untuk mewarnai 1 hingga 15 sediaan sekaligus, terutama di fasilitas kesehatan yang membutuhkan hasil diagnosis segera. Pada metode ini, Giemsa digunakan dengan konsentrasi 10% dan waktu pewarnaan sekitar 20–25 menit, sehingga hasil pewarnaan cukup tajam dan detail morfologi parasit dapat terlihat jelas. Kekurangan metode cepat adalah kebutuhan reagen yang lebih banyak sehingga menambah biaya pemeriksaan. Sementara itu, metode lambat menggunakan larutan Giemsa konsentrasi 3% dengan waktu pewarnaan sekitar 45–60 menit. Metode ini lebih hemat reagen dan hasil pewarnaan lebih stabil, namun membutuhkan waktu lebih lama sehingga kurang sesuai untuk kebutuhan diagnosis segera (WHO, 2016; WHO, 2021).

#### 9. Pelarut pengencer pewarnaan giemsa

##### a. Larutan Buffer fosfat

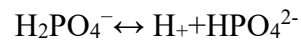
Larutan buffer fosfat (*phosphate buffer*) merupakan salah satu komponen penting dalam proses pewarnaan Giemsa, khususnya pada pemeriksaan sediaan darah tepi untuk mendeteksi *Plasmodium sp.* Buffer fosfat berfungsi untuk menjaga kestabilan pH larutan pewarna selama proses pewarnaan berlangsung, karena hasil pewarnaan Giemsa sangat bergantung pada pH media yang digunakan. pH optimum untuk pewarnaan Giemsa adalah  $7,2 \pm 0,05$ ,

di mana keseimbangan warna antara komponen basa (Azure B, methylene blue) dan komponen asam (Eosin Y) dapat bekerja dengan baik, menghasilkan warna morfologis yang jelas pada eritrosit dan parasit malaria (Rahmawati, 2022; WHO, 2021).

Buffer memiliki pH terlalu asam ( $<7,0$ ), maka hasil pewarnaan akan tampak terlalu merah muda karena dominasi eosin, sedangkan jika terlalu basa ( $>7,4$ ), hasilnya menjadi terlalu kebiruan akibat dominasi metilen biru. Kondisi tersebut dapat menyebabkan perubahan intensitas dan kejernihan warna pada parasit, sehingga struktur Plasmodium seperti inti, sitoplasma, dan pigmen hemozoin tidak terlihat jelas. Ketidakjelasan morfologi ini tidak hanya memengaruhi penilaian kualitas warna, tetapi juga berdampak langsung pada akurasi penghitungan jumlah Plasmodium, karena parasit yang warnanya pudar atau tertutup warna dominan dapat terlewat saat perhitungan, sehingga menimbulkan *undercount*. Sebaliknya, bila pewarnaan terlalu biru, artefak dapat tampak seperti parasit dan menyebabkan *overcount* (Fatmawati dkk., 2023). Dengan demikian, kualitas warna yang terbentuk dari kestabilan pH buffer berperan langsung dalam ketepatan estimasi densitas parasitemia.

Buffer fosfat merupakan campuran antara natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) sebagai asam lemah dan dinatrium

hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) sebagai basa konjugatnya. Keduanya bekerja menstabilkan pH melalui sistem kesetimbangan ion fosfat:



Penambahan ion  $\text{H}^+$ , maka ion  $\text{HPO}_4^{2-}$  akan menangkap ion tersebut, sedangkan apabila terdapat penambahan ion  $\text{OH}^-$ , maka  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  akan melepaskan ion  $\text{H}^+$  untuk menjaga pH tetap konstan. Mekanisme ini menjadikan buffer fosfat ideal digunakan dalam proses pewarnaan biologis yang sangat peka terhadap pH, seperti pewarnaan Giemsa (Ganesh dkk., 2016; Widyaningsih, 2022). Stabilitas pH inilah yang memastikan bahwa warna parasit tampak optimal sehingga proses perhitungan jumlah Plasmodium dapat dilakukan secara akurat dan konsisten antar-sediaan.

Tabel 1. Kandungan Giemsa

|    |                                             |         |
|----|---------------------------------------------|---------|
| 1. | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                   | 6,33 gr |
| 2. | $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ | 5,58 gr |
| 3. | Aquadest add                                | 1 liter |

Sumber : Widyaningsih, 2022

Penggunaan aquadest (air suling) sebagai pelarut bertujuan untuk menghindari pengaruh ion logam, karbonat, atau zat terlarut lain yang dapat mengubah pH larutan atau membentuk endapan garam fosfat. Apabila air yang mengandung mineral digunakan, pH dapat berubah dan memengaruhi kualitas warna, yang pada akhirnya dapat menurunkan kejelasan penampakan parasit di bawah mikroskop. Aquadest membantu mempertahankan kestabilan warna pewarna sehingga detail parasit tampak jelas, dan proses penghitungan jumlah Plasmodium dapat dilakukan dengan presisi (UIN Suska Riau, 2023).

#### b. Aquadest

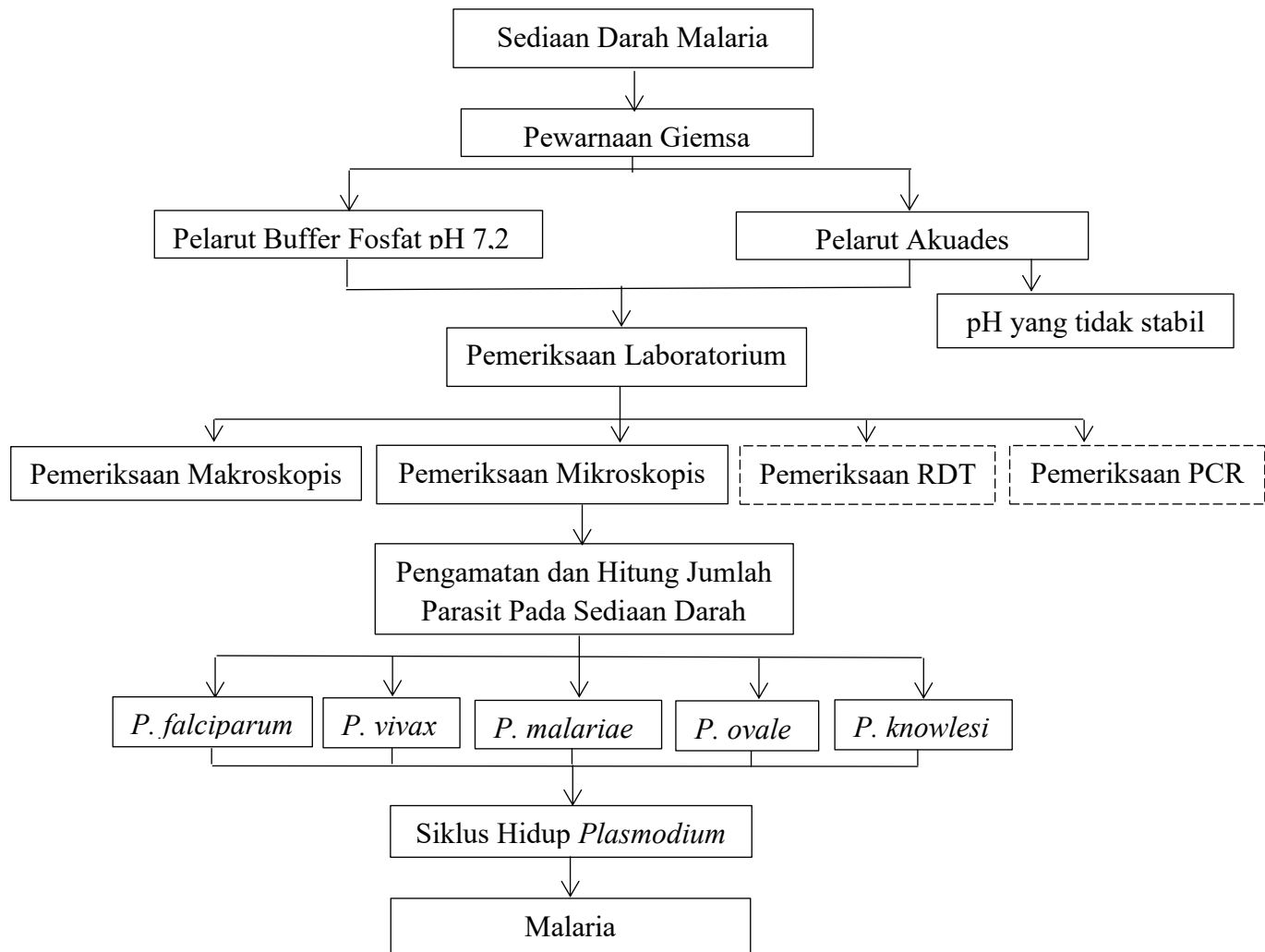
Aquadest adalah air hasil destilasi yang bebas ion dan mineral sehingga banyak digunakan sebagai pelarut di laboratorium, termasuk untuk melarutkan pewarna Giemsa (Rahmawati, 2022). Karena kemurniannya, aquadest mampu melarutkan komponen pewarna seperti azure, eosin, dan metilen biru tanpa gangguan ion logam (Widyaningsih, 2022).

Aquadest memiliki kelemahan utama yaitu pH yang tidak stabil. Aquadest mudah menyerap CO<sub>2</sub> dari udara sehingga pH turun menjadi 5,5–6,5. pH yang terlalu asam membuat hasil pewarnaan Giemsa tampak lebih merah muda dan pucat, sehingga kontras antara eritrosit dan parasit tidak optimal (Fatmawati dkk., 2023)

Kualitas warna yang tidak stabil ini berpengaruh langsung terhadap akurasi penghitungan jumlah *Plasmodium*. Parasit dapat tampak kurang jelas, terutama bentuk ring yang berukuran kecil, sehingga berisiko tidak terhitung (*undercount*). Detail morfologi seperti inti dan pigmen hemozoin juga dapat hilang, menyebabkan kesalahan identifikasi.

*Aquadest* tetap digunakan karena mudah diperoleh, murah, dan aman, terutama di laboratorium yang tidak memiliki buffer. Namun, untuk mendapatkan hasil pewarnaan Giemsa yang optimal dan jumlah *Plasmodium* yang akurat, pH ideal tetap diperlukan (WHO, 2021)

## B. Kerangka Teori



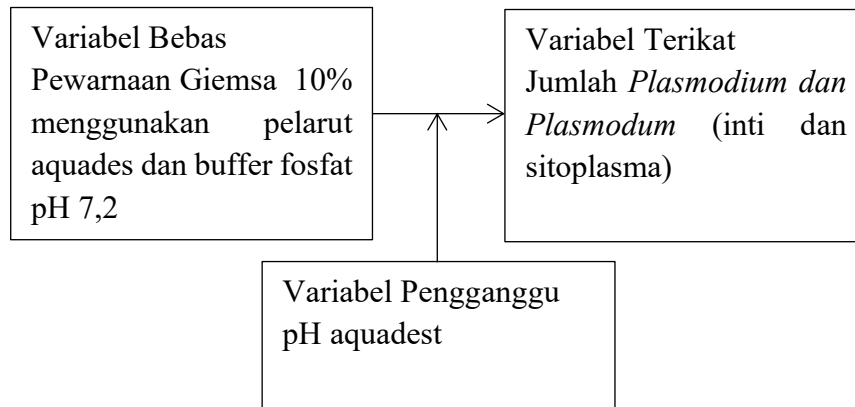
Keterangan :

▭ Pemeriksaan yang dilakukan

▭ Pemeriksaan yang tidak dilakukan

Gambar 7. Kerangka Teori

### C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 8. Hubungan Antar Variabel

### D. Hipotesis

Penggunaan aquadest dan buffer fosfat pada pewarnaan Giemsa dapat menghasilkan kualitas pembacaan jumlah *Plasmodium* yang relatif sama, namun buffer fosfat cenderung memberikan hasil yang lebih optimal karena memiliki pH yang stabil dan sesuai dengan karakteristik kerja pewarna Giemsa.