

# UJI DIAGNOSTIK *POLYMERASE CHAIN REACTION* DIBANDINGKAN DENGAN PENGECATAN *GIEMSA* PADA INFEKSI MALARIA

Hanina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi

Email: [justnina.13@gmail.com](mailto:justnina.13@gmail.com)

## ABSTRACT

*Plasmodium* is a parasite causing malaria, the most important infection disease in the world. Gold standard of malaria diagnosis was founded *Plasmodium* by Giemsa staining method. Fundamental difference between Giemsa and Polymerase Chain Reaction (PCR) is the ability to detect parasite. Giemsa can detect minimal 50-100 parasit/μl whereas PCR detect parasite DNA in lower parasitemia. The purpose of this study was to determine the sensitivity and specificity of the PCR compared to blood slide with Giemsa in detecting of malaria infection.

A diagnostic test has been conducted in Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Jambi and Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. There were 87 subjects who fulfilled the criteria inclusion and drawn by consecutive sampling.

Blood samples were taken from venous blood. Detection of *Plasmodium* used Giemsa and PCR method. Detection of *Plasmodium* from 87 subjects, Giemsa and PCR method founded 1 subject (1.1%) *P. falciparum* and 4 subjects (4.6%) *P. vivax*. 82 subjects (94.3%) were negative. The sensitivity and specificity of PCR was 100%, positive predictive value and negative predictive value was 100%. Conclusion is higher sensitivity and spesificity PCR method in the malaria diagnosis was proven and PCR method able to identified *Plasmodium* species accuratly.

**Keywords:** *Plasmodium*, Malaria, Giemsa, PCR, Diagnostic Test

## ABSTRAK

*Plasmodium* merupakan parasit penyebab malaria, suatu penyakit infeksi paling penting di dunia. Baku emas diagnosa malaria adalah menemukan *Plasmodium* melalui pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan Giemsa. Perbedaan mendasar antara metode Giemsa dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terletak pada kemampuan mendeteksi parasit. Metode Giemsa hanya mampu mendeteksi *Plasmodium* dengan ambang batas antara 50-100 parasit/μl sedangkan metode PCR dapat mendeteksi DNA parasit pada parasitemia yang lebih rendah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas metode PCR dibandingkan dengan pengecatan Giemsa dalam menegakkan diagnosis infeksi malaria.

Penelitian ini merupakan uji diagnostik yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi dan Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Penelitian dilakukan mulai bulan Januari sampai April 2017. Subjek penelitian berjumlah 87 orang yang diambil secara *consecutive sampling* dari laboratorium RS Theresia Jambi.

Semua subjek diambil sampel darah venanya, kemudian dilakukan pengecatan Giemsa dan pemeriksaan PCR. Hasil pemeriksaan PCR nested menggunakan primer genus dan primer spesies

*Plasmodium* ditemukan *P.falciparum* positif sebanyak 1 sampel (1,1%). Sedangkan *P.vivax* positif sebanyak 4 sampel (4,6%). Sebanyak 82 sampel (94,3%) negatif. Hal ini sesuai dengan hasil pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan *Giemsa*. Metode PCR dibandingkan dengan metode pengecatan *Giemsa* sensitivitas dan spesifisitasnya 100%, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatifnya 100%. Dapat disimpulkan bahwa metode PCR sangat sensitif dan spesifik dalam penegakan diagnosis malaria dan mampu mengidentifikasi spesies parasit secara akurat.

**Kata Kunci: Plasmodium, Malaria, Giemsa, PCR, Uji Diagnostik.**

---

## PENDAHULUAN

*Plasmodium* merupakan parasit penyebab malaria, suatu penyakit infeksi paling penting di dunia karena masih menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas di hampir seluruh dunia (WHO, 2014). Saat ini terdapat lima spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* dan *Plasmodium knowlesi* (Kantele and Jokiranta, 2011; CDC, 2013; WHO, 2014).

Baku emas diagnosa malaria adalah pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan *Giemsa* (Vaidya and Sukesh, 2012; CDC, 2013; Adel *et al*, 2014; WHO, 2014). Dengan pengecatan yang baik, pemeriksaan ini dapat menentukan spesies dan stadium *Plasmodium* yang menginfeksi sehingga pengobatan menjadi lebih tepat. Namun terdapat beberapa kekurangan yang menurunkan sensitivitas pemeriksaan ini, diantaranya pengecatan *Giemsa* tidak bisa secara meyakinkan mendeteksi parasitemia yang sangat

rendah (Vaidya and Sukesh, 2012; Adel *et al*, 2014). Seorang tenaga laboratorium umumnya hanya dapat mendeteksi parasit dengan ambang batas antara 50-100 parasit/ $\mu$ l (WHO, 2010).

Dalam kasus infeksi campuran sulit membuat diagnosis yang benar dengan pengecatan *Giemsa* jika satu diantaranya menginfeksi eritrosit dalam jumlah sedikit (Adel *et al*, 2014). Selain itu, spesies *Plasmodium* tertentu memiliki kemiripan struktur mikroskopis dengan spesies lain misalnya *P. knowlesi* yang sangat mirip dengan *P. malariae* dan *P. falciparum* (Cox-Singh and Singh, 2008; Imwong *et al*, 2009; Lee *et al*, 2009). Penelitian Lee *et al*, (2009) yang dilakukan terhadap arsip sediaan darah sejak tahun 1996 di Sarawak, Malaysia, dimana beberapa sediaan darah yang dinyatakan positif *P. malariae* berdasarkan pemeriksaan mikroskopis ternyata adalah *P. knowlesi* berdasarkan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Beberapa penelitian menggunakan metode PCR dalam identifikasi parasit malaria

menunjukkan PCR lebih sensitif dan lebih spesifik dibandingkan pemeriksaan mikroskopis (Badaby *et al*, 2009; Snounou and Singh, 2002), terutama pada infeksi campuran dan infeksi dengan kadar parasitemia rendah (Adel *et al*, 2014; Alemu *et al*, 2014).

Di Provinsi Jambi, angka *Annual Parasite Incidence* (API) mengalami penurunan dari tahun ke tahun. Angka API di Provinsi Jambi pada tahun 2009 adalah 1,89, pada tahun 2011 menurun hingga 1,46 per 1000 penduduk, pada tahun 2015 menurun hingga 0,47 per 1000 penduduk (Pusdatin, 2016). Pada tahun 2017 ini beberapa kabupaten telah dinyatakan bebas malaria, namun morbiditas yang diakibatkan penyakit malaria dan sulitnya membuat diagnosis spesies yang tepat terutama pada kasus sulit menjadikan upaya penegakan diagnosis spesies yang tepat menjadi sangat penting.

Sejauh ini belum ada penelitian mengenai uji diagnostik PCR pada kasus malaria di Provinsi Jambi. Oleh karena latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas metode PCR dibandingkan dengan pengecatan *Giemsa* dalam menegakkan diagnosis malaria di Provinsi Jambi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas

metode PCR dibandingkan dengan pengecatan *Giemsa* dalam menegakkan diagnosis malaria.

## METODE

Sebanyak 87 sampel darah dari penderita suspek malaria didapatkan dari Laboratorium RS Theresia Kota Jambi periode Januari – April 2017.

Pengecatan *Giemsa* dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi, pembacaan hasil dilakukan oleh peneliti dan dikonfirmasi dengan seorang Parasitolog di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Pembuatan apusan darah tebal dan tipis dilakukan sesuai dengan panduan dari CDC pada satu objek glass. Apusan darah tipis difiksasi dengan methanol. Kemudian dilakukan pengecatan *Giemsa*. Setelah kering, preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran obyektif 100 kali dan menggunakan minyak imersi.

Pemeriksaan PCR dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. PCR yang dilakukan adalah nested PCR dengan sumber DNA dari darah segar (whole blood). Sampel darah segar dalam tabung EDTA diekstraksi dengan menggunakan protokol ekstraksi dari Qiagen blood mini kit sehingga dihasilkan isolat DNA yang disimpan

pada kulkas suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga PCR dilakukan.

Primer yang digunakan pada PCR ini terdiri dari enam pasang primer. Satu pasang primer merupakan primer genus *Plasmodium* yang digunakan pada PCR pertama. Sedangkan lima pasang primer lainnya merupakan primer spesies *Plasmodium* yang digunakan pada nested-PCR. Penjelasan lebih rinci mengenai primer yang digunakan dapat dilihat pada tabel1.

Amplifikasi nest 1 dengan primer *Plasmodium* sp dimulai dengan denaturasi inisial  $94^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit diikuti 35 siklus dengan suhu denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, suhu *annealing*  $57^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit dan suhu ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, diikuti ekstensi final  $72^{\circ}\text{C}$  4 menit dan diakhiri pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Amplifikasi nest 2 dilakukan dalam dua kali *running*, untuk primer spesies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale* dilakukan dengan denaturasi inisial  $94^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit diikuti 35 siklus dengan suhu denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, suhu

*annealing*  $60^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit dan suhu ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, diikuti ekstensi final  $72^{\circ}\text{C}$  4 menit dan diakhiri pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Suhu *annealing* ini didapatkan berdasarkan optimasi suhu yang telah dilakukan sebelumnya.

Sedangkan untuk primer spesies *P. Knowlesi* dilakukan dengan denaturasi inisial  $94^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit diikuti 35 siklus dengan suhu denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, suhu *annealing*  $62^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit dan suhu ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, diikuti ekstensi final  $72^{\circ}\text{C}$  4 menit dan diakhiri pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .

Volume total reaksi PCR adalah 25  $\mu\text{L}$  yang berisi 0,5  $\mu\text{L}$  masing-masing primer (tabel primer), 10  $\mu\text{L}$  Go *Taq green* mix (Promega), 9  $\mu\text{L}$  air steril dan 5  $\mu\text{L}$  *template* DNA.

Visualisasi pita hasil PCR multipleks dilakukan dengan cara elektroforesis pada 2% gel agarosa, 1X TAE, 80 volt, 400 mili ampere selama 20 menit, diwarnai dengan etidium bromida 10 mg/mL dan difoto dengan *Biorad Gel Doc* (Biorad System, USA).

**Tabel 1. Primer dan Ukuran Amplikon *Plasmodium spp.* untuk Pemeriksaan Nested PCR**

No	Species	Primer	Sequence (5'-3')	Ukuran Amplikon (bp)
1.	<i>Plasmodium spp.</i>	rPLU5 rPLU6	CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	1.100
2.	<i>P. falciparum</i>	rFAL1 rFAL2	TTAAACTGGTTTGGGAAAACC AAATATATT ACACAATGAACTCAATCATGA CTACCCGTC	205
3.	<i>P. vivax</i>	rVIV1 rVIV2	CGCTTCTAGCTTAATCCACAT AACTGATAC ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGA AAGTCCTTA	120
4.	<i>P. ovale</i>	rOVA1 rOVA2	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAG TATTGGAGA GGAAAAGGACACATTAATTGT ATCCTAGTG	800
5.	<i>P. malariae</i>	rMAL1 rMAL2	ATAACATAGTTGTACGTTAAG AATAACCGC AAAATTCCCATGCATAAAAAA TTATACAAA	144 bp
6.	<i>P. knowlesi</i>	PK18SF PK18SR	GAGTTTTTCTTTTCTCCCGGAG GGGAAAGGAATCACATTTAACGT	424 bp

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pemeriksaan mikroskopik dengan pengecatan *Giemsa* terhadap 87 sampel pada penelitian ini, didapatkan hasil positif *P. falciparum* sebanyak satu sampel (1,1%) yaitu pada sampel no. 36 dan *P. vivax* sebanyak empat sampel (4,6%) yaitu pada sampel no. 84, 85, 86 dan 87. Sedangkan 82 sampel (94,3%) negatif. Pada pemeriksaan PCR, PCR nest-1 menggunakan primer genus *Plasmodium spp.* ditemukan 5 sampel positif dengan ukuran amplikon 1100 bp (sampel no. 36, 84, 85, 86 dan 87). Selanjutnya dilakukan PCR nest-2 dengan 5 pasang primer sesuai spesies

*Plasmodium* dan ditemukan 2 spesies yaitu *P. falciparum* dan *P. vivax*. Sebanyak satu sampel (1,1%) *P. falciparum* yaitu pada sampel no. 36 dengan ukuran amplikon 205 bp dan empat sampel (4,6%) *P. vivax* yaitu pada sampel no. 84, 85, 86 dan 87 dengan ukuran amplikon 120 bp. Tidak ditemukan infeksi campuran. Hasil ini sesuai dengan hasil pemeriksaan mikroskopik dengan pengecatan *Giemsa*. Hasil PCR dapat dilihat pada gambar 1-5.

Uji diagnostik terhadap 87 sampel tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2 Uji Diagnostik Hasil Pemeriksaan Giemsa dan PCR (n=87)**

		Pemeriksaan mikroskopis		Jumlah
		Positif	Negatif	
PCR	Positif	5	0	5
	Negatif	0	82	82
Jumlah		5	82	87

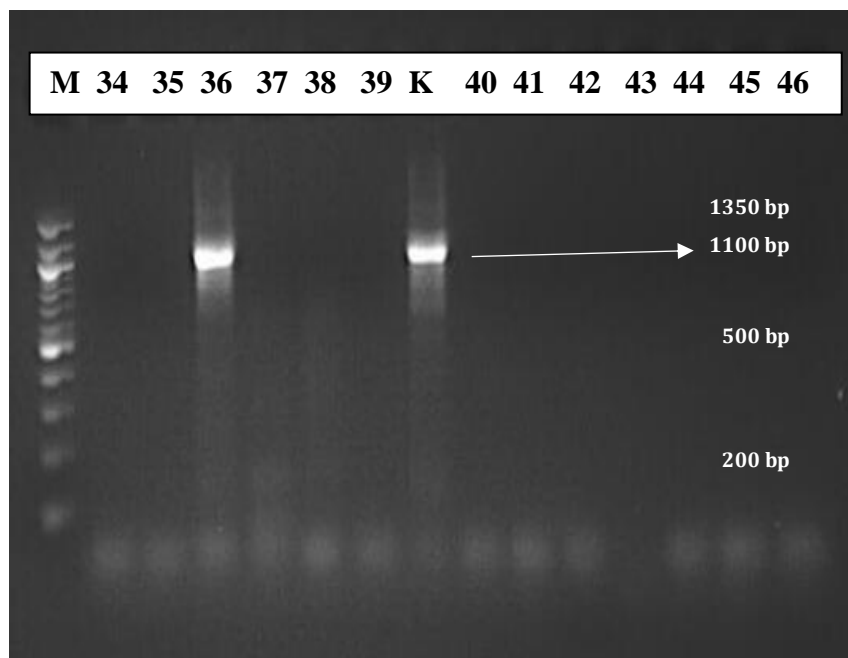
Berdasarkan tabel di atas maka didapatkan nilai uji diagnostik sebagai berikut:

Sensitivitas =  $a / (a+c)$   
 =  $5 / (5+0)$   
 = 100%

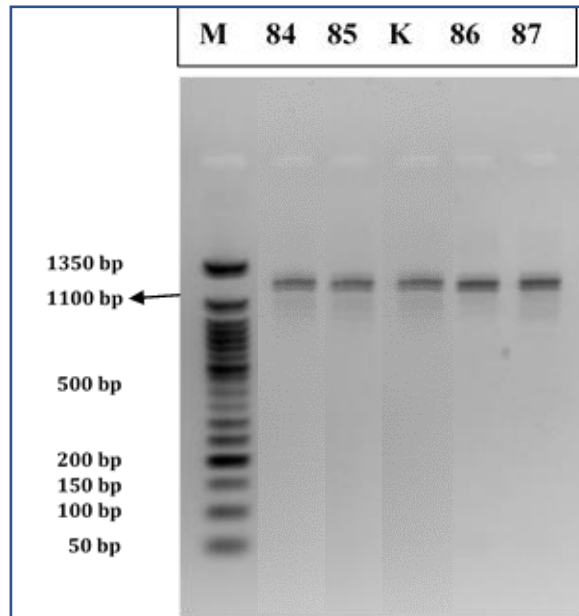
Spesifisitas =  $d / (b+d)$   
 =  $82 / (0+82)$   
 = 100%

Nilai prediksi positif (PPV) =  $a / (a+b)$   
 =  $5 / (5+0)$   
 = 100%

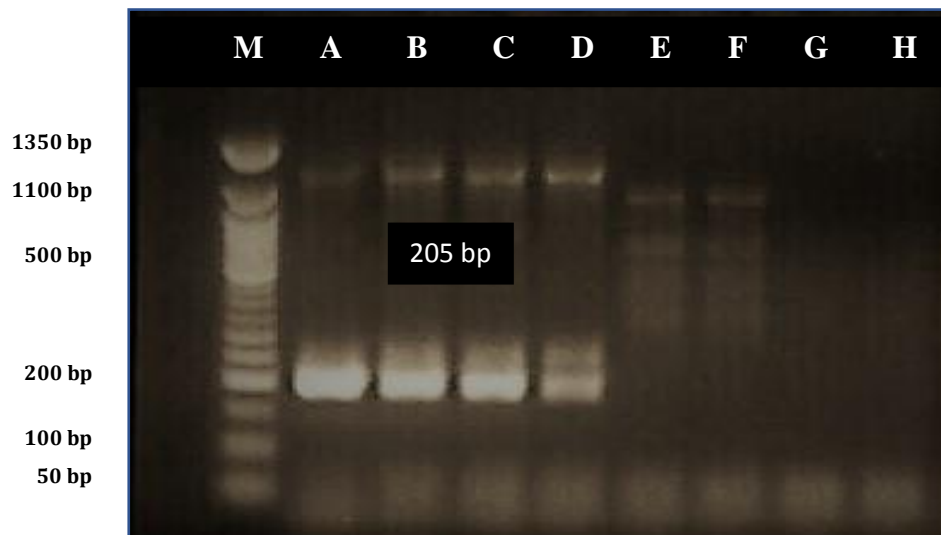
Nilai prediksi negatif (NPV) =  $d / (c+d)$   
 =  $82 / (0+82)$



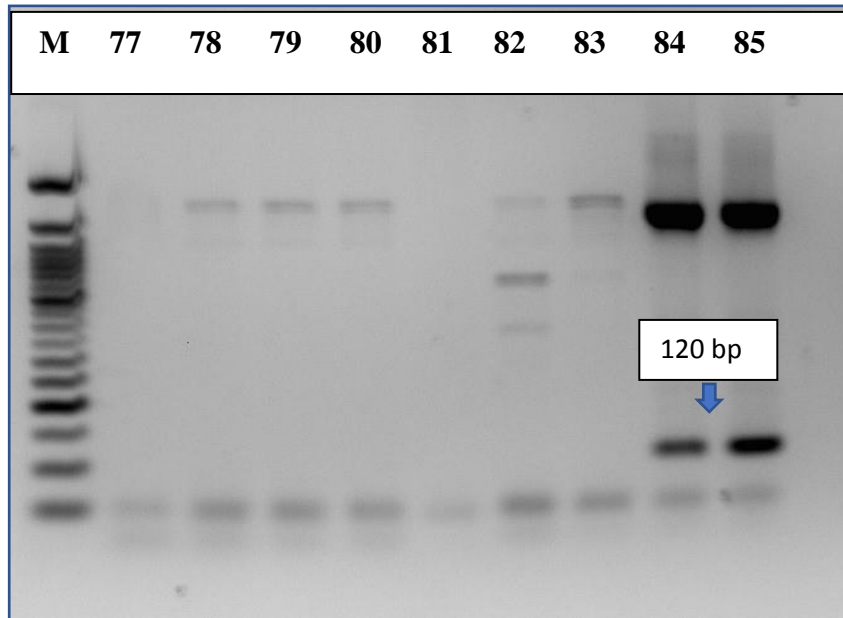
**Gambar 1. Hasil PCR Nest 1 (*Plasmodium spp*) dengan Amplikon Sebesar 1100 bp, M adalah Marker DNA, K adalah Kontrol Positif, Sampel positif no.36**



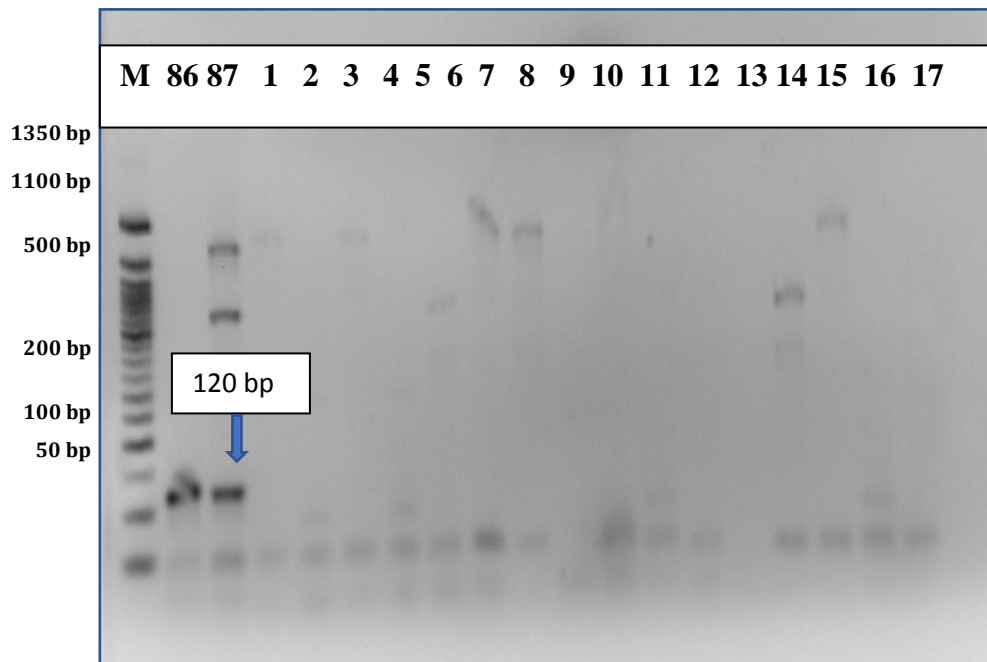
**Gambar 2.** Hasil PCR Nest 1 (*Plasmodium spp*) dengan Amplikon Sebesar 1100 bp, M adalah Marker DNA, K adalah Kontrol Positif, Sampel Positif no.84,85,86 dan 87



**Gambar 3.** Hasil PCR Nest 2 (*P.falciparum*) dengan Amplikon Sebesar 205 bp, M adalah Marker DNA, A-D = sampel no.36, suhu annealing 60°C(A), 59°C(B), 58°C(C) dan 57°C (D)



**Gambar 4. Hasil PCR Nest 2 (*P.vivax*) dengan Amplikon Sebesar 120 bp, M adalah Marker DNA, Sampel positif no.84 dan 85**



**Gambar 5. Hasil PCR Nest 2 (*P.vivax*) dengan Amplikon Sebesar 120 bp, M adalah Marker DNA, Sampel positif no.86 dan 87**



Berdasarkan hasil pemeriksaan baik pengecatan *Giemsa* maupun PCR ditemukan dua spesies *Plasmodium* yang menginfeksi pada sampel penelitian ini yaitu *P. falciparum* dan *P. vivax*, sedangkan tiga spesies lainnya tidak ditemukan. Hal ini sesuai dengan data dari Dinas Kesehatan Provinsi Jambi dimana *P. falciparum* dan *P. vivax* merupakan spesies yang paling banyak ditemukan di Jambi. Tidak terdapat infeksi campuran dan tidak terdapat kesalahan interpretasi spesies berdasarkan pengecatan *Giemsa* karena morfologi kedua spesies ini memang khas dan dapat dibedakan secara mudah melalui pengamatan di bawah mikroskop. Kelemahan pada penelitian ini adalah sedikitnya jumlah

sampel positif dan kurang beragamnya spesies *Plasmodium* yang ditemukan, sehingga hasil uji diagnostik PCR baik sensitivitas maupun spesifisitas sangat tinggi yaitu 100 persen. Selanjutnya perlu dilakukan penelitian dengan jumlah sampel positif yang lebih banyak dan spesies yang lebih beragam sehingga dapat lebih nyata menilai sensitivitas dan spesifisitas PCR dibanding pengecatan *Giemsa* dalam penegakan diagnostik malaria.

## KESIMPULAN

Metode PCR sangat sensitif dan spesifik dalam penegakan diagnosis malaria dan mampu mengidentifikasi spesies parasit secara akurat.

## REFERENSI

- Adel E, Saeed M, Ali PM. 2014. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) on Fixed Stained Slides in Comparison to Whole Blood as a Source of DNA in Southeast of Iran. *J Trop Dis.* 2:3.
- Alemu A, Fuehrer HP, Getnet G, Kassu A, Getie S, Noed H. 2014. Comparison of Giemsa microscopy with nested PCR for the diagnosis of malaria in North Gondar, north-west Ethiopia. *Alemu et al. Malaria Journal.* 13:174.
- Babba I. 2007. Faktor-Faktor Risiko yang Mempengaruhi Kejadian Malaria. Diunduh dari: <http://eprints.undip.ac.id/17758/15/IKRAYAMMABABBA.pdf>. Diakses pada tanggal 4 Desember 2016.
- Badaby NE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Pritt BS. 2009. Short Report: Detection of *Plasmodium knowlesi* by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(3): 516–518.
- CDC. 2013. Malaria. Diunduh dari: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>. Diakses pada tanggal 4 Desember 2014.
- CDC. 2014. Laboratory Diagnosis of Malaria - Determination of Parasitemia. Diunduh dari : [http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Parasitemia\\_andLifeCycle.pdf](http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Parasitemia_andLifeCycle.pdf). Diakses pada: 12 Maret 2014.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. 2008. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans is Widely Distributed and Potentially Lifethreatening. *Clinical Infectious Diseases.* 46: 165–171.

- Cox-Singh J, Singh B. 2008. Knowlesi Malaria: Newly Emergent and of Public Health Importance? *Trend in Parasitology*. 24(9): 406-410.
- Depkes RI. 2008. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia. Diunduh dari: [http://www.pppl.depkes.go.id/asset/\\_download/Pedoman\\_Penatalaksana\\_Kasus\\_Malaria\\_di\\_Indonesia.pdf](http://www.pppl.depkes.go.id/asset/_download/Pedoman_Penatalaksana_Kasus_Malaria_di_Indonesia.pdf). Diakses pada: 13 Januari 2014.
- Dinkes Provinsi Jambi. 2006. Analisa Situasi Malaria, Rekapitulasi Laporan Pengobatan dan Penemuan Penderita Klinis Malaria per Kabupaten dalam Provinsi Jambi.
- Doolan DL, Dobano C, Baird JK. 2009. Acquired Immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(1): 13-36.
- Elwakil HS and Abaza, SM. 2013. Towards a Unified Taxonomy. *PUJ*. 6(1): 1-5.
- Figtree M, Lee R, Bain L, Kennedy T, Mackertich S, Urban M, Cheng Q, Hudson BJ. 2010. *Plasmodium knowlesi* in Human, Indonesian Borneo. *Emerg Inf Dis.* 16(4): 672-674.
- Handoyo D, dan Rudiretna A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. 9(1): 17-29.
- Hariyanto P. 2006. Malaria. In: Sudoyo A, Sotiyohandi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S (eds). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. 4th ed. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. p. 1754-66.
- Ima AL, Purwanto AP, Arfi S, Tetrawindu H, Octora M, Mulyanto, Surayah K, Amanukarti. 2006. Uji Diagnostik *Plasmodium* Malaria Menggunakan Metode Imunokromatografi Diperbandingkan dengan Pemeriksaan Mikroskopis. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 12(3): 118-122.
- Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day NPJ, White NJ, Snounou G. 2009. Spurious Amplification of a *Plasmodium vivax* Small-Subunit RNA Gene by Use of Primers Currently Used To Detect *P.knowlesi*. *J Clin Microbiol.* 47(12): 4173-4175.
- Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJ. 2006. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *J Clin Microbiol.* 44(3): 1087–1089.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. 2004. Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Malaria in Human, Thailand. *Emerg Inf Dis.* 10: 2211–2213.
- Kantele A, Jokiranta TS. 2011. Review of Case: the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Inf Dis.* 52(11): 1356-1362.
- Kemenkes RI. 2010. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Riset Kesehatan Dasar 2010.
- Kemenkes RI. 2011. Direktorat Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang. Pedoman Teknis Pemeriksaan Parasit Malaria.
- Kemenkes RI. 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Riset Kesehatan Dasar 2013.
- Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. 2009. Morphological Features and Differential Counts of *Plasmodium knowlesi* Parasites in Naturally Acquired Human Infections. *Malaria Journal*. 8: 73.
- McCutchan TF, Piper RC, Makler MT. 2008. Use of Malaria Rapid Diagnostic Test to Identify *Plasmodium knowlesi* Infection. *Emerg Inf Dis.* 14(11): 1750-1752.
- Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Jarrod LP, Ng LC, Wong PS, Tu TM, Loh JP, Leo YS. 2008. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore. *Emerg Inf Dis.* 14: 814–816.
- Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 5. 2013. Pedoman Tata Laksana Malaria. Diunduh dari: [www.djpp.depkumham.go.id](http://www.djpp.depkumham.go.id). Diakses pada: 13 Januari 2014.

- Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI. 2016. Malaria. Diunduh dari: [www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/InfoDatin-Malaria-2016.pdf](http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/InfoDatin-Malaria-2016.pdf). Diakses pada: 13 Januari 2014.
- Putaporntip C, Hongsumuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongutiwes S. 2009. Differential Prevalence of *Plasmodium* Infections an Cryptic *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans in Thailand. *J Inf Dis*.199:1143–50.
- Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. 2012. Human *Plasmodium knowlesi* Infection in Ranong Province, South Western Border of Thailand. *Malaria Journal*. 11: 36.
- Singh B, Daneshvar C. 2013. Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(2):165-184.
- Singh B, Lee KS, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway D. 2004. A Large Focus of Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Infection in Human Beings. *The Lancet* 363, 1017-1024.
- Snounou G, Singh B. 2002. Nested PCR Analysis of Plasmodium Parasites. *Methods Mol. Med.* 72:89-203.
- Tan CH, Vythilingam I, Matusop A, Chan ST, Singh B. 2008. Bionomics of *Anopheles latens* in Kapit, Sarawak, Malaysian Borneo in Relation to The Transmission of Zoonotic Simian Malaria Parasite *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*. 7(1): 52- 59.
- Van den Eede P, Vythilingam I, Duc TN, Van HN, Hung LX, D'Alessandro U. 2010. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Vietnam: Some Clarifications. *Malaria Journal* .9:20
- Vaidya KA and Suresh. 2012. Quantitative Buffy Coat (QBC) Test and Other Diagnostic Techniques for Diagnosing Malaria. *National Journal of Medical Research*. 2(3): 386-388.
- Vythilingam, I. 2010. *Plasmodium knowlesi* in Humans: A Review on The Role of Its Vectors in Malaysia. *Trop Biomed*. 27(1): 1-12.
- Vythilingam, I., NoorAzian, Y., M., Huat, T., C., Jiram, A., I., Yusri, Y., M., Azahari, A., H., NorParina I, NoorRain A, LokmanHakim S. 2008. *Plasmodium knowlesi* in Humans, Macaques and Mosquitoes in Peninsular Malaysia. *Parasite and Vectors*. 26(1).
- White NJ. 2008. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clin Inf Dis*. 46: 172-173.
- WHO. 2010. Basic Malaria Microscopy PartI Learner's guide. 2nded. WHO. Diunduh dari : [http://www.searo.who.int/LinkFiles/Malaria\\_malaria\\_microscopy\\_Learners\\_guide2010.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Malaria_malaria_microscopy_Learners_guide2010.pdf). Diakses pada : 11 Januari 2014
- WHO. 2014. World Malaria Report 2014. WHO Press, Switzerland.
- Yan J, Li N, Wei X, Li P, Zhao Z, Wang L, Li S, Li X, Wang Y, Li S, Yang Z, Zheng B, Zhou G, Yan, G, Cui L, Cao Y, Fan Q. 2013. Performance of Two Rapid Diagnostic Tests for Malaria Diagnosis at the China-Myanmar Border Area. *Malaria Journal*. 12:73.
- Zakeri S, Kakar Q, Ghasemi F, Raeisi A, Butt W, Safi N, Afsharpad M, Memon MS, Gholizadeh S, Salehi M, Atta H, Zamani G, Djadid NP. 2010. Detection of mixed *Plasmodium falciparum* & *P. vivax* infections by nested-PCR in Pakistan, Iran & Afghanistan. *Indian J Med Res*. 132:31-35.