

Deteksi *Plasmodium knowlesi* Menggunakan *Nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) di Kecamatan Muara Komam Kalimantan Timur

Detection of *Plasmodium knowlesi* using *Nested Polymerase Chain Reaction* (PCR) in Muara Komam District, East Kalimantan

Zulfa Zahra Salsabila¹, Rintis Noviyanti², Farah Coutrier², Leily Trianty², Eman Sutrisna³, Lantip Rujito^{3*}

¹Institut Teknologi Kesehatan dan Sains (ITKES) Wiyata Husada Samarinda
Jalan Kadrie Oening Gang Monalisa Nomor 77, Air Hitam, Kota Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia

²Lembaga Biologi Eijkman Jakarta
Jalan Pangeran Diponegoro Nomor 69, Kenari, Kecamatan Senen, Kota Jakarta Pusat, Indonesia

³Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto
Jalan Dr. Gumbreg Nomor 1, Mersi, Purwokerto Kidul, Kecamatan Purwokerto Selatan, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah, Indonesia
E_mail: l.ujito@unsoed.ac.id

Received date: 13-11-2022, Revised date: 20-12-2022 Accepted date: 27-12-2022

ABSTRAK

Plasmodium knowlesi adalah parasit genus plasmodium yang secara alami menginfeksi kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dan merupakan zoonotik, sekarang sudah dilaporkan menginfeksi manusia. Identifikasi/deteksi *P. knowlesi* dapat dilakukan menggunakan pemeriksaan RDT, mikroskopis, maupun molekuler menggunakan *nested PCR*. *Nested PCR* merupakan metode pemeriksaan paling sensitif dan spesifik untuk saat ini. Penelitian ini bertujuan mendeteksi *P. knowlesi* pada manusia dengan pemeriksaan RDT, mikroskopis, dan *nested PCR*. Jenis penelitian adalah deskriptif dengan pendekatan *cross sectional*, dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juli 2019. Sampel dalam penelitian ini sejumlah 123 yang berasal dari pasien terduga teinfeksi malaria dan melakukan pemeriksaan laboratorium di Puskesmas Muara Komam. Pemeriksaan mikroskopis dan pemeriksaan RDT dilakukan di Puskesmas Muara Komam, sedangkan *nested PCR* dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Eijkman Jakarta. Hasil pemeriksaan RDT dan mikroskopis menunjukkan sebanyak 16 dari 123 (13%) sampel positif malaria *P. falciparum* dan *P. vivax*, 10 dari 123 (8,1%) sampel positif malaria *P. falciparum* dan *P. vivax*. Pemeriksaan *nested PCR* yang menargetkan gen SSU rRNA mampu mengidentifikasi *P. knowlesi* sebanyak 6 dari 123 (4,87%). Penelitian menunjukkan bahwa *Plasmodium knowlesi* terdeteksi pada manusia di Muara Komam, Kalimantan Timur melalui pemeriksaan *nested PCR*.

Kata kunci: malaria, *P. knowlesi*, *nested PCR*, Kalimantan Timur

ABSTRACT

Plasmodium knowlesi is a parasite of the genus plasmodium that naturally infects long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*), but currently reported has ability to infect humans. The identification/detection of *P. knowlesi* can be done using RDT, microscopic, or molecular examinations using *nested PCR*. *Nested PCR* is the most sensitive and specific method of examination to date. This study aimed to detect *P. knowlesi* in humans by RDT, microscopic, and *nested PCR* examinations. The study was descriptive with a cross-sectional approach, carried out from March to July 2019. The samples in this study were 123 patients who were suspected of being infected with malaria and who underwent laboratory tests at the Muara Komam Health Center. Microscopic examination and RDT examination were carried out at the Muara Komam Health Center, while *nested PCR* was carried out at the Eijkman Molecular Biology Laboratory Jakarta. The results of RDT and microscopic examinations showed as many as 16 of 123 (13%) malaria-positive samples of *P. falciparum* and *P. vivax*, and 10 of 123 (8.1%) malaria-positive samples of *P. falciparum* and *P. vivax*. *Nested PCR* tests targeting the rRNA SSU gene were able to identify *P. knowlesi* by 6 out of 123 (4.87%). In conclusion, the study showed that *Plasmodium knowlesi* was detected in humans in Muara Komam, East Kalimantan through *nested PCR* examination.

Keywords: malaria, *P. knowlesi*, *nested PCR*, Kalimantan Timur

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit endemis di Indonesia yang dapat menyebabkan kematian. Insidensi malaria menurut data *World Malaria Report* diperkirakan sebanyak 219 juta kasus yang tersebar di 87 negara dengan jumlah kematian mencapai 435000.¹ Ada lima spesies dari genus *Plasmodium* sebagai penyebab malaria yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi*.^{2,3}

Target eliminasi malaria di Indonesia berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomor 293/MENKES/SK/IV/2009 yaitu pada tahun 2030.⁴ Kasus baru malaria di Indonesia pada tahun 2020 sebanyak 254.055 kasus. Jumlah terduga malaria yang dikonfirmasi menggunakan teknik laboratorium mikroskopis dan atau RDT mencapai 97%. Jumlah ini diperoleh dari pemeriksaan 1.823.104 dari 1.877.769 individu yang diperiksa, dengan *positivity rate* (PR) sebesar 14%. Pada tahun 2020 angka *Annual Parasite Incidence* (API) di Indonesia masih sebesar 0,87 per 1000 penduduk.⁵

Spesies *Plasmodium* yang paling banyak ditemukan di antara lima spesies adalah *P. falciparum* (143.926 kasus) dan *P. vivax* (95.694 kasus).¹ Secara statistik, kasus *P. knowlesi* pada manusia masih minim ditemukan di wilayah Indonesia, dengan angka positif tidak lebih dari 27 kasus. Data tersebut diperoleh dari penelitian di Kalimantan Selatan dari penelitian 2010 sampai tahun 2019.⁶⁻⁸

Pemeriksaan baku standar untuk diagnosis malaria sampai saat ini adalah dengan pemeriksaan mikroskop cahaya pada pewarnaan giemsa apusan darah tebal dan tipis untuk melihat adanya bentuk *Plasmodium*.⁹ Diagnosis *P. knowlesi* dengan pemeriksaan mikroskopis dapat terjadi mis-identifikasi dengan spesies lain akibat kemiripan morfologis antara *P. knowlesi* dengan *P. malariae* serta *P. falciparum*.¹⁰ *Rapid Diagnostic Test* (RDT) adalah pemeriksaan alternatif dalam diagnosis malaria dengan target antigen *Plasmodium*. Pemeriksaan ini telah digunakan secara luas di berbagai negara. Semua RDT yang tersedia secara komersial saat

ini dikembangkan sebelum diketahui bahwa *P. knowlesi* dapat menginfeksi manusia. Fakta ini mengakibatkan pemeriksaan RDT tidak sensitif dalam mendeteksi *P. knowlesi*.¹¹

Kesalahan diagnosis malaria *P. knowlesi* dapat dapat menyebabkan kondisi penderita menjadi parah, seperti terjadinya trombositopenia, gagal ginjal akut, dan hemolisis.^{12,13} Hal ini terjadi karena *Plasmodium* ini memiliki siklus eritrositik yang pendek sekitar 24 jam yang mengakibatkan jumlah parasit dalam tubuh dapat meningkat dengan cepat, sehingga infeksi dapat berpotensi menjadi berat.¹⁴ Kondisi tersebut menyebabkan perlunya pendekatan molekuler yang bersifat konfirmasi untuk mendeteksi *P. knowlesi* karena pemeriksaan ini memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi.¹⁵

Diagnosis konfirmasi *P. knowlesi* dengan metode deteksi berbasis PCR yang menargetkan spesifik gen rRNA lebih sensitif dan spesifik bila dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskop. Walaupun demikian, uji ini membutuhkan peralatan dan tenaga teknis yang khusus dan tidak tersebar di semua laboratorium uji. Pemeriksaan *nested PCR* menargetkan gen 18S ribosomal RNA (18S rRNA). Dalam teknik ini, primer PCR PkF1160, PkF1140, dan PkR1550 yang spesifik untuk *P. knowlesi*¹⁶ digunakan dalam reaksi sekunder setelah dilakukan amplifikasi oleh primer yang spesifik genus *Plasmodium*, rPLU5 – rPLU6.¹⁷

Kecamatan Muara Komam merupakan salah satu habitat dari primata kera ekor panjang yang masih sering ditemukan dan hidup bebas dekat dengan perkampungan warga. Muara Komam merupakan pintu perbatasan menuju Provinsi Kalimantan Selatan di mana setelah tahun 2010 telah dilaporkan adanya infeksi malaria *P. knowlesi* di provinsi tersebut.

Ketidaktahuan petugas laboratorium akan adanya infeksi *P. knowlesi* memungkinkan dapat terjadinya kesalahan pembacaan apusan darah antara *P. falciparum* dan *P. malariae* dengan *P. knowlesi*. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi infeksi malaria *P. knowlesi* pada

manusia menggunakan RDT, pemeriksaan mikroskopik, dan *nested PCR*.

METODE

Penelitian *cross sectional* ini dilakukan pada bulan Maret - Juli 2019 di Kecamatan Muara Komam Kabupaten Paser Provinsi Kalimantan Timur. Penentuan besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus untuk uji diagnostik, dengan perkiraan sensitifitas mikroskopik 85-90% dan interval kepercayaan 95%. Total sampel yang diperoleh sebanyak 123 sampel. Kriteria dari sampel adalah pasien yang melakukan pemeriksaan malaria di Puskesmas Muara Komam, dan Puskesmas Keliling Muara Komam.

Pemeriksaan RDT dan mikroskopik menggunakan darah kapiler sedangkan untuk pemeriksaan PCR menggunakan darah vena masing-masing sebanyak 3ml yang dikoleksi pada tabung *ethylene diaminetetra acetide acid* (EDTA). Sampel darah EDTA kemudian disimpan di kulkas dengan suhu 4 °C sebelum dibawa ke laboratorium untuk dilakukan ekstraksi DNA. Pemeriksaan mikroskopis dan RDT dilakukan di laboratorium Puskesmas Muara Kowam, dengan validasi di laboratorium Eijkman Jakarta, sedangkan uji *nested PCR* dilakukan di laboratorium Eijkman Jakarta.

Pemeriksaan RDT dalam penelitian ini menggunakan RDT *CareStart™* Malaria HRP2/pLDH (Pf/PAN) Combo (Access Bio Inc.). Pemeriksaan RDT berdasarkan deteksi dari *histidine rich protein 2* (HRP-2) spesifik untuk *P. falciparum* dan *parasite lactate dehydrogenase* (pLDH) spesifik untuk *Plasmodium* sp. Pemeriksaan RDT dilakukan sesuai dengan buku panduan dari pabrik. Hasil dari *rapid test* dapat dibaca setelah 15 menit. Pasien dengan hasil positif RDT akan langsung diobati.

Apusan darah tebal dan tipis dibuat dengan darah kapiler. Apusan darah tipis di fiksasi menggunakan methanol kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa 10%. Apusan darah dibaca oleh peneliti dan dikonfirmasi ulang oleh ahli mikroskopis dari Lembaga Biologi Eijkman Institute, Jakarta.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) sesuai dengan instruksi pabrik. DNA yang diekstraksi disimpan pada suhu -20 °C sampai diperlukan untuk analisis molekuler. *Nested PCR* menggunakan dua set primer dan dua reaksi PCR. Amplikon yang dihasilkan dari reaksi PCR pertama digunakan sebagai templat untuk set primer kedua sebagai amplifikasi kedua.¹⁸ Primer yang digunakan untuk PCR *nest* pertama *Plasmodium genus-spesific* adalah rPLU 6 – rPLU 5, sedangkan untuk PCR *nest* pertama *Plasmodium knowlesi-spesific* adalah PkF 1160 – PkR 1150. Primer *nest* kedua yang digunakan untuk *Plasmodium species-spesific* adalah rFAL 1 – rFAL 2, rVIV 1 – rVIV 2, dan PkF1140 – PkR 1150.^{16,17}

Hasil PCR *nest* kedua kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan 1% gel agarose, yang diwarnai dengan *ethidium bromide*. Pita-pita DNA yang tervisualisasi divalidasi menggunakan *apparatus Gel Doc*.

Data diolah menggunakan *Microsoft Access Database* dengan frekuensi dan interval kepercayaan 95% (CI) untuk digunakan sebagai variabel kategori. Setiap metode pemeriksaan mikroskopis, RDT, dan *nested PCR* dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai prediktif positif (PPV), dan nilai prediktif negatif (NPV).

Penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kedokteran FK Universitas Jenderal Soedirman dengan nomor Ref:1085/KEPK/III/2019. *Informed consent* tertulis diperoleh dari semua peserta.

HASIL

Sebanyak 123 sampel diperoleh dari bulan Maret – Juli 2019 diperiksa RDT, mikroskopis, dan *nested PCR*. Terbanyak pada rentang usia 21 – 50 tahun; (82,9%), sedangkan berdasar jenis kelamin sampel terbanyak adalah laki-laki (54%) (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian (n=123)

Karakteristik pasien	Total (%)
Jenis Kelamin	
Wanita	56 (45,53)
Laki-laki	67 (54,47)
Total	123 (100)
Usia	
< 20	15 (12,30)
20– 50	102 (82,90)
> 50	6 (4,80)
Total	123 (100)

Hasil pemeriksaan dengan RDT ditemukan 13% positif malaria, pemeriksaan mikroskopik sebanyak 8,1% positif malaria, dan pemeriksaan molekuler dengan *nested PCR* sebanyak 18,7% positif malaria. Perbedaan yang signifikan ditemukan di antara sampel positif dan negatif dan pada spesies yang

berbeda ketika membandingkan ketiga metode pemeriksaan (Tabel 2).

Hasil pemeriksaan positif RDT sebanyak 5 positif *P. falciparum*, 5 positif *P. vivax*, dan 6 positif campuran *P. falciparum* dan *P. vivax* (Tabel 2). Hasil positif pemeriksaan mikroskopis berdasarkan hasil pembacaan sediaan apus darah, diketahui 3 sampel positif *P. falciparum*, 4 sampel positif *P. vivax*, 1 positif campuran *P. falciparum* dan *P. vivax*, dan 2 sampel positif campuran *P. knowlesi* dan *P. vivax*. Hasil positif pemeriksaan *nested PCR* ditemukan sebanyak 7 sampel positif *P. falciparum*, 8 positif *P. vivax*, 4 positif *P. knowlesi*, 2 positif campuran *P. falciparum* dan *P. vivax*, 1 positif campuran *P. falciparum* dan *P. knowlesi*, dan 1 sampel positif campuran *P. knowlesi* dan *P. vivax*.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan *Plasmodium* antara RDT, Mikroskopis, dan *Nested PCR*

	RDT			Mikroskopik			<i>Nested PCR</i>		
	N	%	95% CI	N	%	95% CI	N	%	95% CI
Sampel negatif	107	87	81 – 92,9	113	91,9	85,9 – 97,8	100	81,3	11,8 – 25,6
Sampel positif	16	13	7,1 – 19,0	10	8,1	3,3 – 13,0	23	18,7	75,4 – 87,2
<i>P. falciparum</i>	5	31,2	8,5 – 53,9	3	30	15,9 – 58,4	7	30,4	11,6 – 49,2
<i>P. vivax</i>	5	31,2	8,5 – 53,9	4	40	9,6 – 70,3	8	34,8	15,3 – 54,2
<i>P. knowlesi</i>	-	-	-	-	-	-	4	17,4	1,9 – 32,8
<i>P. falciparum</i> dan <i>P. vivax</i>	6	37,5	13,7 – 61,2	1	10	0,8 – 28,5	2	8,7	0,28 – 20,2
<i>P. falciparum</i> dan <i>P. knowlesi</i>	-	-	-	-	-	-	1	4,3	0,39 – 12,6
<i>P. knowlesi</i> dan <i>P. vivax</i>	-	-	-	2	20	4,7 – 44,7	1	4,3	0,39 – 12,6

Keterangan = N: jumlah sampel. CI: *Confidence Interval*

Tabel 3. Sensitifitas, Spesifisitas, Nilai Prediksi Positif dan Negatif dari RDT, Mikroskopis terhadap hasil *Nested PCR*

	<i>Nested PCR</i>		<i>Sensitivity</i> (95% CI)	<i>Specificity</i> (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
	Positif	Negatif				
RDT						
Positif	13	3	57 (34-77)	97 (91-99)	81 (54-96)	91 (83-95)
Negatif	10	97				
Mikroskopis						
Positif	9	1	90 (55-100)	88 (80-93)	39 (20-61)	99 (95-100)
Negatif	14	99				

Dibandingkan dengan RDT, pemeriksaan mikroskopis memiliki sensitivitas yang lebih

tinggi (90 vs 57), tetapi untuk spesifitas RDT memiliki nilai yang lebih tinggi daripada

mikroskopi (97 vs 88). Untuk nilai prediksi positif RDT memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan mikroskopis (81 vs 39), namun memiliki nilai NPV lebih rendah (91 vs 99) (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Kecamatan Muara Komam merupakan salah satu kecamatan di Kabupaten Paser Provinsi Kalimantan Timur, berbatasan langsung dengan Provinsi Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah. Kedua Provinsi tersebut sebelumnya telah diketahui adanya laporan terkait infeksi malaria *P. knowlesi*.⁶⁻⁸

Deteksi dini dan penanganan segera adalah salah satu strategi utama dalam mengendalikan penyakit malaria. Diagnosis malaria di Kecamatan Muara Komam dilakukan berdasarkan tanda dan gejala klinis pasien, serta pemeriksaan laboratorium berupa pemeriksaan mikroskopis, dengan atau tanpa RDT. Pemeriksaan mikroskopis dengan apusan darah Giemsa merupakan pemeriksaan baku emas dalam mendiagnosis malaria, tetapi apabila di suatu daerah pemeriksaan mikroskopis tidak tersedia, maka konfirmasi malaria dapat menggunakan RDT.¹

Hasil positif pemeriksaan mikroskopis ditemukan sebanyak 10 dari 123 subjek penelitian (8,07%). Terdapat dua sampel yang memiliki kualitas sediaan apus darah yang buruk dan mengakibatkan sediaan tidak dapat terbaca dengan mikroskop. Hasil pemeriksaan RDT dan PCR menunjukkan kedua sampel positif *P. falciparum* dan *P. vivax*.

Diagnosis *P. knowlesi* pada seseorang tidak dapat dilakukan hanya dengan menggunakan pemeriksaan mikroskopik karena kemiripan morfologi *P. knowlesi*, *P. malariae*, dan *P. falciparum*. Hal tersebut menyebabkan diagnosis etiologis sulit ditegakkan dan dapat berakhir dengan kesalahan diagnosis.² *Rapid Diagnostic Test* yang digunakan dalam penelitian ini tidak dapat membedakan *P. knowlesi* dari *P. vivax*. Hal tersebut disebabkan reaksi silang antara antibodi monoklonal genus *Plasmodium* atau

species-specific parasite lactate dehydrogenase (pLDH) tidak hanya bereaksi dengan antigen pada *P. knowlesi* tetapi juga pada *P. vivax*, sehingga tidak dapat dibedakan antara keduanya. Hal ini telah didukung oleh penelitian sebelumnya dengan kesimpulan bahwa identifikasi *P. knowlesi* tunggal dengan RDT memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah.^{19,20} Oleh karena itu, diperlukan pemeriksaan konfirmasi identifikasi *P. knowlesi* dengan sensitifitas dan spesifisitas yang lebih tinggi yaitu dengan pemeriksaan molekuler *nested* PCR dengan gen target SSU rRNA. Gen SSU rRNA digunakan karena spesifik terhadap spesies parasit malaria dan sebagai pembeda spesies malaria.²¹

Total keseluruhan sampel positif dengan setidaknya satu dari tiga parameter pemeriksaan malaria sebanyak 26 dari 123 (21,13%) sampel. Sembilan sampel menunjukkan hasil positif dengan ketiga parameter pemeriksaan, empat sampel positif dengan pemeriksaan *nested* PCR dan RDT, satu sampel menunjukkan hasil positif dengan pemeriksaan RDT dan mikroskop, dua sampel positif hanya dengan pemeriksaan RDT, dan sepuluh sampel positif hanya dengan pemeriksaan PCR.

Satu sampel dengan kode MKM018 pada saat amplifikasi DNA *Plasmodium-specific* dengan menggunakan template DNA 1µL dari total *aliquot* 25µL positif *P. falciparum* dan negatif *P. knowlesi*, tetapi setelah dilakukan pengulangan pemeriksaan sampel dan template DNA yang digunakan dinaikkan sebanyak 3µL, hasil *nested* PCR menunjukkan sampel negatif *P. falciparum* dan positif *P. knowlesi*. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa sampel tersebut positif campuran antara *P. knowlesi* dan *P. falciparum*, dengan parasitemia *P. falciparum* yang tinggi dan parasitemia *P. knowlesi* yang sangat rendah.

Hasil pemeriksaan sampel dengan kode MKM013 dan MKM014 menunjukkan positif *P. falciparum* dengan RDT dan pada pemeriksaan mikroskopis dan *nested* PCR menunjukkan hasil negatif, sedangkan kode sampel MKM089 menunjukkan positif *P. vivax* pada pemeriksaan RDT dan mikroskopis,

sedangkan pemeriksaan *nested* PCR negatif. Setelah dilakukan pengulangan dengan dilusi bertingkat dan menaikkan templat DNA sebanyak 3 μ L hasil ketiga sampel tetap negatif. Pemeriksaan PCR memungkinkan hasil yang sensitif dan spesifik, namun juga memiliki keterbatasan diantaranya adalah terkait dengan target sekuen sesuai primer, sensitifitas reagen, dan *hands on* laboratorium yang teliti. Dua sampel negatif pemeriksaan PCR setelah pengulangan dapat terjadi karena adanya mutan dalam target primer yang diberikan, atau kendala *hands on* dalam pelaksanaan pemeriksaan. Hal ini menjadi keterbatasan atau kelemahan dalam penelitian ini. Hasil penelitian sebelumnya, yang dilakukan di hutan kawasan Kalimantan Tengah dan Selatan menunjukkan adanya hasil positif *P. malariae* dengan pemeriksaan mikroskopis pada pekerja penebang kayu.²² Data tersebut memberi informasi bahwa mungkin saja telah ada infeksi *P. malariae* di Kecamatan Muara Komam sebagaimana infeksi malaria *P. knowlesi* yang baru terdeteksi.

Hasil pemeriksaan *nested* PCR positif, menunjukkan adanya penyebaran malaria *P. knowlesi* di Kecamatan Muara Komam, kemungkinan dikarenakan letak lokasi dari geografis Kecamatan Muara Komam yang berbatasan langsung dengan wilayah yang telah terkonfirmasi malaria *P. knowlesi* yaitu Kalimantan Selatan, dan Kalimantan Tengah, serta habitat inang alami yaitu kera ekor panjang. Meskipun *P. knowlesi* masih dapat diobati oleh semua obat antimalarial, infeksi *P. knowlesi* dapat menyebabkan meningkatnya morbiditas dan mortalitas yang menurunkan kualitas hidup pasien maupun beban ekonomi keluarga dan pemerintah.

KESIMPULAN

Infeksi *P. knowlesi* pada manusia terdeteksi di Kecamatan Muara Komam melalui pemeriksaan *nested* PCR, sedangkan pemeriksaan RDT dan mikroskopis tidak dapat mendeteksi adanya infeksi tersebut.

SARAN

Perlu adanya peningkatan kemampuan tenaga mikroskopis yang ada di Puskesmas terutama yang berada di daerah endemis dan secara ekologis diduga sebagai daerah penularan malaria *knowlesi*.

KONTRIBUSI PENULIS

ZZS berperan sebagai konseptor, pelaksana lapangan, pemeriksaan laboratorium dan penulisan manuskrip. RN, FC, LT adalah konsulen pemeriksaan mikroskopis dan supervisor laboratorium. ES berkontribusi dalam konsep penelitian dan penulisan. LR adalah pengembang konsep, penulisan manuskrip, dan korespondensi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan penghargaan kepada tenaga kesehatan di Kecamatan Muara Komam atas bantuan dan partisipasi pasien dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. World malaria report 2021. Geneva; 2021.
2. Plewes K, Leopold SJ, Kingston HWF, Dondorp AM. Malaria: What's new in the management of malaria? *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Mar;33(1):39–60. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.002.
3. Slater L, Ashraf S, Zahid O, Ali Q, Oneeb M, Akbar MH, et al. Current methods for the detection of *Plasmodium* parasite species infecting humans. *Curr Res Parasitol vector-borne Dis.* 2022;2:100086. doi: 10.1016/j.crpvbd.2022.100086.
4. Kementerian Kesehatan RI. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 293/MENKES/SK/IV/2009 tentang Eliminasi Malaria di Indonesia. Indonesia; 2009.
5. Kementerian Kesehatan RI. Profil malaria Indonesia 2020. Jakarta; 2020.
6. Bin Said I, Kouakou YI, Omorou R, Bienvenu AL, Ahmed K, Culleton R, et al. Systematic review of *Plasmodium knowlesi* in Indonesia: a risk of emergence in the context of capital relocation to Borneo? *Parasit Vectors.* 2022

- Jul;15(1):258. doi: 10.1186/s13071-022-05375-8.
7. Herdiana H, Irnawati I, Coutrier FN, Munthe A, Mardiaty M, Yuniarti T, et al. Two clusters of *Plasmodium knowlesi* cases in a malaria elimination area, Sabang Municipality, Aceh, Indonesia. *Malar J*. 2018 May;17(1):186. doi: 10.1186/s12936-018-2334-1.
 8. Lempang MEP, Dewayanti FK, Syahrani L, Permana DH, Malaka R, Asih PBS, et al. Primate malaria: an emerging challenge of zoonotic malaria in Indonesia. *One Heal [Internet]*. 2022;14:100389. doi: 10.1016/j.onehlt.2022.100389.
 9. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar J*. 2018 Sep;17(1):333. doi: 10.1186/s12936-018-2481-4.
 10. Han TZ, Han KT, Aye KH, Hlaing T, Thant KZ, Vythilingam I. Comparison of microscopy and PCR for the detection of human *Plasmodium* species and *Plasmodium knowlesi* in southern Myanmar. *Asian Pac J Trop Biomed [Internet]*. 2017;7(8):680–5. doi: 10.1016/j.apjtb.2017.06.004.
 11. Kojom Foko LP, Pande V, Singh V. Field performances of rapid diagnostic tests detecting human *Plasmodium* species: a systematic review and meta-analysis in India, 1990-2020. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2021;11(4). doi: 10.3390/diagnostics11040590.
 12. Lau YL, Tan LH, Chin LC, Fong MY, Noraishah MAA, Rohela M. *Plasmodium knowlesi* reinfection in human. Vol. *Emerging infectious diseases*. United States; 2011;17:1314–5. doi: 10.3201/eid1707.101295.
 13. Daneshvar C, Davis TME, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PCS, et al. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009;49(6):852–60. doi: 10.1086/605439.
 14. Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH, Lanza M, Hisam S, Rubio JM. Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(3):299–304. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.03.014.
 15. Naserrudin NA, Hod R, Jeffree MS, Ahmed K, Hassan MR. The emerging threat of *Plasmodium knowlesi* malaria infection: a concept paper on the vulnerable factors in human. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(7):4419. doi: 10.3390/ijerph19074419.
 16. Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, Day NPJ, White NJ, Snounou G. Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):4173–5. doi: 10.1128/JCM.00811-09.
 17. Fitri LE, Widaningrum T, Endharti AT, Prabowo MH, Winaris N, Nugraha RYB. Malaria diagnostic update: from conventional to advanced method. *J Clin Lab Anal [Internet]*. 2022;36(4):e24314. doi: 10.1002/jcla.24314.
 18. Sabour S. Diagnostic reliability of nested PCR: Methodological issues on reliability and validity. Vol. 25, *Helicobacter*. England; 2020. p. e12701. doi: 10.1111/hel.12701
 19. Yerlikaya S, Campillo A, Gonzalez JJ. A systematic review: performance of rapid diagnostic tests for the detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* monoinfections in human blood. *J Infect Dis*. 2018;218(2):265–76. doi: 10.1093/infdis/jiy150.
 20. Amir A, Cheong FW, de Silva JR, Liew JWK, Lau YL. *Plasmodium knowlesi* malaria: current research perspectives. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1145–55. doi: 10.2147/IDR.S148664.
 21. Nishimoto Y, Arisue N, Kawai S, Escalante AA, Horii T, Tanabe K, et al. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol Phylogenet Evol [Internet]*. 2008;47(1):45–53. doi: 10.1016/j.ympcv.2008.01.031.
 22. Ompusunggu S. Malaria hutan di Provinsi Kalimantan Tengah dan Kalimantan Selatan, Indonesia tahun 2013. *J Ekol Kesehatan*. 2016;14(2):145–56. doi: 10.22435/jek.v14i2.4669.145-156.

