

Molecular Detection of *Plasmodium vivax* in Stored Blood Smears using Nested PCR

Dewi Saroh*, Dwi Haryatmi, Ferdiawan Diki Cahyo, Diah Ayu Pramudya Wardani, Didik Wahyudi

Program Studi Diploma III Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia;

Article History

Received : August 16th, 2026

Revised : September 10th, 2026

Accepted : September 16th, 2026

*Corresponding Author:

Dewi Saroh,

Program Studi Diploma III
Teknologi Laboratorium Medis
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan
Nasional, Surakarta, Indonesia;
Email:

dewisaroh.stikesnas@gmail.com

Abstract: Malaria is an infectious disease caused by Plasmodium parasites and transmitted by female Anopheles mosquitoes. Plasmodium vivax is widely distributed and can form hypnozoites that cause relapse. Detection may be difficult, particularly in samples with low parasite density. This descriptive study used 23 stored Giemsa stained blood smear samples previously confirmed as P. vivax by microscopic examination. Positive and negative controls were included to monitor the amplification process. Agarose gel electrophoresis was used to visualize the PCR products. No expected bands were detected in the first or second amplification stages. In the third stage, 10 of 23 samples (43.48%) produced the expected 121 bp band and were identified as positive for P. vivax. The absence of expected bands in the earlier stages may indicate DNA fragmentation caused by methanol fixation, Giemsa staining, and prolonged storage. The main limitation of this study was the use of stored samples with potentially degraded DNA, which may have affected amplification results. These findings indicate that Nested PCR with species-specific primers can detect P. vivax DNA in stored blood smear samples, particularly when short DNA fragments remain available for amplification.

Keywords: Plasmodium vivax, Stored Blood Smear, Nested PCR, Molecular Detection, Malaria Diagnostics.

Pendahuluan

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit dari genus *Plasmodium* dan ditularkan kepada manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi (Supranelfy & Oktarina, 2021). Menurut laporan WHO tahun 2023, terdapat sekitar 263 juta kasus malaria di seluruh dunia. Di Indonesia, jumlah kasus malaria yang dilaporkan pada tahun 2023 mencapai 418.546 kasus, dengan Provinsi Papua menjadi wilayah dengan jumlah kasus tertinggi, yaitu 369.119 kasus (Apay et al., 2024). Dari beberapa spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia, seperti *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, dan *P. inui*, *Plasmodium vivax* merupakan salah satu spesies yang memiliki persebaran geografis paling luas di dunia (Fatmaningsih et al., 2024).

Plasmodium vivax memiliki kemampuan membentuk hipnozoit, yaitu bentuk dorman parasit

yang dapat bertahan di dalam hati dalam waktu tertentu sebelum kembali aktif dan menyebabkan kekambuhan malaria. Selain itu, infeksi *P. vivax* umumnya ditandai dengan jumlah parasit yang relatif rendah dalam darah dan sering tidak menimbulkan gejala yang khas. Kondisi tersebut menyebabkan keberadaan parasit lebih sulit dikenali melalui pemeriksaan mikroskopis, sehingga berpotensi mengurangi keberhasilan diagnosis malaria. (Howes et al., 2016). Pemeriksaan mikroskopis masih banyak digunakan sebagai metode utama dalam diagnosis malaria. Namun, kemampuan metode ini dalam mendeteksi parasit relatif terbatas, terutama pada infeksi dengan jumlah parasit yang rendah. Selain itu, ketepatan hasil pemeriksaan sangat dipengaruhi oleh keterampilan dan pengalaman petugas laboratorium. Oleh karena itu, diperlukan metode diagnostik yang lebih sensitif untuk meningkatkan akurasi deteksi malaria (Suwandi, 2021).

Nested PCR yang menargetkan gen 18S

rRNA *Plasmodium* merupakan salah satu metode diagnostik molekuler yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam mendeteksi infeksi malaria, bahkan pada sampel dengan jumlah parasit yang sangat rendah (<1 parasit/ μ L) (Inderiati et al., 2022). Metode ini dilakukan melalui dua tahap amplifikasi menggunakan dua pasang primer yang berbeda. Primer luar (*outer primer*) digunakan untuk mendeteksi DNA *Plasmodium* pada tingkat genus, sedangkan primer dalam (*inner primer*) digunakan untuk mengidentifikasi spesies secara lebih spesifik. Pendekatan ini dapat meningkatkan ketepatan identifikasi sekaligus mengurangi kemungkinan terjadinya amplifikasi non-spesifik (Salsabila et al., 2022).

Apusan darah tersimpan memiliki potensi sebagai sumber DNA untuk pemeriksaan molekuler, namun pemanfaatannya masih belum optimal. Kualitas DNA pada sampel ini dapat menurun akibat proses fiksasi metanol, penyimpanan dalam jangka waktu lama, serta adanya residu pewarnaan giemsa yang dapat menyebabkan degradasi DNA. Meskipun demikian, berbagai penelitian menunjukkan bahwa DNA dari apusan darah tersimpan masih dapat dimanfaatkan untuk analisis molekuler retrospektif, sehingga berpotensi menjadi sumber sampel alternatif dalam penelitian dan diagnosis malaria (Lestaris et al., 2022; Viana et al., 2016). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran deteksi *Plasmodium vivax* dari sampel apusan darah tersimpan sebagai pengganti sampel darah segar dengan metode PCR.

Bahan dan Metode

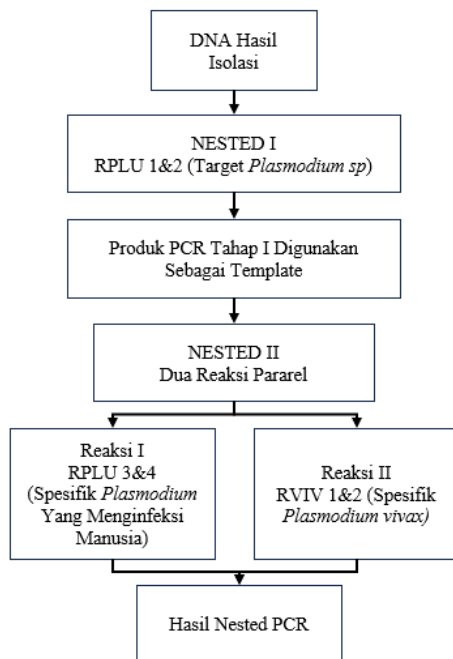
Penelitian ini menggunakan 23 sampel apusan darah tersimpan yang berasal dari pasien positif malaria dari Provinsi Papua, koleksi sampel dilakukan pada November 2023 hingga Agustus 2024, preparat yang digunakan telah diperiksa secara mikroskopis dan teridentifikasi mengandung parasit *Plasmodium vivax*. Setelah pembuatan preparat, sampel disimpan dalam box preparat pada suhu ruang hingga dilakukan pemeriksaan molekuler. Preparat yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam kondisi baik, tidak mengalami kerusakan secara fisik, dan tidak menunjukkan tanda-tanda

degradasi. Pemeriksaan molekuler dilakukan pada tahun 2026, sehingga sampel telah disimpan selama kurang lebih dua hingga tiga tahun, bergantung pada waktu pengambilan masing-masing sampel. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan dengan nomor KEPK/UMP/105/XI/2024.

Pengambilan apusan darah dari preparat dilakukan dengan mengelupas apusan darah pada permukaan kaca objek menggunakan skalpel. Apusan darah yang telah diperoleh kemudian dilarutkan dalam larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) dan dihomogenkan hingga tercampur secara merata. Selanjutnya, dilakukan isolasi DNA menggunakan metode *Chelex-100* untuk memperoleh DNA yang selanjutnya digunakan sebagai templat dalam pemeriksaan Nested PCR.

Kualitas DNA hasil isolasi diperiksa menggunakan elektroforesis gel agarosa, sedangkan kuantitas DNA diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan metode Nested PCR dalam dua tahap sesuai prosedur (Inderiati et al., 2022). Tahap pertama menggunakan pasangan primer rPLU1 (5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3') dan rPLU5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3') yang menargetkan gen 18S rRNA *Plasmodium* dengan ukuran produk 1640 bp dan suhu annealing 55°C. Produk PCR putaran pertama selanjutnya digunakan sebagai template pada putaran kedua.

Pada tahap kedua dilakukan dua reaksi amplifikasi secara paralel. Reaksi pertama menggunakan primer rPLU3 (5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGC AAA AGC TGT-3') dan rPLU4 (5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3') dengan target produk 240 bp dan suhu annealing 49°C. Reaksi kedua menggunakan primer spesifik *P. vivax*, yaitu rVIV1 (5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3') dan rVIV2 (5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3') dengan target produk 121 bp dan suhu annealing 64°C. Kedua reaksi tersebut menggunakan produk PCR tahap pertama sebagai template DNA. Dengan demikian, proses Nested PCR terdiri atas satu putaran PCR awal yang dilanjutkan dengan dua reaksi amplifikasi secara paralel pada putaran kedua.



Gambar 1. Alur Nested PCR

Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% dalam larutan TBE 1×. Sebanyak 8 µL produk PCR dicampurkan dengan 3 µL GelRed dan 3 µL loading dye sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel. DNA ladder 100 bp digunakan sebagai penanda ukuran fragmen dengan komposisi 3 µL DNA ladder, 3 µL GelRed, dan 2 µL loading dye. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 60 V selama 120 menit sesuai dengan SOP yang digunakan. Pita DNA divisualisasikan menggunakan Gel Documentation System. Ukuran fragmen ditentukan dengan membandingkan posisi pita sampel terhadap DNA ladder 100 bp.

Pembuatan kontrol positif diperlukan untuk memastikan bahwa proses amplifikasi DNA dengan metode *Nested* PCR berjalan dengan baik dan seluruh komponen reaksi PCR berfungsi secara optimal. Kontrol positif digunakan sebagai pembanding untuk menunjukkan bahwa primer, enzim Taq polymerase, serta kondisi PCR mampu menghasilkan pita DNA target sesuai ukuran yang diharapkan. Selain itu, kontrol positif juga membantu memastikan bahwa hasil negatif pada sampel bukan disebabkan oleh kegagalan proses amplifikasi, melainkan karena DNA target memang tidak terdeteksi dalam sampel yang diperiksa. Kontrol positif dibuat dengan cara

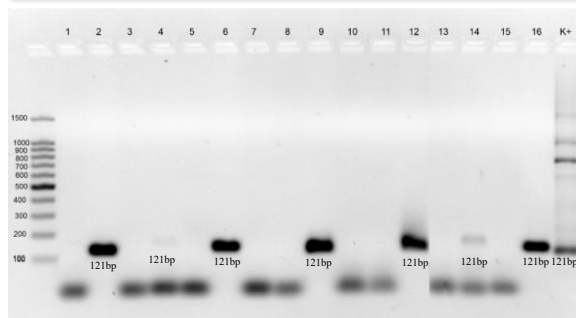
mengganti sampel DNA dengan sampel kontrol *fresh whole blood* (tanpa proses penyimpanan) yang sudah dikonfirmasi positif *Plasmodium vivax* yang kemudian diisolasi dengan menggunakan protokol isolasi *QIAamp DNA Kits*. Kemudian dicampur dengan *master mix*, NFW, primer *forward* dan *reverse*. Kontrol negatif, kontrol ekstraksi negatif, dan kontrol tanpa template tidak tersedia dalam penelitian ini sehingga tidak digunakan. Ketiadaan kontrol tersebut menjadi salah satu keterbatasan penelitian, khususnya dalam mengevaluasi kemungkinan kontaminasi selama proses ekstraksi dan amplifikasi.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Pada tahap pertama, pasangan primer rPLU 1 dan rPLU 5 digunakan untuk mengamplifikasi gen 18S rRNA konservatif seluruh spesies *Plasmodium*, dengan ukuran ampikon yang diharapkan sebesar 1640 bp pada suhu *annealing* 55°C. Hasil elektroforesis sampel 1-23 beserta kontrol positif menunjukkan bahwa tidak ada pita DNA yang spesifik pada ukuran 1640 bp pada seluruh sampel yang diuji. Hanya kontrol positif yang menampilkan pita terang pada ukuran yang sesuai, membuktikan bahwa proses amplifikasi dan seluruh komponen reagen berfungsi dengan baik.

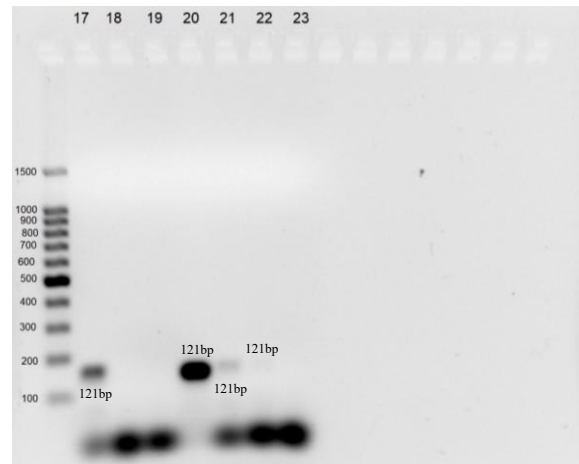
Tahap kedua menggunakan primer rPLU 3 dan rPLU 4 yang menargetkan daerah internal gen 18S rRNA spesifik *Plasmodium* yang menginfeksi manusia, dengan produk amplifikasi berukuran 240 bp pada suhu *annealing* 49°C. Hasil elektroforesis sampel 1–23 memperlihatkan bahwa meskipun beberapa sampel menunjukkan pita samar di bawah ukuran 240 bp, tidak ada sampel yang menghasilkan pita pada posisi target yang diharapkan. Kontrol positif menampilkan pita yang jelas pada 240 bp, memvalidasi keberhasilan proses amplifikasi secara umum. Pita berukuran kecil di bawah 100 bp yang muncul pada beberapa sampel termasuk sampel nomor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, dan 16 diinterpretasikan sebagai kemungkinan primer dimer, sedangkan pita samar sekitar 300 bp pada sampel 2 dan 16 diduga merupakan produk amplifikasi non spesifik. Dari 23 sampel sebanyak 10 sampel dinyatakan positif *Plasmodium vivax*.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis PCR Tahap Ketiga Primer rVIV 1&2 Target 121 bp Suhu 64°C Bagian 1 (Sampel 1–16, dan K+ (kontrol positif))

Hasil elektroforesis sampel (1-16) dan kontrol positif (K+) menunjukkan bahwa beberapa sampel menghasilkan pita DNA pada kisaran 121 bp. Sampel nomor 2, 6, 9, 12, dan 16 menampilkan pita yang relatif terang pada posisi target, sementara sampel 4 dan 14 memperlihatkan pita yang lebih samar namun tetap terdeteksi pada 121 bp. Kontrol positif (K+) menunjukkan pita yang jelas pada 121 bp meskipun sedikit *smear* dan kemungkinan pita non spesifik juga teramati. Pada sampel nomor 9 dan 12 teramati pita DNA yang sesuai dengan target amplifikasi, yaitu 121 bp. Namun, di sekitar pita tersebut masih terlihat sedikit *smear* yang kemungkinan mengindikasikan adanya

DNA yang mengalami degradasi.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis PCR Tahap Ketiga Primer rVIV 1&2 Target 121 bp Suhu 64°C Bagian 2 (Sampel 17-23)

Pada elektroforesis sampel 17–23, sampel nomor 20 menampilkan pita paling jelas pada kisaran 121bp. Sampel nomor 17, 21, dan 22 juga memperlihatkan pita pada posisi 121bp meskipun dengan intensitas lebih rendah. Beberapa sampel yang memunculkan pita pada panjang 121bp menandakan sampel tersebut terdeteksi positif *Plasmodium vivax*.

Tabel 1. Rekap Hasil Nested PCR Primer RVIV 1&2

Primer	Target (bp)	Positif (%)	Negatif (%)
rPLU 1&5	1640	0 (0%)	23 (100%)
rPLU 3&4	240	0 (0%)	23 (100%)
rVIV 1&2	121	10 (43,48%)	13 (56,52%)

Pemeriksaan *Nested* PCR terhadap 23 sampel menunjukkan bahwa seluruh sampel tidak menghasilkan pita DNA target pada tahap pertama menggunakan primer rPLU 1&5 (1640bp) maupun tahap kedua menggunakan primer rPLU 3&4 (240bp). Namun, pada tahap ketiga menggunakan primer spesifik *Plasmodium vivax* rVIV 1&2 (121bp), terdapat 10 (43,48%) sampel yang menunjukkan hasil positif, yaitu sampel nomor 2, 4, 6, 9, 12, 14, 17, 20, 21, dan 22. Hasil ini menunjukkan bahwa fragmen DNA berukuran pendek lebih mudah diamplifikasi dibandingkan fragmen panjang, terutama pada sampel apusan darah tersimpan yang kemungkinan telah mengalami degradasi DNA. Oleh karena itu, meskipun target DNA pada tahap awal tidak terdeteksi, DNA

Plasmodium vivax masih dapat teramplifikasi pada tahap spesifik spesies dengan target yang lebih pendek.

Pembahasan

Kegagalan amplifikasi pada tahap pertama pada 23 sampel kemungkinan besar disebabkan oleh menurunnya kualitas DNA yang diekstraksi dari apusan darah tersimpan yang telah diwarnai dengan giemsa. Pada sampel seperti ini, integritas DNA dapat terganggu akibat proses fiksasi metanol, pewarnaan giemsa, serta penyimpanan dalam jangka waktu yang lama. Fiksasi metanol yang bertujuan mempertahankan morfologi sel dapat menyebabkan DNA mengalami kerusakan atau terfragmentasi, sehingga jumlah DNA utuh yang dapat

diekstraksi menjadi berkurang. Selain itu, residu pewarna giemsa yang masih tertinggal pada preparat dapat menghambat aktivitas enzim DNA polimerase selama proses PCR. Kombinasi dari penurunan kualitas DNA dan adanya inhibitor tersebut menyebabkan DNA target, terutama yang berukuran panjang, menjadi lebih sulit diamplifikasi sehingga pita DNA yang diharapkan tidak tervisualisasi (Kassaza et al., 2018; Viana et al., 2016)

Munculnya pita non spesifik dan primer dimer pada tahap kedua berkaitan dengan kualitas DNA template yang kurang baik. Primer dimer dapat terbentuk ketika primer *forward* dan *reverse* saling berikatan karena adanya daerah yang bersifat komplementer, sehingga primer lebih banyak berikatan satu sama lain daripada menempel pada DNA target. Kondisi ini lebih mudah terjadi apabila jumlah DNA template sangat sedikit atau DNA telah mengalami degradasi (Garafutdinov et al., 2020). Produk amplifikasi non spesifik sekitar 300 bp yang teramati pada sampel 2 dan 16 diakibatkan penempelan primer yang tidak tepat pada sekuens template yang telah mengalami fragmentasi (Abdullah et al., 2025).

Deteksi positif *Plasmodium vivax* pada 10 sampel pada tahap ketiga, meskipun tahap pertama dan kedua tidak menunjukkan pita target, kemungkinan berkaitan dengan perbedaan ukuran fragmen DNA yang diamplifikasi. Target pada tahap ketiga memiliki ukuran lebih pendek, yaitu 121 bp, sehingga lebih memungkinkan untuk tetap teramplifikasi ketika kualitas DNA mengalami penurunan kualitas. Sebaliknya, target berukuran lebih panjang, yaitu 1640 bp dan 240 bp, memerlukan template DNA yang relatif lebih utuh, oleh karena itu keberhasilan amplifikasi target 121 bp pada beberapa sampel dapat menjadi indikasi bahwa DNA *Plasmodium* masih dapat terdeteksi meskipun kualitas atau integritas DNA kemungkinan telah menurun selama penyimpanan (Schulze et al., 2023). Kondisi tersebut tidak dapat dipastikan sebagai akibat degradasi DNA karena penelitian ini tidak melakukan analisis kuantitatif terhadap hubungan antara kualitas DNA dan keberhasilan amplifikasi, hasil ini menunjukkan bahwa target dengan ukuran lebih pendek berpotensi lebih sesuai untuk mendeteksi DNA *Plasmodium vivax* dari apusan darah yang telah disimpan dalam waktu lama. Temuan ini sejalan dengan

penelitian (Lestaris et al., 2022) yang menunjukkan bahwa analisis PCR dari apusan darah tersimpan tetap dapat dilakukan meskipun kualitas DNA sudah menurun.

Selain faktor kualitas DNA, keberhasilan amplifikasi juga dipengaruhi oleh kondisi optimasi PCR seperti suhu *annealing*, jumlah siklus amplifikasi, kemurnian DNA, serta aktivitas enzim Taq polymerase, suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat meningkatkan risiko amplifikasi non spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer gagal menempel secara optimal pada DNA target (Latham et al., 2023). Pada penelitian ini masih ditemukan smear dan pita non spesifik pada beberapa sampel maupun kontrol positif, yang menunjukkan bahwa proses amplifikasi belum sepenuhnya optimal. Smear pada hasil elektroforesis dapat disebabkan oleh degradasi DNA template, konsentrasi DNA terlalu tinggi, kontaminasi protein atau sisa pewarna, serta kondisi elektroforesis yang kurang stabil (Siswara et al., 2021).

Perbedaan intensitas pita DNA pada sampel positif, di mana beberapa pita tampak terang sedangkan yang lain terlihat samar, menunjukkan adanya variasi jumlah dan kualitas DNA *Plasmodium vivax* yang berhasil diamplifikasi. Pita yang lebih terang mengindikasikan bahwa DNA target yang tersedia dalam sampel relatif lebih banyak dan masih dalam kondisi yang baik, sehingga proses amplifikasi berlangsung lebih optimal. Sebaliknya, pita yang samar menunjukkan bahwa jumlah DNA target yang tersedia lebih sedikit atau kualitas DNA telah menurun akibat degradasi selama proses preparasi dan penyimpanan. Dengan demikian, intensitas pita DNA dapat menggambarkan perbedaan jumlah DNA target yang berhasil diamplifikasi pada masing-masing sampel (Mahittikorn et al., 2021).

Pada penelitian ini, sampel apusan darah yang digunakan telah disimpan sejak tahun 2023 dan diperiksa pada tahun 2026, sehingga memiliki lama penyimpanan sekitar 2-3 tahun. Hasil pemeriksaan *Nested* PCR menunjukkan bahwa 10 sampel (43,48%) terdeteksi positif *Plasmodium vivax*, sedangkan 13 sampel (56,52%) menunjukkan hasil negatif. Lama penyimpanan dapat memengaruhi kualitas dan jumlah DNA yang tersedia karena selama

penyimpanan DNA berpotensi mengalami degradasi dan fragmentasi akibat kondisi lingkungan, suhu, kelembapan, serta proses preparasi seperti fiksasi metanol dan pewarnaan giemsa (Schulze et al., 2023). Meskipun seluruh sampel disimpan dalam rentang waktu yang sama, perbedaan hasil yang diperoleh kemungkinan disebabkan oleh variasi kualitas dan jumlah DNA pada masing-masing sampel. Faktor seperti tingkat parasitemia awal, ketebalan preparat, serta tingkat degradasi DNA yang berbeda dapat menyebabkan sebagian sampel masih memiliki DNA target yang cukup untuk diamplifikasi, sedangkan sampel lainnya memiliki DNA yang telah rusak atau jumlahnya terlalu sedikit sehingga tidak terdeteksi pada pemeriksaan *Nested* PCR (Mahittikorn et al., 2021).

Kualitas DNA template juga perlu diperhatikan karena DNA yang terdegradasi atau berkonsentrasi rendah dapat meningkatkan kemungkinan terbentuknya primer dimer. Optimasi komponen PCR lainnya, seperti konsentrasi $MgCl_2$ dan jumlah siklus amplifikasi, juga penting untuk mengurangi amplifikasi non-spesifik. Dengan kondisi PCR yang optimal, pembentukan primer dimer dapat diminimalkan sehingga hasil amplifikasi menjadi lebih spesifik dan mudah diinterpretasikan (Bustin et al., 2019).

Suhu *annealing* yang digunakan pada masing-masing tahap amplifikasi, yaitu 55°C untuk primer rPLU 1&5, 49°C untuk rPLU 3&4, dan 64°C untuk rVIV 1&2, merupakan parameter penting yang mempengaruhi spesifisitas amplifikasi. Suhu *annealing* yang lebih tinggi pada primer rVIV 1&2 (64°C) meningkatkan spesifisitas penempelan primer sehingga pita yang dihasilkan lebih dapat diandalkan sebagai penanda spesies, optimasi suhu *annealing* merupakan salah satu faktor kritis dalam menentukan kualitas hasil PCR, di mana suhu yang terlalu rendah dapat menghasilkan amplifikasi non spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat mengurangi efisiensi penempelan primer (Setyawati & Zubaidah, 2021).

Tiga belas sampel yang tetap negatif pada seluruh tiga tahap kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain degradasi DNA yang sangat parah hingga di bawah ambang deteksi, parasitemia awal yang sangat rendah, atau kemungkinan bahwa sebagian sampel yang

dikonfirmasi positif secara mikroskopis tidak mengandung DNA *P. vivax* yang memadai (Echeverry et al., 2016). Mengingat pemeriksaan mikroskopis memiliki batas deteksi sekitar 5–100 parasit/ μ L darah, perbedaan hasil antara pemeriksaan mikroskopis dan metode molekuler seperti PCR merupakan hal yang masih dapat terjadi. (Aryani et al., 2024).

Perbedaan hasil pada setiap tahap amplifikasi menunjukkan bahwa metode *Nested* PCR memiliki peran penting dalam deteksi molekuler malaria, terutama pada sampel apusan darah yang telah disimpan. Metode ini tetap mampu mendeteksi DNA *Plasmodium vivax* meskipun kualitas sampel sudah menurun. Penggunaan dua pasang primer secara bertahap dapat meningkatkan sensitivitas pemeriksaan karena hasil amplifikasi pada tahap pertama digunakan kembali sebagai template pada tahap kedua. Dengan demikian, DNA parasit yang jumlahnya sangat sedikit masih dapat diperbanyak dan terdeteksi dengan lebih jelas (Anwar & Liberty, 2024).

Hasil ini secara keseluruhan menegaskan bahwa *Nested* PCR merupakan metode yang sensitif untuk deteksi *Plasmodium vivax* dari sampel apusan darah tersimpan, khususnya ketika primer spesifik spesies yang menargetkan ampikon pendek digunakan. Optimasi protokol isolasi DNA termasuk penggunaan kit komersial atau buffer lisis alternatif serta penyempurnaan kondisi siklus PCR pada tahap awal berpotensi meningkatkan tingkat deteksi pada penelitian mendatang (Latham et al., 2023; Inderiati et al., 2022).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, keberhasilan deteksi hanya ditemukan pada tahap ketiga amplifikasi, metode *Nested* PCR dalam penelitian ini mampu mendeteksi DNA *Plasmodium vivax* dari sampel apusan darah tersimpan. Dari 23 sampel yang diperiksa, sebanyak 10 sampel (43,48%) dinyatakan positif *Plasmodium vivax*, yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA pada ukuran 121bp menggunakan primer spesifik rVIV 1&2. Hasil ini menunjukkan bahwa apusan darah tersimpan masih dapat dimanfaatkan sebagai sumber DNA untuk pemeriksaan molekuler. Untuk meminimalkan terbentuknya primer dimer dan

amplifikasi non spesifik harus dilakukan optimasi lebih lanjut terhadap parameter amplifikasi, seperti suhu *annealing*, jumlah siklus PCR terutama pada tahap pertama dan kedua, kemudian menurunkan konsentrasi primer apabila terbentuk primer dimer. Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan kontrol negatif dan *no-template control* (NTC) untuk mendeteksi kemungkinan kontaminasi selama proses ekstraksi dan PCR. NTC diperlukan untuk memastikan bahwa pita DNA yang muncul bukan berasal dari kontaminasi pada reaksi PCR. Penelitian ini menggunakan 23 sampel dengan desain deskriptif. Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan jumlah sampel yang lebih besar serta menyertakan kelompok pembanding antara sampel apusan darah tersimpan dengan sampel darah segar, agar validitas dan generalisasi hasil penelitian dapat lebih diperkuat.

Referensi

- Abdullah, A., Rianti, P., Yani, S. W., Sauqi, S. D. A., Nandita, D. D., Ananda, M. F., & Lisnaina, E. (2025). Identifikasi Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Melalui Pengembangan Primer Spesifik Dan Metode Lamp Kolorimetri Berbasis Field Dna Extraction. *Indonesian Fisheries Processing Journal/Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(10). <https://doi.org/10.17844/r3v5ys15>
- Anwar, H. C., & Liberty, I. A. (2024). *Buku Monograf Tinjauan Molekuler: Deteksi & Preventif Resistensi Malaria*. Bening Media Publishing.
- Apay, F., Manangsang, F., Purba, E. R. V., Gentidatu, S., Swastika, I. K., Rophi, K. H., Rumaseb, E., Muspitha, F. D., Rahayu, G., & Mebri, E. (2024). Peningkatan Derajat Kesehatan Masyarakat Di Kampung Ifar Besar Papua Melalui Penyuluhan Malaria, Stunting, Scabies, Asam Urat, Dan Tb. *Jurnal Masyarakat Madani Indonesia*, 3(3), 222–228. <https://doi.org/10.59025/js.v3i3.227>
- Aryani, D., Riyanti, A., Fazri, M., & Pakonglean, C. (2024). Komparasi Hasil Pemeriksaan *Plasmodium Sp* Menggunakan Mikroskopis, Rdt, Dan Pcr Di Rsudp Papua Barat. *Jurnal Analis Laboratorium Medik*, 9(2), 74–82. <https://doi.org/10.51544/jalm.v9i2.5319>
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2019). Parameters For Successful Pcr Primer Design. In *Quantitative Real-Time Pcr: Methods And Protocols* (Pp. 5–22). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Echeverry, D. F., Deason, N. A., Davidson, J., Makuru, V., Xiao, H., Niedbalski, J., Kern, M., Russell, T. L., Burkot, T. R., & Collins, F. H. (2016). Human Malaria Diagnosis Using A Single-Step Direct-Pcr Based On The *Plasmodium* Cytochrome Oxidase Iii Gene. *Malaria Journal*, 15(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1185-x>
- Fatmaningsih, L., Samasta, N. A., & Octa, L. (2024). Differences In The Life Cycle And Growth Of *Plasmodium Knowlesi*, *Inui*, *Vivax*, *Malariae*, *Falciparum*, *Ovale*. *Journal Of Biomedical And Techno Nanomaterials*, 1(2), 59–69. <https://doi.org/10.70177/jbtn.v1i2.1020>
- Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., & Sakhabutdinova, A. R. (2020). The Influence Of Quality Of Primers On The Formation Of Primer Dimers In Pcr. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 39(9), 1251–1269. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global Epidemiology Of *Plasmodium Vivax*. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 95(6 Suppl), 15. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141>
- Inderiati, D., Handayani, S., Syaeptiani, D., & Aryadnyani, N. P. (2022). Identifikasi *Plasmodium Vivax* Menggunakan Metode Nested PCR Di Wilayah Endemis Malaria Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Journal Of Indonesian Medical Laboratory And Science (Joimedlabs)*, 3(1), 38–50. <https://doi.org/10.53699/joimedlabs.v3i1.96>
- Kassaza, K., Operario, D. J., Nyehangane, D., Coffey, K. C., Namugosa, M., Turkheimer, L., Ojuka, P., Orikiriza, P., Mwanga-Amumpaire, J., & Byarugaba, F.

- (2018). Detection Of *Plasmodium* Species By High-Resolution Melt Analysis Of Dna From Blood Smears Acquired In Southwestern Uganda. *Journal Of Clinical Microbiology*, 56(1), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01060-17>
- Latham, S., Hughes, E., Budgen, B., & Morley, A. (2023). Inhibition Of The Pcr By Genomic Dna. *Plos One*, 18(4), E0284538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284538>
- Lestaris, T., Arwati, H., Dachlan, Y. P., Keman, S., & Safruddin, D. (2022). The Use Of Archived Giemsa-Stained Blood Smears And Rdt For Pcr-Based genotyping of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in Central Kalimantan Province, Indonesia. *African Journal of Infectious Diseases*, 16(1), 13–20. <https://doi.org/10.21010/Ajid.v16i1.3>
- Mahittikorn, A., Masangkay, F. R., Kotepui, K. U., De Jesus Milanez, G., & Kotepui, M. (2021). Comparative Performance Of Pcr Using DNA Extracted From Dried Blood Spots And Whole Blood Samples For Malaria Diagnosis: A Meta-Analysis. *Scientific Reports*, 11(1), 4845. <https://doi.org/10.1038/s41598-02183977-5>
- Salsabila, Z. Z., Noviyanti, R., Coutrier, F., Trianty, L., Sutrisna, E., & Rujito, L. (2022). Deteksi *Plasmodium Knowlesi* Menggunakan *Nested* Polymerase Chain Reaction (Pcr) Di Kecamatan Muara Komam Kalimantan Timur. *Balaba*, 18(2), 183–190. <https://doi.org/10.22435/blb.v18i2.6359>
- Schulze Johann, K., Bauer, H., Wiegand, P., Pfeiffer, H., & Vennemann, M. (2023). Detecting Dna Damage In Stored Blood Samples. *Forensic Science, Medicine And Pathology*, 19(1), 50–59. <https://doi.org/10.1007/s12024-02200549-3>
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer Dan Suhu Annealing Dalam Mendeteksi Gen Leptin Pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal Of Laboratory*, 4(1), 36–40.
- Siswara, H. N., Erwanto, Y., & Suryanto, E. (2021). Kualitas Dna Dari Bakso Yang Beredar Di Pasaran Kabupaten Bojonegoro. *Jurnal Sains Dan Teknologi Peternakan*, 3(1), 1–7.
- Supranelfy, Y., & Oktarina, R. (2021). Gambaran Perilaku Pencegahan Penyakit Malaria Di Sumatera Selatan (Analisis Lanjut Riskesdas 2018). *Balaba*, 17(1), 19–28.
- Suwandi, J. F. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (Lamp) Dalam Penegakan Diagnosis Infeksi Parasit Malaria Berbasis Molekuler. *Jambi Medical Journal: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 9(2), 120–129.
- Viana, G. M. R., Chamma-Siqueira, N. N., Barbosa, D. R. L., Do Carmo, E. L., Peres, J. M. V., De Souza Nascimento, J. M., & Póvoa, M. M. (2016). *Nested* PCR Using Thick Blood Smears As Source Of *Plasmodium* Dna: An Alternative To Study Archival Blood Films. *Revista Pan-Amazônica De Saúde*, 7(Esp), 8. <https://doi.org/10.5123/S21766223201600500012>