

Optimalisasi Pewarnaan Giemsa Pada Apusan Darah Tipis Terinfeksi *Plasmodium berghei* Untuk Mendukung Pengembangan Vaksin Malaria Iradiasi

Mukh Syaifudin¹, Indah Irma², Dwi Ramadhani¹

1. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta.
2. Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Insitut Sains dan Teknologi Nasional, Jakarta

Abstrak

Malaria merupakan salah satu masalah kesehatan yang terbesar di Indonesia sehingga perlu dikendalikan antara lain dengan pemberian vaksin yang dapat dibuat dengan melemahkan mikroorganisme penyebab malaria dengan iradiasi sinar gamma. Salah satu aspek penting dalam pembuatan vaksin adalah deteksi dan identifikasi parasit dalam darah secara mikroskopis setelah pewarnaan Giemsa. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan persentase optimal larutan Giemsa dengan hasil visualisasi terbaik dan kualitasnya setelah penyimpanan. Darah terinfeksi *Plasmodium berghei* diiradiasi sinar gamma dosis 100-250 Gy dan kemudian disuntikkan secara intraperitoneal pada mencit. Pada waktu-waktu tertentu pasca penyuntikan dibuat apusan darah tipis dari ekor mencit pada preparat kaca, kemudian diwarnai dengan Giemsa pada berbagai konsentrasi (5; 7,5; 10; 12; 15 dan 20%) selama variasi waktu 10 dan 20 menit. Kualitas pewarnaan diperiksa kembali 1 bulan setelah disimpan pada suhu ruang. Pengamatan apusan dilakukan dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000x dan intensitasnya ditentukan dengan menggunakan perangkat lunak pengolahan citra digital ImageJ 1.47. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi larutan Giemsa 7,5% merupakan konsentrasi optimal untuk pewarnaan apusan dengan waktu pewarnaan 10 menit dan nilai intensitasnya paling tinggi dimana sebelum dan sesudah penyimpanan 1 bulan masing-masing adalah 6,84 dan 5,83 candela.

Kata Kunci : malaria, vaksin, *Plasmodium berghei*, iradiasi gamma, pewarnaan Giemsa,

Abstract

Malaria is one of the biggest health problems in Indonesia so it needs to be controlled, among others, by providing vaccines that can be made by weakening the microorganisms that cause malaria with gamma ray irradiation. One important aspect of vaccine production is the detection and identification of parasites in the blood microscopically after Giemsa staining. This study aims to determine the optimal percentage of Giemsa solution with best visualization results and quality after storage. The infected blood of *Plasmodium berghei* is irradiated by gamma rays at doses of 100-250 Gy and then was injected intraperitoneally into mice. At certain times after the injection, a thin blood smear is made from the tail of the mice on a glass preparation, then stained with Giemsa at various concentrations (5, 7.5, 10, 12, 15 and 20%) for 10 and 20 minute time variations. The quality of the staining is checked again 1 month after being stored at room temperature. The smear observations were performed with a light microscope at 1000x magnification and the intensity was determined using digital ImageJ Image processing software 1.47. The results showed that the concentration of Giemsa 7.5% solution was the optimal concentration for smear staining with 10 minute staining time and the highest intensity value before and after 1 month storage were 6.84 and 5.83 candela, respectively.

Key words : malaria, vaccine, *Plasmodium berghei*, gamma irradiation, Giemsa staining

Pendahuluan

Penyakit malaria menyebabkan kematian 1-2 juta jiwa per tahun terutama akibat infeksi *P. falciparum* yang banyak terjadi di daerah tropis seperti Indonesia dimana kasusnya hingga 60%.¹⁻³ Sejak dimulai lebih dari 5 dasawarsa lalu, upaya pengendalian malaria telah membuahkan hasil. Keberhasilan tersebut ditandai dengan terus menurunnya angka kejadian malaria melalui berbagai usaha untuk membantu mengoptimalkan strategi intervensi malaria.⁴ Menurut Laporan Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit (P2P) Kementerian Kesehatan bahwa kejadian malaria terus menurun dari waktu ke waktu, jika pada tahun 2011 kejadian malaria (*annual parasite incidence*, API) masih mencapai 1,75/1000 penduduk, angka ini menurun menjadi 1,69.⁵ Jumlah daerah yang telah mencapai eliminasi malaria pun bertambah dimana pada tahun 2016 tercatat sebanyak 247 kabupaten/kota.

Salah satu alternatif untuk pengendalian malaria adalah pemberian vaksin yang dapat dibuat dengan teknik nuklir yakni iradiasi sinar gamma untuk melemahkan plasmodium.^{6,7} Keunggulan teknik ini adalah terjadinya peningkatan respon imun dibandingkan dengan teknik konvensional seperti pemanasan atau kimia.⁸ Penyuntikan parasit malaria dalam stadium darah yang dilemahkan dapat menghambat perkembangan parasit dalam eritrosit sehingga dapat menyebabkan reduksi parsial parasitemia.^{8,9} Meskipun jenis vaksin yang telah dikembangkan selama ini telah berhasil memicu respon imun humoral pada imunogen terkait patogen, namun masih diperlukan upaya atau strategi pembuatan vaksin yang lebih efektif, cepat dan aman. Iradiasi telah digunakan untuk mengembangkan berbagai macam vaksin karena teknik ini dapat menghilangkan kontaminan kimia dan mampu menetrasi patogen untuk

menghancurkan asam nukleat tanpa merusak antigen permukaan patogen.^{7,10}

Penelitian berbagai aspek imunologis malaria, termasuk vaksin, banyak menggunakan *P. berghei* dan mencit sebagai hospesnya. Dengan model ini ada kemungkinan dilakukan manipulasi pada hospes sehingga dapat dipelajari perubahan imunologis yang terjadi selama infeksi malaria.^{6,8}

World Health Organization (WHO) mengharuskan agar diagnosis malaria ditegakkan sebaik-baiknya¹¹, salah satunya dengan pewarnaan apusan darah yang baik. Diagnosis infeksi malaria dilakukan dengan mengamati parasit dalam sediaan atau apusan darah di bawah mikroskop setelah dipulas dengan Giemsa pada konsentrasi tertentu untuk mendapatkan warna yang optimal dan sesuai dengan standar teknis sehingga dapat diketahui jenis-jenis leukosit, parasit, trombosit dan benda-benda lain yang terlihat. Prinsip dari pewarnaan Giemsa adalah adanya presipitasi hitam yang terbentuk dari penambahan larutan metilen biru dan eosin yang dilarutkan di dalam metanol. Pewarnaan Giemsa adalah pulasan yang terdiri dari eosin, metilin azur dan metilen blue yang berguna untuk mewarnai sel darah melalui fiksasi dengan metil alkohol.^{12,13} Untuk memperoleh hasil pemeriksaan mikroskopis yang efektif maka diperlukan penentuan konsentrasi Giemsa yang optimal meskipun dengan beberapa kekurangan, diantaranya pengamatan mikroskopis yang masih tergantung pada mata yang dapat memiliki persepsi berbeda-beda.

Dengan ketentuan di atas maka diperlukan metode yang dapat digunakan untuk mengetahui kualitas pewarnaan Giemsa secara lebih baik dan sensitif, salah satunya dengan cara melihat nilai intensitas warna preparat kaca terpulas larutan Giemsa dengan program komputer perangkat lunak pengolahan citra digital

imageJ 1.47. Jika nilai intensitas warna Giemsa tinggi maka dikategorikan sebagai warna larutan Giemsa yang optimal dan sebaliknya jika nilai intensitas warna rendah maka warna larutan Giemsa kurang optimal. Program pengolahan citra digital ini digunakan untuk memanipulasi dan menganalisis citra dengan bantuan komputer. Kemampuan sistem visual manusia dicoba dan ditiru oleh komputer yang mana komputer menerima masukan berupa citra objek yang akan diidentifikasi, memproses citra, dan memberikan luaran berupa deskripsi objek di dalam citra.^{14,15}

Metode

Parasit yang digunakan adalah *P. berghei* strain ANKA yang diperoleh dari Lembaga Eijkman Jakarta. Hewan mencit putih jantan (Swiss Webster) berumur 2-3 bulan dengan berat badan 25-30 gram diperoleh dari Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Salemba Jakarta. Penelitian diawali dengan mengembang biakkan *P. berghei* secara *in vivo* dalam tubuh mencit. Dua hari kemudian dibuat apusan darah tipis dari ujung ekor mencit. Setelah dibersihkan dengan kapas beralkohol, ujung ekor mencit digunting dengan gunting steril, kemudian ditekan dari bagian pangkal sampai ujung hingga diperoleh satu tetes darah lalu ditempelkan pada bagian tengah slide/preparat kaca untuk dibuat sediaan darah tipis. Setelah apusan kering kemudian difiksasi dengan methanol selama 3-5 detik. Kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa (Sigma-Aldrich, Germany) atau *Azure eosin methylene blue* dengan konsentrasi (persen volume) 3%, 5%, 7,5%, 8%, 10%, 12%, 15%, 20% selama 10 menit dan 20 menit. Apusan darah yang diwarnai dan telah kering kemudian diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000x untuk mengetahui kualitas pewarnaan dengan diberi *immersion oil*.¹⁵ Setelah itu intensitas pewarnaan ditentukan dengan program komputer pengolah Citra Digital

Image 1.47 dengan mengikuti prosedur standard, kemudian diuji analisis statistik dengan Anova dan t-Test.

Untuk pengembangan vaksin malaria iradiasi, darah mencit yang terinfeksi parasit diiradiasi sinar gamma dengan variasi dosis 100, 150, 200 dan 250 Gy (laju dosis 350 Gy/jam) pada Fasilitas IRPASENA Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) BATAN Pasar Jum'at. Darah yang telah diiradiasi kemudian disuntikkan pada mencit secara intraperitoneal. Untuk mengetahui efektivitas iradiasi maka diambil darah mencit dari ekor, dibuat apusan, diwarnai dan diamati di bawah mikroskop seperti prosedur di atas. Jumlah parasit pada apusan darah tipis dihitung. Selain itu juga diuji kualitas pewarnaan baik secara mikroskopis maupun menggunakan program komputer setelah disimpan 1 bulan pada suhu kamar.¹⁵

Pengambilan citra digital dilakukan dengan mikroskop cahaya Nikon BIOPHOT dilengkapi lensa objektif Nikon Plan 20X DL dan kamera digital Single Lens Reflect (DSLR) Nikon D5100. Proses pengukuran intensitas cahaya dilakukan dengan menggunakan perintah *Color Threshold* terlebih dahulu. Metode *threshold* yang digunakan adalah Otsu dan RGB sebagai sistem warna. Perintah *Histogram* kemudian digunakan dan nilai intensitas warna dilakukan pada kanal hijau.

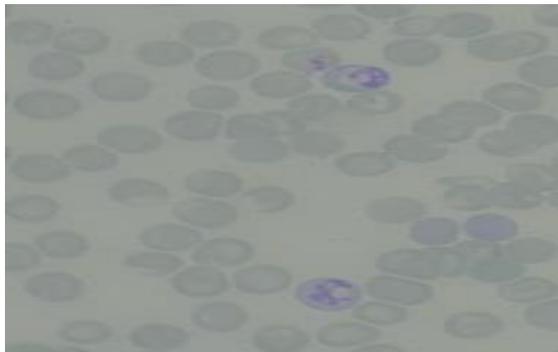
Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk pewarnaan pada konsentrasi 3% selama minimal 10 menit warna sel darah merah yang terinfeksi parasit tidak terlihat jelas karena larutan Giemsa sangat sedikit atau rendah dan terlalu bening. Demikian halnya untuk pewarnaan selama 20 menit. Untuk pewarnaan 5% baik pewarnaan selama 10 maupun 20 menit warna sel darah merah yang terinfeksi masih belum

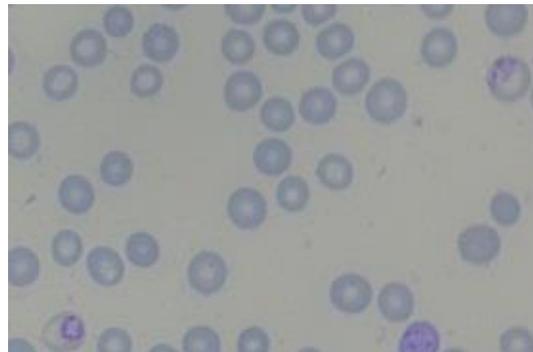
terlihat dengan jelas keberadaan parasitnya. Pada pewarnaan 7,5% untuk kedua waktu pewarnaan (10 dan 20 menit) warna sel darah merah yang terinfeksi terlihat jelas. Hasil pewarnaan Giemsa tidak terlalu bening dan tidak terlalu gelap sehingga parasit dan dapat diamati dengan mudah/jelas. Untuk pewarnaan 8% warna sel darah merah yang terinfeksi terlihat agak gelap sehingga titik kromatin pada parasit tidak terlihat dengan jelas, baik untuk waktu 10 maupun 20 menit. Sedangkan untuk pewarnaan 10% warna sel darah merah yang terinfeksi terlihat agak gelap sehingga parasit dapat teramati dengan baik. Untuk pewarnaan 12% dan 15% warna sel darah merah yang terinfeksi parasit masih gelap sehingga inti kromatin tidak terlalu terlihat, baik untuk waktu pewarnaan 10 menit maupun 20 menit. Untuk pewarnaan 20% warna sel darah merah yang terinfeksi terlihat sangat

gelap karena larutan Giemsa yang terlalu kental.¹⁵

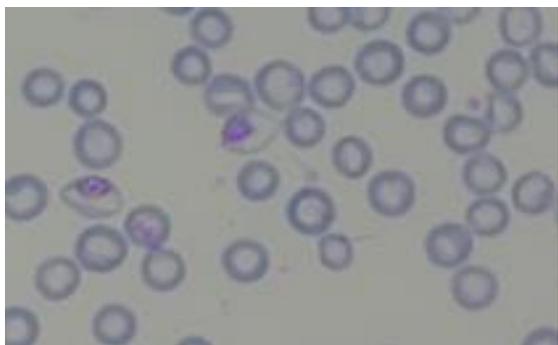
Hasil pengamatan preparat pasca pewarnaan dengan larutan Giemsa terhadap *P. berghei* setelah disimpan selama satu bulan tidak berbeda dengan sebelum penyimpanan. Sebelum penyimpanan, konsentrasi 7,5% merupakan persentase Giemsa yang terbaik (optimal) untuk pengamatan parasit dengan waktu pewarnaan 10 menit. Pada Gambar 1 terlihat bahwa konsentrasi Giemsa 7,5% merupakan konsentrasi yang paling optimal dibandingkan dengan konsentrasi lainnya karena pada konsentrasi tersebut warna sel darah merah yang terinfeksi terlihat jelas. Pewarna Giemsa tidak terlalu bening dan tidak terlalu gelap sehingga parasite dapat teramati dengan jelas.



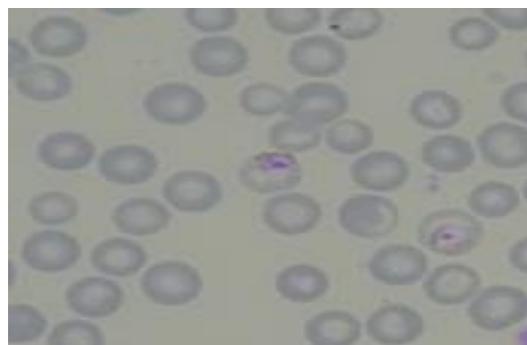
3 %



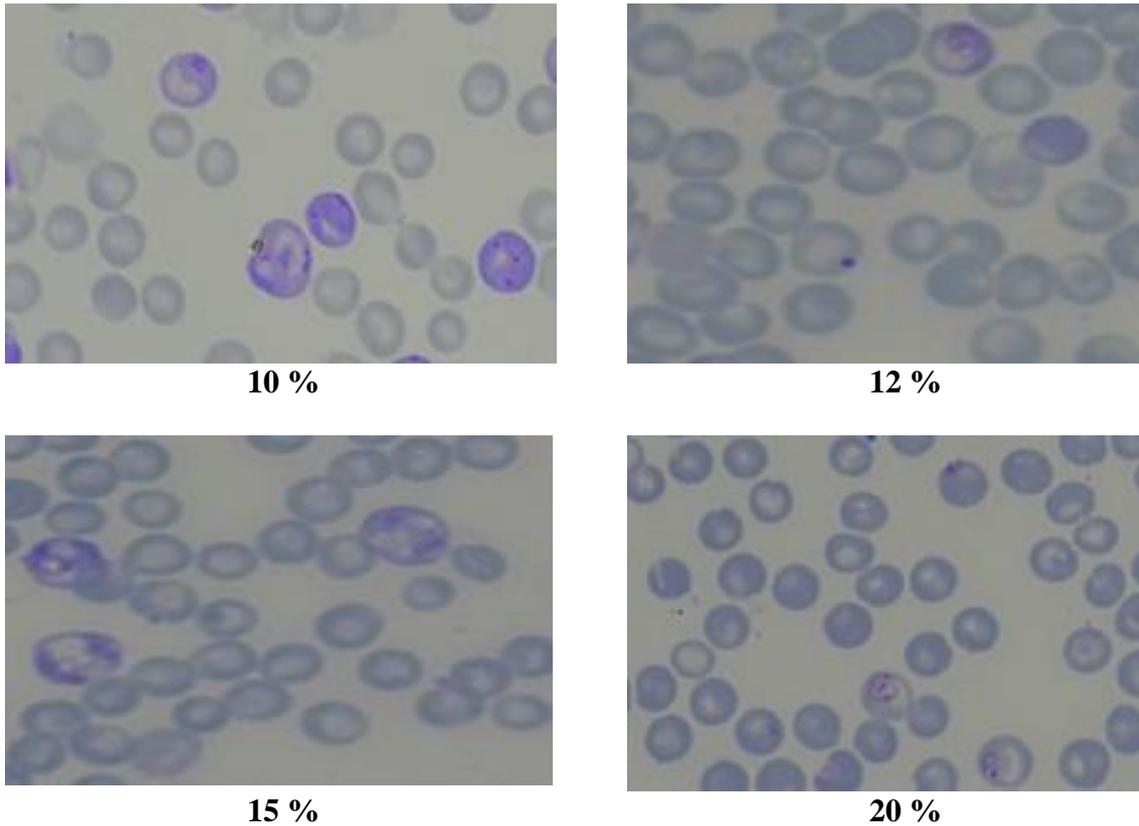
5 %



7,5 %



8 %



Gambar 1. Hasil pengamatan mikroskopis apusan pada berbagai konsentrasi Giemsa (3; 5; 7,5; 8; 10; 12; 15 dan 20%) untuk pewarnaan 10 menit dan tidak disimpan.

Hasil pengujian larutan Giemsa dengan menggunakan perangkat lunak Citra Digital Image 1.47 menunjukkan bahwa nilai intensitas untuk konsentrasi 7,5% dengan waktu pewarnaan 10 menit adalah 6,844. Nilai ini merupakan nilai yang tertinggi dibandingkan dengan nilai intensitas untuk konsentrasi yang lain (3%, 5%, 8%, 10%, 12%, 15% dan 20%). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 7,5% merupakan konsentrasi yang paling optimal. Sedangkan nilai intensitas untuk konsentrasi 7,5% dengan waktu pewarnaan 20 menit adalah 5,370 dimana nilai ini paling tinggi dibandingkan dengan nilai untuk konsentrasi 3%, 5%, 8%, 10%, 12%, 15% dan 20%. Nilai intensitas untuk konsentrasi 7,5% dengan waktu pewarnaan 10 menit (6,844) lebih tinggi dibandingkan nilai untuk waktu pewarnaan 20 menit

(5,370). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 7,5 % dengan waktu pewarnaan 10 menit lebih baik dibandingkan 20 menit.

Setelah preparat kaca disimpan selama 1 bulan, diketahui bahwa kualitas hasil pewarnaannya sama dengan sebelum disimpan. Pada konsentrasi larutan Giemsa 7,5% intensitas warnanya paling baik karena memiliki nilai intensitas yang tertinggi. Setelah disimpan selama 1 bulan intensitas warna untuk konsentrasi 7,5 % dengan waktu pewarnaan 10 menit adalah 5,835. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan pewarnaan selama 20 menit yaitu 5,454. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu 10 menit memiliki nilai intensitas pewarnaan yang lebih baik daripada waktu 20 menit.¹⁵ Hasilnya disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Nilai intensitas untuk pewarnaan Giemsa terhadap apusan darah tipis *P. berghei* sebelum penyimpanan.

Konsentrasi Giemsa	Intensitas rata-rata untuk pewarnaan Giemsa pada apusan darah tipis (Candela)	
	Pewarnaan 10 menit	Pewarnaan 20 menit
3%	4,141	4,337
5%	4,379	4,783
7,5%	6,844	5,370
8%	4,192	4,951
10%	4,726	4,822
12%	4,762	4,992
15%	4,989	5,106
20%	5,271	5,364

Tabel 2. Nilai intensitas untuk pewarnaan Giemsa terhadap apusan darah tipis *P. berghei* setelah penyimpanan 1 bulan.

Konsentrasi Giemsa	Intensitas rata-rata untuk pewarnaan Giemsa terhadap <i>P. berghei</i> pada apusan darah tipis (Candela)	
	Pewarnaan 10 menit	Pewarnaan 20 menit
3%	4,080	4,275
5%	4,317	4,430
7,5%	5,835	5,454
8%	4,136	4,500
10%	4,439	4,524
12%	4,615	4,846
15%	4,924	5,047
20%	5,079	5,303

Pemeriksaan apusan darah tipis secara mikroskopis memiliki kekurangan antara lain adalah kurang sensitif karena hanya mengandalkan penglihatan kasat mata dan pendapat atau opini di antara pengamat juga dapat berbeda.^{16,17} Oleh karena itu pada penelitian ini telah diuji kualitas pewarnaan Giemsa menggunakan program komputer Citra Digital Image 1.47. Metode ini lebih sensitif untuk mengamati kualitas apusan larutan Giemsa yakni nilai intensitas pewarnaan. Jika nilai intensitas warnanya tinggi maka dapat dinyatakan bahwa kualitas pewarnaannya optimal.

Selain persentase larutan Giemsa dan waktu pewarnaan, terdapat hal-hal lain yang berpengaruh terhadap kualitas pewarnaan sediaan antara lain kualitas

kaca sediaan, ketebalan apusan darah, kualitas larutan Giemsa dan proses pewarnaan itu sendiri. Pewarnaan sediaan dapat dilakukan setelah sediaan benar-benar kering dan untuk sediaan darah tipis harus difiksasi dengan metanol agar tidak terhemolisa. Sedangkan untuk sediaan darah tebal harus diwarnai atau dihemolisa dengan aquades paling lambat satu malam. Jika lebih dari sehari semalam maka sediaan darah tebal sudah tidak bisa terhemolisa lagi dimana warna eritrosit yang berasal dari hemoglobin tidak dapat dilepas. Hal ini akan menutupi sel parasit atau menjadi gelap dan parasit tidak dapat teramati.¹⁸

Pada saat proses pewarnaan terjadi pengeluaran zat warna eritrosit yang

setidaknya memerlukan waktu 15 menit dan zat warna Giemsa akan masuk setelah 10 menit. Perendaman yang terlalu cepat akan menyebabkan tidak sempurnanya hemolisis dan pewarnaan. Sediaan akan terlihat berwarna kehijauan (berasal dari zat warna eritrosit/hemoglobin dan akan menutupi sel parasit). Dengan cara tersebut hasil pewarnaan akan lebih baik namun harus hati-hati karena slide/sediaan mudah terkelupas.¹⁹

Banyak program komputer dapat dipergunakan untuk mempertinggi atau memperbaiki kualitas pengamatan spesies parasit malaria, terutama untuk mengetahui densitas yang merupakan komponen penting dalam diagnosis malaria. Pewarnaan Giemsa masih merupakan metode *gold standard* untuk pengamatan parasit malaria²⁰. Metode mikroskopi memiliki kelemahan dalam memperoleh cacah parasit yang akurat sehingga dikembangkan metode elektronik atau berbasis komputer.²¹ Salah satunya adalah oleh Freaan²² yang menggunakan perangkat lunak *open-access* software dan tidak memerlukan pemrogram yang handal atau pengelola spesial, terutama untuk kerapatan parasit yang sangat tinggi yang tidak dapat atau sulit dihitung secara konvensional. Keperluan akan kamera digital, komputer dan kualitas pewarnaan slide yang baik dapat dengan mudah diperoleh. Peneliti lain menggunakan metode atau teknik *AutoCount* yang terbukti berguna untuk penentuan secara cepat dan akurat parasitemia darah mencit terinfeksi. Meskipun kualitas apusannya rendah penentuan parasitemia dapat digunakan dengan *CountingAid*.²³ Linder dkk menggunakan program digital untuk *scanning* apusan tipis terinfeksi *P. falciparum* bentuk trophozoit dengan kemampuan hingga 50.000 eritrosit per sampel.²¹ Dengan metode ini diperoleh sensitivitas dan spesifitas masing-masing hingga 95% dan 100%. Sedangkan Prasad dkk menggunakan algoritma yang mampu mendeteksi hingga 96% parasit dengan *false positive* 20%.²⁴ Peneliti lain

menggunakan teknik molekuler yakni *nested Polymerase Chain Reaction* untuk mengidentifikasi campuran parasit.²⁵

Kesimpulan

Konsentrasi pewarnaan Giemsa yang paling optimal sebelum penyimpanan yaitu 7,5% selama waktu 10 menit dengan nilai intensitas pewarna Giemsa yaitu 6,844 candela dan setelah penyimpanan yaitu 5,835 candela. Pemeriksaan nilai intensitas pewarnaan Giemsa terhadap *P. berghei* dengan menggunakan program computer perangkat lunak pengolahan citra digital imageJ 1.47 lebih optimal dibandingkan secara mikroskopis karena menghasilkan nilai intensitas pewarnaan Giemsa yang sensitif dan akurat.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih dan apresiasi yang setinggi-tingginya disampaikan pada Teja Kisnanto, staf Bidang TNKBR-PTKMR BATAN, dan seluruh staf Laboratorium Hewan PAIR BATAN yang telah memberi bantuan teknis selama penelitian. Penelitian ini didanai oleh DIPA tahunan PTKMR BATAN.

Daftar Pustaka

1. WHO. Malaria and its control in the WHO South-East Asia Region; World Health Organization, Regional Office for South-East Asia. 2012. http://www.searo.who.int/entity/malaria/topics/Malaria_factsheetWMD2012.pdf.
2. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012; 379:413-31.
3. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, et al. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med.* 2010; 7: e1000290-
4. Elyazar IRF, Gething PW, Patil AP, Rogayah H, Kusriastuti R, Wismarini DM, et al. *Plasmodium falciparum* malaria endemicity in Indonesia in 2010. *PLoS ONE* 2011; 6(6):e21315.

5. Kementerian Kesehatan, Laporan Kinerja Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit (P2P) Kementerian Kesehatan, 2016. Diakses di : <http://www.depkes.go.id/resources/download/LAKIP2017/5%20LKj%20Es%201%202016/2.%20Lkj%20Ditjen%20P2P%20Tahun%2016%20.pdf>.
6. Syaifudin S, Darlina, Rahardjo T, Tetriana D, Nurhayati S, Surniyantoro HNE, et al. Effectiveness of gamma rays in attenuating rodent malaria parasites of *Plasmodium berghei* in blood of mice., *Atom Indonesia* 2013; 39(1):19-23.
7. Seo HS. Application of radiation technology in vaccines development. *Clin Exp Vaccine Res.* 2015 Jul; 4(2):145–58.
8. Syaifudin M, Tetriana D, Darlina, Nurhayati S. The feasibility of gamma irradiation for developing malaria vaccine. *Atom Indonesia* 2011; 37(3):91-101.
9. Griffin JT, Hollingsworth TD, Okell LC, Churcher TS, White M, Hinsley W, et al. Reducing *Plasmodium falciparum* malaria transmission in Africa: a model-based evaluation of intervention strategies. *PLoS Med.* 2010 Aug; 7(8):e1000324.
10. Tetriana D, Darlina, Armanu, Syaifudin M., Pengaruh radiasi gamma terhadap profil protein *Plasmodium berghei* stadium eritrositik, *Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan dan Lingkungan IV dan Internasional on Occupational Health and Safety I*, Depok, 27 Agustus 2008, hal. 282-290.
11. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Second ed. WHO Press, World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2010.
12. Mac Neal WJ. Methylene violet and methylene azure. *The Journal of Infectious Diseases* 1906; 3(3):412-33.
13. Horobin RW. How Romanowsky stains work and why they remain valuable including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Journal of Biotechnic & Histochemistry* 2011; 86(1):36-51.
14. Desrinawati, Perbandingan hasil pemeriksaan metode *immunochromatographic test* (ICT) dengan pewarnaan Giemsa pada infeksi malaria *falcifarum*, *Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara*, Digitized USU Digital Library, 2003, hal. 1-13.
15. Irma I., Optimalisasi teknik pewarnaan Giemsa pada apusan darah tipis *Plasmodium berghei* pasca iradiasi gamma dalam pengembangan vaksin malaria, *Skripsi, Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jakarta*, 2014.
16. Susanto L.P., Astuty H. Diagnosis of malaria by the rapid manual test. *Medical Journal of Indonesia* 1995; 4:24-9.
17. Kementerian Kesehatan, Direktorat Pengendalian Penyakit Berbasis Binatang, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan (P2PL) Kementerian Kesehatan, 2011.
18. World Health Organization, Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide, Second Edition. WHO. 2010.
19. Garcia, L.S. *Diagnostic Medical Parasitology* ed. 4, ASM Press. Washington, D.C. 2001.
20. Pentithory JC, Ardoin F, Ash LR. Rapid and inexpensive method of diluting Giemsa stain for diagnosis of malaria and other infestations by blood parasites, *Journal of Clinical Microbiology* 2005 Jan; 43(1):528.
21. Linder N, Turkki R, Walliander M, Mårtensson A, Diwan V, Rahtu E, et al. A malaria diagnostic tool based on computer vision screening and visualization of *Plasmodium falciparum* candidate areas in digitized blood smears. *PLoS ONE* 2014; 9(8):e104855.
22. Frean JA. Reliable enumeration of malaria parasites in thick blood films using digital image analysis. *Malaria Journal* 2009; 8:218.
23. Ma C, Harrison P, Wang L, Coppel RL. Automated estimation of parasitaemia of *Plasmodium yoelii*-infected mice by digital image analysis of Giemsa-stained thin blood smears. *Malaria Journal* 2010; 9(1): 348-9.
24. Prasad K, Winter J, Bhat UM, Acharya RV, Prabhu GK. Image analysis approach for development of a decision support system for detection of malaria parasites in thin blood smear images. *J Digit Imaging* 2012; 25:542-9.
25. Zakeri S, Kakar Q, Ghasemi F, Raeisi A, Butt W, Safi N, et al. Detection of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections by nested-PCR in Pakistan, Iran & Afghanistan. *Indian J Med Res.* 2010; 132: 31-5.