

**MALARIA PRIMATA: POTENSI ZONOSIS DI SUAKA
MARGASATWA BUTON UTARA SULAWESI TENGGARA**

PRIMATE MALARIA: POTENTIAL ZONOSSES IN BUTON UTARA
WILDLIFE SANCTUARY SOUTHEAST SULAWESI

MEYBY EKA PUTRI LEMPANG



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

MALARIA PRIMATA: POTENSI ZONOSIS DI SUAKA MARGASATWA
BUTON UTARA SULAWESI TENGGARA

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor
Program Studi Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh:

MEYBY EKA PUTRI LEMPANG

Nomor Pokok: C013191043

Kepada

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR
2024

DISERTASI

**MALARIA PRIMATA: POTENSI ZOOZONOSIS DI SUAKA MARGASATWA BUTON
UTARA SULAWESI TENGGARA**

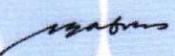
**PRIMATE MALARIA: POTENTIAL ZOOZONOTIC IN NORTH BUTON WILDLIFE
SANCTUARY, SOUTHEAST SULAWESI**

Disusun dan Diajukan oleh:

Meyby Eka Putri Lempang
C01319104

*Telah dipertahankan di Hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 2 Desember 2024
dan dinyatakan Telah Memenuhi Syarat Kelulusan*

Menyetujui
Tim Promotor,


Prof. dr. Syafruddin, PhD
Nip. 19600516 198601 1 002

Co-Promotor

Co-Promotor


Prof. Dr. drh. Ratmawati Malaka, M.Sc
NIP. 19640712 198911 2 002


Dr. Puji Budi Setia Asih, S.Si
NIP. 19751123 201212 2 002

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
NIP. 19671103 199802 1 001

an. Dekan Fakultas Kedokteran
Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin


Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.ClinMed, PhD, Sp.GK(K)
NIP. 19700821 199903 1 001



ABSTRACT

MEYBY EKA PUTRI LEMPANG. *Primate Malaria: Zoonotic Potential in North Buton Wildlife Sanctuary, Southeast Sulawesi* (Supervised by Din Syafruddin, Ratmawati Malaka, and Puji Asih).

This study aims to: (1) determine the number of *Plasmodium* sp. found in primates in the forest adjacent of the North Buton Wildlife Sanctuary (BUWS); (2) determine the number of *Anopheles* sp. in the region and potentially vector species; and (3) determine the potential risk of zoonotic malaria transmission from primates to humans (if found to carry *Plasmodium* sp.). The research method was used observational research design, cross-sectional analysis, and convenience sampling research techniques. Primates and mosquitoes were identified by species based on morphological and molecular examinations. *Plasmodium* sp. examination in the blood of primates and mosquitoes (head-thorax) were used microscopic, molecular, sequencing, and phylogenetic analysis. The results of the study of 26 primates show that morphologically and molecularly the primates that were successfully caught are Buton monkeys (*Macaca brunnescens*), while out of a total of 80 mosquitoes *Anopheles* sp. caught is the species *Anopheles flavirostris* (47.5%), *An. Sulawesi* (36.25%), *An. Maculatus* (12.5%), *An. Subpictus* (2.5%), and *An. vagus* (1.25%). The 13 *Macaca brunnescens* are infected with *Plasmodium inui* (76.92%), *Plasmodium cynomolgi* (15.38%), and *Plasmodium simiovale* (7.7%), while *Plasmodium* in mosquitoes is identified as *Plasmodium inui* (2.5%).

Keywords: North Buton Wildlife Sanctuary, *Macaca brunnescens*, *Anopheles* sp., *Plasmodium* sp



ABSTRACT

MEYBY EKA PUTRI LEMPANG. *Primate Malaria: Zoonotic Potential in North Buton Wildlife Sanctuary, Southeast Sulawesi* (Supervised by Din Syafruddin, Ratmawati Malaka, and Puji Asih).

This study aims to: (1) determine the number of *Plasmodium* sp. found in primates in the forest adjacent of the North Buton Wildlife Sanctuary (BUWS); (2) determine the number of *Anopheles* sp. in the region and potentially vector species; and (3) determine the potential risk of zoonotic malaria transmission from primates to humans (if found to carry *Plasmodium* sp.). The research method was used observational research design, cross-sectional analysis, and convenience sampling research techniques. Primates and mosquitoes were identified by species based on morphological and molecular examinations. *Plasmodium* sp. examination in the blood of primates and mosquitoes (head-thorax) were used microscopic, molecular, sequencing, and phylogenetic analysis. The results of the study of 26 primates show that morphologically and molecularly the primates that were successfully caught are Buton monkeys (*Macaca brunnescens*), while out of a total of 80 mosquitoes *Anopheles* sp. caught is the species *Anopheles flavirostris* (47.5%), *An. Sulawesi* (36.25%), *An. Maculatus* (12.5%), *An. Subpictus* (2.5%), and *An. vagus* (1.25%). The 13 *Macaca brunnescens* are infected with *Plasmodium inui* (76.92%), *Plasmodium cynomolgi* (15.38%), and *Plasmodium simiovale* (7.7%), while *Plasmodium* in mosquitoes is identified as *Plasmodium inui* (2.5%).

Keywords: North Buton Wildlife Sanctuary, *Macaca brunnescens*, *Anopheles* sp., *Plasmodium* sp





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, (0411)586279 http : // med,unhas,ac.id

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : **Meyby Eka Putri Lempang**
Nomor Pokok : C013191043
Program Studi : Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul: **Malaria Primata:
Potensi Zoonosis di Suaka Margasatwa Buton Utara Sulawesi
Tenggara**

Adalah karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan
tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar
merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan
Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi
atas perbuatan tersebut.

Makassar, 14 Agustus 2024

Yang menyatakan



Meyby Eka Putri Lempang

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas karunia-Nya sehingga disertasi hasil penelitian dengan judul “Malaria Primata: Potensi Zoonosis di Suaka Margasatwa Buton Utara Sulawesi Tenggara” ini dapat diselesaikan.

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Prof. dr. Syafruddin, Ph.D. selaku Promotor, Prof. Dr. drh. Ratmawati Malaka, M.Sc. dan Dr. Puji Budi Setia Asih, S.Si selaku Ko-promotor yang dengan penuh perhatian dan kearifan senantiasa memberikan motivasi, membuka wawasan, membimbing, mendorong, dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak awal program S3 hingga penulisan proposal pada hasil disertasi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin;
2. Prof. dr. Budu Ph. D., Sp. M (K)., M.Med.Ed selaku Direktur Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin;
3. Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD, K-GH, Sp.GK, FINASIM selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin;
4. Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes. selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran.
5. Tim Penguji; Dr. Wuryantari Setiadi, Prof. Dr. Ir. Ngakan Putu Oka, M.Sc., dr. Isra Wahid Ph.D, Dr. drh. Muflihanah, M.Kes., Dr. dr.

Ilhamjaya Patellongi, M.Kes., Professor Masaharu Tokoro, MD.
Ph.D. selaku penguji eksternal.

6. Kepala Balai Konservasi dan Sumber Daya Alam Sulawesi Tenggara yang telah mengizinkan kami untuk melaksanakan penelitian di lapangan.
7. Tim Peneliti Pusat Riset Biologi Molekuler Eijkman dan FK UNHAS; Farahana Kresno Dewayanti, Dendi Hadi Permana, Lepa Syahrani, Suradi, Pak Ismail Ekoprayitno Rozi, dan Irdyanti yang sangat membantu pelaksanaan penelitian, perhatian, dan motivasi.
8. Orang tua Marthen Lempang dan Berlin Eppang, Mama tua Agustina Lempang, Nataniel Depianto, Georgi Dwi Putra Lempang, S.Si, dan Jathniel Hiro Depianto atas doa, nasehat, dukungan, dan semangat dalam menyelesaikan hasil penelitian disertasi ini.
9. Penulis mohon maaf bilamana terdapat hal-hal yang tidak berkenan dalam penulisan ini, karena penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan hasil penelitian disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, dan semoga hasil penelitian disertasi ini bermanfaat bagi semua orang.

Makassar, 5 November 2024

Meyby Eka Putri Lempang

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I PENDAHULUAN.....	7
1.1. Latar Belakang	7
1.2. Rumusan Masalah	10
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Hipotesis.....	11
1.5. Manfaat Penelitian.....	11
1.6. Kebaruan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	13
2.1. Malaria pada Manusia dan Hewan Primata.....	6
2.2. Vektor Nyamuk Malaria.....	18
2.3. Jenis Primata di Sulawesi Tenggara	24
2.4. Diagnostik penyakit Malaria Pada Hewan Primata	20
2.5. Aturan Penggunaan <i>Macaca (Non Human Primate)</i>	32
2.6. Kerangka Teori	34
2.7. Kerangka Konsep.....	35
BAB III METODE PENELITIAN.....	36
3.1. Rancangan Penelitian	36
3.2. Gambaran Umum Lokasi Penelitian	36
3.3. Sampel Penelitian.....	37
3.4. Defenisi Operasional Variabel Penelitian	38
3.5. Etik Penelitian.....	38

3.6. Alat dan Bahan Penelitian Alat yang digunakan	39
3.7. Cara Kerja	Error! Bookmark not defined.
3.8. Alur Penelitian	48
BAB IV HASIL PENELITIAN	50
4.1. Pemeriksaan morfologi dan molekuler spesies primata	50
4.2. Prevalensi <i>Plasmodium</i> spp. pada monyet buton	Error! Bookmark not defined.
4.3. Tipe perindukan larva nyamuk	53
4.4. Jumlah sampel nyamuk <i>Anopheles</i> dan inkriminasi vektor	Error! Bookmark not defined.
4.5. <i>Mass Blood Survey</i> (MBS) pada masyarakat di sekitar SMBU	57
BAB V PEMBAHASAN	58
BAB VI PENUTUP	62
6.1. Kesimpulan	62
6.2. Saran	62
6.3. Keterbatasan Penelitian	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	75

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
Tabel 2.1. Angka kejadian malaria knowlesi di beberapa negara di Asia	15
Tabel 2.2. <i>Plasmodium</i> pada hewan primata yang ditemukan di Asia	17
Tabel 4.1. Hasil penangkapan hewan primata	Error! Bookmark not defined.
Tabel 4.2. Spesies <i>Plasmodium</i> yang terdeteksi	Error! Bookmark not defined.
Tabel 4.3. Variasi tempat perindukan nyamuk	53
Tabel 4.4. Identifikasi molekuler menggunakan gen ITS2 di SMBU	55
Tabel 4.5. Prilaku menggigit <i>Anopheles</i> di SMBU	53

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
Gambar 2.1. Siklus hidup <i>Plasmodium</i> sp. pada nyamuk dan host	7
Gambar 2.2. Siklus hidup nyamuk <i>Anopheles</i> sp.....	21
Gambar 2.3. Morfologi nyamuk <i>Anopheles</i> dewasa.....	22
Gambar 2.4. Habitat vektor malaria primata	23
Gambar 2.5. Penggunaan MBNT.....	24
Gambar 2.6. Spesies-spesies Macaca di Pulau Sulawesi	18
Gambar 2.7. Proses elektroforesis.....	34
Gambar 2.8. Kerangka teori.....	35
Gambar 2.9. Kerangka konsep	29
Gambar 3.1. Peta Pembagian Resort SMBU)	31
Gambar 3.2. Alur penelitian pengambilan sampel darah primata	51
Gambar 3.3. Alur penelitian pengambilan sampel larva dan nyamuk	52
Gambar 4.1. Monyet buton	46
Gambar 4.2. Hasil elektroforesis amplikon yang diperoleh	47
Gambar 4.3. Pohon filogeni <i>Macaca brunnescens</i>	48
Gambar 4.4. Pohon filogeni <i>Plasmodium</i>	49
Gambar 4.5. Pohon filogeni <i>Plasmodium simiovale</i> .. Error! Bookmark not defined.	
Gambar 4.6. Hasil pemeriksaan mikroskopik <i>Plasmodium</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Gambar 4.7. Jenis tempat perindukan nyamuk <i>Anopheles</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Gambar 4.8. Tampilan gel produk PCR.....	Error! Bookmark not defined.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Malaria masih menjadi tantangan kesehatan masyarakat di banyak negara di dunia, termasuk Indonesia. Program pengendalian malaria bertujuan untuk mengurangi beban penyakit dan mempertahankannya pada tingkat yang cukup rendah, serta pada akhirnya untuk menghilangkan penyakit dari wilayah geografis tertentu dan memberantas penyakit tersebut secara global (WHO, 2008). Terdapat 249 juta kasus malaria pada tahun 2022 yang tersebar di 108 negara endemis malaria yang umumnya berada di wilayah Afrika, Asia Selatan, dan Asia Tenggara (WHO, 2023). Di Indonesia, dalam 10 tahun terakhir, angka kejadian malaria mengalami penurunan, khususnya di bagian barat Indonesia dan pada tahun 2023 terdapat 418.546 kasus malaria (Kementerian Kesehatan, 2023).

Malaria pada manusia disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale*, sedangkan *P. knowlesi* dapat menginfeksi primata (*non-human primate* (NHP)) seperti *Macaca* dan telah dilaporkan dapat menginfeksi manusia yang menyebabkan malaria zoonotik di Asia Tenggara (Sato, 2021). Di kawasan Asia Tenggara penelitian mengenai malaria primata juga telah dilaporkan, seperti di Thailand dimana dari tiga lokasi dengan jumlah 95 sampel darah monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) hasilnya menunjukkan prevalensi

Plasmodium inui sebanyak 44.2%, *P. fieldi* 41%, *P. cynomolgi* 23.2%, *P. coatneyi* 21%, dan *P. knowlesi* 19% (Gamalo et al., 2019).

Malaria pada *Macaca* terdistribusi di timur Teluk Benggala dari Bangladesh ke Taiwan, bagian selatan Pulau Jawa di Indonesia, Filipina, dan di barat Teluk Benggala, serta meluas ke barat daya India dan Sri Lanka (Subbarao, 2011). Di Asia Tenggara, terdapat 13 spesies parasit malaria pada primata, 7 di antaranya menginfeksi genus *Macaca* (Collins 1988).

Database mengenai malaria primata khususnya pada *Macaca* (monyet) di Indonesia tercatat tahun 2015 pernah dilakukan di Pulau Sumatra tepatnya di wilayah Sumatra Selatan dengan lokasi Palembang dan Lampung, serta Jawa Barat menggunakan sampel feses dan darah dari dua spesies *Macaca* yakni *M. fascularis* dan *M. nemestrina*, penelitian tersebut melaporkan adanya *P. inui* (Siregar et al., 2015). Kemudian pada tahun 2016 penelitian terhadap *Plasmodium* pada *M. fascularis* di wilayah Sumatra Selatan dari 50 sampel darah positif hasilnya yaitu *P. cynomolgi* sebanyak 39 sampel, *P. inui* sebanyak 1 sampel, dan *P. fieldi* sebanyak 1 sampel (Zhang et al., 2016). Terakhir pada wilayah Sumatra di Provinsi Jambi terdapat 6 ekor *M. fascularis* yang terinfeksi *P. knowlesi* dari sampel darah (Salwati et al., 2017). Hasil penelitian pada spesies *M. fascularis* dan *M. nemestrina* pada tahun 2010 menemukan 2,4% positif *P. inui* pada spesies *Macaca cyclopis* di Taiwan (Huang et al., 2010).

Plasmodium knowlesi telah dilaporkan menginfeksi 120 orang di Kapit, Serawak, Malaysia yang merupakan daerah berbukit dan memiliki

hutan hujan tropis (Singh et al. 2004). Di Sumatra dan Kalimantan, tantangan baru telah muncul dengan adanya malaria zoonotik (Setiadi et al 2016, Lubis et al 2017). Infeksi pada manusia dengan berbagai jenis malaria primata seperti *Plasmodium knowlesi*, *P cynomolgi*, dan *P inui* telah dilacak di berbagai tempat di Malaysia. Sangat mungkin bahwa fenomena ini juga terjadi di berbagai lokasi di Indonesia di mana primata adalah endemik. Sekitar 38 spesies primata endemik di Indonesia (Groves, 2010; Mittermeier et al., 2013; Roos et al. 2014), dan 9 diantaranya merupakan *Macaca* endemik seperti monyet ekor babi Mentawai (*Macaca pagensis*), monyet yaki atau monyet hitam (*M. nigra*), monyet dare (*M. maura*), monyet dige (*M. hecki*), monyet digo atau monyet butung (*M. ochreata*), monyet boti (*M. tonkeana*), monyet buton (*M. brunnescens*), dan monyet dihe (*M. nigrescens*) (Supriatna 2019; Mustari 2020). Selain infeksi tunggal, infeksi ganda antara *P knowlesi* dan *P cynomolgi* juga ditemukan pada *Macaca* (Zhang et al., 2016; Gamalo et al., 2019) dan pada manusia (Imwong et al., 2019).

Kemunculan malaria zoonotik baru-baru ini di berbagai daerah di Indonesia mengingatkan kita akan perlunya upaya mitigasi untuk mencegah dan menangani kasus-kasus tersebut. Kepulauan Indonesia merupakan rumah bagi banyak spesies primata dan deforestasi secara substansial telah mengurangi habitat primata dan mengintensifkan interaksi antara primata dan manusia. Suaka Margasatwa Buton Utara (SMBU) adalah salah satu suaka margasatwa di Pulau Buton, Sulawesi Tenggara, Indonesia. Beberapa spesies endemik primata dilaporkan

menghuni SMBU (Supriatna 2019). Namun, belum ada informasi tentang spesies malaria primata yang menginfeksi primata maupun keanekaragaman spesies primata di Pulau Sulawesi, Indonesia.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Apakah ditemukan *Plasmodium* pada hewan primata di kawasan Suaka Margasatwa Buton Utara (SMBU)?
2. Apakah ditemukan vektor nyamuk *Anopheles* di SMBU?
3. Bagaimanakah faktor-faktor risiko penularan jika *Plasmodium* ditemukan pada hewan primata di wilayah tersebut?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara spesifik, bertujuan untuk:

1. Mengetahui spesies primata (*non-human primate* (NHP)) di daerah kawasan SMBU.
2. Mengetahui seberapa banyak spesies *Plasmodium* sp. yang ditemukan pada primata di SMBU.
3. Mengetahui seberapa banyak spesies *Anopheles* sp. di wilayah tersebut dan spesies yang berpotensi sebagai vektor.
4. Mengetahui potensi dan risiko penularan malaria zoonotik dari primata ke manusia (bila ditemukan membawa *Plasmodium* sp.)

1.4. Hipotesis

Terdapat *Plasmodium* sp. pada primata dan adanya vektor nyamuk *Anopheles* di daerah pinggiran hutan SMBU, Provinsi Sulawesi Tenggara.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bidang Akademik

Memberikan informasi tentang *Plasmodium* sp. pada primata yang terdapat di wilayah Sulawesi Tenggara.

1.5.2. Bidang Klinik

Menyumbangkan informasi ilmiah tentang *Plasmodium* sp. yang bersifat zoonosis dengan melihat adanya kemungkinan infeksi dari primata ke manusia

1.5.3. Kesehatan Masyarakat

Sebagai informasi kepada masyarakat tentang penyakit zoonosis khususnya malaria dan faktor risiko.

1.6. Kebaruan dan Urgensi Penelitian

Studi tentang parasit darah, terutama *Plasmodium* pada primata endemik sangat jarang dilakukan. Lebih banyak laporan penelitian pada primata spesies *Macaca fascicularis* dan *M. nemestrina*. Di Indonesia penemuan pertama *Plasmodium pitheci* pada orang utan (*Pongo pygmaeus*) di Kalimantan dan *P. inui* pada spesies *M. fascicularis* dan *M. nemestrina* (Contacos et al., 1963), dan setelah ratusan tahun spesies *Plasmodium knowlesi*, *P. inui*, dan *P. coatneyi* dilaporkan menginfeksi

tidak hanya *M. fascicularis* dan *M. nemestrina*, tetapi juga *Presbytis* sp. (Contacos, P.G. et al., 1963; Siregar J.E. et al., 2015; Zhang et al., 2016; Salwati, E. et al, 2017; Kesumawati, U., 2020)

Penelitian ini, merupakan penelitian pertama yang dilakukan pada spesies primata endemik khas pulau Sulawesi, sedangkan penelitian sebelumnya yang dilakukan pada spesies primata di pulau Jawa, Kalimantan, dan Sumatra.

Urgensi dari penelitian ini yakni pemetaan potensi penyakit zoonosis yang dapat ditularkan dari primata agar pencegahan dan pengobatan yang tepat dapat dilakukan.

BAB II

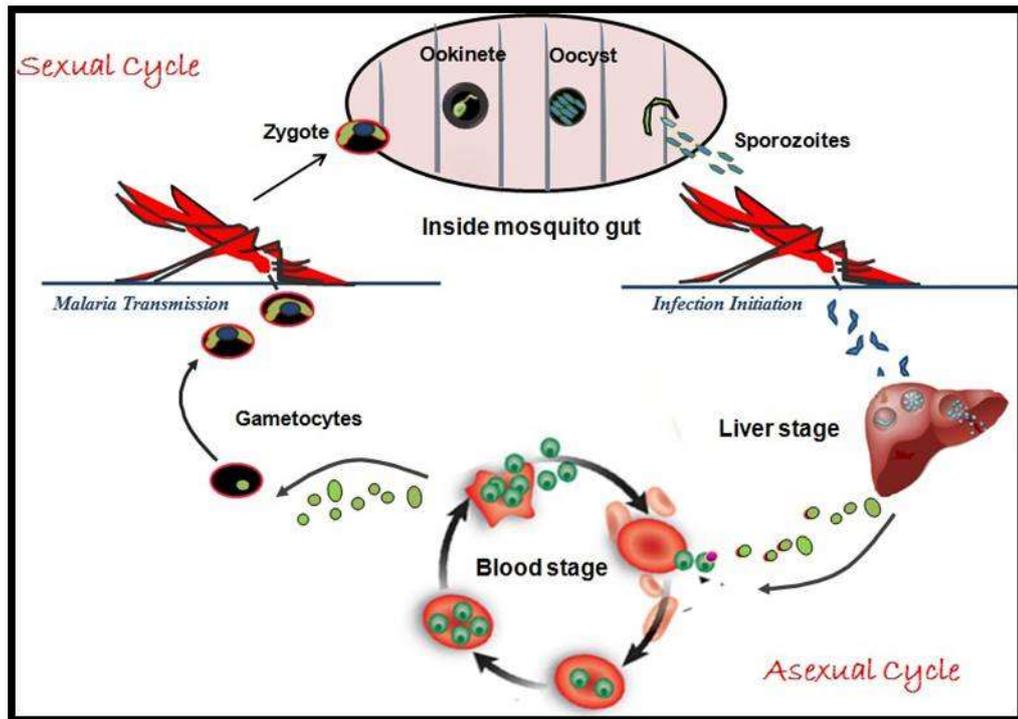
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Malaria pada Manusia dan Hewan Primata

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium*, yang ditransmisikan melalui gigitan nyamuk *Anopheles sp.* betina. Parasit protozoa darah tersebut dapat menginfeksi manusia dan beberapa jenis hewan, kurang lebih terdapat 250 spesies *Plasmodium* yang menginfeksi manusia, reptil, burung, rodensia, dan primata (Rich dan Ayala, 2006; Cruz, et al, 2013; Ramasamy, 2014). Terdapat empat spesies *Plasmodium* yang menyebabkan manusia yakni *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale*. Namun, beberapa dekade terakhir *P. knowlesi* menjadi penyebab kelima malaria yang menginfeksi manusia (Wesolowski et al., 2015).

Siklus hidup *Plasmodium* pada nyamuk (seksual/sporogoni) dan *host* (aseksual/schizogoni) misalnya manusia, terdapat pada Gambar 2.1. Siklus hidup *Plasmodium* dalam tubuh nyamuk di mulai ketika nyamuk mengisap darah manusia atau hewan vetebrata yang terinfeksi *Plamodium sp.* (tahap gametosit) yang beberapa menit berkembang menjadi gamet, gamet betina disebut makrogamet dan gamet jantan disebut mikrogamet, makrogamet difertilisasi oleh mikrogamet dan menghasilkan zigot, kemudian zigot berkembang menjadi ookinet dan berada pada *peritrophic matrix* (PM) usus selanjutnya 16-26 jam setelah

feeding akan keluar dari *midgut epithelium* (MGT-E), ookinet yang berhasil akan menjadi oosit pada lamina basalis, oosit akan berkembang dalam 7-21 hari untuk menjadi ribuan sporozoit yang akan dilepaskan pada hemolimfa nyamuk dan kemudian akan berada pada kelenjar air ludah (*salivary glands*) nyamuk (Cruz, et al, 2013).



Gambar 2.1. Siklus hidup *Plasmodium* sp. pada nyamuk dan host yang terinfeksi (Sharma dan Awasthi, 2015)

Infeksi malaria pada manusia di mulai setelah nyamuk betina yang membawa sporozoit pada kelenjar air liurnya, mengisap darah manusia, sporozoit masuk ke dalam pembuluh darah manusia dan menuju sel hati, untuk *Plasmodium falciparum*, *P. malaria*, dan *P. knowlesi* membutuhkan waktu 1-2 minggu dari sporozoit menjadi merozoit, pada fase eritositik merozoit berkembang menjadi tropozoit hati, kemudian dari tropozoit

berkembang menjadi skizon hati, kemudian skizon hati akan pecah menjadi merozoit dengan jumlah 10.000 - 300.000 merozoit, tahapan tersebut disebut tahapan pada organ hati (*liver stage*), tahapan selanjutnya pada sel darah (*erythrocytic stage*), merozoit akan memasuki peredaran darah dan menginfeksi sel darah merah/eritrosit, di dalam eritrosit akan menjadi tropozoit yang juga akan menjadi skizon eritrosit yang akan pecah dan menghancurkan sel darah merah dan selanjutnya berkembang menjadi gametosit (Sharma dan Awasthi, 2015).

Knowles dan Das Gupta tahun 1932 sudah menggambarkan bentuk parasit pada darah namun tidak menamainya, kemudian di tahun yang sama Sinton dan Mulligan juga menggambar, menjelaskan siklus hidup, dan menamai parasit darah tersebut dengan nama knowlesi sebagai penghormatan kepada Dr. R Knowles. *Plasmodium knowlesi* pertama kali dilaporkan tahun 1965 menginfeksi pria berusia 37 tahun di hutan Malaysia barat/peninsular (Chin et.al., 1965).

Plasmodium knowlesi umumnya menginfeksi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dan monyet ekor babi atau beruk (*Macaca nemestrina*), lutung atau langur (*Trachypithecus obscurus*), dan simpai atau lutung simpai tangan kuning (*Presbytis melalophus*) (Moyes et al., 2014). Jumlah kasus *Plasmodium knowlesi* atau malaria knowlesi pada manusia angka kejadian dari tahun 2004-2016 di kawasan Asia yang terkonfirmasi secara molekuler dapat terlihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Angka kejadian malaria knowlesi di beberapa negara di Asia

Negara	Jumlah Kasus
Thailand	37
Myanmar	33
China daerah Yunan	1
Vietnam	3
Filipina	5
Brunai	1
Singapura	6
Indonesia	465
Malaysia Barat (Peninsular Malaysia)	204
Malaysia Timur : Sabah, Serawak, Labuan	4553

Sumber : Abeyasinghe, 2017

Plasmodium sp. penyebab malaria primata tidak hanya *Plasmodium. knowlesi*. Akan tetapi, spesies *Plasmodium* yang menginfeksi *Macaca* antara lain disebabkan oleh *P. inui*, *P. cynomolgi*, *P. fieldi*, *P. simiovale*, *P. coatneyi*, *P. fragile*, dan *P. knowlesi* (Irene, 2011). Terdapat 13 spesies *Plasmodium* pada primata yang telah ditemukan di Asia dari total 27 spesies *Plasmodium* menyebabkan malaria pada primata secara global. Jenis *Plasmodium* yang menyebabkan malaria primata terdapat pada Tabel 2.2

Tabel 1.2. *Plasmodium* pada primata yang ditemukan di Asia

Spesies <i>Plasmodium</i>	Inang (<i>Host</i>)
<i>Plasmodium pitheci</i>	Orangutan (<i>Pongo pygmaeus</i>)
<i>Plasmodium inui</i>	Monyet ekor panjang (<i>Macaca fascicularis</i>)
<i>Plasmodium cynomolgi</i>	<i>Macaca fascicularis</i>
<i>Plasmodium eylesi</i>	Gibbon (<i>Hylobates lar</i>)
<i>Plasmodium hylobatid</i>	Gibbon (<i>Hylobates leuciscus</i>)
<i>Plasmodium jefferyi</i>	Gibbon (<i>Hylobates lar</i>)
<i>Plasmodium youngi</i>	Gibbon (<i>Symphalangus syndactylus</i>)
<i>Plasmodium fieldi</i>	<i>Macaca nemestrana</i>
<i>Plasmodium simiovale</i>	<i>Macaca sinica</i>
<i>Plasmodium coatneyi</i>	<i>Macaca mulatta</i>
<i>Plasmodium fragile</i>	<i>Macaca radiata</i>
<i>Plasmodium knowlesi</i>	<i>Macaca fascicularis</i>
<i>Plasmodium silvaticum</i>	Orangutan (<i>Pongo pygmaeus</i>)

Sumber : Martinelli dan Culleton, 2016

Penelitian mengenai infeksi *P. knowlesi* pada *Macaca mulatta* melaporkan gejala klinis pucat, letargi, dan anoreksia, pada hasil patologi anatomi organ paru mengalami emfisema yang berkaitan simian tungau paru (*Pneumonyssus simicola*), warna organ hati menjadi coklat pucat keabuan, pada pemeriksaan histopatologi pada eritrosit ditemukan pigmen malaria yang disebut hemozoin (Spangler et al., 1978). Spesies *Macaca mulatta* yang terinfeksi *P. coatneyi* mengalami kehilangan nafsu makan, dehidrasi, anemia, dan mengalami takipenia, dan hasil *post mortem* ditemukan perubahan warna organ hati dan ginjal menjadi coklat pucat

keabuan, perubahan warna akibat kongesti vaskular dan hemozoin pada eritrosit (Moreno et al., 2013; Lombardini et al., 2015).

2.2. Vektor Nyamuk Malaria

Sir Ronald Ross pada tahun 1902 memperoleh Nobel untuk bidang Kedokteran karena menemukan nyamuk *Anopheles* sebagai penular malaria, hal tersebut didasarkan oleh adanya penemuan parasit malaria pada saluran gastrointestinal nyamuk. *Plasmodium* sp. ditransmisikan dari manusia ke manusia dan hewan ke manusia (zoonosis) melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina, sedangkan *Anopheles* jantan hanya menghisap nektar dan tidak mentransmisikan malaria (William dan Pinto, 2012). Nyamuk *Anopheles* betina merupakan vektor yang membawa *Plasmodium* penyebab malaria pada manusia dan juga hewan dapat hidup 3-4 minggu dan membutuhkan darah hewan atau manusia karena dalam darah terdapat asam amino yang diperlukan untuk maturasi telurnya (WHO, 2013). Kurang lebih ada 450 spesies *Anopheles*, diperkirakan ada 60-70 spesies yang dapat menularkan malaria dan ada 30 spesies yang sangat penting bagi penularan malaria (WHO, 2013). Siklus hidup terdapat pada Gambar 2.2. Nyamuk *Anopheles* yang memiliki empat tahapan yakni telur, larva, pupa, dan nyamuk dewasa.

- Telur

Nyamuk betina hanya kawin satu kali seumur hidupnya, setelah itu nyamuk betina harus mendapatkan darah untuk perkembangan telurnya, kemudian nyamuk betina meletakkan telurnya di air sebelum mengisap

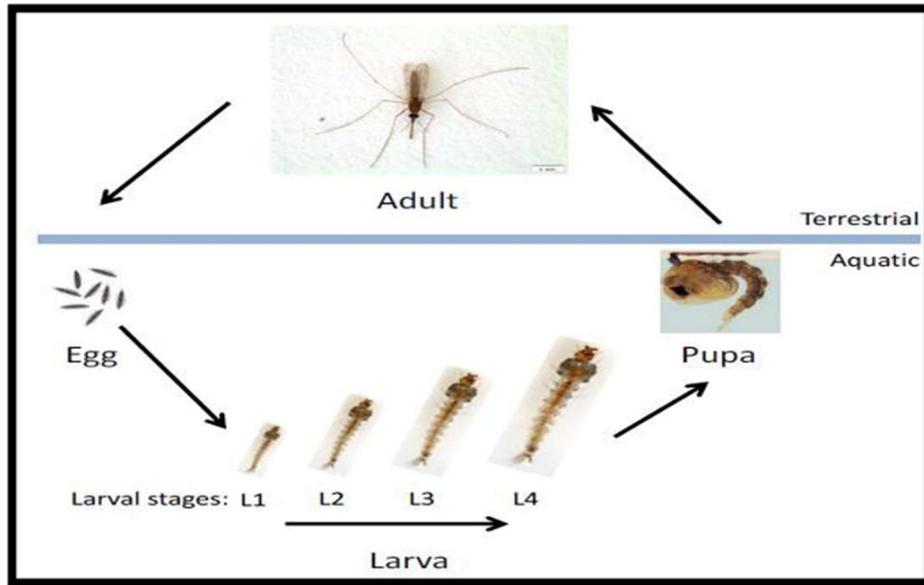
darah lagi. Telur akan menetas menjadi larva membutuhkan waktu 2-3 hari jika 30°C atau 7-14 hari jika suhu 16°C. *Anopheles* betina menghasilkan sekitar 100-150 telur selama ovoposisi.

- Larva

Larva memiliki kepala dengan 'mouth brushes' yang digunakan untuk makan, pakan larva misalnya alga, bakteri, dan bahan organik. Larva *Anopheles* tidak memiliki siphon, sehingga larva selalu berada di permukaan air. Larva berkembang pada empat tahapan L1-L4 di kenal dengan sebutan instar akan menjadi pupa dalam waktu 5-10 hari pada suhu normal.

- Pupa

Pupa nyamuk *Anopheles* berbentuk seperti koma dan tinggal pada permukaan air, saat tahap ini pupa tidak makan namun hanya merespon rangsangan, pada tahapan ini merupakan peralihan dari hidup di air ke hidup di darat sebagai nyamuk dewasa. Tahapan pupa memerlukan waktu 2-5 hari hingga menjadi nyamuk dewasa.



Gambar 2.2. Siklus hidup nyamuk *Anopheles sp* (William dan Pinto, J., 2012)

Lama siklus hidup dari telur ke nyamuk dewasa bergantung pada suhu, jika suhu 31°C maka hanya membutuhkan 7 hari

- Nyamuk dewasa

Durasi dari telur ke nyamuk dewasa membutuhkan 7 hari pada suhu 31°C dan 20 hari pada suhu 20°C. *Anopheles* jantan dan betina dibedakan dari antena (bagian anatomi) yang jantan memiliki sikat /brushes (plumose). Bila dalam kondisi resting nyamuk *Anopheles* betina dapat dibedakan dengan nyamuk lainnya karena membentuk sudut antara 50°-90°. Nyamuk *Anopheles* dewasa dapat hidup rata-rata dua minggu, namun ada beberapa spesies yang dapat hidup lebih dari dua minggu. Bagian-bagian tubuh nyamuk *Anopheles* dewasa di bagi menjadi 3 bagian yakni kepala, thorax, dan abdomen. Di bagian kepala ciri yang paling khas dari nyamuk *Anopheles* betina dewasa yakni palp yang hampir sama

panjang dengan probosis, dapat di lihat pada Gambar 2.3.a, dibedakan dengan jenis culicines (*Aedes*, *Culex*, dan *Mansonia*) melalui panjang probosis, karena panjang probosis hampir sama dengan palp.

Pada bagian thorax nyamuk *Anopheles* dewasa terdapat tiga pasang kaki dan satu pasang sayap, terdapat noda atau spot pada daerah sayap, kaki belakang nyamuk memiliki lima segmen, dan pada ada bagian adomen baik pada dorsal dan ventral terdapat bulu-bulu halus.



Gambar 2.3. Morfologi nyamuk *Anopheles* dewasa (*Environmental Health Directorate, Department of Health WA, 2017*)

Keterangan : lingkaran merah, a. bagian probosis dan palp yang hampir sama panjang, b. adanya spot/noda-noda di bagian dorsal sayap, c.adanya lima segmen pada kaki, d. bulu halus pada ventral abdomen

Vektor malaria primata dikaitkan dengan hutan hujan tropis yang menjadi habitat *Anopheles* (Faust dan Dobson, 2015). Habitat vektor juga dikaitkan dengan adanya aliran air yang lambat, bekas kaki hewan, genangan air, dan kolam tanah bekas kendaraan bermotor (Ahmad, 2016), tempat habitat vektor terdapat pada Gambar 2.4.

Nyamuk-nyamuk *Anopheles* yang menjadi vektor malaria pada primata ke manusia (zoonotik) adalah *Anopheles cracens*, *An. latens*, *An. dirus*, dan *An. balabacensis* (Vythilingam dan Hii, 2013), sedangkan vektor malaria knowlesi di beberapa wilayah Malaysia dan Vietnam adalah *An. latens* di Sarawak, *An. balabacensis* di Sabah, *An. cracens* di Peninsular Malaysia, *An. dirus* di Vietnam (Abeyasinghe, 2017).



Gambar 2.4. Habitat vektor malaria primata (Ahmad, 2016)

Keterangan: 1. aliran air yang lambat, 2. Bekas kaki hewan, 3. genangan air, dan 4. kolam tanah bekas kendaraan bermotor

Metode yang digunakan untuk memperoleh sampel nyamuk *Anopheles* bermacam-macam, ada dua metode yang digunakan yaitu metode *Human Landing Catch* (HLC) dan *Monkey Baited Net Trap* (MBNT) (Gambar 2.5).

Pada penelitian di Kudat distrik Sabah Malaysia Timur menggunakan metode HLC dan MBNT, Penggunaan metode HLC

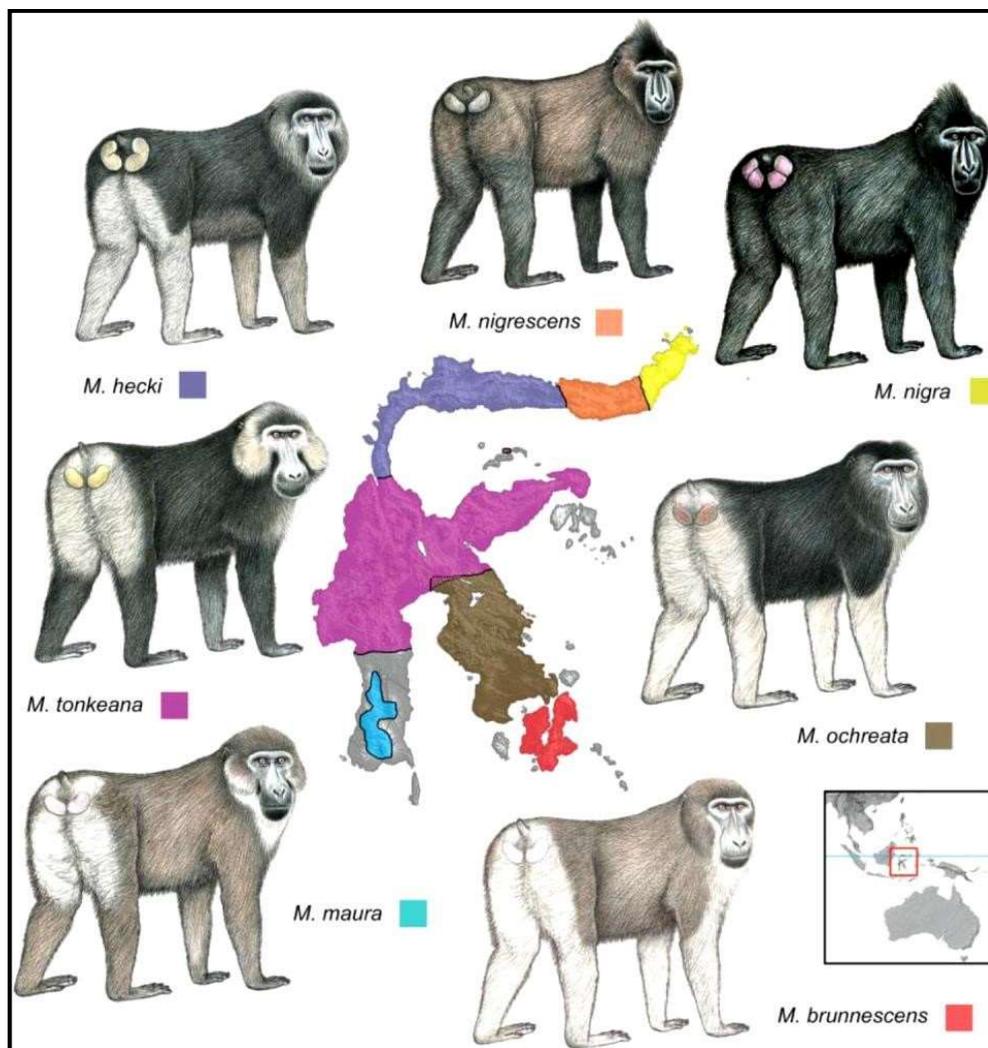
berhasil memperoleh sepuluh spesies *Anopheles* sedangkan metode MBNT hanya memperoleh satu spesies *Anopheles* (Hawkes et al. 2017). Penggunaan HLC juga memperoleh tiga spesies *Anopheles* di salah satu desa di Lampung Barat (Wibowo et al., 2020) .



Gambar 2.5. Penggunaan MBNT (Vythiligam dan Hii, 2013)

2.3. Jenis Primata di Sulawesi Tenggara

Pulau Sulawesi dilalui garis Wallacea, tentunya memiliki primata endemik salah satunya yakni *Macaca* atau di sebut monyet. Di pulau Sulawesi terdapat tujuh spesies *Macaca* yakni *Macaca nigra*, *M. brunnescens*, *M. maura*, *M. nigrescens*, *M. tonkeana*, *M. hecki* dan *M. ochreata* (Nowak, 1999), spesies monyet tersebut terdapat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Spesies-spesies *Macaca* di Pulau Sulawesi (Riley et al., 2010), di gambar oleh Stephen Nash Conservation)

Macaca yang berada di wilayah Sulawesi Tenggara, Buton Utara, adalah *Macaca brunnescens* (monyet buton atau monyet ndoke).

Berikut ini merupakan taxonomi dari *Macaca brunnescens* :

Suborder	: Haplorrhini
Infraorder	: Simiiformes
Superfamily	: Cercopithecoidea
Family	: Cercopithecinae
Subfamily	: Cercopithecinae
Genus	: <i>Macaca</i>
Species	: <i>Macaca brunnescens</i>

Status konservasi untuk *Macaca brunnescens* di Pulau Buton, Sulawesi Tenggara Indonesia berdasarkan *The International Union for Conservation of Nature* (IUCN) belum di evaluasi pada Peraturan Menteri lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia tahun 2018 tentang Jenis Tumbuhan dan Satwa yang Dilindungi, *M. brunnescens* bukan merupakan satwa yang dilindungi (MENTERI LHK RI, 2018).

Prilaku dan pakan monyet buton (*M. brunnescens*) (Mustari, 2020) sebagai berikut :

1. Hidup berkelompok, kelompok dipimpin oleh monyet jantan, hidup diatas pohon (*arboreal*) dan lebih banyak beraktivitas di tanah (*terrestrial*), saat beraktivitas di tanah monyet bergerak dengan menggunakan ke empat anggota gerakanya (*quadropedal*), jika berpindah dari satu pohon ke pohon lain dilakukan dengan meloncat.
2. Jelajah harian 400-1500 m dan daerah jelajahnya mencampai 30-40 Ha, apabila hutan masih rapat monyet buton tidak akan turun ke tanah,

namun bila hutan sudah jarang monyet akan turun ke tanah.

3. Lebih banyak beraktivitas pada pagi dan sore hari, pada siang hari lebih banyak digunakan untuk beristirahat atau bermain dan saling mengutui (*grooming*), pada malam hari digunakan untuk tidur bersama kelompok di atas pohon rimbun tanpa membuat sarang.
4. Komposisi pakan berupa buah-buahan (57%), daun (20%), bunga 20%, dan sisanya sumber pakan lain, untuk habitat sering di pinggiran perkebunan atau daerah pertanian.

2.4. Diagnostik penyakit Malaria Pada Hewan Primata

Pemeriksaan Mikroskopik

Malaria disebabkan oleh parasit yang ada di dalam sel darah untuk itu membutuhkan bantuan mikroskop untuk dapat melihatnya. Untuk melihat parasit dibawah mikroskop perlu dibuat sediaan apusan darah pada objek glass. Terdapat dua sediaan apusan yakni sediaan apusan darah tipis dan tebal, kemudiaan sediaan diwarnai dengan pewarna atau larutan giemsa 10%.

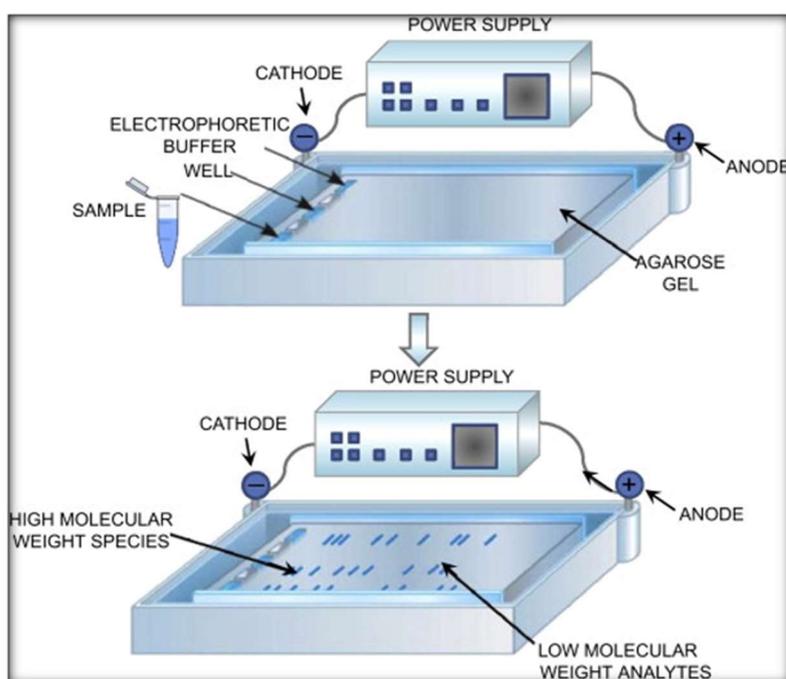
Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pemeriksaan malaria yang sering dilakukan yakni menggunakan *Nested PCR*, *Multiplex PCR*, *Realtime PCR*, dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT- PCR). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh sepasang primer (Handoyo dan Rudiretna, 2001; McPherson dan Moller,

2006). Metode PCR pertama kali diperkenalkan oleh Kary Mullis pada tahun 1980an. Proses PCR memerlukan komponen-komponen PCR seperti DNA template, primer, *deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs), buffer PCR, $MgCl_2$, dan enzim polimerase DNA. Prinsip dasar dari teknik PCR yakni perbanyak fragmen DNA menggunakan enzim polimerase secara eksponensial.

Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu proses perpindahan molekul bermuatan dalam medium yang dialiri arus listrik. Menggunakan media agarosa, elektroforesis gel agarosa merupakan metode untuk memisahkan dan memvisualisasi fragmen DNA. Hasil elektroforesis berupa band yang terbentuk dari hasil amplifikasi dari DNA.



Gambar 2.7. Proses elektroforesis (Drabik et al., 2017)

Teknik elektroforesis didasarkan pada fakta bahwa DNA bermuatan negatif pada pH netral, karena memiliki gugus fosfat (Artati, 2016). Jika DNA diberikan arus listrik maka DNA menuju kutub positif diperlambat dengan melewati DNA pada gel agarose. Konsentrasi gel agarose yang besar akan menurunkan mobilitas molekul DNA sehingga berguna untuk memisahkan molekul DNA yang kecil dan begitu sebaliknya jika konsentasi gel agaorse yang rendah maka akan meningkatkan mobilitas molekul DNA sehingga berguna untuk memisahkan molekul DNA yang besar (Adhiyanto et al., 2020).

Pada elektroforesis digunakan penanda sebagai standar untuk menentukan ukuran DNA dari suatu fragmen DNA yang tidak diketahui. Fragmen terdeteksi oleh pewarnaan gel dengan *Ethidium Bromide* (EtBr), diikuti oleh visualisasi/fotografi di bawah sinar UV (Fatchiyah et al., 2018). Pewarnaan yang umum yang sering digunakan untuk visualisasi DNA pada agarose ialah Etbr, namun EtBr merupakan salah satu biohazard yang bersifat karsinogenik, mutagenik, dan teratogenik (Rifa et al., 2020). Beberapa pewarna yang dapat digunakan dan cukup aman dengan tingkat toksisitas dan mutagenik yang rendah sebagai pewarna DNA antara lain GelRed, peqGREEN, PicoGreen, dan DAPI (Crisafuli et al., 2013; Rifa et al., 2020)

Sekuensing DNA merupakan suatu metode penentuan urutan nukleotida atau basa dalam fragmen DNA (Gaffar, 2007). Target DNA yang diamplifikasi dengan pemeriksaan PCR, dan urutan basa yang diperoleh dapat dijadikan bahan untuk identifikasi penentuan spesies.

Keunggulan teknik sekuensing DNA adalah metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tanpa harus menunggu dengan waktu yang lama, misalnya saja pada identifikasi bakteri yang tidak perlu dikultur terlebih dahulu. Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode dideoksi Sanger. Sekuensing dengan menggunakan metode tersebut merupakan sekuensing generasi pertama dan menjadi teknik standar dalam mengidentifikasi sekuens DNA karena metode ini relatif efisien dan membutuhkan biaya yang paling rendah diantara metode-metode lainnya seperti Maxam-Gilbert, sekuensing dye terminator, Pyrosequencing, Illumina (Solexa), dan lain-lain (Kchouk et al., 2017)

Salah satu software yang digunakan untuk mengedit sekuen asam nukleat dan protein serta menganalisis hasil sekuen adalah BioEdit (Hall et al. 2011). BioEdit merupakan aplikasi yang secara mudah dapat digunakan untuk menganalisis dan atau mengedit sekuens biologis yang disejajarkan.

Uji statistik pada penelitian

Pada desain penelitian kuantitatif terdapat dua desain penelitian yaitu penelitian observasional (tanpa perlakuan/intervensi) dan penelitian eksperimental (adanya perlakuan/intervensi). Jenis penelitian observasional berdasarkan ada tidaknya hubungan antar variabel terdiri atas penelitian observasional deskriptif dan observasional analitik (Santoso, S., 2008).

Pada penelitian observasional analitik terdapat beberapa jenis studi yaitu studi potong lintang (*cross sectional study*), studi kasus kontrol (*case*

control study), studi kohor (*cohort study*). Pada studi potong lintang variabel bebas dan variabel terikat pada penelitian hanya di observasi pada variabel satu kali saja dan pada saat itu juga, sehingga tidak perlu dilakukan pengulangan, sedangkan pada studi kasus kontrol observasi dilakukan pada variabel bebas dan variabel terikat tidak dilakukan pada saat yang sama (Notoatmojo, 2010). Pada studi kohort penelitian mulai dilakukan dengan mengidentifikasi faktor resiko atau penyebabnya terlebih dahulu (Santoso, S., 2008).

Pengambilan sampel penelitian menggunakan teknik pengambilan sampel penelitian. Terdapat dua teknik sampling yaitu *probability sampling* dan *non probability sampling*. Penjelasan dari kedua kelompok teknik sampling :

1. *Probability sampling*

Pada teknik sampling ini pengambilan sampel ini memberikan peluang atau kesempatan bagi setiap unsur atau anggota populasi untuk terpilih menjadi sampel (Amirullah, 2015; Sugiyono, 2015). Pada teknik *probability sampling* terbagi atas 4 jenis (Amirullah, 2015):

a. *Simple Random Sampling*

Teknik pengambilan sampel secara acak akan tetapi seluruh populasi memiliki kesempatan yang sama menjadi anggota sampel.

b. *Sistematic Sampling*

Teknik pengambilan sampel dengan cara melakukan seleksi poin populasi secara acak dengan menentukan penomoran setiap populasi

untuk mendapatkan kerangka sampel.

c. Stratified Random Sampling

Teknik pengambilan sampel dimana populasi dibagi kedalam sub populasi atau tingkatan.

d. Cluster Sampling

Teknik pengambilan sampel dimana target populasi target di bagi menjadi sub kelompok dan kelompok yang diteliti dalam jumlah yang banyak.

2. Non probability sampling

Pada teknik sampling ini pengambilan sampel tidak memberikan peluang atau kesempatan yang sama bagi setiap unsur atau anggota populasi untuk terpilih menjadi sampel (Amirullah, 2015; Sugiyono, 2015). Teknik *non probability sampling* terbagi menjadi 4 antara lain (Amirullah, 2015) :

a. Convenience Sampling

Disebut juga *accidental sampling* dimana teknik pengambilan sampelnya dilakukan secara kebetulan. Monica et al. (2012) dan Sihombing et al. (2019) menggunakan teknik *convenience sampling* pada penelitian dengan menggunakan satwa liar yakni *Macaca fascicularis*.

b. Purposive Sampling

Teknik pengambilan sampel didasarkan pada penilaian tujuan dan maksud penelitian.

c. Quota Sampling

Teknik pengambilan sampel dimana peneliti secara mandiri menentukan jumlah sampel yang diambil secara acak dari populasi

d. Snowball Sampling

Teknik pengambilan sampel dimana penentuan awal sampel kecil, tetapi responden sebelumnya tidak puas, sehingga responden tersebut mencari responden lain untuk mencapai tujuan.

2.5. Aturan Penggunaan *Macaca* (*Non Human Primate*)

Penelitian yang memakai satwa liar sebagai objek ataupun subjek penelitian harus menyertakan etik penelitian. Persetujuan etik penelitian harus di peroleh dari lembaga yang berwenang. Pedoman penggunaan *Macaca* sebagai hewan penelitian disebutkan oleh Hawkes et al. (2017) pada lampiran satu (*additional file one*) yaitu *Macaca* merupakan hewan yang biasa terkena infeksi herpesvirus tipe B (*Macacine herpesvirus 1*), *Macaca* dapat terinfeksi herpes tipe B baik secara simptomatik atau asimptomatik, pada manusia tingkat kematian hingga 70% jika tidak mendapatkan perawatan yang memadai, dan vaksin herpesvirus tersebut juga belum ditemukan, jika bekerja kurang dari satu meter maka peneliti harus menggunakan alat perlindungan diri seperti jas pelindung, sepatu boot, masker N100, kaca mata, dan sarung tangan (*handscoon*) steril serta tidak steril.

Pemanfaatan satwa liar untuk penelitian pun diijinkan oleh pemerintah Indonesia dengan batasan tertentu dan bila satwa tersebut

termasuk dalam satwa dilindungi memerlukan ijin presiden dalam Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999.

Konsep 3Rs dalam penelitian hewan coba harus dipahami sebaik-baiknya, *Replacement, Reduction and Refinement* (3Rs) (Russell dan Burch, 1959). Penjelasan mengenai *Replacement, Reduction and Refinement* sebagai berikut:

- Replacement

Hal ini dapat berarti penggantian vertebrata menjadi invertebrata. Ini juga mencakup penggunaan kultur sel dan jaringan.

- Reduction

Sama halnya dengan menurunkan jumlah hewan coba yang digunakan tanpa mengurangi informasi yang berguna. Hal ini mungkin dicapai dengan mengurangi jumlah variabel melalui desain eksperimental yang baik, menggunakan statistik yang tepat, menggunakan genetik hewan yang homogen, dan memastikan bahwa kondisi eksperimen terkontrol dengan baik.

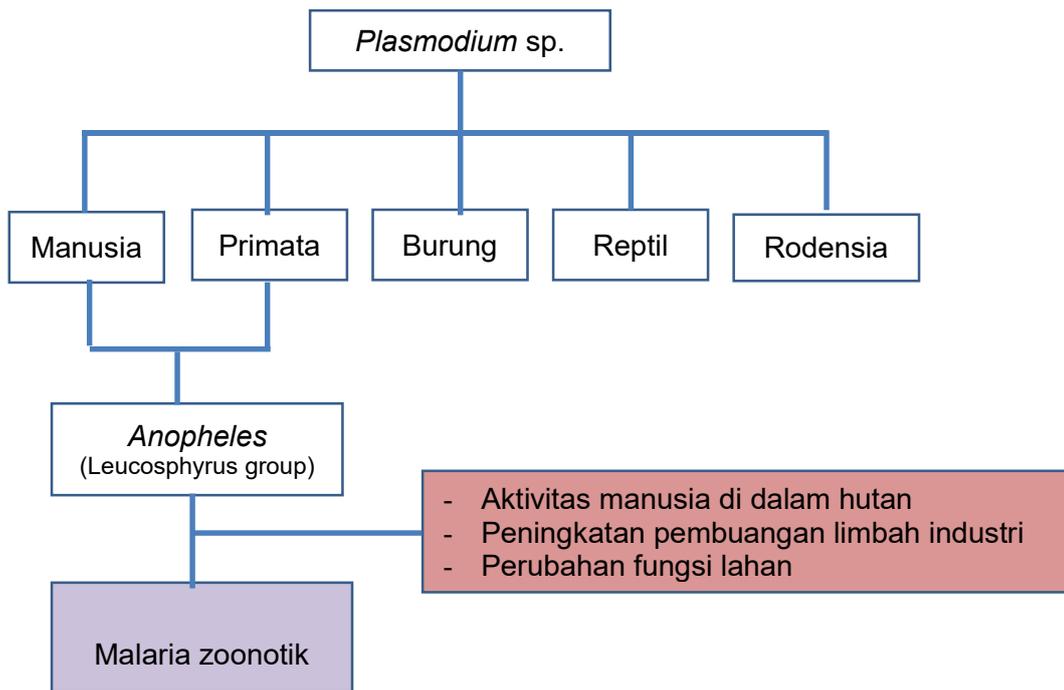
- Refinement

Berarti perubahan dalam beberapa aspek perlakuan yang berpotensi menimbulkan rasa sakit atau stres jangka panjang, memperlakukan hewan coba secara manusiawi dan menjamin kesejahteraan hewan (animal welfare) hingga akhir penelitian.

Terdapat lima prinsip (*5 Freedom*) yang dikemukakan oleh *Farm Animal Welfare Council* tahun 1979 yang perlu sangat diperhatikan, berikut ini merupakan lima prinsip tersebut :

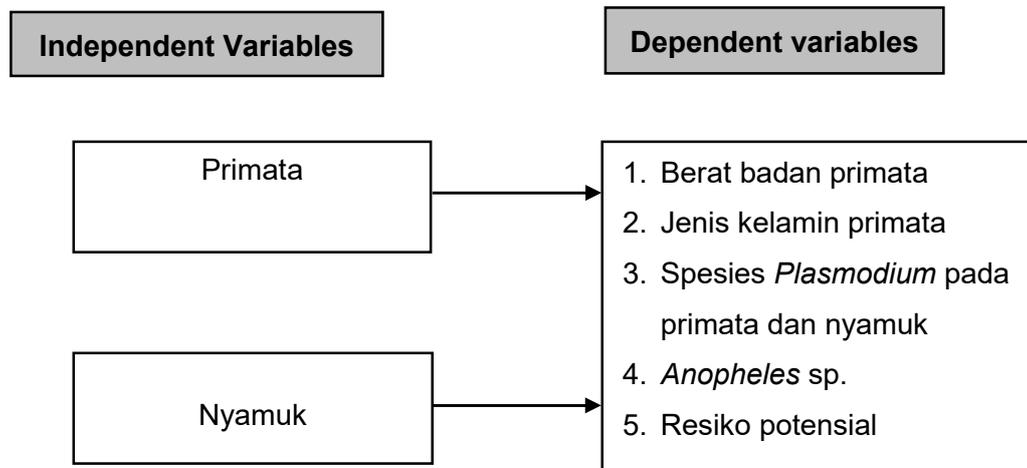
1. *Freedom of hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus).
2. *Freedom from discomfort* (bebas dari rasa tidak nyaman).
3. *Freedom of pain, injury or disease* (bebas dari rasa nyeri, trauma, dan penyakit).
4. *Freedom to fear and distress* (bebas dari ketakutan dan stres jangka panjang).
5. *Freedom to express natural behaviour* (bebas mengekspresikan tingkah laku alami, diberikan ruang dan fasilitas yang sesuai).

2.6. Kerangka Teori



Gambar 2.8. Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.9. Kerangka Konsep