

## Derajat Parasitemia Mencit Galur BALB/c yang Divaksinasi Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* sebagai Model *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Melawan Malaria (*Degree of Parasitemia of BALB/c Mice Vaccinated with Salivary Gland of Anopheles sundaicus as a Model of Transmission Blocking Vaccine (TBV) Against Malaria*)

Windradini Rahvian Aridama<sup>1</sup>, Kartika Senjarini<sup>2</sup>, Sugiyanta<sup>3</sup>

1. Fakultas Kedokteran, Universitas Jember (UNEJ)

2. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)

3. Fakultas Kedokteran, Universitas Jember (UNEJ)

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

E-mail: [kartika\\_senjarini@yahoo.com](mailto:kartika_senjarini@yahoo.com)

### Abstrak

Malaria merupakan penyakit infeksi yang menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Berbagai upaya pemberantasan penyakit malaria telah dilakukan namun masih belum memberikan hasil yang optimal. *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) berbasis kelenjar saliva vektor merupakan salah satu vaksin yang sedang dikembangkan untuk melawan malaria. Protein imunomodulator dalam kelenjar saliva vektor diduga mampu mempengaruhi respon imun inang serta memberikan efek proteksi pada inang. Hasil penelitian menggunakan ekstrak kelenjar saliva *An.sundaicus* menunjukkan bahwa mencit perlakuan yang divaksinasi model vaksin pellet dan supernatan kelenjar saliva *An.sundaicus* memiliki derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak divaksinasi. Derajat parasitemia hewan coba didapatkan paling rendah terutama pada kelompok perlakuan pellet. Hal ini mengindikasikan protein imunomodulator lebih dominan didapatkan pada fraksi *insoluble* pellet kelenjar saliva.

**Kata Kunci:** *An. sundaicus*, derajat parasitemia, kelenjar saliva, malaria, TBV

### Abstract

*Malaria is still being one of the major health problems in the world. It caused by Plasmodium and transmitted through the bite of female Anopheles mosquito. Many efforts has been done to eradicate malaria, however it still doesn't give the optimal results. Transmission Blocking Vaccine (TBV) based vector salivary gland is one of malaria vaccines that is being develop to eradicate malaria. The imunomodulatory proteins within vector salivary gland is suspected can influence the host immune response and gives a protective effect. The results using An.sundaicus salivary gland extract showed that mice vaccinated with vaccine model of An. sundaicus salivary gland has lower degree of parasitemia compared control that were not vaccinated. The lowest degree of parasitemia found in pellet group. It indicated that the immunomodulatory protein are dominantly found in insoluble fraction of pellet salivary gland.*

**Keywords:** *An. sundaicus*, degree of parasitemia, malaria, salivary gland, TBV

### Pendahuluan

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit *Plasmodium* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina [8]. Penyakit ini menyebabkan kematian sebanyak 2.7 juta penduduk dunia setiap tahunnya [17]. Di Indonesia, malaria masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama [2]. Tingginya angka mortalitas dan morbiditas malaria disebabkan karena program eradikasi malaria yang belum memberikan hasil optimal serta adanya resistensi obat pada parasit malaria maupun pada nyamuk *Anopheles* sebagai vektor. Maka dari itu, diperlukan suatu

terobosan baru untuk mengatasi masalah tersebut dimana salah satunya adalah pembuatan vaksin malaria [6]

*Transmission Blocking Vaccine* (TBV) berbasis kelenjar saliva vektor merupakan salah satu vaksin yang sedang dikembangkan untuk memberantas penyakit malaria [11]

[14]. Kelenjar saliva vektor malaria telah diketahui mengandung komponen aktif yang memodulasi sistem hemostasis, penghambatan vasokonstriksi, faktor inflamasi dan respon imun inang sehingga meningkatkan transmisi patogen [5][16]. Protein imunomodulator dalam saliva nyamuk merupakan salah satu komponen yang bersifat immunosupresif dan bekerja dengan cara mempengaruhi

pergeseran respon imun inang ke arah Th2 yang menguntungkan vektor [5]. Paparan berulang dari saliva vektor malaria *Anopheles stephensi* ternyata dapat membatasi perkembangan pertumbuhan *Plasmodium yoelii* dan menurunkan derajat parasitemia pada hewan coba serta mengubah pergeseran respon imun dari Th2 ke arah Th1 yang bersifat protektif pada inang [3]. Berdasarkan fakta tersebut, pemberian saliva vektor sebagai model vaksin diharapkan mampu membatasi pertumbuhan parasit dengan cara menginduksi respon kekebalan pada inang. Dalam penelitian ini, diamati potensi kelenjar saliva *An.sundaicus* dalam menekan derajat parasitemia mencit perlakuan dan mencit kontrol yang tidak divaksinasi pasca infeksi *Plasmodium berghei* (*P. berghei*).

### Metode Penelitian

#### Isolasi kelenjar saliva *An. sundaicus*

Kelenjar saliva *An.sundaicus* diisolasi dari tubuh nyamuk dengan metode *microdissection* menggunakan *entomological needles* di bawah mikroskop. Setiap 50 pasang kelenjar saliva hasil isolasi dimasukkan dalam tabung eppendorf berisi larutan PBS dan disimpan dalam suhu -20°C hingga siap digunakan.

#### Preparasi Hewan Coba

Empat puluh lima mencit sehat galur BALB/c betina berusia 6-8 minggu diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Sebelum perlakuan mencit diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Jember. Mencit tersebut kemudian dibagi menjadi tiga kelompok dimana masing-masing terdiri dari 15 ekor mencit. Kelompok pertama merupakan kontrol yang diinjeksi adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> dan larutan PBS. Kelompok kedua merupakan kelompok perlakuan pellet yang divaksinasi dengan model vaksin pellet. Kelompok ketiga merupakan kelompok perlakuan supernatan yang divaksinasi dengan model vaksin supernatan.

#### Preparasi model vaksin kelenjar saliva *An. sundaicus* dan vaksinasi

Isolat kelenjar saliva beku dalam suhu -20°C dicairkan dengan metode *freez and thaw* selama 3 menit, dihomogenisasi dengan mikropistil dan disonikasi menggunakan *water sonication* selam 30 menit. Kelenjar saliva selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C hingga didapatkan pellet dan supernatan. Masing-masing pellet dan supernatan ditambah dengan adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> dengan perbandingan volume 1:1 serta berperan sebagai vaksin model pellet dan vaksin model supernatan. Vaksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Setiap mencit divaksinasi 100µl vaksin secara subkutan pada femur bagian luar.

#### Preparasi *P. berghei*

Isolat *P. berghei* diperoleh dari mencit donor melalui proses pasase. Mencit donor dengan derajat parasitemia ≥

15% dibedah di bagian thorax dan dilakukan pengambilan darah secara intrakardial. Setiap mencit diinjeksi campuran isolat *P.berghei* dan *medium plus* sebanyak 200µl secara intraperitoneal 2 minggu pasca vaksinasi ke-3.

#### Penghitungan derajat parasitemia

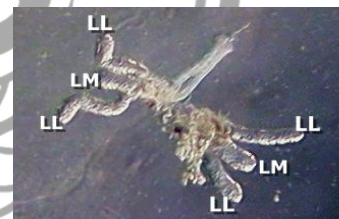
Penghitungan dilakukan 48 jam pasca inokulasi *P.berghei* sampai hari ke-7. Sebelum penghitungan dilakukan pembuatan hapusan darah tepi dari ekor mencit dengan pewarnaan Giemsa. Hapusan selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x menggunakan minyak emersi. Derajat parasitemia dihitung dengan rumus:

$$\text{Derajat Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

### Hasil Penelitian

#### Isolasi kelenjar saliva *An. sundaicus*

Seribu lima ratus pasang kelenjar saliva diisolasi dari nyamuk *Anopheles sundaicus* betina yang didapatkan dari kawasan pantai Kenagarian Sungai Pinang, Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat. *An. sundaicus* memiliki sepasang kelenjar saliva yang terletak di bagian depan thorax dimana masing-masing kelenjar saliva terdiri atas tiga lobus yang terdiri dari 2 lobus lateral dan 1 lobus medial.



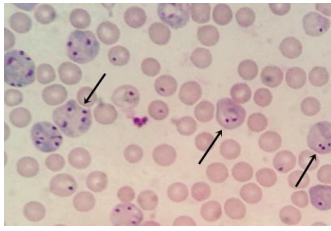
Gambar 1. Morfologi kelenjar saliva *An.sundaicus* hasil isolasi. LL:lobus lateral, LM: lobus medial.

#### Model vaksin kelenjar saliva *An. sundaicus*

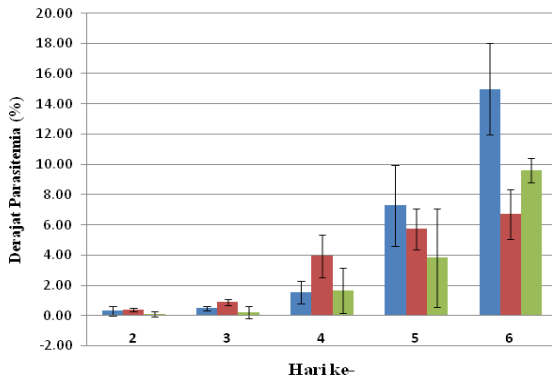
Volume pellet dan supernatan hasil sentrifugasi yang didapatkan masing-masing sebanyak 3000µl. Model vaksin pellet terdiri dari 800µl pellet kelenjar saliva ditambah dengan 800µl adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> untuk setiap kali vaksinasi kelompok perlakuan pellet. Model vaksin supernatan terdiri dari 800µl supernatan kelenjar saliva ditambah dengan 800µl adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> untuk setiap kali vaksinasi kelompok perlakuan supernatan. Kelompok kontrol diinjeksi 800µl larutan PBS ditambah dengan 800µl adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> untuk setiap kali vaksinasi.

#### Derajat Parasitemia

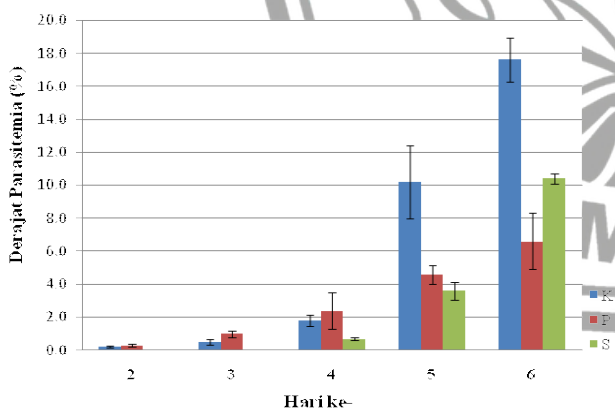
Derajat parasitemia ditentukan dengan menghitung jumlah eritrosit terinfeksi setiap 1000 eritrosit dan dinyatakan dalam persen (%). Eritrosit terinfeksi mengandung *ringform*, memiliki dinding yang lebih elastis serta berukuran lebih besar dibanding eritrosit normal.



Gambar 2. Hapusan darah mencit pasca inokulasi *Plasmodium berghei*. Anak panah menunjukkan eritrosit yang terinfeksi parasit.



Gambar 3. Grafik perkembangan derajat parasitemia (%) pada populasi (n=3) dalam kelompok. K: Kelompok kontrol; P: Kelompok perlakuan pellet; S: Kelompok perlakuan supernatan.



Gambar 4. Grafik perkembangan derajat parasitemia (%) dengan ulangan individu. K: Kelompok kontrol; P: Kelompok perlakuan pellet; S: Kelompok perlakuan supernatan.

### Pembahasan

Isolasi kelenjar saliva dilakukan dengan metode *microdissection* menggunakan *entomological needles* dibawah mikroskop stereo [7]. *Anopheles* betina mempunyai sepasang kelenjar saliva dan masing-masing mempunyai 3 lobus yaitu 2 lobus lateral dan satu lobus medial [9].

Vaksinasi yang dilakukan dalam penelitian ini sebanyak 3 kali dengan interval setiap kali vaksinasi adalah 2 minggu. Vaksinasi I berperan sebagai pemicu awal kemudian diperkuat dengan vaksinasi II dan vaksinasi III (*booster*) untuk memaksimalkan respon imun terhadap antigen dalam vaksin. Pada vaksinasi I tubuh akan membentuk respon imun untuk mengaktifasi sel B dan sel T. Sel B akan bereplikasi membentuk sel memori yang menghasilkan antibodi. Paparan berulang dari antigen vaksin menyebabkan sel memori yang dihasilkan lebih banyak sehingga respon imun humoral yang terbentuk menjadi lebih kuat [1].

Hasil pengamatan derajat parasitemia masing-masing kelompok pada uji populasi (Gambar 2) dan uji validasi (Gambar 3) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan derajat parasitemia antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan pellet dan kelompok perlakuan supernatan. Sampai hari ke-6 kelompok perlakuan (pellet dan supernatan) memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, terutama kelompok perlakuan pellet. Rendahnya derajat parasitemia kelompok perlakuan (pellet dan supernatan) dibanding dengan kelompok kontrol relevan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Donovan *et al.*, (2007). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa mencit yang mendapat paparan saliva berulang dari gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* steril memiliki derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak disensitiasi.

Respon imun utama yang berperan dalam pathogenesis malaria adalah respon kekebalan seluler yang diperantai oleh sel limfosit T [4]. Sel limfosit T terdiri dari sel limfosit T sitotoksik ( $CD8^+$ ) dan sel limfosit T helper ( $CD4^+$ ). Sel limfosit T sitotoksik membunuh parasit dengan melisis eritrosit terinfeksi. Sel T helper terdiri dari dua subset sel yaitu Th1 dan sel Th2. Sel Th1 menghasilkan sitokin  $IFN-\gamma$ , IL-2 dan  $TNF-\alpha$  yang mengaktifkan makrofag, membentuk sitokin pro-inflamasi dan destruksi eritrosit yang terinfeksi. Sel T helper tipe 2 (Th-2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 yang menginduksi pembentukan antibodi serta mampu menghambat fungsi makrofag [14]. Karena saliva vektor bersifat nonpatogenik dan lebih bersifat imunogenik maka sel Th2 lebih berperan aktif daripada sel Th1 sehingga pada paparan pertama saliva nyamuk pada inang menyebabkan perubahan respon imun seluler dari Th1 ke Th2 yang lebih menguntungkan vektor [16]. IL-4 merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2 yang berperan dalam diferensiasi dan proliferasi sel B untuk memproduksi antibodi dan bekerja secara antagonis dengan sitokin sel Th2,  $IFN-\gamma$ . Sitokin tersebut menghambat aktifitas sel Th1 dengan mekanisme regulasi silang. Hal ini menyebabkan mekanisme induksi respon imun seluler oleh sel Th1 dalam mengeliminasi parasit juga berkurang [1]. Paparan berulang saliva nyamuk menyebabkan perubahan respon imun inang dari Th2 ke arah Th1 yang lebih menguntungkan inang dan memberikan respon protektif [3]. Hal ini ditandai dengan pergeseran respon imun ke arah Th1 yang menginduksi sekresi  $IFN-\gamma$  untuk aktivasi sel-sel makrofag. Makrofag yang teraktivasi menghasilkan *Nitric Oxide* sebagai senyawa toksik dan berperan dalam proses



eliminasi parasit. Hal ini ditunjukkan dengan rendahnya derajat parasitemia kelompok perlakuan yang disensitisasi kelenjar saliva *An.sundaicus*. Pada kelompok kontrol tidak diberikan sensitisasi kelenjar saliva *Anopheles sundaicus* sehingga kadar IFN-  $\gamma$  tidak cukup tinggi untuk aktivasi makrofag pasca inokulasi *P.berghei*. Dengan demikian parasit berkembang lebih cepat daripada kelompok perlakuan sehingga derajat parasitemia pada kelompok kontrol cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan.

Pada proses sentrifugasi saat preparasi model vaksin, berbagai macam molekul akan terurai berdasarkan besarnya massa dan tingkat kelarutan. Komponen protein tertentu pada ekstrak kelenjar saliva akan membentuk endapan pellet dan sebagian lagi akan terlarut dalam supernatan [12]. Pada penelitian oleh Rajab (2012) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan pemberian pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* memberikan gambaran derajat parasitemia yang lebih rendah dibanding dengan kelompok perlakuan supernatan dan kelompok kontrol [13]. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Soraya (2012) menunjukkan hasil bahwa pellet kelenjar saliva *Anopheles aconitus* memberikan gambaran derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan supernatan dan kelompok kontrol [15]. Hasil tersebut mengindikasikan keberadaan protein imunomodulator yang diduga bersifat *insoluble* dan terdapat di bagian pellet kelenjar saliva *Anopheles*. Protein ini dapat memicu respon imun protektif pada inang yang ditunjukkan dengan rendahnya derajat parasitemia.

Pada hari ke-7 banyak mencit coba yang mati. Hal ini dimungkinkan karena tingginya daya infektifitas parasit serta respon imun pada-masing-masing mencit dalam proses eliminasi parasit yang tidak sama antara satu dengan lainnya. Oleh karena itu pengamatan dilakukan sampai hari ke-6.

### Kesimpulan dan Saran

Kelompok perlakuan (pellet dan supernatan) memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol yang tidak divaksinasi. Kelompok perlakuan pellet memiliki derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan kedua kelompok lainnya. Dengan demikian protein imunomodulator yang terdapat pada fraksi *insoluble* pellet dan fraksi *soluble* supernatan kelenjar saliva *An. sundaicus* berpotensi sebagai kandidat target dalam pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) melawan malaria.

Keterkaitan vaksin model kelenjar saliva *An. sundaicus* dalam memodulasi respon imun inang terhadap patogenitas malaria perlu diuji lebih lanjut. Lebih jauh lagi perlu dilakukan analisis protein imunomodulator pada fraksi supernatan dan pelet kelenjar saliva *An. sundaicus* untuk menentukan kandidat target dalam pengembangan TBV malaria.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis W. R. A mengucapkan terimakasih kepada Dr. Rer. Nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si., dr. Yunita Armiyanti, M.Kes dan dr. Sugiyanta, M.Ked atas segala masukan, bimbingan, dan bantuan dalam kelangsungan kegiatan penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- [1] Baratawidjaja, K.G dan Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar Edisi Ke-8*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- [2] Dale, Sipe, Anto, Hutajulu, Ndoen, Papayungan, Saikhu, dan Prabowo. 2005. Malaria in Indonesia : A summary of recent research into its environmental relationships. *Southeast Asian J trop Med Public Health*. Vol. 36 (1): 1 – 13.
- [3] Donovan, Messmore, Scafford, Sacks, Kamhawi, dan McDowell. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection with Malaria Parasites. *Infection and Immunity*. Vol. 75 (5): 2523–2530.
- [4] Fitri, Rosyidah, Sari, dan Endarti. 2009. Effect of N-Acetyl Cysteine administration to the degree of parasitemia and plasma interleukin-12 level of mice infected *plasmodium berghei* and treated with artemisinin. *Med J Indones*. Vol.18 (1):5-9.
- [5] Fontaine, Diouf, Bakkali, Misse, Pages, Fussai, Rogier, dan Almeras. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors*. 4 : 187.
- [6] Greenwood, B., dan Mutabingwa, T., 2002. Malaria in 2002. *Nature*. Vol 415.
- [7] Hajirpiloo, Edrissian, Nateghpour, Basseri, Eslami, dan Billingsley. 2005. Effects of Anti-Mosquito Salivary Glands and Deglycosylated Midgut Antibodies of *Anopheles stephensi* on Fecundity and Longevity. *Iranian Journal Public Health*. Vol. 34 (4): 8-14.
- [8] Harijanto, P.N. 2007. Malaria: Buku Ajar Penyakit Dalam Jilid III edisi V. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- [9] Jariyapan, Choochote, Jitpakdi, Harnnoi, Siriyasetin, Wilkinson, Junkum, dan Bates. 2007. Salivary Gland Proteins of Human Malaria Vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*. Vol. 49 (1): 5-10.
- [10] Langhorne, Ndungu, Sponaas dan Marsh. 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*. Vol 9 (7): 725-732.
- [11] Lavazec, Boudin, Lacroix, Bonnet, Diop, Thiberge, Boisson, Tahar, dan Bouorgouin. 2007. Carboxypeptidases of *Anopheles gambiae* as Targets for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*. America. Vol 75 (4): 1635-1642.
- [12] Ngili, Yohanes. 2009. *Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- [13] Rajab, Z. 2012. "Derajat Parasitemia Mencit Galur BALB/c yang Divaksinasi Kelenjar Saliva *Anopheles*

- maculatus* dengan Adjuvan Aluminium Hidroksida”. Tidak diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- [14] Sharma, S. & Pathak, S. Malaria Vaccine: a current perspective. *J Vector Borne Dis.* 45:1-20.
- [15] Soraya, I. 2012. “Derajat Parasitemia Mencit BALB/c Pasca Vaksinasi Kelenjar Saliva *Anopheles aconitus* sebagai Model *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) terhadap Malaria”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- [16] Titus, R.G., Bishop, J. V., dan Mejia, J. S. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for These Factors to Serve as Vaccine Targets to Prevent Pathogen Transmission. *Paracyte Immunology.* Vol 28: 131-141.
- [17] WHO. Malaria Vector Control and Personal Protection. 2007. Report of a WHO Study Group.

