



**DERAJAT PARASITEMIA MENCIT GALUR BALB/c  
YANG DIVAKSINASI DENGAN KELENJAR SALIVA  
Anopheles maculatus DENGAN AJUVAN  
ALUMINIUM HIDROKSIDA**

**SKRIPSI**

Oleh

**Zahirah Rajab  
NIM 092010101069**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2012**



**DERAJAT PARASITEMIA MENCIT GALUR BALB/c  
YANG DIVAKSINASI DENGAN KELENJAR SALIVA  
Anopheles maculatus DENGAN AJUVAN  
ALUMINIUM HIDROKSIDA**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

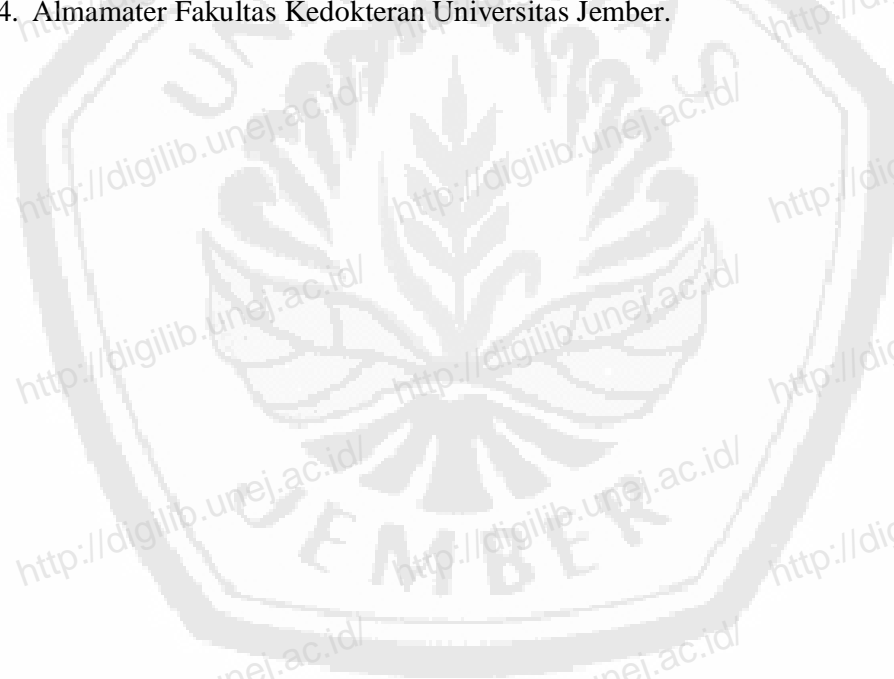
Zahirah Rajab  
NIM 092010101069

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2012**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan kekuatan lahir batin dan kesempatan untuk menuntut ilmu beserta Nabi Muhammad SAW sebagai Rasul-Nya yang selalu menjadi panutan dalam setiap langkah.
2. Ummi Azizah dan Abi Fathi tercinta yang telah memberikan do'a, dukungan, bimbingan, kasih sayang, kerja keras, pengorbanan, dan perjuangan untukku.
3. Guru dan dosen yang telah mendidiku dengan penuh kesabaran sejak dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi.
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



## MOTO

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan,

kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain.

Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.

(Q.S. Alam Nasyrah ayat 5-8)



## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Zahirah Rajab

NIM : 092010101069

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Derajat Parasitemia Mencit Galur Balb/c yang Divaksinasi dengan Kelenjar Saliva Anopheles maculatus dengan Ajuvan Alumunium Hidroksida” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan oleh institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Oktober 2012

Yang menyatakan,

Zahirah Rajab

NIM 092010101069

**SKRIPSI**

**DERAJAT PARASITEMIA MENCIT GALUR BALB/c  
YANG DIVAKSINASI DENGAN KELENJAR SALIVA  
Anopheles maculatus DENGAN AJUVAN  
ALUMUNIUM HIDROKSIDA**



Oleh  
**Zahirah Rajab**  
NIM 092010101069

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama**

**: Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si, M.Si.**

**Dosen Pembimbing Anggota**

**: dr. Dina Helianti, M.Kes.**

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Derajat Parasitemia Mencit Galur Balb/c yang Divaksinasi dengan Kelenjar Saliva Anopheles maculatus dengan Ajuvan Alumunium Hidroksida” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 29 Oktober 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

dr. Yudha Nurdian, M.Kes  
NIP. 19711019 199903 1 001

dr. Sugiyanta, M.Ked  
NIP. 19790207 200501 1 001

Penguji III,

Penguji IV,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si  
NIP. 19750913 200003 2 001

dr. Dina Helianti, M.Kes  
NIP. 19741104 200012 2 001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran,

Dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 19700214 199903 2 001

## RINGKASAN

Derajat Parasitemia Mencit Galur Balb/c yang Divaksinasi dengan Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus* dengan Ajuvan Aluminium Hidroksida; Zahirah Rajab, 092010101069; 2012; 60 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh *Plasmodium* dan ditularkan oleh nyamuk betina *Anopheles*. Malaria menjadi suatu penyakit endemis terutama di Kawasan Timur. Banyak upaya yang dapat dilakukan untuk menanggulangi malaria. Salah satunya adalah dengan pembuatan vaksin. Salah satu vaksin yang banyak dikembangkan saat ini ialah Transmission Blocking Vaccine (TBV) yang dapat mencegah transmisi malaria dari vektor ke manusia. Pendekatan TBV yang sedang dikembangkan saat ini menggunakan saliva vektor malaria sebagai kandidat vaksin. Saliva dari nyamuk *Anopheles* mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator untuk membantu proses blood feeding dan transmisi patogen termasuk *Plasmodium* ke dalam tubuh inang. Faktor vasomodulator berfungsi sebagai antihemostasis dengan menghambat vasokonstriksi, aktivitas agregasi platelet, dan kaskade hemostasis, serta faktor imunomodulator berfungsi untuk menekan respon imun nonspesifik (innate immunity) dan mengubah respon imun spesifik (adaptive immunity) ke arah Th2 sehingga lebih menguntungkan bagi nyamuk untuk melakukan blood feeding. Oleh karena itu, dengan membuat anti terhadap komponen saliva tersebut diharapkan dapat menghambat transmisi *Plasmodium* dan sebagai proteksi terhadap inang.

Hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa paparan berulang dengan menggunakan ekstrak kelenjar saliva *Anopheles* menyebabkan terjadinya pergeseran respon imun inang ke arah Th1. Subset Th1 melalui sekresi IFN- akan meningkatkan imunitas selular dan menghambat pertumbuhan parasit di jaringan. Sehubungan dengan hal tersebut, *Anopheles maculatus* merupakan salah satu vektor potensial di Indonesia dan belum diteliti aktifitas kelenjar salivanya.



Dalam penelitian ini, ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* diujikan sebagai vaksin model ke hewan coba. Untuk meningkatkan respon imun inang, vaksin tersebut ditambah dengan ajuvan aluminium hidroksida. Efek hambatan pertumbuhan parasit oleh ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dengan ajuvan aluminium hidroksida tersebut dapat diketahui dengan mengukur derajat parasitemianya.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c yang dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok supernatan dan pellet. Kelompok kontrol divaksinasi dengan PBS dan ajuvan aluminium hidroksida, kelompok supernatan divaksinasi dengan supernatan dari ekstrak kelenjar saliva dan ajuvan aluminium hidroksida, serta kelompok pellet divaksinasi dengan pellet dari ekstrak kelenjar saliva dan ajuvan aluminium hidroksida. Vaksin tersebut diinjeksikan sebanyak 3 kali yaitu imunisasi I, II, dan III dengan interval 2 minggu. Kemudian 2 minggu setelah imunisasi III dilakukan infeksi *Plasmodium berghei* dan dilanjutkan dengan penghitungan derajat parasitemia pada hari ke-2 sampai ke-10.

Hasil penghitungan derajat parasitemia menunjukkan bahwa derajat parasitemia kelompok supernatan lebih rendah daripada kelompok kontrol. Derajat parasitemia kelompok pellet lebih rendah daripada kelompok kontrol dan supernatan. Dengan demikian, protein imunomodulator yang diduga terdapat pada saliva vektor kemungkinan terdapat pada protein insoluble dari pellet ekstrak kelenjar saliva. Hal ini ditunjukkan dengan derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah pada kelompok pellet yang mengindikasikan adanya suatu rangsangan imun pada inang sehingga dapat memberikan proteksi terhadap patogen. Dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa kelenjar saliva mempunyai potensi untuk digunakan sebagai kandidat vaksin.

## PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Derajat Parasitemia Mencit Galur Balb/c yang Divaksinasi dengan Kelenjar Saliva Anopheles maculatus dengan Ajuvan Aluminium Hidroksida”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Dina Helianti M.Kes. selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran, dan perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini.
3. Dr. Yunita Armiyanti, M.Kes yang sudah memberikan kesempatan untuk masuk ke dalam kelompok “TBV Research Group” dan juga telah banyak membantu, meluangkan waktu, pikiran, dan perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini.
4. Dr. Yudha Nurdian M.Kes dan dr. Sugiyanta, M.Kes selaku dosen penguji atas kesediaannya untuk turut memberikan saran dan penilaian terhadap hasil penelitian ini.
5. Kepala Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember beserta staf atas bantuan dan kerjasamanya.
6. Ummi dan Abi, serta adik-adikku yang selalu berdo'a untuk kesuksesan dan keberhasilanku.

7. Teman-teman “Malaria Group” Mas Imam dan Mbak Ika atas kebaikan dan bantuan yang kalian berikan.
8. Sahabat-sahabatku Wulan, Dini, Elys, Dani, Kiki, Dija, Harmas, Apen, serta “the turtle” atas kerjasama, kebaikan, dan bantuan yang kalian berikan.
9. Rekan-rekan angkatan 2009 “Avicenna” semuanya atas kebaikan dan bantuan yang kalian berikan selama ini.
10. Dan akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini dan telah mendo’akan demi kesuksesan ujian skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat-Nya dan hanya Allah jualah yang dapat membalas semua kebbaikannya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima segala kritik dan saran dari pembaca sekalian. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Jember, Oktober 2012

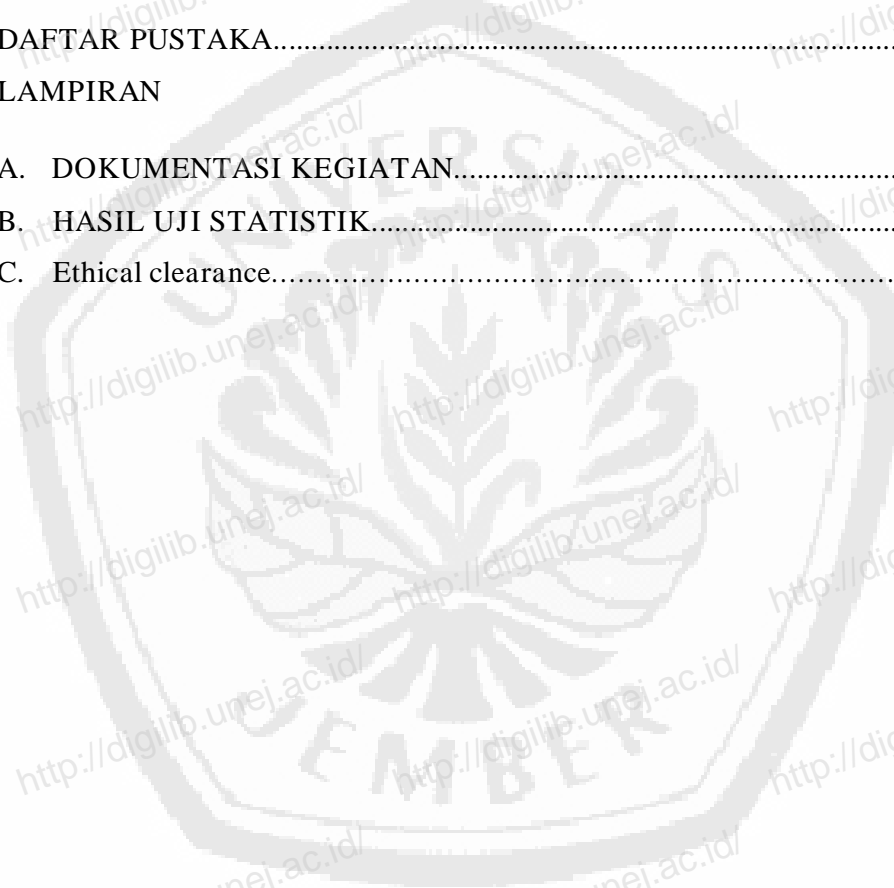
Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
BAB 1. Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitan.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Malaria.....	5
2.1.1 Definisi.....	5
2.1.2 Etiologi.....	5
2.1.3 Siklus Hidup Parasit Malaria.....	5
2.1.4 Patogenesis dan Manifestasi Klinis.....	8
2.1.5 Diagnosis Malaria.....	11
2.1.6 Penatalaksanaan.....	12
2.1.7 Pencegahan dan Vaksin Malaria.....	13
2.2 Vektor Anopheles maculatus.....	15
2.2.1 Siklus Hidup dan Morfologi.....	15
2.2.2 Bionomik (Aspek Perilaku) Nyamuk.....	19

2.3 Transmission Blocking Vaccines sebagai Penanggulangan Malaria.....	20
2.3.1 Definisi dan Perkembangan TBV.....	20
2.3.2 Peran Saliva Vektor dalam Transmisi Patogen.....	21
2.3.3 TBV berbasis Saliva Vektor.....	25
2.4 Ajuvan Aluminium Hidroksida.....	26
2.5 Kerangka Konseptual.....	27
2.6 Hipotesis Penelitian.....	28
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	29
3.4 Definisi Operasional.....	30
3.5 Rancangan Penelitian.....	32
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	33
3.6.1 Alat Penelitian.....	33
3.6.2 Bahan Penelitian.....	33
3.7 Prosedur Penelitian.....	33
3.7.1 Isolasi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus.....	33
3.7.2 Preparasi Vaksin.....	34
3.7.3 Vaksinasi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus.....	34
3.7.4 Infeksi Hewan Coba dengan Plasmodium berghei.....	35
3.7.5 Pembuatan Preparat Hapusan Darah Tipis.....	36
3.7.6 Penghitungan Derajat Parasitemia.....	36
3.8 Alur Penelitian.....	37
3.9 Penyajian Data.....	38
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>39</b>
4.1 Hasil Penelitian.....	39
4.1.1 Hasil Isolasi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus.....	39
4.1.2 Hasil Preparasi Vaksin dan Vaksinasi.....	39
4.1.3 Hasil Penghitungan Derajat Parasitemia.....	40
4.1.4 Hasil Uji Statistik.....	42

4.2 Pembahasan.....	43
4.2.1 Isolasi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus.....	43
4.2.2 Preparasi Vaksin dan Vaksinasi.....	44
4.2.3 Pengamatan Derajat Parasitemia.....	46
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>50</b>
5.1 Kesimpulan.....	50
5.2 Saran.....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>51</b>
<b>LAMPIRAN</b>	
A. DOKUMENTASI KEGIATAN.....	55
B. HASIL UJI STATISTIK.....	56
C. Ethical clearance.....	57



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup Plasmodium.....;;.....	8
2.2 Target vaksin malaria.....	14
2.3 Telur nyamuk Anopheles.....	16
2.4 Larva nyamuk Anopheles.....;;.....	16
2.5 Kepompong nyamuk Anopheles.....	17
2.6 Nyamuk Anopheles dewasa.....	18
2.7 Kelenjar saaliva Anopheles sp.....	19
2.8 Transmission Blocking Vaccine.....	21
2.9 Skema peran protein pada saliva vektor (arthropoda) dalam memodulasi respon hemostasis dalam tubuh inang.....	23
2.10 Skema peran protein pada saliva vektor (arthropoda) dalam memodulasi respon imun innate dan adaptive pada inang.....	24
4.1 Kelenjar saliva Anopheles maculatus.....	39
4.2 Hapusan darah mencit pasca inokulasi.....	40
4.2 Grafik persentase derajat parasitemia mencit pada ulangan populasi yang didapat pasca vaksinasi.....	41
4.3 Grafik persentase derajat parasitemia mencit pada ulangan individu yang didapat pasca vaksinasi.....	41

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

World Health Organization (WHO) memperkirakan 3,3 milyar orang di dunia memiliki risiko terjangkit malaria. The World Malaria Report 2011 menyatakan bahwa terdapat 216 juta kasus malaria dan 655.000 diantaranya meninggal pada tahun 2010. Sebagian besar dari jumlah kasus yang meninggal ialah anak-anak usia dibawah 5 tahun (WHO, 2011).

Indonesia adalah negara berkembang pada wilayah Asia Tenggara yang endemis malaria. Daerah endemis malaria di Indonesia antara lain kawasan Timur, mulai dari Kalimantan, Sulawesi Tengah, Maluku, Irian Jaya, dan NTT (Harijanto, 2007). Pada tahun 2008, terdapat 1,62 juta kasus malaria klinis dan pada tahun 2009 menjadi 1,14 juta kasus. Jumlah penderita positif malaria (hasil pemeriksaan mikroskop terdapat patogen malaria) pada tahun 2008 terdapat 266 kasus dan masih 199 ribu kasus pada tahun 2009. Walaupun mengalami penurunan jumlah kasus, angka tersebut masih cukup tinggi sehingga malaria termasuk ke dalam daftar penyakit yang perlu diupayakan pemberantasannya dalam MDGs (Millenium Development Goals) (Kemenkes RI, 2011).

Malaria adalah salah satu penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh Plasmodium dan ditularkan oleh nyamuk betina Anopheles (Prianto, 2006). Anopheles maculatus merupakan salah satu dari 24 jenis Anopheles yang berpotensi sebagai vektor malaria di Indonesia (Dale et al., 2005; Depkes RI, 2008). Anopheles maculatus dikenal sebagai vektor utama malaria di Pulau Jawa dan Sumatera (Harmendo, 2008). Spesies ini sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena mudah dikembangbiakkan pada suhu dan kondisi yang telah dimodifikasi di laboratotium (Barodji et al., 2002).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi malaria, yaitu meliputi pengobatan dengan obat antimalaria (Artemisin Combination Therapies/ACTs, klorokuin, dan primakuin) dan pengendalian vektor yang meliputi penggunaan kelambu tempat tidur serta insektisida (Depkes RI, 2008). Upaya-upaya tersebut mengalami berbagai kendala, seperti terjadi resistensi



parasit malaria terhadap obat malaria yang tersedia maupun resistensi nyamuk *Anopheles* terhadap insektisida. Resistensi *Plasmodium* terjadi karena rendahnya kepatuhan terhadap pengobatan malaria atau pengobatan yang tidak adekuat (Depkes RI, 2008). Oleh karena itu, perlu dikembangkan strategi baru dalam pengendalian malaria diantaranya dengan pengembangan vaksin. Vaksin malaria yang telah dikembangkan saat ini ada bermacam-macam berdasarkan siklus hidup *Plasmodium* yang kompleks dan respon imun alami yang berbeda-beda pada setiap stadium dari siklus hidup tersebut. Pada prinsipnya terdapat tiga macam vaksin yang dikembangkan terhadap tiga stadium perkembangan parasit yang berbeda, yaitu vaksin terhadap stadium preeritrositik, vaksin terhadap stadium eritrositik (stadium aseksual) dan vaksin terhadap stadium seksual. Jenis vaksin yang terakhir disebut juga Transmission Blocking Vaccine (TBV) yang menginduksi antibodi dalam tubuh manusia dan antibodi tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit di dalam midgut nyamuk, sehingga terjadi penghambatan transmisi malaria dari nyamuk ke manusia (Moorthy et al., 2004).

Salah satu pendekatan TBV yang sedang dikembangkan saat ini menggunakan saliva vektor malaria sebagai kandidat target. Saliva dari nyamuk *Anopheles* mengandung faktor vasomodulator dan imunomodulator (Titus et al., 2006). Faktor vasomodulator berfungsi sebagai antihemostasis dengan melawan vasokonstriktor, menghambat aktifitas agregasi platelet, dan menghambat kaskade hemostasis sehingga memudahkan masuknya darah inang ke tubuh nyamuk (Bilingsley, 2006). Faktor imunomodulator berfungsi untuk menekan respon imun nonspesifik (innate immunity) dan mengubah respon imun spesifik (adaptive immunity) ke arah  $Th_2$  sehingga lebih menguntungkan bagi nyamuk untuk melakukan blood feeding. Keadaan tersebut dimanfaatkan oleh patogen termasuk *Plasmodium*, untuk masuk ke dalam tubuh inang karena tidak adanya perlawanan yang efektif dari respon imun inang. Oleh karena itu dengan membuat anti terhadap komponen saliva tersebut diharapkan dapat menghambat transmisi *Plasmodium* dan sebagai proteksi terhadap inang (Fontaine et al., 2011). Hal ini didukung penelitian penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa gigitan nyamuk *Anopheles* yang tidak terinfeksi secara berulang pada mencit

mempengaruhi sistem imun lokal dan sistemik melalui peningkatan subset Th<sub>1</sub> (Donovan et al., 2007). Subset Th<sub>1</sub> melalui sekresi IFN- $\gamma$  akan meningkatkan imunitas selular yang dilakukan oleh makrofag, monosit, dan leukosit. Fagosit-fagosit ini akan menghasilkan radikal bebas seperti nitrit oksid (NO), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dan OH $\cdot$ . Pada paparan berikutnya dengan vektor yang infeksius, senyawa-senyawa tersebut akan menghambat pertumbuhan parasit melalui stress oksidatif (Hariyanto, 2000). Hambatan terhadap pertumbuhan parasit diketahui berdasarkan pengukuran derajat parasitemia yang lebih rendah pada kelompok perlakuan (Donovan et al., 2007).

Respon imun inang terhadap suatu vaksin dapat ditingkatkan dengan penambahan adjuvan. Salah satu adjuvan yang aman bagi manusia adalah aluminium hidroksida (Abbas dan Litchman, 2005). Kelebihan dari aluminium hidroksida ialah pada aktivitasnya sebagai pemicu respon imun nonspesifik (innate immunity) (Coffman et al., 2010). Dalam penelitian ini, akan diteliti aktivitas ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dengan adjuvan aluminium hidroksida terhadap pertumbuhan parasit malaria *Plasmodium berghei* pada hewan coba sebagai model pengembangan TBV melawan malaria.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana gambaran derajat parasitemia mencit galur BALB/c yang divaksinasi dengan vaksin model ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dan adjuvan aluminium hidroksida?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* sebagai target dalam pengembangan Transmission Blocking Vaccine (TBV) melawan malaria.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

- a. Membandingkan derajat parasitemia pada hapusan darah mencit BALB/c yang divaksinasi dengan vaksin model kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dengan ajuvan aluminium hidroksida pada sediaan pellet dan supernatan dengan mencit BALB/c kontrol.
- b. Mengukur derajat parasitemia pada hapusan darah mencit BALB/c yang divaksinasi dengan vaksin model kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dengan ajuvan aluminium hidroksida sediaan pellet dan supernatan.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini antara lain:

- a. Penelitian ini dapat memberikan informasi baru mengenai potensi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dalam mempengaruhi respon imun inang melalui pengukuran derajat parasitemia. Hal ini dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut, khususnya dibidang imunologi dan parasitologi, untuk melakukan isolasi komponen imunomodulator saliva *Anopheles maculatus* yang sampai saat ini belum ditemukan.
- b. Penelitian ini bermanfaat sebagai pengembangan bidang parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Dengan diketahuinya hasil derajat parasitemia ini, diharapkan membawa era baru penanggulangan malaria dengan Transmission Blocking Vaccine berbasis saliva vektor.
- c. Memberikan informasi tentang langkah awal dalam perkembangan pembuatan vaksin malaria yang akan memberikan harapan baru bagi penanggulangan malaria di Indonesia.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Malaria

#### 2.1.1 Definisi

Malaria adalah penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh Plasmodium yang menyerang eritrosit dan ditandai dengan ditemukannya bentuk aseksual di dalam darah (Harijanto, 2007). Penularan penyakit ini melalui gigitan nyamuk Anopheles betina (Fauci et al., 2008).

#### 2.1.2 Etiologi

Penyebab infeksi malaria adalah genus Plasmodium. Genus Plasmodium termasuk dalam phylum Apicomplexa, kelas Sporozoa, subkelas Coccidiiida, ordo Eucoccidides, sub-ordo Haemosporidiiida, famili Plasmodiidae. Plasmodium selain menginfeksi manusia, juga menginfeksi binatang seperti golongan burung, reptil, dan mamalia (Harijanto, 2007).

Spesies dari genus Plasmodium yang menginfeksi manusia ada 5, yaitu Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, dan Plasmodium knowlesi. Kasus malaria yang paling sering dijumpai adalah Plasmodium vivax yang menyebabkan malaria tertiana (Benign malaria) dan Plasmodium falciparum yang menyebabkan malaria tropika (Maligna malaria), sedangkan kasus malaria oleh Plasmodium malariae dan Plasmodium ovale jarang terjadi (Fauci et al., 2008). Penelitian terbaru di wilayah Asia Tenggara menambahkan Plasmodium knowlesi sebagai etiologi malaria. Plasmodium knowlesi merupakan parasit malaria yang inang alaminya ialah kera jenis macacau. Spesies jenis ini dapat menginfeksi manusia karena adanya interaksi dengan inang reservoirnya (Sabbatani et al., 2010).

#### 2.1.3 Siklus Hidup Parasit Malaria

Siklus hidup parasit malaria mengalami stadium-stadium yang berpindah dari vektor nyamuk ke manusia dan kembali ke nyamuk lagi. Siklus tersebut meliputi siklus seksual (sporogoni) pada nyamuk Anopheles dan siklus aseksual

pada manusia yang terdiri dari fase eritrosit (erythrocytic schizogony) dan fase yang berlangsung di dalam sel hepar (exo-erythrocytic schizogony) (Harijanto, 2007).

a. Stadium hati (exo-erythrocytic schizogony)

Stadium ini dimulai ketika nyamuk *Anopheles betina* menggigit manusia dan memasukkan sporozoit yang terdapat pada salivanya ke dalam darah manusia sewaktu menghisap darah (Harijanto, 2007). Melalui aliran darah inilah sporozoit akan menuju hati selama 30 menit sampai 1 jam (Latief et al., 2005). Di dalam sel parenkim hati, mulailah perkembangan aseksual (intrahepatic schizogony). Perkembangan ini memerlukan waktu 5,5 hari untuk *Plasmodium falciparum* dan 15 hari untuk *Plasmodium malariae* (Harijanto, 2007).

Sporozoit selanjutnya akan mengalami pembelahan sel untuk menjadi skizon muda sampai skizon matang (matur) (Harijanto, 2007; Latief et al., 2005). Skizon yang pecah akan mengeluarkan banyak merozoit ke sirkulasi darah. Pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale*, sebagian parasit di dalam sel hati membentuk hipnozoit yaitu sporozoit yang tidak mengalami perkembangan lanjut pada proses skizogoni. Hipnozoit akan tetap laten selama 8-9 bulan sebelum berkembang menjadi skizont jaringan (Harijanto, 2007).

b. Stadium darah

Siklus di darah dimulai dengan keluarnya merozoit dari skizont matang di hati ke dalam sirkulasi. Sebagian merozoit masuk ke dalam eritrosit untuk memulai siklus eritrosit, yaitu merozoit, trophozoit muda (bentuk cincin), trophozoit tua, skizont. Skizont yang telah matur akan pecah dan mengeluarkan merozoit yang selanjutnya akan memasuki eritrosit baru. Sebagian merozoit yang lain memulai dengan gametogoni membentuk mikro dan makrogametosit (Latief et al., 2005).

Parasit menginvasi eritrosit melalui 4 tahap yaitu: perlekatan merozoit dengan eritrosit, perubahan bentuk mendadak eritrosit terinfeksi, invaginasi membran eritrosit dimana parasit melekat disertai pembentukan kantong merozoit, dan terakhir pembentukan kembali membran eritrosit di sekeliling parasit. Keseluruhan proses berlangsung dalam 30 detik. Reseptor pada eritrosit yang

diperlukan untuk perlekatan parasit dengan membran eritrosit berbeda-beda pada masing-masing spesies. Plasmodium vivax memiliki antigen Duffy yaitu suatu reseptor untuk kemokin pada permukaan eritrosit, sedangkan Plasmodium falciparum menggunakan glycophorin A untuk tujuan yang sama (Harijanto, 2007).

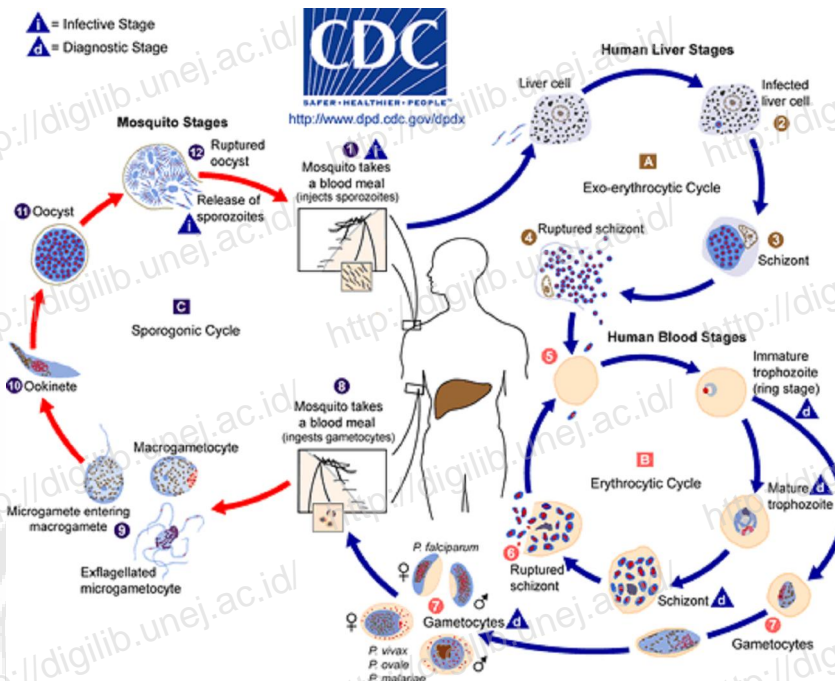
Setelah masuk ke dalam eritrosit, bentuk merozoit menjadi bulat dan semua organelnya hilang. Parasit berada dalam membran vakuola parasitophorous dan tampak berbentuk cincin. Parasit terus tumbuh membesar dan bergerak secara amoeboid. Setelah 12-24 jam gerakan melambat, vakuola menghilang dan tampak pigmen hematin yang merupakan sisa penguraian Hb dari eritrosit pada sitoplasma. Parasit kemudian berbentuk sebagai sel tunggal dinamakan trophozoit. Selanjutnya terjadi proses skizogoni dengan pembentukan beberapa merozoit (Harijanto, 2007).

Beberapa merozoit berdiferensiasi menjadi bentuk seksual parasit yaitu gametosit. Ada 2 jenis gametosit yaitu makrogametosit (betina) dan mikrogametosit (jantan). Gametosit akan tertelan bersama darah yang dihisap nyamuk yang menggigit penderita (Harijanto, 2007).

#### c. Stadium nyamuk (sporogoni)

Parasit berkembang secara seksual (sporogoni) dalam tubuh nyamuk. Mikro dan makrogametosit berkembang menjadi mikro dan makrogamet di dalam lambung nyamuk. Mikro dan makrogamet akan membentuk zigot yang disebut ookinet. Selanjutnya ookinet akan menembus dinding lambung nyamuk membentuk ookista yang membentuk banyak sporozoit. Sporozoit akan dilepaskan dan masuk ke dalam kelenjar saliva nyamuk. Siklus tersebut disebut masa tunas ekstrinsik (Harijanto, 2007; Latief et al., 2005).

Siklus hidup Plasmodium adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Siklus hidup Plasmodium (sumber: DEPKES RI, 2008)

#### 2.1.4 Patogenesis dan Manifestasi Klinis

Patogenesis malaria dipengaruhi oleh faktor parasit dan faktor penjamu (host). Yang termasuk dalam faktor parasit adalah intensitas transmisi, densitas parasit, dan virulensi parasit. Sedangkan yang masuk dalam faktor penjamu adalah tingkat endemisitas daerah tempat tinggal, genetik, usia, status nutrisi dan status imunologi (Harijanto, 2007).

Manifestasi umum infeksi malaria meliputi tiga gejala utama, yaitu demam anemia, dan splenomegali. Munculnya gejala-gejala tersebut terkait dengan siklus eritrositik plasmodium di dalam tubuh manusia. Demam pada malaria diperantarai oleh pirogen endogen yang dilepaskan oleh monosit dan makrofag sebagai respon terhadap rupturnya skizon. Pirogen endogen tersebut meliputi TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6 yang bekerja langsung pada hipotalamus untuk mengubah titik set termoregulator (Fauci et al., 2008).

Ciri khas periode demam pada malaria yang membedakan dengan demam akibat penyakit infeksi lain ialah demam pada malaria didahului oleh periode dingin dan diakhiri dengan periode berkeringat. Pola demam yang meliputi periode dingin, periode panas, dan periode berkeringat disebut “Trias Malaria” (malaria paroxysm) (Harijanto, 2010).

a. Periode dingin

Mulai menggigil, kulit dingin dan kering, penderita sering membungkus diri dengan selimut atau sarung dan saat menggigil seluruh tubuh sering bergetar dan gigi-gigi sering terantuk, pucat sampai sianosis seperti orang kedinginan. Periode ini berlangsung 15 menit sampai 1 jam diikuti dengan meningkatnya temperatur.

b. Periode panas

Muka merah, kulit panas dan kering, nadi cepat dan panas tubuh tetap tinggi, dapat sampai  $40^{\circ}\text{C}$  atau lebih, penderita membuka selimutnya, respirasi meningkat, nyeri kepala, nyeri retro-orbital, muntah-muntah, dapat terjadi syok (tekanan darah turun), dapat delirium sampai terjadi kejang (anak). Periode ini lebih lama dari fase dingin, dapat sampai 2 jam atau lebih, diikuti dengan keadaan berkeringat.

c. Periode berkeringat

Penderita berkeringat, mulai dari temporal, diikuti seluruh tubuh, sampai basah, temperatur turun, penderita merasa kelelahan dan sering tertidur. Jika penderita bangun akan merasa sehat dan dapat melakukan pekerjaan biasa.

Keadaan anemia merupakan gejala yang sering dijumpai pada infeksi malaria. Anemia lebih sering dijumpai pada penderita di daerah endemik, anak-anak, dan ibu hamil. Beberapa mekanisme terjadinya anemia adalah:

- a. Pengrusakan eritrosit oleh parasit.
- b. Hambatan eritropoiesis yang sementara.
- c. Hemolisis karena proses complement mediated immune complex.
- d. Eritrofagositosis.
- e. Penghambatan pengeluaran retikulosit (Harijanto, 2010).



Pembesaran limpa biasanya teraba tiga hari setelah serangan infeksi akut. Limpa merupakan organ yang penting untuk pertahanan tubuh melawan infeksi malaria. Limpa mengeliminasi eritrosit yang terinfeksi melalui mekanisme imun dan pengenalan perubahan deformabilitas. Eritrosit yang terinfeksi memiliki bentuk yang berbeda dari normalnya, sehingga ketika melewati limpa akan dihancurkan oleh sel-sel makrofag dan limfosit. Pada gambaran jaringannya didapatkan eritrosit terinfeksi melekat pada makrofag melalui knob permukaan karena terjadi fagositosis aktif. Adanya retensi eritrosit terinfeksi, peningkatan fagositosis oleh mononuklear limpa, dan lisis yang dimediasi complement-fixing malaria antigen-antibodi, menyebabkan hipertrofi RES (Reticuloendothelial System) dan berkontribusi terhadap terjadinya splenomegali (Buffet et al., 2011).

Malaria berat akibat *Plasmodium falciparum* mempunyai patogenesis yang khusus dan dapat memicu timbulnya komplikasi. Hal ini terjadi karena eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* akan mengalami sitoadherensi, sekuestrasi, dan rosetting. Sitoadherensi ialah perlekatan antara EP (eritrosit yang mengandung parasit) stadium matur pada permukaan endotel vaskular. Pada permukaan EP akan timbul tonjolan-tonjolan yang disebut knob. Pada knob tersebut terdapat protein yang berperan penting pada sitoadheren yakni PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1). Protein ini akan berikatan dengan berbagai molekul adhesi pada permukaan endotel pembuluh darah sebagai reseptornya. Sitoadheren menyebabkan EP matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. Parasit dalam eritrosit matur yang tinggal dalam jaringan mikrovaskular disebut EP matur yang mengalami sekuestrasi. Kelompok EP matur yang mengalami sekuestrasi diselubungi oleh 10 atau lebih eritrosit nonparasit, proses ini disebut rosetting (Fauci et al., 2008).

Ketiga proses di atas berperan dalam terjadinya obstruksi aliran darah kapiler dalam jaringan (Harijanto, 2007). Penyumbatan aliran darah menyebabkan anoksia, asidosis laktat, dan kebocoran kapiler. Sumbatan tersebut dapat terlepas dari dinding kapiler, mengikuti aliran darah, dan menempel pada endotel pembuluh darah organ-organ vital seperti otak, hati, dan ginjal. Dengan demikian

jelasan bahwa *Plasmodium falciparum* dapat menimbulkan komplikasi berat pada malaria (Davey, 2006)

### 2.1.5 Diagnosis Malaria

Diagnosis malaria yang cepat dan tepat merupakan hal yang sangat diperlukan dalam penatalaksanaan kasus malaria. Diagnosis malaria sering memerlukan anamnesis yang tepat dari penderita tentang keluhan utama yang dialami, asal penderita apakah dari daerah endemis malaria, riwayat pengobatan kuratif maupun preventif. Setelah penderita dicurigai secara klinis menderita malaria, pemeriksaan laboratorium untuk menemukan parasit harus secepatnya dilakukan. Berbagai cara dapat dilakukan dari pemeriksaan konvensional dengan mikroskop cahaya untuk mengevaluasi sediaan darah (pemeriksaan baku emas) sampai berbagai pemeriksaan yang lebih modern dengan menggunakan mikroskop fluoresensi, flow cytometri, automated blood cell analyser, pemeriksaan serologi, berbagai metode molekular maupun dengan laser desorption mass spectrometry (Fauci et al., 2008).

Beberapa pemeriksaan darah secara mikroskopik yang dapat dilakukan untuk menegakkan diagnosis adalah sebagai berikut:

#### a. Tetesan Darah Tebal

Merupakan cara terbaik untuk menemukan parasit malaria karena tetesan darah cukup banyak dibandingkan preparat darah tipis. Ketebalan dalam membuat sediaan perlu untuk memudahkan identifikasi parasit (Fauci et al., 2008). Pemeriksaan parasit dilakukan selama 5 menit (diperlukan 100 lapang pandangan dengan pembesaran kuat). Preparat dinyatakan negatif bila setelah diperiksa 200 lapang pandangan dengan pembesaran kuat 700-1000 kali tidak ditemukan parasit. Hitung parasit dapat dilakukan pada tetes tebal dengan menghitung jumlah parasit per 200 leukosit. bila leukosit 10.000/ $\mu$ l maka hitung parasitnya ialah jumlah parasit dikalikan 50 merupakan jumlah parasit per mikroliter darah (Harijanto, 2007).

#### b. Tetesan Darah Tipis

Digunakan untuk identifikasi jenis Plasmodium bila dengan preparat darah tebal sulit ditentukan. Kepadatan parasit dinyatakan sebagai hitung parasit (parasit count), dapat dilakukan berdasar jumlah eritrosit yang mengandung parasit per 1000 sel darah merah. Bila jumlah parasit lebih dari 100.000/ $\mu$ l darah menandakan infeksi yang berat. Hitung parasit penting untuk menentukan prognosis penderita malaria, walaupun komplikasi juga dapat timbul dengan jumlah parasit yang minimal. Pengecatan bisa dilakukan dengan cat Giemsa, Leishman's, Field's, atau Romanowsky. Pengecatan Giemsa yang umum dipakai pada beberapa laboratorium dan merupakan pengecatan yang mudah dengan hasil yang cukup baik (Fauci et al., 2008).

#### 2.1.6 Penatalaksanaan

Pengobatan yang diberikan adalah pengobatan radikal malaria dengan membunuh semua stadium parasit yang ada di dalam tubuh manusia. Adapun tujuan pengobatan radikal untuk mendapat kesembuhan klinis dan parasitologi serta memutuskan rantai penularan (Depkes RI, 2008).

Pengobatan malaria menjadi penting karena selain harus dilakukan dengan cepat, pemilihan obat berhubungan dengan masalah resistensi dan penurunan tingkat morbiditas dan mortalitas. Pengobatan dengan derivat artemisinin saat ini menjadi terapi pilihan yang disarankan oleh WHO. Studi tentang efektifitas penggunaan derivat artemisinin dibandingkan dengan penggunaan kina dalam mengatasi malaria dengan komplikasi telah dilakukan di Rumah Sakit Umum Bethesda Serukam, Kalimantan Barat. Dari hasil studi tersebut dapat disimpulkan bahwa efektifitas penggunaan derivat artemisinin terbukti dalam hal menurunkan lama demam, lama perawatan, dan tingkat mortalitas (Darnindro, 2010).

Pengobatan malaria secara umum dibagi menjadi lini pertama dan lini kedua. Lini pertama pengobatan malaria adalah Artemisinin Combination Therapy (ACT). Pilihan obat yang dianjurkan pada lini pertama ialah artesunat, amodiakuin, dan primakuin. Sedangkan pilihan obat yang dianjurkan pada lini kedua ialah kina, doksisisiklin, dan primakuin. Pengobatan lini kedua malaria

diberikan jika pengobatan lini pertama tidak efektif yaitu ditemukan gejala klinis tidak memburuk tetapi parasit aseksual tidak berkurang (persisten) atau timbul kembali (rekrudesensi) (Depkes RI, 2008).

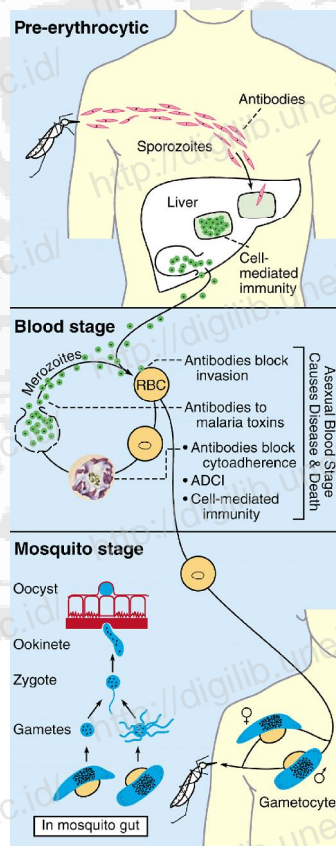
#### 2.1.7 Pencegahan dan Vaksin Malaria

Pencegahan malaria secara umum meliputi tiga hal, yaitu edukasi, kemoprofilaksis, dan upaya menghindari gigitan nyamuk. Edukasi adalah faktor terpenting pencegahan malaria yang harus diberikan kepada setiap pelancong atau petugas yang akan bekerja di daerah endemis. Materi utama edukasi adalah mengajarkan tentang cara penularan malaria, risiko terkena malaria, gejala dan tanda malaria, serta pencegahan malaria dengan kemoprofilaksis. Sebagian besar kasus malaria impor terjadi karena pasien tidak mendapat informasi yang akurat dan lengkap tentang malaria sehingga tidak menyadari akan risiko terkena malaria di daerah yang dikunjunginya (Harijanto, 2010).

Konsumsi obat kemoprofilaksis perlu ditambahkan untuk mengurangi risiko jatuh sakit jika telah tergigit nyamuk infeksius. Beberapa obat antimalaria yang saat ini digunakan sebagai obat kemoprofilaksis adalah klorokuin, doksisisiklin, dan primakuin. Sebagian besar regimen kemoprofilaksis dapat memberi perlindungan sebesar 75-95% jika digunakan dengan benar, namun perlu ditekankan bahwa tidak ada regimen kemoprofilaksis yang 100% efektif. Tingkat efektifitas kemoprofilaksis sangat ditentukan oleh tingkat resistensi Plasmodium setempat terhadap obat antimalaria dan kepatuhan penggunaannya (Harijanto, 2010).

Vaksin malaria yang berkembang saat ini bermacam-macam. Hal ini disebabkan siklus hidup Plasmodium yang kompleks dan adanya perbedaan serta variasi antigen pada setiap stadium. Vaksin malaria dibedakan berdasarkan stadium dalam siklus hidup Plasmodium yang terdiri dari stadium pre-eritrositik (liver stage), stadium aseksual atau eritrositik di dalam darah (blood stage), dan vaksin stadium seksual di dalam tubuh nyamuk (mosquito stage) (Moorthy et al., 2004; Sharma dan Pathak, 2008). Pada prinsipnya, vaksin tersebut dirancang untuk dapat meningkatkan respon imun inang terhadap patogen (Moorthy et al., 2004).

Setiap vaksin memiliki mekanisme cara kerja yang berbeda berkenaan dengan tujuannya untuk meningkatkan respon imun inang. Penggunaan vaksin malaria pada stadium pre-eritrositik bertujuan untuk mencegah masuknya sporozoit ke dalam hati dan menginduksi sel limfosit T sitotoksik untuk membunuh sel hepatosit yang terinfeksi (WHO, 2000; Moorthy et al., 2004). Vaksin stadium eritrosit dirancang untuk dapat mencegah invasi merozoit ke dalam eritrosit dan menghambat perkembangan Plasmodium di dalam eritrosit (Moorthy et al., 2004). Vaksin stadium nyamuk mencegah transmisi malaria dengan menginduksi antibodi yang melawan antigen pada stadium seksual parasit dalam tubuh nyamuk (midgut) (Sharma dan Pathak., 2008). Secara umum, mekanisme kerja vaksin tersebut dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Target vaksin malaria (Sumber: WHO, 2000)

## 2.2 Vektor *Anopheles maculatus*

Beragam spesies dari nyamuk *Anopheles* tersebar di berbagai daerah sebagai vektor penyakit malaria. *Anopheles* dapat disebut vektor malaria disuatu daerah apabila spesies *Anopheles* tersebut di daerah yang bersangkutan telah pernah terbukti positif mengandung sporozoit di dalam kelenjar ludahnya. Berdasarkan survey unit kerja SPP (Serangga Penular Penyakit) telah ditemukan ada 46 spesies nyamuk *Anopheles* yang tersebar di seluruh Indonesia. Dari spesies-spesies nyamuk tersebut ternyata ada 20 spesies nyamuk *Anopheles* yang berperan sebagai vektor penyakit malaria, salah satu diantaranya *Anopheles maculatus* (Hiswani, 2004).

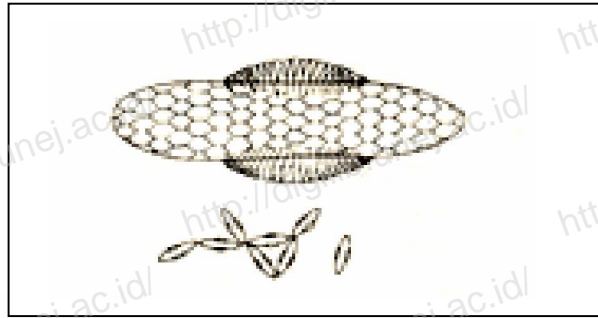
Nyamuk *Anopheles maculatus* termasuk dalam Filum Arthropoda, Ordo Diptera, Kelas Hexapoda, Famili Culicidae, Sub famili Anopheline, Genus *Anopheles*, Spesies *maculatus* (Harmendo, 2008; Ideham, 2009). *Anopheles maculatus* merupakan salah satu vektor utama malaria di Pulau Jawa dan Sumatera (Harmendo, 2008).

### 2.2.1 Siklus Hidup dan Morfologi

Nyamuk *Anopheles* dalam siklus hidupnya mengalami metamorfosis lengkap (complete metamorphosis). Dalam siklus hidupnya terdapat 4 stadium nyamuk, yaitu telur, larva, pupa, dan dewasa. Pada umumnya nyamuk *Anopheles* membutuhkan waktu satu sampai tiga minggu untuk menyelesaikan satu siklus (Ideham, 2009). Siklus nyamuk *Anopheles* sebagai berikut.

#### a. Telur

Telur *Anopheles* berbentuk oval panjang, kedua ujung runcing, pada sekeliling bagian tengah terdapat alat pelampung (Gambar 2.3) (Ideham, 2009). Nyamuk betina meletakkan telurnya sebanyak 50-200 butir sekali bertelur. Telur-telur tersebut diletakkan di dalam air dan mengapung di tepi air. Telur tidak dapat bertahan di tempat yang kering dan dalam waktu 2-3 hari akan menetas menjadi larva (Harmendo, 2008).



Gambar 2.3 Telur nyamuk Anopheles (Sumber: CDC)

b.

Larva

Larva nyamuk Anopheles memiliki kepala dan mulut yang digunakan untuk mencari makan, sebuah thorax dan sebuah abdomen (perut) (Harmendo, 2008). Pada ruas abdomen terdapat palmate hairs yang berbentuk kipas dan tergalplate (Gambar 2.4). Pada ujung abdomen terdapat 2 spirakel yaitu lubang-lubang pernafasan yang berbentuk bulat. Sifon pada larva pendek sekali atau tidak ada (Ideham, 2009). Perbedaan dengan nyamuk lainnya, larva Anopheles tidak mempunyai saluran pernafasan dan untuk posisi badan mereka sendiri sejajar dipermukaan air (Ideham, 2009).



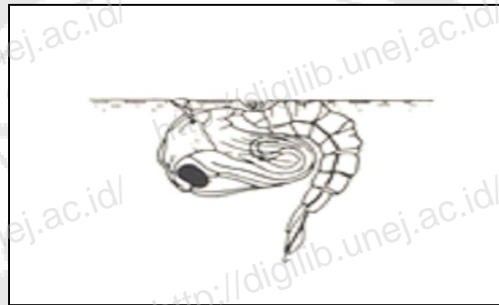
Gambar 2.4 Larva nyamuk Anopheles (Sumber: CDC)

Larva Anopheles yang sering disebut jentik hidup dan berkembang di air bersih, di sawah, selokan yang ditumbuhi rumput, pinggir sungai, dan genangan air hujan. Larva memerlukan makanan berupa alga, bakteri, dan mikroorganisme lainnya di permukaan air. Larva berenang tiap tersentak pada seluruh badan atau bergerak terus dengan mulut. Diakhir stadium, larva berganti kulit dan

mengeluarkan eksoskeleton atau kulit ke pertumbuhan yang lebih lanjut (Harmendo, 2008).

#### c. Kepompong

Kepompong (pupa) berbentuk seperti 'koma' dan terletak pada permukaan air (Gambar 2.5). Kepompong tidak memerlukan makanan tetapi memerlukan udara. Pada kepompong belum ada perbedaan antara jantan dan betina. Kepompong menetas dalam 1-2 hari menjadi nyamuk. Pada umumnya nyamuk jantan lebih dulu menetas daripada nyamuk betina (Ideham, 2009; Harmendo, 2008).



Gambar 2.5 Kepompong nyamuk Anopheles (Sumber: CDC)

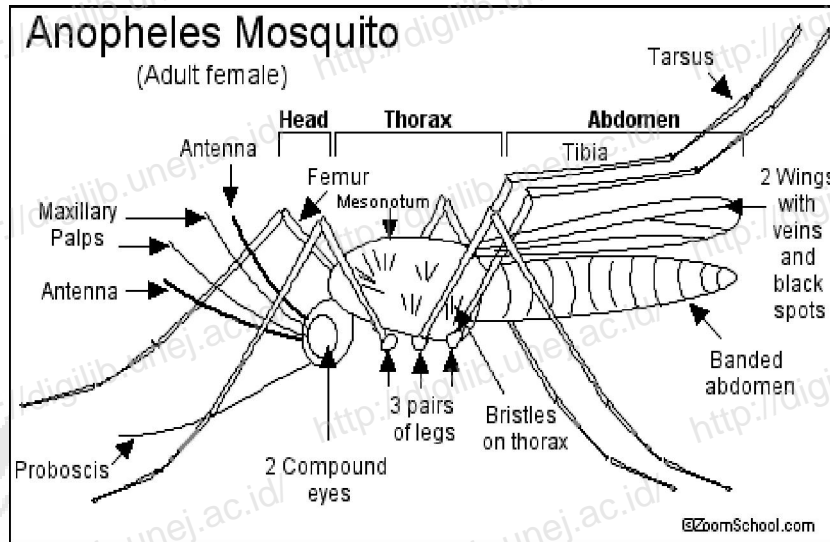
#### d. Nyamuk Dewasa

Semua nyamuk, khususnya Anopheles dewasa memiliki tubuh yang kecil dengan tiga bagian: kepala, thorax, dan abdomen (perut). Kepala nyamuk berfungsi untuk memperoleh informasi dan untuk makan (Harmendo, 2008). Pada kepala terdapat mata, antena, palpus, dan probosis. Anopheles jantan memiliki antena berbulu lebat dan panjang (plumose), palpus hampir sama panjang dengan probosis, dan ujung palpus membesar seperti gada. Anopheles betina memiliki antena berbulu jarang (pilose), palpus sama panjang dengan probosis, dan ujung palpus tidak membesar (Gambar 2.6) (Ideham, 2009). Antena nyamuk sangat penting untuk mendeteksi bau host dari tempat perindukan dimana nyamuk betina meletakkan telurnya. Thorax berfungsi untuk penggerak (Harmendo, 2008).

Nyamuk Anopheles jantan dan betina memiliki posisi istirahat dengan perut berada di udara. Perut berfungsi untuk pmencerna makanan dan



mengembangkan telur. Bagian badannya mengembang agak besar ketika nyamuk betina menghisap darah. Darah tersebut lalu dicerna tiap waktu untuk membantu memberikan sumber protein pada produksi telurnya (Harmendo, 2008).

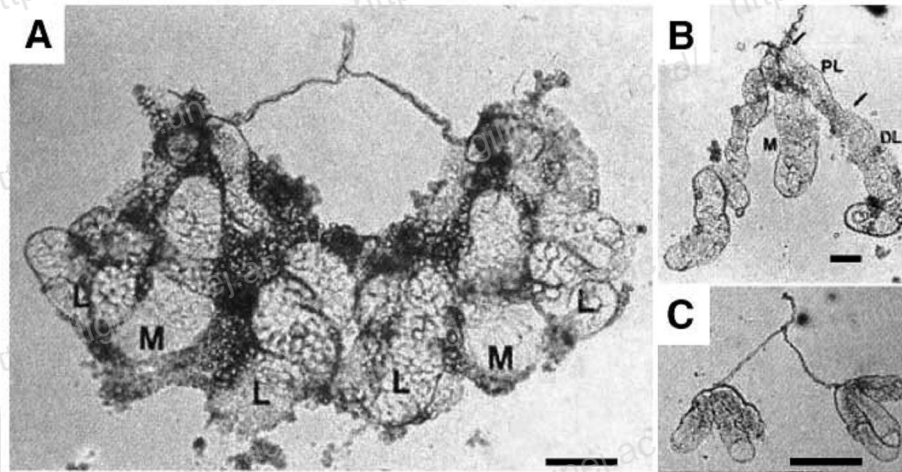


Gambar 2.6 Nyamuk *Anopheles* dewasa (Sumber : <http://www.Arbovirus.Health.nsw.gov.AU/areas/arbovirus/mosquito/photos.mosquitophotos.htm>)

Kelenjar saliva dari nyamuk menempel pada esofagus dibagian thorax. Kelenjar saliva *Anopheles* betina lebih besar daripada *Anopheles* jantan. Setiap nyamuk memiliki sepasang kelenjar dan setiap kelenjar memiliki 3 lobus, 2 lateral dan 1 media. Pada *Anopheles* betina lobus lateral terdiri dari 3 regio, yaitu regio distal, intermediet, dan proksimal (Gambar 2.7). Sedangkan lobus media hanya terdiri dari regio distal dan proksimal. Tiap lobus memiliki duktus sentralis yang dilapisi oleh sel epitel di bagian dalam dan lamina basalis di bagian luar. Duktus dari masing-masing lobus bergabung membentuk duktus lateralis yang menghubungkan antara kelenjar saliva yang satu dengan lainnya. Duktus ini mengalami dilatasi ketika nyamuk menyekresi saliva (Dhar dan Kumar, 2003).

Masing-masing lobus pada kelenjar saliva nyamuk betina memiliki fungsi yang berbeda-beda (Dhar dan Kumar, 2003). Lobus lateral regio proksimal dari kelenjar saliva nyamuk betina berfungsi untuk memproduksi enzim seperti amilase dan 1-4 glukosidase untuk proses sugar-feeding. Sedangkan lobus lateral

regio distal dan lobus medial dari kelenjar saliva berfungsi untuk memproduksi protein-protein yang berhubungan dengan blood feeding, seperti enzim apyrase, antikoagulan, vasodilator, dan imunomodulator. Bagian lobus inilah yang akan dimasuki oleh sporozoit (James, 2003).



A. Sepasang kelenjar saliva dari nyamuk betina, lobus lateral dan lobus medial dihubungkan dengan jaringan lemak; B. Kelenjar saliva *Anopheles* betina: Medial (M), Proksimal-Lateral (PL), Distal-Lateral (DL); C. Kelenjar saliva *Anopheles* jantan  
Gambar 2.7 Kelenjar saliva *Anopheles* sp. (Sumber: James, 2003)

### 2.2.2 Bionomik (Aspek Perilaku) Nyamuk

Bionomik nyamuk mencakup pengertian tentang perilaku, perkembangbiakan, umur, populasi, penyebaran, fluktuasi musiman, serta faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi, berupa lingkungan fisik (musim, kelembaban, angin, matahari, dan arus air), lingkungan kimiawi (kadar garam dan pH), serta lingkungan biologi seperti tumbuhan bakau dan ganggang vegetasi di sekitar tempat perindukan (Hiswani, 2004). Dalam perjalanan hidup nyamuk, ada tiga macam tempat yang diperlukan untuk kelangsungan hidupnya yaitu tempat berkembang biak (breeding places), tempat untuk mendapatkan umpan atau darah (feeding places), dan tempat untuk beristirahat (resting places) (Nurmaini, 2003).

*Anopheles* memiliki bermacam breeding places sesuai dengan spesiesnya (Nurmaini, 2003). *Anopheles maculatus* berkembang biak di daerah pegunungan. Tempat perindukan yang spesifik vektor *Anopheles maculatus* adalah sungai yang kecil dengan air jernih dan mata air yang mendapat sinar matahari langsung. Di kolam dengan air jernih juga ditemukan jentik nyamuk ini, meskipun densitasnya

rendah. Densitas *Anopheles* tinggi pada musim kemarau, sedangkan pada musim hujan, vektor jenis ini agak berkurang karena tempat perindukan hanyut terbawa banjir (Hiswani, 2004).

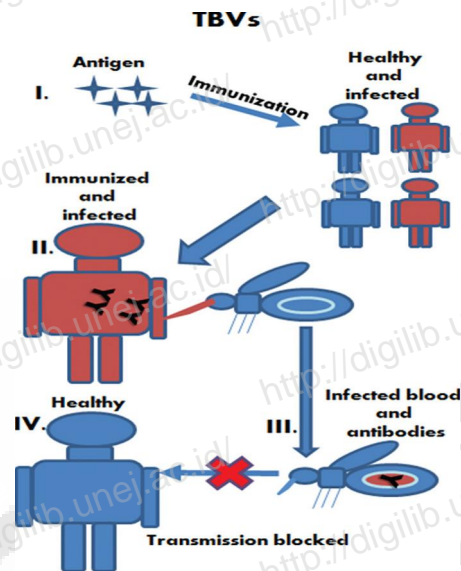
Perilaku mencari darah hanya terdapat pada nyamuk betina, sedangkan nyamuk jantan tidak menghisap darah. Nyamuk betina membutuhkan darah untuk proses pertumbuhan telurnya. Vektor *Anopheles*, khususnya *Anopheles maculatus* aktif mencari darah pada malam hari antara pukul 21.00 hingga 03.00 WIB (Hiswani, 2004).

Setelah nyamuk *Anopheles* betina menggigit inang, nyamuk tersebut akan beristirahat selama 2-3 hari. Tempat beristirahat (resting places) nyamuk *Anopheles* ialah di dalam rumah maupun di luar rumah. Tempat beristirahat di dalam rumah misalnya hinggap di dinding atau di tempat yang gelap, sedangkan tempat beristirahat di luar rumah misalnya di tempat dekat tanah, lubang lembab atau hinggap di tempat yang cukup tinggi (Hiswani, 2003; Nurmaini, 2004).

## 2.3 Transmission Blocking Vaccine sebagai Penanggulangan Malaria

### 2.3.1 Definisi dan Perkembangan TBV

Transmission Blocking Vaccine (TBV) adalah salah satu jenis vaksin stadium nyamuk yang saat ini sedang dikembangkan. TBV merupakan vaksin yang ditujukan untuk mencegah dan menghetikan terjadinya transmisi patogen dari vektor ke hospes vertebrata yang tidak terinfeksi melalui pencegahan perkembangan parasit di dalam midgut nyamuk (Carter et al., 2000; Abreu dan Ortigao, 2010). Molekul target untuk TBV harus diekspresikan oleh parasit stadium seksual mulai gametosit sampai ookinet. Antibodi yang dibangkitkan melalui vaksinasi dapat membunuh parasit di dalam tubuh manusia atau ikut tertelan bersama gametosit masuk ke dalam tubuh nyamuk dan membunuh gamet saat keluar dari eritrosit dalam midgut nyamuk. Vaksin TBV bertujuan melindungi suatu komunitas dari infeksi parasit *Plasmodium*, tetapi tidak melindungi individu yang divaksinasi (Gambar 2.8) (Sharma dan Pathak, 2008).



Skema mekanisme kerja TBV. I: Individu sehat (biru) dan terinfeksi (merah) divaksinasi antigen TBV; II: Vektor menghisap darah individu terinfeksi yang mengandung ikatan spesifik antibodi-antigen TBV; III: Antibodi spesifik diproduksi untuk melawan patogen dalam tubuh vektor; IV: Pencegahan transmisi ke inang yang belum terinfeksi.

Gambar 2.8 Transmission Blocking Vaccine (Sumber: Abreu-Ortigao, 2010).

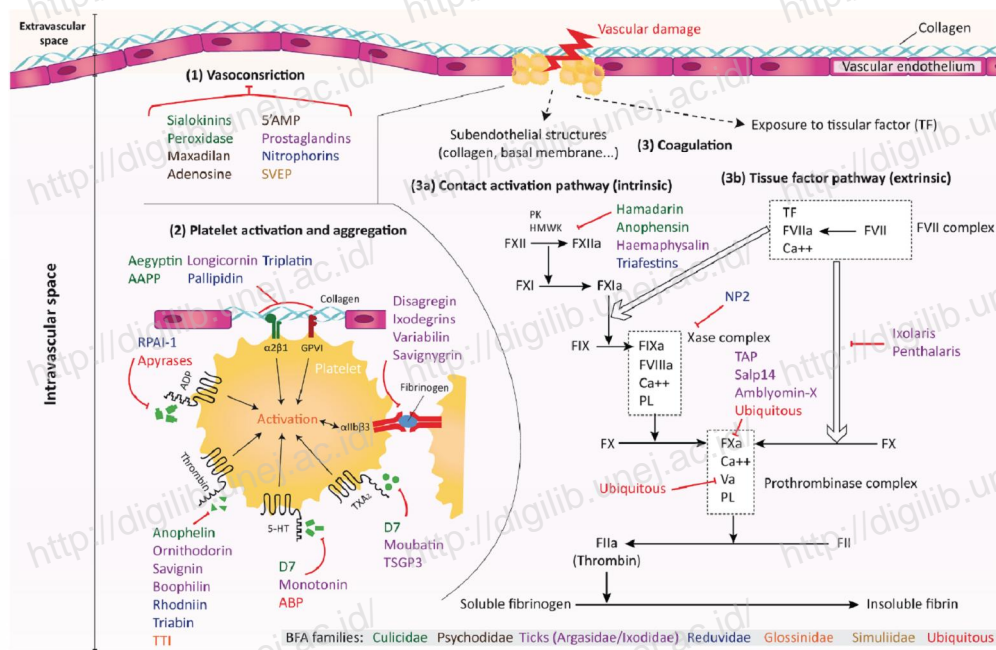
Transmission Blocking Vaccine memiliki target antigen pada gamet, zigot, dan ookinet yang berada pada midgut *Anopheles* betina (Sharma dan Pathak, 2008). Beberapa contoh kandidat target pada *Plasmodium falciparum* adalah Pfs25, Pfs48/45, dan Pfs230. Pfs25 merupakan protein yang diekspresikan pada permukaan zigot dan ookinet (Abreu dan Ortigao, 2010). Pfs48/45 dan Pfs230 merupakan protein yang diekspresikan pada makrogametosit dan mikrogametosit dari *Plasmodium falciparum* (Sharma dan Pathak, 2008).

### 2.3.2 Peran Saliva Vektor dalam Transmisi Patogen

Saliva dari vektor arthropoda mengandung molekul vasomodulator dan imunomodulator yang menguntungkan proses blood feeding. Faktor vasomodulator berfungsi sebagai antihemostasis dengan melawan vasokonstriktor, menghambat aktifitas agregasi platelet, dan menghambat kaskade hemostasis (Bilingsley, 2006). Faktor imunomodulator berfungsi untuk menekan

respon imun nonspesifik (innate immunity) dan mengubah respon imun spesifik (adaptive immunity) ke arah Th2 (Fontaine, 2011). Saliva yang diekskresikan oleh vektor saat menggigit inang juga berperan dalam membantu transmisi dan perkembangan patogen di dalam tubuh inang (Titus et al., 2006).

Kerusakan yang terjadi pada pembuluh darah, misalnya oleh gigitan nyamuk, akan membangkitkan respon hemostatis di dalam tubuh inang. Respon hemostatis merupakan reaksi dari berbagai sel dan molekul yang bertujuan untuk mengurangi hilangnya darah lebih lanjut saat terjadi gangguan pada pembuluh darah. Respon hemostatis yang terjadi terdiri dari vasokonstriksi, hemostasis primer (agregasi platelet), dan hemostasis sekunder (kaskade koagulasi) (Andrade et al., 2005). Kerja respon hemostatis tersebut dihambat oleh faktor vasomodulator pada saliva vektor (Gambar 2.9). Beberapa contoh komponen vasomodulator pada saliva vektor adalah peroksidase, anophelin, dan hamadarin. Faktor peroksidase pada saliva *Anopheles albimanus* berfungsi menghambat pada tahapan terjadinya vasokonstriksi, sedangkan faktor anophelin bekerja sebagai alpha thrombin inhibitor yang akan mengganggu proses agregasi platelet. Saliva vektor *Anopheles stephensi* mengandung faktor hamadarin yang berfungsi menghambat kerja kaskade koagulasi yakni pada perubahan faktor hageman (FXII-XIIa) (Fontaine et al., 2011).

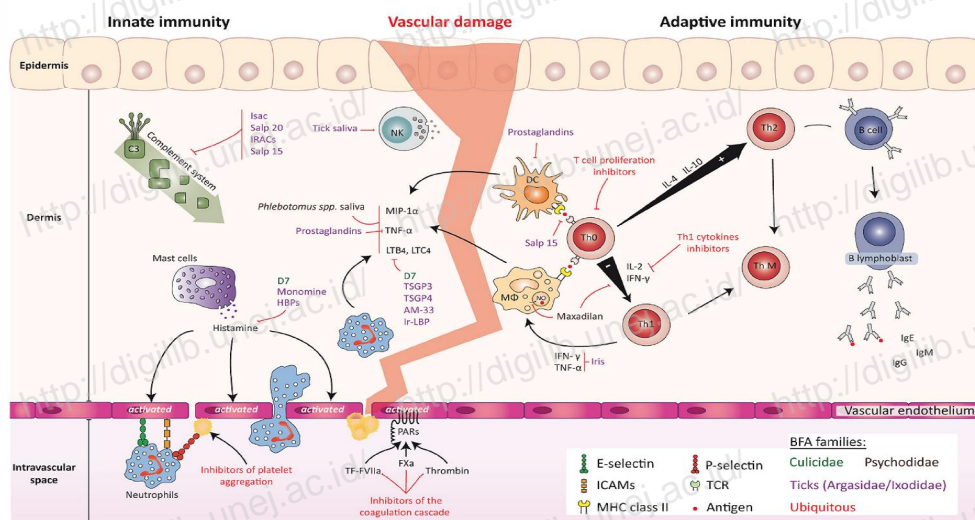


Gambar 2.9 Skema peran protein pada saliva vektor (arthropoda) dalam memodulasi respon hemostatis dalam tubuh inang (Sumber: Fontaine et al., 2011)

Adanya kerusakan pada pembuluh darah tidak hanya menimbulkan respon hemostatis, tetapi juga membangkitkan respon imun inang. Respon imun inang tersebut meliputi respon imun alami (innate immunity) untuk memicu terjadinya perbaikan jaringan, mencegah kolonisasi patogen lebih lanjut, dan pada akhirnya menginisiasi respon imun didapat (adaptive immunity) yang merupakan respon imun spesifik terhadap patogen tertentu (Andrade et al., 2005). Pada saat nyamuk mengigit inang, sel-sel yang pertama menimbulkan reaksi inflamasi adalah sel endotel, leukosit, sel mast, neutrofil, dan platelet. Sel-sel tersebut selanjutnya akan mengeluarkan mediator-mediator proinflamasi dan faktor-faktor kemotaksis seperti histamin, MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) dan leukotrien yang bertujuan untuk mengumpulkan leukosit-leukosit lebih lanjut pada bagian pembuluh darah yang mengalami kerusakan. Secara umum, bangkitan respon pada tubuh inang tersebut bertujuan sebagai pertahanan untuk mengeliminasi

organisme asing dari tubuh dan menghalangi proses blood feeding lebih lanjut (Malaguarnera dan Musumeci, 2002).

Respon imun hospes yang timbul pada saat proses blood feeding dihambat oleh faktor imunomodulator pada saliva vektor (Gambar 2.10) (Bilingsley, 2006). Beberapa contoh komponen imunomodulator pada saliva vektor adalah argasid atau ixodid dan enzim adenosin deaminase. Komponen-komponen tersebut menghambat respon imun inang pada tahapan yang berbeda. Komponen ixodid misalnya, yang telah teridentifikasi pada saliva ticks dapat menyupresi respon imun alami melalui penghambatan pada aktivasi sistem komplemen, makrofag dan sel NK (Natural Killer Cell) (Fontaine, 2011). Inflamasi pada permukaan kulit akibat gigitan nyamuk akan menyebabkan degradasi ATP dan produksi adenosin. Produksi adenosin penting untuk menimbulkan persepsi nyeri pada tempat inflamasi yang akan memberikan ‘alarm’ bagi hospes terhadap adanya gigitan nyamuk sehingga memicu behavioral defense. Proses inflamasi tersebut dihambat oleh adenosin deaminase pada saliva *Aedes aegypty* yang bekerja dengan menekan produksi adenosin sehingga meminimalkan persepsi nyeri (Andrade et. al., 2005)



Gambar 2.10 Skema peran protein pada saliva vektor (arthropod) dalam memodulasi respon imun innate dan adaptive pada inang (Sumber: Fontaine et al., 2011)

Respon imun innate selanjutnya akan memicu timbulnya respon imun adaptive melalui sel APC (Antigen Presenting Cell) seperti makrofag dan sel dendritik. Sel tersebut berperan dalam menangkap komponen pada saliva atau antigen patogen pada tempat gigitan dan mempresentasikannya pada limfosit T yang selanjutnya memicu pengeluaran antibodi. Pada tahapan ini, komponen pada saliva vektor bekerja dengan menghambat sekresi sitokin oleh Th1 seperti IFN- $\gamma$  dan IL-2. Karena respon kerja Th1 antagonis terhadap Th2, keadaan tersebut akan meningkatkan respon Th2 untuk menyekresi antibodi (Fontaine et al., 2011). Th1 merupakan imunitas seluler yang berperan melawan parasit malaria yang berada di jaringan seperti stadium preeritrositik. Sedangkan Th2 merupakan imunitas humoral yang akan melawan parasit setelah berada pada stadium darah (Harijanto, 2000). Oleh karena itu, respon imun inang ke arah Th2 yang lebih tinggi daripada Th1 akan memudahkan proses blood feeding serta transmisi patogen oleh vektor kepada inang (Fontaine et al., 2011).

### 2.3.3 Transmission Blocking Vaccine Berbasis Saliva Vektor

Pendekatan baru yang potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat target dalam pembuatan TBV adalah dengan menggunakan komponen saliva vektor. Saliva vektor mengandung protein imunomodulator dan vasomodulator yang bersifat immunosupresif terhadap inang sehingga dapat meningkatkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang. Sehingga adanya vaksinasi dengan menggunakan komponen lawan substansi tersebut dapat mengendalikan transmisi patogen. Hal ini mengacu pada penelitian terdahulu yang telah berhasil mengidentifikasi protein MAX (Maxadilan) dan SP15 pada saliva dari sandflies sebagai kandidat target TBV pada penyakit leishmaniasis (Titus et al., 2006).

Penelitian yang dilakukan oleh Donovan (2007) menunjukkan bahwa gigitan berulang nyamuk *Anopheles* yang tidak terinfeksi oleh *Plasmodium* mempengaruhi sistem imun lokal dan sistemik serta membatasi pertumbuhan parasit pada host. Perubahan respon imun yang terjadi ialah adanya peningkatan aktivitas ke arah Th1 yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan IFN- $\gamma$  dan IL-12 serta penurunan kadar IL-4. Pergeseran respon imun ke arah Th1 lebih efektif



bagi inang untuk melawan malaria yang dapat diketahui dengan penurunan derajat parasitemia. Oleh karena itu, studi mengenai saliva nyamuk *Anopheles* merupakan strategi yang esensial untuk dikembangkan sebagai kandidat TBV (Donovan, 2007).

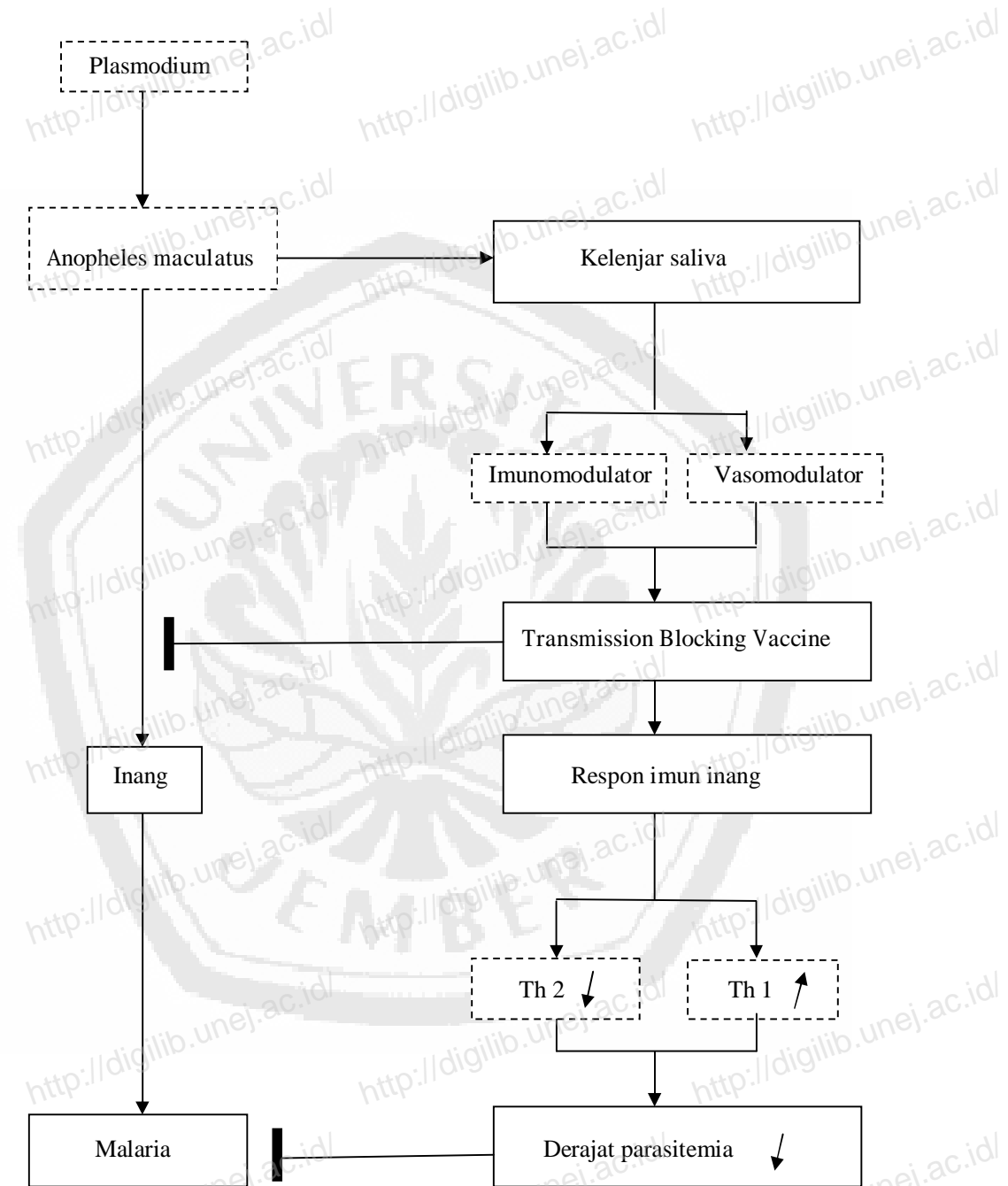
#### 2.4 Ajuvan Alumunium Hidroksida

Kata 'ajuvan' berasal dari Bahasa Latin yang berarti 'membantu'. Ajuvan perlu ditambahkan pada vaksin untuk mempertinggi respon imun melawan antigen vaksin. Ajuvan harus memiliki beberapa sifat, antara lain dapat membuat depot antigen, mempertahankan integritas antigen, dan mempunyai sasaran APC (Antigen Presenting Cell). Contoh ajuvan antara lain Complete Freund Adjuvant (ajuvan dari bakteri), Incomplete Freund Adjuvant (ajuvan dari komponen penyusun bakteri), sitokinin (IL-1 dan IL-2), serta garam alumunium (Marsetyawan, 2011).

Komposisi ajuvan alumunium hidroksida berupa gel. Garam alumunium terutama mempunyai efek depot dengan merangsang pembentukan granuloma kecil yang menyimpan antigen dan melepaskan antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang paparan antigen dengan sistem imun nonspesifik (innate immunity). Perpanjangan pelepasan antigen ini akan memicu sekresi sel APC lebih banyak untuk menangkap antigen tersebut. Dengan demikian jelaslah bahwa peranan alumunium hidroksida sebagai ajuvan vaksin ialah meningkatkan respon imun nonspesifik (innate immunity) (Coffman et al., 2010).

Alumunium hidroksida merupakan jenis ajuvan yang paling banyak digunakan pada vaksinasi manusia dan hewan (Lindblad, 2004). Efek serius yang ditimbulkan akibat vaksinasi dengan ajuvan alumunium hidroksida jarang terjadi. Penelitian terbaru tentang keamanan alumunium hidroksida sebagai ajuvan pada vaksin DPT (Difteri, Pertusis, dan Tetanus) menyatakan tidak ditemukan bukti efek buruk yang serius akibat paparan alumunium tersebut. Namun demikian, efek lokal yang ringan seperti kemerahan dan nodul kecil di tempat injeksi tidak jarang terjadi (Eickhoff dan Myers, 2002).

2.5 Kerangka Konseptual



Keterangan:  
 Diteliti :   
 Tidak diteliti :

Malaria adalah penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh Plasmodium. Siklus hidup Plasmodium memerlukan Anopheles sebagai vektornya. Salah satu organ penting dalam tubuh vektor yang berperan dalam proses transmisi Plasmodium dari tubuh nyamuk ke tubuh inang adalah kelenjar saliva. Pada kelenjar saliva terdapat senyawa imunomodulator dan vasomodulator yang bersifat imunogenik terhadap tubuh inang serta dikeluarkan bersamaan dengan gigitan nyamuk. Senyawa imunogenik yang terkandung dalam saliva nyamuk tersebut dapat membangkitkan respon imun inang. Penelitian yang dilakukan Donovan menunjukkan bahwa paparan berulang saliva nyamuk Anopheles yang tidak terinfeksi dapat mempengaruhi respon imun yang ditandai dengan adanya peningkatan aktivitas Th1 dan penurunan aktivitas Th2. Perubahan respon imun dari Th2 ke Th1 sangat menguntungkan untuk melawan parasit malaria terhadap gigitan nyamuk infeksius berikutnya. Perubahan respon inang tersebut dapat ditunjukkan dengan penurunan derajat parasitemia. Dengan demikian, komponen saliva nyamuk sangat potensial untuk digunakan sebagai Transmission Blocking Vaccine (TBV) melawan malaria (Donovan, 2007).

## 2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat kecenderungan derajat parasitemia yang lebih rendah dari mencit galur BALB/c pasca vaksinasi dengan ekstrak kelenjar saliva nyamuk *Anopheles maculatus* dibandingkan dengan mencit yang tidak divaksinasi.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang didalamnya ditemukan minimal satu variabel yang dimanipulasi untuk mempelajari hubungan sebab akibat. Penelitian eksperimen erat kaitannya dalam menguji suatu hipotesis dalam rangka mencari pengaruh, hubungan, maupun perbedaan perubahan terhadap kelompok yang dikenakan perlakuan (Solso dan MacLin, 2007). Penelitian eksperimental laboratoris adalah penelitian eksperimental yang pelaksanaannya dilakukan di laboratorium (Pratiknya, 2010).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Prosedur penelitian ini dilakukan di beberapa tempat yang berbeda. Isolasi terhadap kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dilaksanakan di Balai Besar Penelitian, Pengembangan Vektor, dan Reservoir (B2P2VRP) di Salatiga, Jawa Tengah. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar dan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember. Penghitungan derajat parasitemia dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu penelitian dilakukan selama bulan Juni 2012 – Agustus 2012.

### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah mencit galur BALB/c. Selanjutnya pengambilan sampel dari populasi tersebut menggunakan teknik sampel random sederhana (simple random sampling). Sampel penelitian menggunakan mencit galur BALB/c jantan usia 6-8 minggu. Jumlah sampel yang dibutuhkan ditentukan berdasarkan rumus Federer:

$$(t-1)(r-1) = 15$$

Dimana: t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah ulangan

Perlakuan pada penelitian ini sebanyak 3 kelompok, sehingga jumlah ulangan untuk tiap perlakuan ialah 9 ekor. Sebagai antisipasi mencit ulangan yang mati, maka digunakan 15 ekor untuk masing-masing perlakuan sehingga jumlah total sampel adalah 45 ekor mencit. Kelompok pertama divaksinasi dengan pellet kelenjar saliva yang dicampur dengan ajuvan alumunium hidroksida, kelompok kedua divaksinasi dengan supernatan kelenjar saliva yang dicampur dengan ajuvan alumunium hidroksida, dan kelompok ketiga adalah kontrol yang divaksinasi dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) yang dicampur dengan ajuvan alumunium hidroksida.

### 3.4 Definisi Operasional

#### a. Kelenjar saliva *Anopheles maculatus*

Kelenjar saliva *Anopheles maculatus* berupa sepasang kelenjar yang menempel di sisi esofagus pada thorax nyamuk. Kelenjar tersebut berfungsi untuk mengekskresi saliva pada saat nyamuk menggigit hospes. Saliva *Anopheles* mengandung vasomodulator dan imunomodulator yang membantu transmisi *Plasmodium* dari tubuh nyamuk ke hospes (Dhar dan Kumar, 2003). Kelenjar saliva diisolasi dari tubuh *Anopheles maculatus* dengan metode *microdissection* untuk selanjutnya dipreparasi menjadi vaksin.

#### b. Infeksi hewan coba

Infeksi hewan coba dilakukan dengan cara menginjeksi  $5 \times 10^6$  *Plasmodium berghei* dari mencit donor ke mencit sehat. Injeksi dilakukan secara intraperitoneal pada ligamentum inguinal mencit dengan sudut  $45^\circ$ .

#### c. Derajat parasitemia

Penghitungan derajat parasitemia dilakukan dengan memeriksa secara mikroskopis preparat hapusan darah tipis yang telah dicat giemsa. Derajat parasitemia selanjutnya dapat diperoleh dengan menghitung jumlah eritrosit yang mengandung parasit per 1000 sel darah merah kemudian dikalikan 100%.

#### d. Ajuvan alumunium hidroksida

Komposisi ajuvan alumunium hidroksida berupa gel garam alumunium. Ajuvan perlu ditambahkan pada vaksin untuk mempertinggi respon imun

melawan antigen vaksin. Jumlah ajuvan yang ditambahkan sama dengan jumlah vaksin yang akan diberikan pada hewan coba.

d. Model vaksin untuk kelompok kontrol

Model vaksin untuk kelompok kontrol terdiri dari campuran PBS (Phosphate Buffer Saline) dan ajuvan alumunium hidroksida dengan perbandingan yang sama.

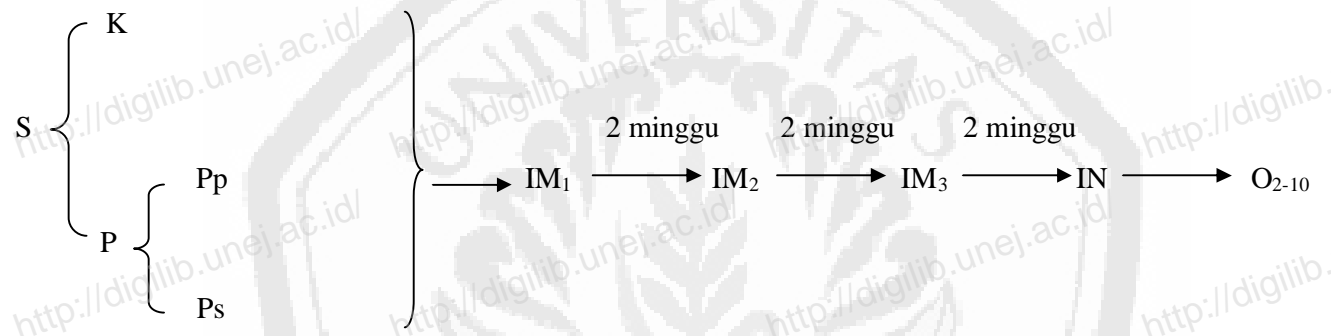
e. Model vaksin untuk kelompok supernatan

Model vaksin untuk kelompok supernatan terdiri dari campuran supernatan ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*, PBS, dan ajuvan alumunium hidroksida. Supernatan diperoleh melalui proses Freez and Thow kelenjar saliva, homogenisasi dengan Water Sonication, dan sentrifuse.

f. Model vaksin untuk kelompok pellet

Model vaksin untuk kelompok pellet terdiri dari campuran pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*, PBS, dan ajuvan alumunium hidroksida. Pellet diperoleh melalui proses Freez and Thow kelenjar saliva, homogenisasi dengan Water Sonication, dan sentrifuse.

### 3.5 Rancangan Penelitian



**Keterangan:**

- S : Sampel
- K : Kelompok kontrol (terdiri dari 15 mencit)
- P : Kelompok perlakuan
- Pp : Kelompok perlakuan pellet (terdiri dari 15 mencit)
- Ps : Kelompok perlakuan supernatan (terdiri dari 15 mencit)
- IM<sub>1-3</sub> : Imunisasi pertama. Kedua, ketiga
- IN : Inokulasi Plasmodium berghei
- O<sub>2-8</sub> : Observasi data derajat parasitemia mencit hari ke-2 sampai ke-10 pasca inokulasi

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah minor kit, papan untuk membedah mencit, jarum pentul, disposable syringe 1 cc, disposable syringe 3 cc, pipet, vacutainer heparin, eppendorf, hemositometer, mikroskop cahaya, object glass, cover glass, laminar air flow, pH meter, handscone, masker, cryotube, lemari es (suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ , dan  $4^{\circ}\text{C}$ ), tabung valcon, aluminium foil, beaker glass, pipet, counter, mikropipet, mikrotip, vortex, magnetic stirrer, mikropistil, heater, stereoscopic microscope, disposable petridisc, dan autoclave.

#### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat salivary gland *Anopheles maculatus*, isolat *Plasmodium berghei*, Phosphate Buffer saline (PBS), medium complete, medium plus, chloroform, cat giemsa, buffer giemsa, freezing solution, alkohol 70%, minyak emersi, metanol dan ajuvan aluminium hidroksida.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Isolasi Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus*

Langkah pertama untuk mengisolasi kelenjar saliva adalah menyiapkan nyamuk *Anopheles* betina. Nyamuk tersebut dimasukkan ke dalam aqua gelas dan ditutup kasa. Sesaat sebelum diisolasi, nyamuk dianestesi dengan chloroform. Nyamuk yang sudah tidak bergerak selanjutnya diisolasi kelenjar salivanya dengan proses microdissection.

Proses microdissection dilakukan dibawah stereoscopic microscope dengan menggunakan jarum diseksi. Nyamuk diletakkan pada petridisc yang sebelumnya telah diberi 1 tetes PBS (Phosphate Buffer Saline). Jarum diseksi ditangan kiri menekan thorax dengan lembut dan jarum diseksi di tangan kanan menarik bagian kepala perlahan-lahan sampai kepala terpisah dari tubuh nyamuk. Pada bagian kepala nyamuk tersebut akan tampak kelenjar saliva. Kelenjar saliva selanjutnya dipisahkan dari bagian kepala dan disedot dengan menggunakan



mikropipet. Kelenjar saliva yang diperoleh diletakkan di dalam eppendorf yang telah berisi 10 µl PBS. Tiap eppendorf berisi 50 µl kelenjar saliva. Proses ini dilakukan sampai terkumpul 1500 kelenjar saliva (30 eppendorf). Selanjutnya eppendorf tersebut diletakkan di dudukan eppendorf kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.2 Preparasi Vaksin

Proses preparasi vaksin dimulai dengan menghancurkan sel-sel pada kelenjar saliva untuk mengeluarkan protein yang diduga sebagai protein imunomodulator dengan teknik freez and thaw, homogenisasi, dan water sonication. Pada proses freez and thaw, sel dibekukan di dalam freezer kemudian dilakukan thawing pada suhu yang lebih tinggi. Proses homogenisasi dan water sonication selanjutnya dilakukan guna melisiskan sel lebih sempurna. Pada proses homogenisasi, kelenjar saliva pada eppendorf diaduk sambil ditekan secara manual dengan menggunakan mikropistil dibawah pengamatan stereoscopic microscope. Tahap penghancuran sel berikutnya dilakukan dengan menggunakan water sonicator.

Kelenjar saliva yang telah homogen selanjutnya disentrifuse sehingga didapatkan bagian supernatan dan pellet. Pellet dan supernatan yang diperoleh masing-masing dilarutkan dalam 2500 µl PBS. Selanjutnya bagian pellet digunakan sebagai vaksin kelompok pellet dan bagian supernatan digunakan sebagai vaksin kelompok supernatan. Kelompok kontrol menggunakan vaksin dari PBS murni. Proses ini dilanjutkan dengan penambahan ajuvan alumunium hidroksida dalam jumlah yang sama pada ketiga vaksin tersebut. Larutan vaksin kelenjar saliva dan ajuvan dicampur dengan perbandingan yang sama.

### 3.7.3 Vaksinasi Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus* pada Mencit BALB/c

Vaksinasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* pada mencit Balb/c dilakukan sebanyak 3 kali yaitu vaksinasi primer, booster 1, dan booster 2 dengan interval waktu 2 minggu. Sesaat sebelum diinjeksikan vaksin di vortex terlebih dahulu. Setiap kali vaksinasi, mencit akan diinjeksi dengan 100 µl kelenjar saliva.

Mencit diinjeksi secara subkutan di bagian femur dengan mencubit bagian femur kemudian diinjeksikan tepat dibawah lapisan kutaneus mencit.

#### 3.7.4 Infeksi Hewan Coba dengan Plasmodium berghei

Mencit BALB/c yang telah mendapatkan vaksinasi lengkap diinjeksi dengan Plasmodium berghei. Interval waktu antara booster II dengan injeksi Plasmodium adalah 2 minggu. Isolat Plasmodium berghei untuk infeksi tersebut diperoleh dari mencit donor melalui proses pasase.

Proses pasase diawali dengan pengambilan darah intrakardial mencit donor. Mencit donor adalah mencit yang derajat parasitemianya sudah mencapai 15%. Pembedahan dilakukan dengan membuka rongga thorax sampai terlihat jantung. Pengambilan darah selanjutnya dilakukan dengan disposable syringe 1 cc yang ditusukkan tepat didaerah ventrikel kanan mencit. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam vacutainer heparin.

Darah mencit donor yang diperoleh kemudian diencerkan dan dihitung jumlah eritrositnya dengan hemositometer. Sampel darah selanjutnya dicampurkan dengan PBS sampai diperoleh pengenceran 10<sup>4</sup>. Selanjutnya larutan dari pengenceran 10<sup>4</sup> dimasukkan ke dalam kamar hitung pada hemositometer dan dihitung jumlah eritrositnya dibawah penganmatan mikroskop. Penghitunga jumlah eritrosit (a) pada seluruh kamar hitung dilakukan dengan perbesaran 400x. Karena terdapat pengenceran, maka hasil penghitungan jumlah eritrosit (a) =  $nx10^4 \times 10^4$ . Setelah diperoleh jumlah eritrosit, pengenceran dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah pengenceran} = \frac{a \times \text{derajat parasitemia}}{5 \times 10^6}$$

Selanjutnya dihitung jumlah darah yang akan diambil dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah darah yang diambil} = \frac{\text{Jumlah volume yang dibutuhkan}}{\text{Jumlah pengenceran}} \times \text{Jumlah mencit yang diinfeksi} \times 200 \mu\text{l}$$

Proses selanjutnya dilakukan secara steril di dalam laminar air flow. Jumlah darah kemudian ditambahkan dengan medium plus hingga volume yang dibutuhkan. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam disposable syringe 1 cc dan siap untuk diinjeksikan. Setiap mencit diinjeksi dengan 200  $\mu$ l secara intraperitoneal.

### 3.7.5 Pembuatan Preparat Hapusan Darah Tipis

Pembuatan preparat hapusan darah tipis mulai dilakukan 48 jam pasca inokulasi Plasmodium berghei. Darah mencit untuk pembuatan hapusan diambil dari ujung ekor. Ujung ekor mencit didesinfeksi dengan alkohol 70%, digunting sedikit ujungnya, lalu diurut hingga keluar darah. Darah dikeluarkan sebanyak 1 tetes dan diletakkan pada object glass. Tetesan darah tersebut kemudian dibuat hapusan dengan menggunakan cover glass dengan sudut 45<sup>0</sup> yang dilakukan secara cepat sehingga didapatkan hapusan darah yang tipis dan rata.

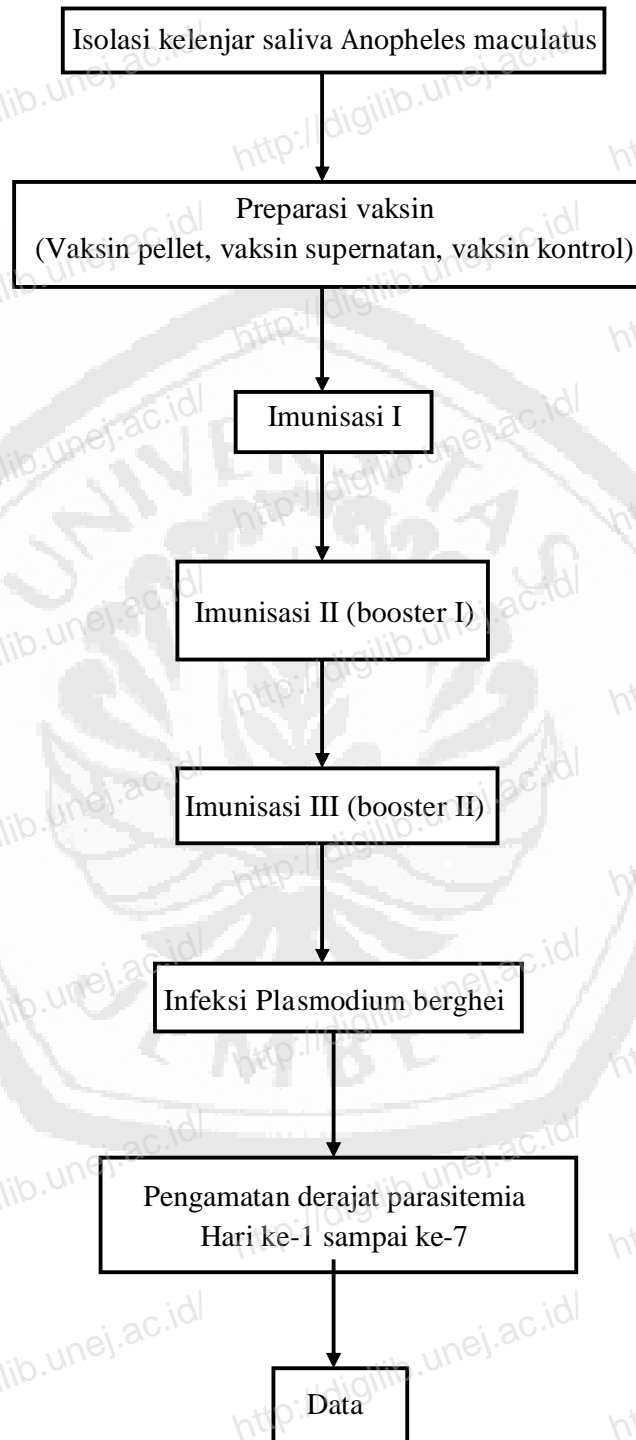
Selanjutnya dilakukan pengecatan giemsa guna mewarnai hapusan darah tersebut. Hapusan darah yang telah kering kemudian difiksasi dengan pemberian metanol secara merata ke seluruh permukaan object glass dan ditunggu hingga kering. Saat menunggu kering dapat membuat campuran cat giemsa ditambah buffer phosphate dengan perbandingan 1:8. Setelah hapusan darah kering, preparat ditetesi dengan campuran cat giemsa secara merata dengan menggunakan pipet. Pengecatan dengan giemsa tersebut ditunggu  $\pm$ 20 menit kemudian dicuci secara perlahan dengan air yang mengalir dan ditunggu hingga kering.

### 3.7.6 Penghitungan Derajat Parasitemia

Derajat parasitemia pada preparat hapusan darah tipis dihitung dibawah pengamatan mikroskop dengan bantuan counter. Penghitungan tersebut memerlukan perbesaran 1000x dengan minyak emersi. Derajat parasitemia diukur dengan menghitung eritrosit yang terinfeksi Plasmodium berghei tiap 1000 eritrosit. Adapun rumusnya adalah sebagai berikut:

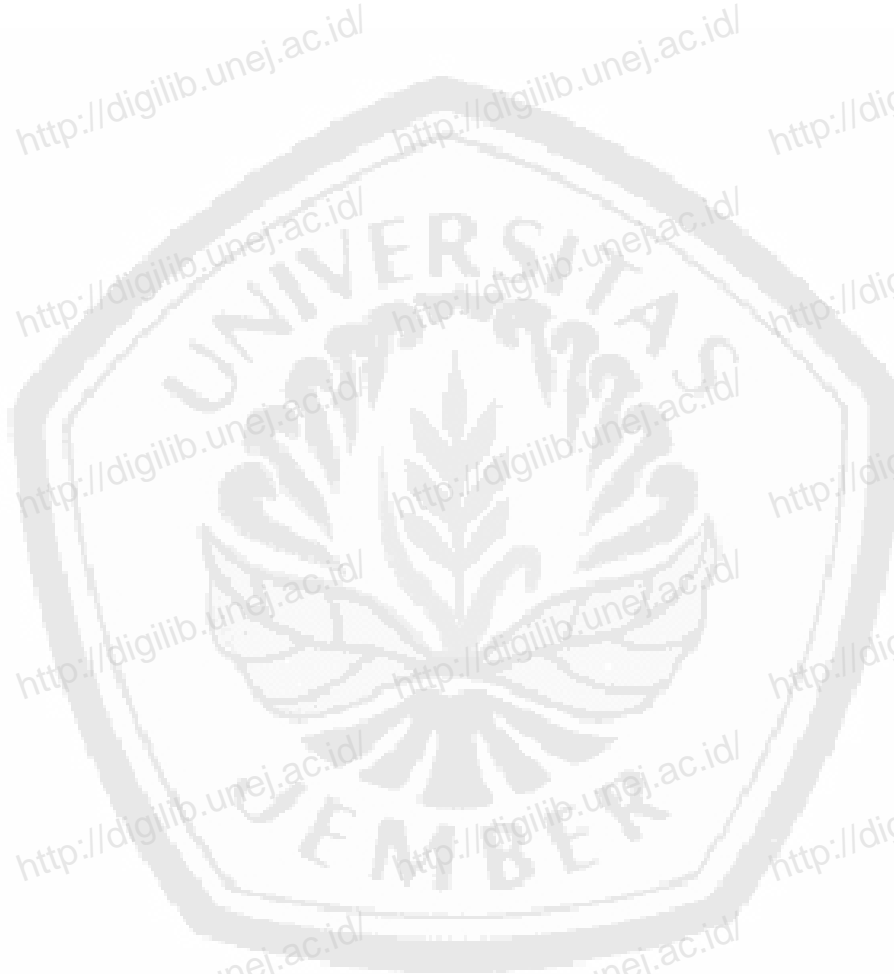
$$\text{Derajat parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi} \times 100\%}{1000 \text{ eritrosit}}$$

## 3.8 Alur Penelitian



### 3.9 Penyajian Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dicatat dalam buku catatan harian (log book) dan disimpan dalam komputer. Data ditampilkan dalam bentuk diagram kemudian dijelaskan secara deskriptif.

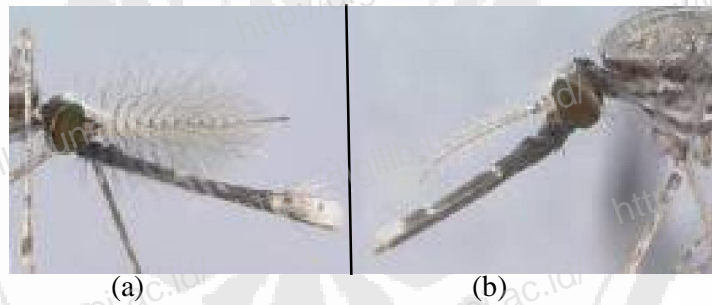


## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

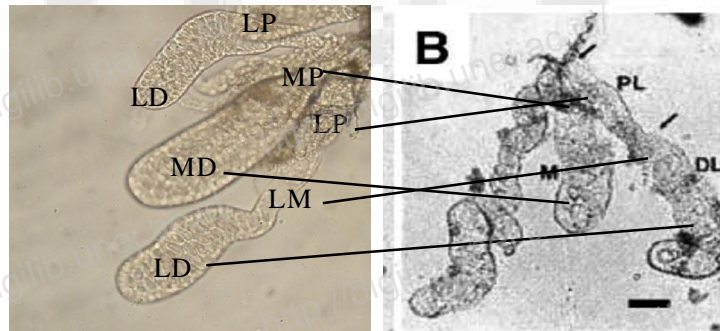
#### 4.1.1 Hasil Isolasi Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus*

Isolasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dilakukan dengan teknik microdissection dengan menggunakan mikroskop stereo. Proses isolasi tersebut dilaksanakan di B2P2VRP dan berhasil mendapatkan 1500 pasang kelenjar saliva. Kelenjar saliva diisolasi dari *Anopheles maculatus* betina. Perbedaan *Anopheles* jantan dan betina terletak pada antena, palpus, dan probosis. *Anopheles* betina memiliki antena berbulu jarang (pilose), palpus sama panjang dengan probosis, dan ujung palpus tidak membesar (Gambar 4.1). *Anopheles* memiliki sepasang kelenjar saliva dan tiap kelenjar memiliki 3 lobus, yaitu 2 lateral dan 1 media. Lobus lateral terbagi menjadi 3 regio, yaitu regio distal, intermediet dan proksimal (Dhar dan Kumar, 2003). Hasil isolasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dapat dilihat pada gambar 4.2.



(a) *Anopheles* jantan, (b) *Anopheles* betina

Gambar 4.1. Perbedaan *Anopheles* jantan dan betina terletak pada antena, palpus, dan probosis.



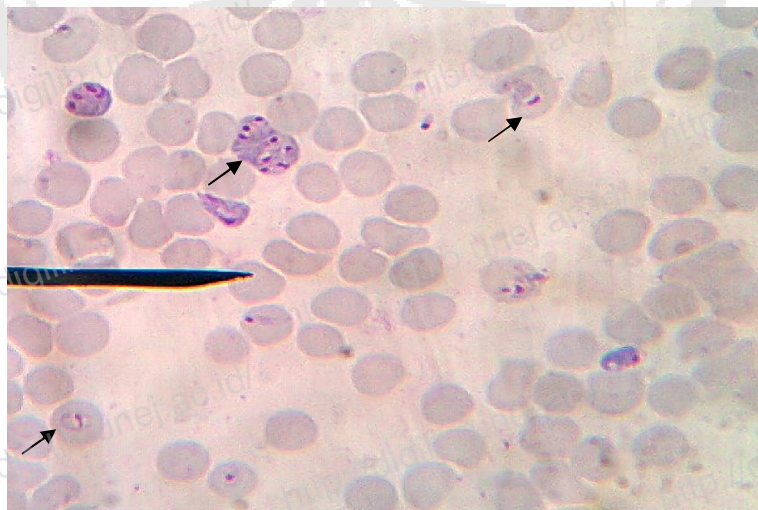
Gambar 4.2 Kelenjar saliva *Anopheles* betina. (a) Hasil isolasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus*, (b) hasil isolasi kelenjar saliva *Anopheles* Sp (Dhar dan Kumar, 2003)

#### 4.1.2 Hasil Preparasi Vaksin dan Vaksinasi

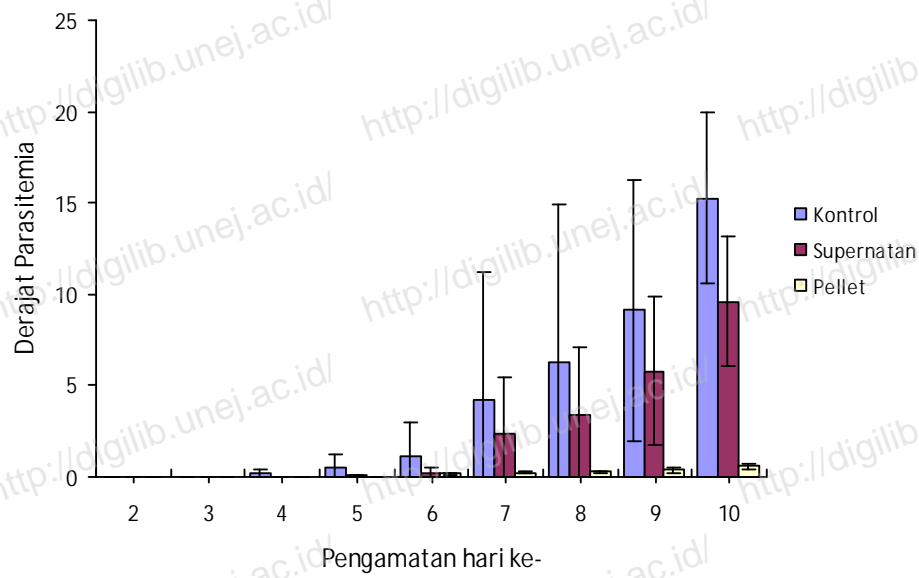
Isolat salivary gland selanjutnya diproses melalui freez and thaw, homogenisasi dengan mikropistol dan water sonicator, serta sentrifuse. Hasil dari proses tersebut ialah terpisahnya isolat salivary gland menjadi 2 bagian, yakni supernatan dan pellet. Bagian supernatan dipisahkan dari bagian pellet selanjutnya masing-masing ditambahkan Phosphate Buffer Saline hingga bervolume 2500  $\mu\text{L}$ . Vaksin pellet maupun supernatan kemudian dicampur dengan ajuvan alumunium hidroksida dan diberikan sebanyak 3 kali, yaitu imunisasi I, II (booster I), dan III (booster II). Vaksinasi dilakukan dengan menginjeksikan hasil preparasi vaksin diatas sebanyak 100  $\mu\text{L}$  secara subkutan pada paha mencit.

#### 4.1.3 Hasil Penghitungan Derajat Parasitemia

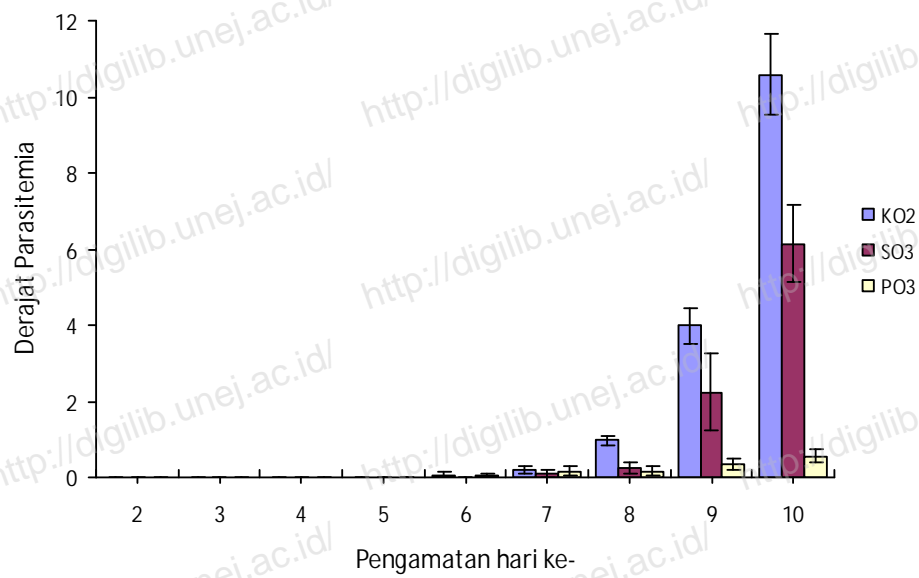
Derajat parasitemia mencit pasca inokulasi ditentukan dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi Plasmodium (ringform) tiap 1000 eritrosit (Gambar 4.3). Penghitungan dimulai 48 jam pasca inokulasi dan besarnya dinyatakan dalam persentase. Penghitungan ini dilakukan 2 kali yaitu dengan ulangan populasi dan ulangan individu. Hasil penghitungan persentase derajat parasitemia tiap populasi yang didapatkan pasca inokulasi Plasmodium berghei ditampilkan dalam gambar 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.3 Hapusan darah mencit pasca inokulasi. Anak panah menunjukkan eritrosit yang terinfeksi parasit.



Gambar 4.4 Grafik perkembangan persentase derajat parasitemia mencit dengan ulangan populasi



Gambar 4.5 Grafik perkembangan persentase derajat parasitemia mencit dengan ulangan individu



Kedua grafik tersebut menunjukkan bahwa persentase derajat parasitemia kelompok supernatan cenderung lebih rendah daripada kelompok kontrol. Persentase derajat parasitemia kelompok pellet cenderung lebih rendah daripada kelompok kontrol dan supernatan.

Namun demikian, besarnya persentase derajat parasitemia kedua grafik diatas cenderung tidak sama. Hal ini karena pada grafik ulangan individu, data diperoleh dari perkembangan derajat parasitemia 1 mencit (sampel) dari tiap kelompok. Preparat hapusan darah dari 1 sampel tersebut dihitung sebanyak 3 kali kemudian dihitung nilai rata-ratanya. Penghitungan ulang sebanyak 3 kali pada tiap sampel (individu) ini dilakukan untuk mengoreksi distribusi parasit pada sediaan hapusan darah yang cenderung tidak merata. Sedangkan besarnya derajat parasitemia pada ulangan populasi merupakan akumulasi dari nilai rata-rata pada tiap individu pada satu kelompok. Grafik ulangan populasi juga menampilkan nilai standar deviasi yang menunjukkan ukuran penyebaran data antar sampel tiap kelompok.

#### 4.1.4 Hasil Uji Statistik

Uji statistik yang digunakan dalam mengolah data pada penelitian ini adalah oneway anova. Alasan digunakannya uji oneway anova antara lain (1) pada penelitian ini variabel yang dihubungkan adalah persentase derajat parasitemia (numerik) dengan kelompok kontrol, pellet, dan supernatan (kategorik), (2) jenis hipotesis ialah komparatif, (3) masalah skala variabel numerik, (4) varians data sama, dan (5) tidak berpasangan.

Hasil uji statistik dengan oneway anova tercantum dalam lampiran B. Hasil uji anova pada hari ke-2 sampai ke-9 menunjukkan nilai signficancy  $p > 0,05$  yang berarti secara statistik tidak bermakna. Namun pada hari ke-10 menunjukkan nilai signficancy  $p = 0,005$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan derajat parasitemia secara bermakna pada 2 kelompok. Jika dilanjutkan dengan uji Tukey's HSD test untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, maka perbedaan yang bermakna terdapat antara kelompok supernatan dan pellet ( $p = 0,039$ ) serta

antara kelompok kontrol dan pellet ( $p=0,04$ ), sedangkan perbedaan yang tidak bermakna terdapat antara kelompok kontrol dan supernatan ( $p=0,185$ ).

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Isolasi Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus*

Hasil isolasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus* sebanyak 1500 pasang kelenjar saliva. Isolasi kelenjar saliva hanya dilakukan pada *Anopheles* betina karena hanya *Anopheles* betina yang menghisap darah manusia sehingga berperan sebagai vektor malaria. Sedangkan *Anopheles* jantan hanya makan gula (sugar feeding) dan memiliki kelenjar saliva lebih kecil daripada *Anopheles* betina (Murdiana, 2005). Kelenjar saliva *Anopheles* menempel pada esofagus di bagian thorax. Proses isolasi untuk mendapatkan kelenjar saliva dilakukan dengan metode microdissection yakni memisah bagian kepala dan thorax di bawah pengamatan mikroskop stereo (Moll, 2008).

Tiap pasang kelenjar saliva *Anopheles* betina yang berhasil diisolasi terdiri dari 3 lobus (Gambar 4.1). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan selama ini bahwa *Anopheles* betina memiliki sepasang kelenjar saliva dan masing-masing memiliki 3 lobus yaitu 2 lobus lateral dan 1 lobus media. Lobus lateral dibagi menjadi 3 regio yaitu regio proksimal, intermediet, dan distal. Lobus media hanya dibagi menjadi 2 regio yaitu regio proksimal dan distal. Setiap lobus memiliki duktus yang dindingnya dilapisi oleh selapit sel epitel sekretoris untuk menyekresi saliva. Duktus dari masing-masing lobus akan menyatu dan bermuara di hipofaring (Dhar dan Kumar, 2003).

Masing-masing lobus pada kelenjar saliva *Anopheles* betina memiliki fungsi yang berbeda-beda. Lobus lateral regio proksimal dapat menyekresi enzim amilase dan 1-4 glukosidase yang berperan dalam proses sugar feeding. Lobus media dan lobus lateral regio distal dapat menyekresi beberapa komponen yang berperan dalam proses blood feeding. Penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya telah berhasil mengidentifikasi enzim apyrase yang disintesis oleh regio spesifik tersebut. Enzim apyrase membantu proses blood feeding dengan cara menghambat agregasi platelet pada pembuluh darah inang (James, 2003).

#### 4.2.2 Preparasi Vaksin dan Vaksinasi

Preparasi vaksin diawali dengan proses disrupsi sel dari kelenjar saliva *Anopheles maculatus* untuk mengeluarkan senyawa protein yang diduga protein imunomodulator. Langkah pertama untuk melisiskan sel dilakukan dengan cara freeze and thaw. Pada proses ini mula-mula sel dibekukan (freeze) kemudian dilakukan perebusan dengan cepat (thawing). Adanya perubahan suhu yang mendadak menyebabkan kristal sel yang terbentuk selama proses freezing akan membengkak dan lisis ketika direbus tiba-tiba pada proses thawing. Proses ini efektif untuk melisiskan sel tanpa merusak struktur protein yang terkandung di dalamnya (Thermo scientific, 2011).

Langkah selanjutnya yang dilakukan untuk menyempurnakan lisisnya sel guna memicu pengeluaran protein lebih baik ialah proses homogenisasi. Pada penelitian ini, homogenisasi dilakukan dengan mikropistol dan water sonicator. Homogenisasi dengan mikropistol merupakan proses pemecahan sel kelenjar saliva secara manual dengan mengaduk sambil menekan kelenjar yang terletak pada mortar dengan menggunakan pistol. Gerakan memutarnya pistol secara manual akan menghasilkan gaya mekanik yang kemudian memecahkan sel-sel tersebut sehingga unsur didalamnya akan dibebaskan. Tahap penghancuran sel berikutnya dilakukan dengan menggunakan water sonicator. Prinsip kerja water sonicator ialah melisiskan sel dengan menggunakan gelombang suara ultrasonik frekuensi tinggi (Thermo scientific, 2011). Tujuan water sonicator ialah untuk menyempurnakan proses homogenisasi ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*.

Ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* yang telah homogen selanjutnya disentrifugasi. Prinsip sentrifugasi ada dua yaitu memisahkan suatu larutan menjadi komponen padatan (pellet) dan komponen yang larut (supernatan) serta memisahkan molekul-molekul berdasarkan massa atau kepadatannya. Proses sentrifugasi ini berfungsi untuk mengendapkan protein-protein tertentu yang terkandung pada ekstrak kelenjar saliva dari campuran bermacam-macam protein. Protein-protein tersebut dapat diendapkan karena berdasarkan solubilitasnya, protein dibagi menjadi protein soluble yaitu protein yang tidak larut dalam larutan

garam dalam air dan protein insoluble yaitu protein yang larut dalam larutan garam dalam air (Ngili, 2008).

Pellet dan supernatan yang telah diperoleh selanjutnya dipreparasi menjadi vaksin dengan penambahan Phosphate Buffer Saline (PBS) dan ajuvan aluminium hidroksida. Vaksin merupakan suatu bahan yang dapat diinjeksikan ke dalam tubuh individu untuk merangsang timbulnya imunitas yang tepat (Wahab dan Julia, 2002). Bahan yang diinjeksikan tersebut dapat berupa patogen yang dilemahkan, patogen yang dimatikan, atau suatu komponen dari patogen. Komponen tersebut dapat bertindak sebagai antigen yang dapat membangkitkan respon imun inang (Abbas dan Litchman, 2005). Dalam hal ini, ekstrak kelenjar saliva dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin karena mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator. Kedua komponen tersebut pada dasarnya berfungsi untuk melancarkan proses blood feeding dan transmisi patogen dari vektor ke inang. Oleh karena itu, dengan membuat anti terhadap komponen tersebut diharapkan dapat mencegah transmisi patogen ke dalam tubuh inang (Titus et al., 2006).

Kerja suatu vaksin dalam membangkitkan respon imun inang dapat diperkuat dengan penambahan ajuvan. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium hidroksida. Aluminium hidroksida merupakan jenis ajuvan yang paling banyak digunakan pada vaksinasi manusia dan hewan (Abbas dan Litchman, 2005). Ajuvan ini jarang sekali menimbulkan efek samping serius seperti abses di tempat injeksi atau respon alergi yang tinggi. Namun demikian, efek lokal yang ringan seperti kemerahan dan nodul kecil di tempat injeksi tidak jarang terjadi (Eickhoff dan Mayer, 2002). Aluminium hidroksida terutama mempunyai efek depot dengan merangsang pembentukan granuloma kecil yang menyimpan antigen dan melepaskan antigen sedikit demi sedikit sehingga memperpanjang pajanan antigen dengan sistem imun nonspesifik (innate immunity). Perpanjangan pelepasan antigen ini akan memicu sekresi sel APC lebih banyak untuk menangkap antigen tersebut (Coffman et al., 2010).

Hasil preparasi vaksin selanjutnya diinjeksikan sebanyak tiga kali (imunisasi primer, booster 1, dan booster 2) dengan interval 2 minggu. Pemberian

booster (imunisasi ulangan) bertujuan untuk mempercepat kembali peningkatan respon imun inang. Sedangkan pemberian imunisasi primer akan menghasilkan produksi antibodi yang lambat. Interval waktu pemberian imunisasi primer dan booster ditentukan berdasarkan pertimbangan trial dari penelitian-penelitian terdahulu tentang efektifitas penggunaan vaksin tersebut (Abbas dan Litchman, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Donovan et al., menunjukkan bahwa paparan awal oleh gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* dengan interval waktu 2 minggu sebanyak tiga kali pada kelompok perlakuan, dapat menekan pertumbuhan derajat parasitemia pada mencit perlakuan dibanding kontrol (Donovan et al., 2007)

Imunisasi pada penelitian ini dilakukan secara subkutan pada mencit. Pemberian subkutan merupakan rute tersering dan terbaik dalam vaksinasi aktif maupun pasif untuk menginduksi respon antibodi, sedangkan cara intravena dapat mengurangi respon imun (Baratawidjaja, 2010). Metode injeksi secara subkutan juga didasarkan pada cara nyamuk menggigit inang untuk menghisap darah. Sebelum nyamuk menghisap darah, nyamuk akan menempelkan probosisnya pada kulit inang, menembus connective tissue yang letaknya tepat diatas lapisan subkutan tissue dan kemudian membuat laserasi kapiler pada jaringan tersebut (Fontaine et al., 2011).

#### 4.2.3 Pengamatan Derajat Parasitemia

Hasil penghitungan derajat parasitemia dapat dilihat pada Gambar 4.1. Grafik pada gambar tersebut menunjukkan bahwa kelompok perlakuan supernatan memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan kelompok perlakuan pellet memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan supernatan dan kelompok kontrol. Dapat disimpulkan bahwa vaksin pellet lebih efektif daripada vaksin supernatan ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dalam menghambat pertumbuhan parasitemia.

Hasil penghitungan derajat parasitemia di atas sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Revina (2012) tentang pengukuran

derajat parasitemia mencit Balb/c yang divaksinasi dengan ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*. Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa kelompok perlakuan pellet memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan supernatan dan kelompok kontrol. Perbedaan dari kedua penelitian tersebut ialah pada ajuvan yang digunakan. Penelitian oleh Revina (2012) menggunakan Complete Freund Adjuvan, sedangkan pada penelitian ini menggunakan ajuvan alumunium hidroksida. Perbedaan ajuvan yang digunakan mempengaruhi besarnya hasil penghitungan derajat parasitemia yang diperoleh, yaitu adanya kecenderungan derajat parasitemia yang lebih rendah pada kelompok pellet yang mendapat ajuvan alumunium hidroksida. Kelebihan dari ajuvan alumunium hidroksida ialah pada aktivitasnya sebagai pemicu respon imun nonspesifik (innate immunity) dan terkenal aman digunakan pada vaksin hewan dan manusia (Coffman et al., 2010).

Penelitian yang sama juga telah dilakukan oleh Soraya (2012) tentang pengukuran derajat parasitemia mencit Balb/c pasca vaksinasi dengan ekstrak kelenjar saliva *Anopheles aconitus*. Perbedaan kedua penelitian ini ialah kelenjar saliva diperoleh dari spesies *Anopheles* yang berbeda. Penelitian oleh Soraya (2012) mengisolasi kelenjar saliva dari *Anopheles aconitus*, sedangkan pada penelitian ini kelenjar saliva diperoleh dari *Anopheles maculatus*. Hasil penghitungan tersebut juga menunjukkan kecenderungan derajat parasitemia yang lebih rendah pada kelompok pellet bila dibandingkan dengan kelompok supernatan dan kelompok kontrol (Soraya, 2012). Hasil tersebut mengindikasikan keberadaan protein imunogen kemungkinan terdapat pada protein insoluble dari pellet ekstrak kelenjar saliva dari vektor *Anopheles* dapat memicu respon imun protektif terhadap inang yang ditunjukkan dengan rendahnya derajat parasitemia.

Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan Donovan et al., (2007), pada mencit yang mendapat paparan berulang (sensitisasi) dengan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* steril terlebih dahulu, menunjukkan pengukuran derajat parasitemia yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak disensitisasi. Pada penelitian yang sama, kelompok mencit yang mendapat sensitisasi ini menunjukkan peningkatan kadar IFN- pada analisis

sitokinya. Peningkatan kadar IFN- $\gamma$  ini menandakan adanya pergeseran respon imun ke arah Th1 yang berarti munculnya efek respon imun sistemik dari vaksinasi kelenjar saliva *Anopheles stephensi*. Keadaan ini menguntungkan inang karena lebih efektif melawan parasit pada awal infeksi. Sedangkan pada kelompok mencit yang mendapat paparan tunggal dengan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* infeksius tanpa disensitisasi sebelumnya menunjukkan peningkatan kadar IL-4 pada hasil analisis sitokin. Peningkatan kadar IL-4 ini menandakan adanya pergeseran respon imun ke arah Th2. Respon imun Th2 pada awal infeksi tidak efektif melawan parasit sehingga memudahkan transmisi (Donovan et al., 2007).

Subset Th1 (imunitas seluler) maupun subset Th2 (imunitas humoral) mempunyai peranan yang penting dalam melawan patogen malaria. Imunitas seluler berperan melawan parasit malaria yang berada di jaringan. Imunitas seluler dibangkitkan melalui aktifitas Th1 yang memproduksi sitokin TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ . Sitokin tersebut akan mengaktifasi sel T sitotoksik, makrofag, monosit, dan leukosit yang akan memfagosit parasit dan menghasilkan radikal bebas untuk menghambat pertumbuhan parasit. Imunitas humoral berperan untuk membangkitkan respon imun di darah baik pada stadium preeritrositik maupun pada stadium eritrositik (Harijanto, 2000).

Keseimbangan imunitas seluler dan imunitas humoral dapat menentukan manifestasi penyakit. Imunitas seluler yang diikuti dengan respon imun humoral penting untuk mengontrol perkembangan parasit secara efektif. Keadaan yang sebaliknya justru dapat memperparah penyakit. Dapat disimpulkan, pada awal infeksi imunitas seluler berperan lebih efektif dibandingkan dengan imunitas humoral (Donovan et al., 2007 dalam Karya Ilmiah Malaria dan Respon Imun Inang).

Hasil penghitungan yang menunjukkan bahwa kelompok perlakuan pellet memiliki derajat parasitemia yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan supernatan dan kelompok kontrol juga didukung oleh hasil uji statistik oneway anova (Lampiran B). Hasil uji statistik menyebutkan bahwa pada hari ke-2 samapi ke-9 tidak ada perbedaan secara bermakna antara

kelompok, namun pada hari ke-10 terdapat perbedaan secara bermakna antara 2 kelompok. Penyebab tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok pada hari ke-2 dan ke-3 adalah seluruh sampel menunjukkan derajat parasitemia 0%, serta pada hari ke-4 sampai ke-9 akibat besarnya derajat parasitemia antar sampel pada satu kelompok memiliki standar deviasi yang tinggi ( $>20\%$  nilai mean). Perbedaan persentase derajat parasitemia tiap sampel dalam satu kelompok dapat terjadi akibat dari respon imun yang dibangkitkan untuk menghambat parasitemia bersifat spesifik tiap individu. Data pada hari ke-10 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok supernatan dan pellet serta antara kelompok kontrol dan pellet, sedangkan perbedaan yang tidak bermakna terdapat antara kelompok kontrol dan supernatan.

Salah satu kriteria malaria berat adalah adanya densitas parasit dalam darah  $> 5\%$  yang berarti hiperparasitemia (Fauci et al., 2008). Pada penelitian ini, vaksinasi dengan pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dapat menekan pertumbuhan parasit secara efektif dalam darah sehingga mencegah timbulnya malaria berat. Hal tersebut ditunjukkan dengan persentase derajat parasitemia kelompok pellet pada hari ke-8, 9, dan 10 berada dibawah 5%.

Hasil penghitungan derajat parasitemia yang cenderung rendah pada kelompok pellet berhubungan dengan komponen-komponen yang terkandung pada pellet. Pada proses sentrifugasi saat preparasi vaksin, berbagai macam molekul akan terurai berdasarkan besarnya massa dan tingkat kelarutan. Dalam hal ini, komponen protein tertentu pada ekstrak kelenjar saliva akan membentuk endapan pellet dan sebagian lagi akan terlarut dalam supernatan (Ngili, 2009). Kompleksitas kimia pada protein memungkinkan adanya berbagai epitop (unit untuk rangsangan antibodi) sehingga lebih besar kemungkinannya seseorang akan memberikan reaksi terhadap satu atau lebih epitop. Oleh sebab itu, protein merupakan imunogen yang poten (Baratawidjaja, 2010). Hal ini mengindikasikan bahwa komponen-komponen protein imunomodulator kemungkinan terdapat pada vaksin pellet.



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Hasil derajat parasitemia kelompok pellet lebih rendah daripada kelompok kontrol dan supernatan menunjukkan bahwa vaksinasi dengan pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dengan ajuvan aluminium hidroksida dapat menghambat pertumbuhan parasitemia lebih efektif dibandingkan dengan kelompok yang tidak divaksinasi dan kelompok supernatan. Hal tersebut mengindikasikan komponen-komponen protein imunomodulator kemungkinan terdapat pada protein insoluble dari pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*. Dengan demikian, ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dapat dijadikan target dalam pengembangan Transmission Blocking Vaccine melawan malaria.

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh maka perlu dilakukan:

- a. Identifikasi respon imun adaptif apa yang dominan akibat vaksinasi dengan pellet ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus*.

Isolasi protein yang terkandung dalam pellet dari ekstrak kelenjar saliva *Anopheles maculatus* untuk mendapatkan protein putatif sebagai kandidat vaksin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Abul dan Litchman, Andrew. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Andrade, Teixeira, Barral-Netto. 2005. Haematophagous Arthropod Saliva and Host Defense System: A Tale of Tear and Blood. *An Acad Bras Cienc*. Vol. 77(4): 665-693.
- Armiyanti, Yunita. 2011. "Karakterisasi dan Uji Potensi Protein Imunomodulator Kelenjar Saliva *Anopheles maculatus* sebagai Target Putatif dalam Pembuatan Vaksin terhadap Malaria: Malaria dan Respon Imun Inang." Tidak Diterbitkan. Karya Ilmiah. Malang: Program Doktor Ilmu Kedokteran Bidang Minat Biomedik.
- Baratawidjaja, K.G dan Rengganis, L. 2009. *Imunologi Dasar Edisi ke-8*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Barodji, Suwasono, Sularso, dan Sutopo. 2002. Uji Kepekaan Nyamuk Vektor dan Efikasi Insektisida yang Digunakan Program Pemberantasan Nyamuk Vektor. *Cermin Dunia Kedokteran*. 131: 45-47.
- Billingsley, Baird, Mitchell, dan Drakeley. 2006. Immune Interactions Between Mosquitoes and Their Hosts. *Parasite Immunology*. Vol 28 (4): 143-153.
- Buffet P.A., Safeukui I., Dplaine. G. 2011. The Pathogenesis Plasmodium falciparum Malaria in Human. *Blood*. 117: 381-392.
- Carter, Mendis, Miller, Molineaux, Saul. 2000. Malaria Transmission Blocking Vaccine: How Can Their Development be Supported. Amerika: Nature America Inc.
- Coffman L., Sher A., and Seder A. 2010. Vaccine Adjuvant: Putting Innate Immunity to Work. Elsevier Inc. *Immunity*, 33.
- Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao. 2010. Transmission Blocking Vaccine to Control Insect-Borne Disease: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105 (1): 1-12.
- Darnindro, Halim, dan Sujuni. 2010. Studi Retrospektif pada Pasien Malaria Falciparum dengan Komplikasi pada Rumah Sakit Umum Bethesda Serukam Periode Tahun 2007-2008. *Jurnal Kedokteran Indonesia*. Vol. 60 (1).
- Davey, Patrick. 2002. *At a Glance Medicine*. Jakarta: Erlangga.

Departemen Kesehatan RI. 2008. Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia: Gebrak Malaria. Jakarta: Depkes RI

Dhar, R. & Kumar, N. 2003. Role of Mosquito Salivary Glands. *Current Science*, 85 (9).

Dinglasan.2010. New Malaria Vaccine Initiative Aims to Stunt Parasite within Mosquitoes. *Voice of America* [serial online].[www.voanews.com/content/decapua-malaria-vaccine18jan10-81960557/152890.html](http://www.voanews.com/content/decapua-malaria-vaccine18jan10-81960557/152890.html). [17 Januari 2010].

Donovan, Messmore, Scrafford, Lacks, Kamhawi, McDowell. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection Against Infection with Malaria Parasite. *Amerika: American Society for Microbiology*. Vol 75 (5): 2523-2530.

Fauci, A.S., Kasper, D.I., Braunwald, E., Hauser, S.L., Jameson J.L., Loscalzo, J.L. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 17th Edition. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Fontaine, Diouf, Bakkali, Misse, Pages, dan Fusai. 2011. Implication of Haematophagous Salivary Proteins in Host-vector Interactions. *Parasites & Vectors*, 4: 1-17.

Fujioka H dan Aikawa M. 2005. *The Malaria Parasite and its Life Cycle in Malaria Molekular and Clinical Aspect*. Editor Mats Wahlgren and Peter Perlmann. Harwood academic publisher, Australia, p: 18-55.

Harijanto, P.N. 2000. *Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, dan Penanganan*. Jakarta: EGC.

Harijanto, P.N., Nugroho, A., Gunawan, C.A. 2010. *Malaria: dari Molekuler ke Klinis*. Jakarta: EGC.

Harijanto, Paul N dalam PAPDI. 2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi IV*. Jakarta: FK UI.

Harmendo. 2008. *Faktor Risiko Kejadian Malaria di Wilayah Kerja Puskesmas Kenanga Kecamatan Sungailiat Kabupaten Bangka Propinsi Kepulauan Bangka Belitung*. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.

Hiswani. 2004. *Gambaran Penyakit dan Vektor Malaria di Indonesia*. Sumatera Utara: USU digitized library.

Ideham, Bariah dan Pusarawati, Suhintam. 2009. *Buku Penuntun Praktis Parasitologi Kedokteran Edisi II*. Surabaya: Airlangga University Press.

Invivogen. 2011. Vaccine Adjuvant Review. [www.invivogen.com](http://www.invivogen.com).

James A.A. 2003. Blocking Malaria Parasite Invasion of Mosquito Salivary Glands. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206 (21): 3817-3821.

Kemendes RI. 2011. Buletin Malaria: Epidemiologi Malaria di Indonesia, Triwulan I, p 1-17.

Latief, Napitupulu, Pudjadi, Ghazali, Putra. 2005. Ilmu Kesehatan Anak. Jakarta: Infomedika.

Lindblad, Erik B. 2004. Aluminium Compound for use in Vaccines. New Jersey: Human Press Inc.

Malaguarnera L. and Musumeci S. 2002. The Immune Response to Plasmodium falciparum Malaria. *The Lancet Infectious Diseases*. 2: 472-478.

Marsetyawan. 2011. Basic Immunology of Vaccine. Yogyakarta: UGM.

Moll Kristern. 2008. Freezing and Thawing of Asexual Plasmodium spp; Methods in Malaria Research 5th Edition. Stockholm, Sweden: Microbiology and Tumor Biology Center (MTC). Karolinska Institutet and Swedish Institute for Infectious Disease Control. Hal. 33-34.

Moorthy, V.S., Good, M.F., dan Hill, A.V. 2004. Malaria Vaccine Developments. *Lancet*, 363, (9403) 150-156.

Ngili, Yohanes. 2009. Struktur dan Fungsi Biomolekul. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Nurmaini. 2003. Identifikasi Vektor dan Pengendalian Nyamuk Anopheles aconitus secara Sederhana. Sumatera Utara: FKM bagian kesehatan lingkungan USU.

Prianto L. A, Tjahaya, dan Darwanto. 2006. Atlas Parasitologi Kedokteran. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Revina, Viny. 2012. "Derajat Parasitemia Mencit Galur Balb/c yang Divaksinasi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus Pasca Infeksi Plasmodium berghei." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Program Sarjana Universitas Jember.

Sabbatani S., Florino S., and Manfredi R. 2010. The Emerging of the Fifth Malaria Parasite (Plasmodium knowlesi). A public health concern? *Braz J Infect Dis*. 45: pp. 1-20.

Sharma, S., dan Pathak, S. 2008. Malaria Vaccine: A Current Perspective. *Journal Vector Borne Disease*. Vol 45: 1-20.

Solso, Robert dan MacLin, Kimberly. 2007. *Experimental Psychology: A Case Approach*. Amerika: Pearson.

Soraya, Ina. 2012. "Derajat Parasitemia Mencit Balb/c Pasca Injeksi Kelenjar Saliva Anopheles aconitus sebagai Model Transmission Blocking Vaccine (TBV) terhadap Malaria." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Program Sarjana Universitas Jember.

Thermo Scientific. 2011. *Traditional Methods of Cell Lysis*. USA: Thermo Fisher Scientific Ink.

Titus, R.G., Bishop, J.V., dan Meija, S. 2006. The Immunomodulatory Factor of Arthropoda Saliva and The Potential for these Factor to Serve as Vaccine Target to Prevent Pathogen Transmission. *Parasite Immunology*. Vol 28 (4): 131-141.

Wahab, Samik dan Julia, Madarina. 2002. *Sistem Imun, Imunisasi, dan Penyakit Imun*. Jakarta: Widya medika.

World Health Organisation. 2000. *Malaria Transmission Blocking Vaccines: an Ideal Public Good*. Amerika: WHO Press.

World Health Organisation. 2011. *World Malaria Report 2011*. Amerika: WHO Press.

## LAMPIRAN A. DOKUMENTASI KEGIATAN



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

## Keterangan:

- (a) Isolasi kelenjar saliva *Anopheles maculatus*
- (b) Preparasi vaksin, homogenisasi dengan mikropistil
- (c) Preparasi vaksin, homogenisasi dengan water sonicator
- (d) Injeksi vaksin secara subkutan
- (e) Inokulasi *Plasmodium berghei*
- (f) Pengecatan preparat hapusan darah

## LAMPIRAN B. HASIL UJI STATISTIK

## Oneway Anova

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Hari ke-2	Kontrol	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Supernatan	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Pellet	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Total	9	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
Hari ke-3	Kontrol	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Supernatan	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Pellet	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
	Total	9	,0000	,00000	,00000	,0000	,00	,00	
Hari ke-4	Kontrol	3	,1667	,28868	,16667	-,5504	,8838	,00	,50
	Supernatan	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Pellet	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total	9	,0556	,16667	,05556	-,0726	,1837	,00	,50
Hari ke-5	Kontrol	3	,5000	,78102	,45092	-1,4402	2,4402	,00	1,40
	Supernatan	3	,0667	,05774	,03333	-,0768	,2101	,00	,10
	Pellet	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	Total	9	,1889	,45674	,15225	-,1622	,5400	,00	1,40

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hari ke-2	Between Groups	,000	2	,000		
	Within Groups	,000	6	,000		
	Total	,000	8			
Hari ke-3	Between Groups	,000	2	,000		
	Within Groups	,000	6	,000		
	Total	,000	8			
Hari ke-4	Between Groups	,056	2	,028	1,000	,422
	Within Groups	,167	6	,028		
	Total	,222	8			
Hari ke-5	Between Groups	,442	2	,221	1,082	,397
	Within Groups	1,227	6	,204		
	Total	1,669	8			

## Oneway Anova

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hari ke-6	Kontrol	3	1,167	1,848	1,067	-3,423	5,756	,10	3,30
	Supematan	3	,217	,293	,169	-,511	,944	,00	,55
	Pellet	3	,167	,058	,033	,023	,310	,10	,20
	Total	9	,517	1,055	,352	-,295	1,328	,00	3,30
Hari ke-7	Kontrol	3	4,250	6,928	4,000	-12,961	21,461	,20	12,25
	Supematan	3	2,350	3,150	1,819	-5,475	10,175	,10	5,95
	Pellet	3	,233	,058	,033	,090	,377	,20	,30
	Total	9	2,278	4,185	1,395	-,939	5,494	,10	12,25
Hari ke-8	Kontrol	3	6,250	8,710	5,029	-15,386	27,886	,90	16,30
	Supematan	3	3,383	3,705	2,139	-5,820	12,587	,10	7,40
	Pellet	3	,267	,058	,033	,123	,410	,20	,30
	Total	9	3,300	5,396	1,799	-,847	7,447	,10	16,30
Hari ke-9	Kontrol	3	9,117	7,184	4,148	-8,729	26,962	3,85	17,30
	Supematan	3	5,783	4,073	2,352	-4,335	15,902	1,10	8,50
	Pellet	3	,367	,115	,067	,080	,654	,30	,50
	Total	9	5,089	5,628	1,876	,762	9,415	,30	17,30
Hari ke-10	Kontrol	3	15,253	4,692	2,709	3,598	26,909	11,46	20,50
	Supematan	3	9,617	3,534	2,040	,837	18,396	5,60	12,25
	Pellet	3	,567	,115	,067	,280	,854	,50	,70
	Total	9	8,479	7,057	2,352	3,054	13,903	,50	20,50

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hari ke-6	Between Groups	1,905	2	,953	,816	,486
	Within Groups	7,005	6	1,168		
	Total	8,910	8			
Hari ke-7	Between Groups	24,224	2	12,112	,627	,566
	Within Groups	115,857	6	19,309		
	Total	140,081	8			
Hari ke-8	Between Groups	53,732	2	26,866	,900	,455
	Within Groups	179,173	6	29,862		
	Total	232,905	8			
Hari ke-9	Between Groups	117,014	2	58,507	2,573	,156
	Within Groups	136,420	6	22,737		
	Total	253,434	8			
Hari ke-10	Between Groups	329,373	2	164,686	14,313	,005
	Within Groups	69,037	6	11,506		
	Total	398,410	8			



### Uji Lanjutan HSD-Tukey

#### Multiple Comparisons

##### Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Hari ke-4	Kontrol	Supernatan	,167	,136	,483	-,251	,584
		Pellet	,167	,136	,483	-,251	,584
	Supernatan	Kontrol	-,167	,136	,483	-,584	,251
		Pellet	,000	,136	1,000	-,418	,418
	Pellet	Kontrol	-,167	,136	,483	-,584	,251
		Supernatan	,000	,136	1,000	-,418	,418
Hari ke-5	Kontrol	Supernatan	,433	,369	,509	-,699	1,566
		Pellet	,500	,369	,420	-,633	1,633
	Supernatan	Kontrol	-,433	,369	,509	-1,566	,699
		Pellet	,067	,369	,982	-1,066	1,199
	Pellet	Kontrol	-,500	,369	,420	-1,633	,633
		Supernatan	-,067	,369	,982	-1,199	1,066



## Multiple Comparisons

## Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Hari ke-6	Kontrol	Supernatan	,950	,882	,561	-1,757	3,657
		Pellet	1,000	,882	,530	-1,707	3,707
	Supernatan	Kontrol	-,950	,882	,561	-3,657	1,757
		Pellet	,050	,882	,998	-2,657	2,757
	Pellet	Kontrol	-1,000	,882	,530	-3,707	1,707
		Supernatan	-,050	,882	,998	-2,757	2,657
Hari ke-7	Kontrol	Supernatan	1,900	3,588	,860	-9,109	12,909
		Pellet	4,017	3,588	,538	-6,992	15,025
	Supernatan	Kontrol	-1,900	3,588	,860	-12,909	9,109
		Pellet	2,117	3,588	,830	-8,892	13,125
	Pellet	Kontrol	-4,017	3,588	,538	-15,025	6,992
		Supernatan	-2,117	3,588	,830	-13,125	8,892
Hari ke-8	Kontrol	Supernatan	2,867	4,462	,803	-10,824	16,557
		Pellet	5,983	4,462	,426	-7,707	19,674
	Supernatan	Kontrol	-2,867	4,462	,803	-16,557	10,824
		Pellet	3,117	4,462	,773	-10,574	16,807
	Pellet	Kontrol	-5,983	4,462	,426	-19,674	7,707
		Supernatan	-3,117	4,462	,773	-16,807	10,574
Hari ke-9	Kontrol	Supernatan	3,333	3,893	,685	-8,612	15,279
		Pellet	8,750	3,893	,141	-3,196	20,696
	Supernatan	Kontrol	-3,333	3,893	,685	-15,279	8,612
		Pellet	5,417	3,893	,403	-6,529	17,362
	Pellet	Kontrol	-8,750	3,893	,141	-20,696	3,196
		Supernatan	-5,417	3,893	,403	-17,362	6,529
Hari ke-10	Kontrol	Supernatan	5,637	2,770	,185	-2,861	14,135
		Pellet	14,687*	2,770	,004	6,189	23,185
	Supernatan	Kontrol	-5,637	2,770	,185	-14,135	2,861
		Pellet	9,050*	2,770	,039	,552	17,548
	Pellet	Kontrol	-14,687*	2,770	,004	-23,185	-6,189
		Supernatan	-9,050*	2,770	,039	-17,548	-,552

\*. The mean difference is significant at the .05 level.