



**ANALISIS RESPON IMUN MANUSIA TERHADAP
EKSTRAK PROTEIN KELENJAR SALIVA *Anopheles sudaicus*
DARI WILAYAH ENDEMIK MALARIA**

SKRIPSI

Oleh
Moh. Mirza Nuryady
NIM. 101810401048

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**ANALISIS RESPON IMUN MANUSIA TERHADAP
EKSTRAK PROTEIN KELENJAR SALIVA *Anopheles sundaicus*
DARI WILAYAH ENDEMIK MALARIA**

SKRIPSI

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

oleh

**Moh. Mirza Nuryady
NIM. 101810401048**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua tercinta yang telah memberikan kasih sayang, do'a restu dan pengorbanan yang tiada henti;
2. semua keluarga besar dan teman-teman yang telah mendukung dan memberi motivasi dalam menempuh pendidikan;
3. semua guru dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan mengajarku, terima kasih yang tak terhingga atas segala ilmu yang diberikan;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“dan perumpamaan-perumpamaan ini Kami buat untuk manusia; dan tiada yang memahaminya kecuali orang-orang yang berilmu”
(terjemahan Surat *Al-Ankabut* ayat 43)¹⁾

“Orang berilmu dan beradab tidak akan diam di kampung halaman. Tinggalkanlah negerimu dan merantaulah ke negeri orang. Merantaulah, kau akan dapatkan pengganti dari kerabat dan kawan. Berlelah-lelahlah, manisnya hidup terasa setelah lelah berjuang”
(Imam safi’i)²⁾

¹⁾Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur’an Cordoba Tajwid dan Terjemaahannya (Al-Qur’an Tafsir Bil Hadis)*. Bandung: Cordoba International-Indonesia.

²⁾Imam Safi’i.2002.*Kata-Kata Mutiara*. Kompas Gramedia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Moh. Mirza Nuryady

NIM : 101810401048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Respon Imun Manusia Terhadap Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Dari Wilayah Endemik Malaria” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian berjudul “Karakterisasi dan Identifikasi Protein Immunogenik Kelenjar Saliva Nyamuk *Anopheles maculatus* dan *Anopheles sundaicus* yang berperan dalam Transmisi Malaria” dan dibiayai program Hibah Riset dan Teknologi DIKTI atas nama Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 10 April 2015

Yang menyatakan,

Moh. Mirza Nuryady
NIM. 101810401048

SKRIPSI

**ANALISIS RESPON IMUN MANUSIA TERHADAP
EKSTRAK PROTEIN KELENJAR SALIVA *Anopheles sundaicus*
DARI WILAYAH ENDEMIK MALARIA**

Oleh

Moh. Mirza Nuryady
101810401048

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Sri Mumpuni WahyuWidajati S.Pd., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Respon Imun Manusia Terhadap Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Dari Wilayah Endemik Malaria” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Jum’at, 10 April 2015

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Dr.rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si
NIP 197509132000032001

Sri Mumpuni WahyuWidajati, S.Pd., M.Si
NIP 197105101999032002

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd
NIP 195805281988021002

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno DEA., Ph.D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Analisis Respon Imun Manusia Terhadap Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Dari Wilayah Endemik Malaria ; Moh. Mirza Nuryady, 101810401048; 2015: 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium* dan nyamuk *Anopheles* sebagai vektornya. Penularan malaria dimulai ketika nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium* menghisap darah manusia sehat. Nyamuk akan melepaskan komponen saliva ke dalam tubuh inangnya. Saliva nyamuk mengandung komponen-komponen yang dapat mempengaruhi hemostasis inang yaitu, vasomodulator dan immunomodulator. Faktor immunomodulator bersifat immunosupresif yang mampu menekan sistem imun nonspesifik inang sehingga memodulasi perubahan dari T *helper* 1 (Th1) ke arah T *helper* 2 (Th2), ditandai dengan peningkatan Interleukin-10 (IL-10), yang mempengaruhi sel B akhirnya membentuk antibodi spesifik seperti IgM dan IgG.

Penelitian ini menggunakan kelenjar saliva *An. sundaicus* yang diambil dari Desa Bangsring, Banyuwangi. Tujuan penelitian untuk mengetahui respon imun inang terhadap ekstrak protein kelenjar saliva (EPKS) *An. Sundaicus*. Metode yang digunakan antara lain 1) preparasi serum darah, 2) ekstrak kelenjar saliva, 3) Kultur PBMC dan 4) Analisis ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan paparan *An. sundaicus* mampu menginduksi tingginya kadar IgG. Kadar IgG anti protein saliva *An. sundaicus* lebih tinggi dibandingkan kadar IgG anti protein saliva *Ae. aegypti*. Lebih lanjut, kelompok umur 11-40 tahun memiliki kadar IgG tertinggi dibandingkan kelompok umur lainnya. Adanya modulasi respon imun dari Th1 menjadi Th2 yang ditunjukkan dengan penurunan kadar IFN- γ dan peningkatan kadar IL-10 membuktikan EPKS *An. sundaicus* dapat memodulasi perubahan jalur respon imun inang.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul: “Analisis Respon Imun Manusia Terhadap Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Dari Wilayah Endemik Malaria”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. dan Sri Mumpuni Wahyu Widajati S.Pd., M.Si. selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, saran dan motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd. dan Dra. Mahriani, M.Si. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. dr. Yunita Armiyanti, M. Kes., selaku dosen pembimbing proyek yang telah banyak memberikan masukan dan saran selama penelitian;
4. Dr. Sabine Specht selaku supervisor di Lab. IMMIP-UKB, Jerman dan Prof. Wolfgang Nellen selaku ketua konsorsium IGN-TTRC, terimakasih atas kesempatan untuk melaksanakan sebagian penelitian ini di Jerman;
5. bapak Fuad, ibu Hari dan bapak Kahar selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan;
6. bapak dan ibu dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati berbagi ilmu dan membantu penulis selama masa perkuliahan;

7. ayahanda Adi Mulyono, Ibunda Nurhayati, kakak Nizar Adi N, adik Roni yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, dukungan moril, materiil serta do'a tulus;
8. sahabat-sahabatku Renam, Riya, Laura, Nana, Bagus, Lani dan Zahra yang selama ini telah memberikan semangat, teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2010, serta saudaraku di Kontrakan M-15 terima kasih atas kebersamaan, persaudaraan, dan tempat berbagi suka dan duka;
9. rekan kerja seperjuangan Renam, Elisa, Washil, Ajeng, Novanda, pak Sugeng, pak Gora, bu Yanti, bu Titin dan pak Mahful, teman-teman lab. mikro, lab. entomologi dan lab. biomol tumbuhan terima kasih atas kerja sama, dukungan serta bantuan yang diberikan selama penelitian;
10. kakak-kakak seperjuangan mbak Esti, mbak Riskha, mas Wathon, mas Imam, mbak Ika, mas Arif, mbak Madaniyah, mbak Dewi, mbak Rofi'atul, pak Ali, dan adik-adik seperjuangan Zakiya, Dewi, Bella, Izzay, Amatullah dan Suci yang selalu memberikan dukungan dan semangatnya;
11. staf dan peneliti di IMMIP Uniklinikum Bonn, Germany, staf B₂P₂VRP Salatiga, teknisi Lab. Biosains Poltek Jember, teknisi Lab. Biomol Fakultas Kedokteran, teknisi Lab. Biokimia Farmasi dan teknisi Lab. Biologi Dasar, Mikrobiologi serta Zoologi FMIPA Universitas Jember yang telah meluangkan waktu dan tenaganya dalam mendukung lancarnya proses penelitian;
12. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat.

Jember, 10 April 2015

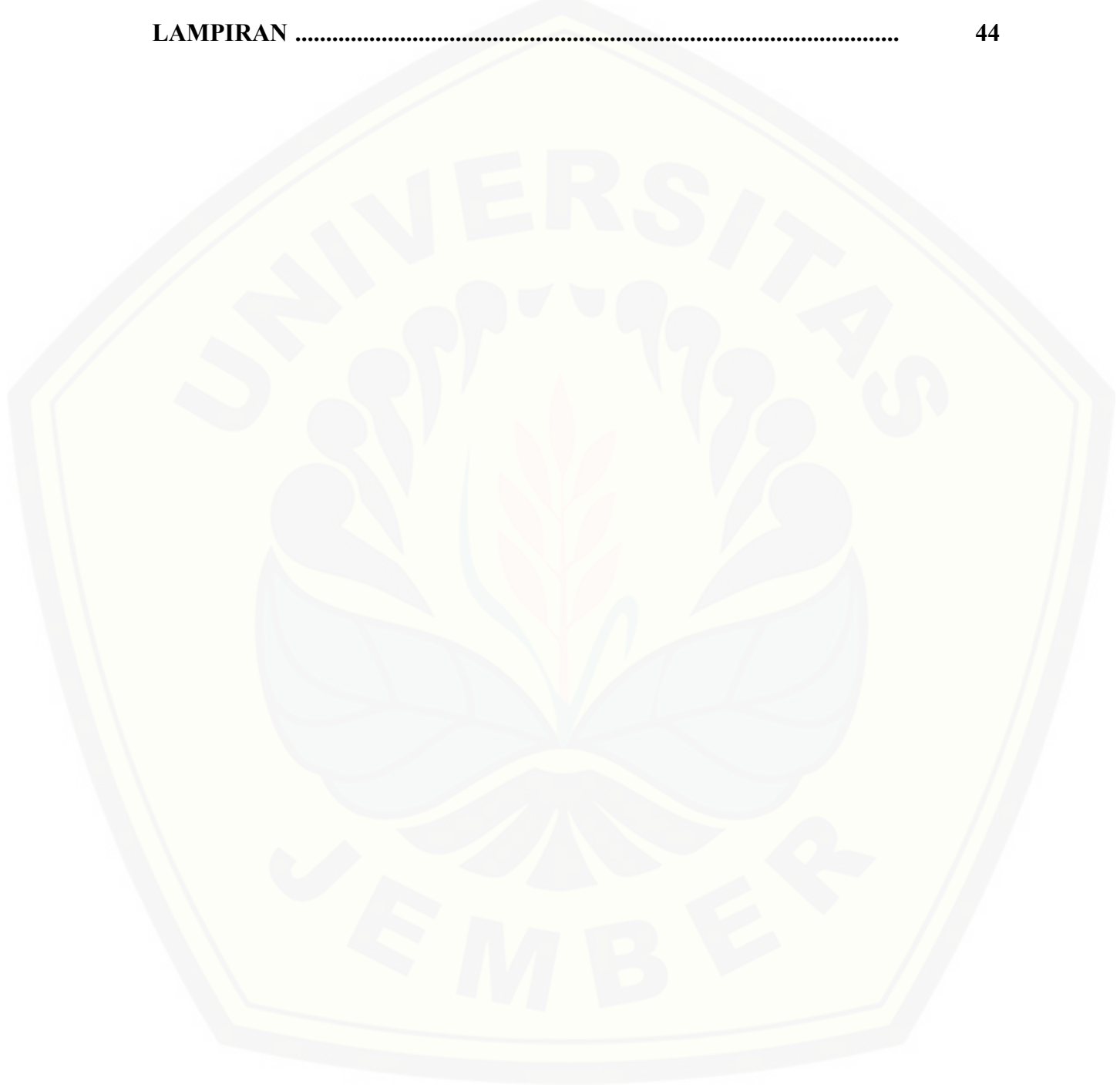
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Penelitian	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Epidemiologi Malaria di Indonesia	5
2.2 <i>Plasmodium</i> Penyebab Malaria dan Siklus Hidupnya	6
2.3 Penyebaran Spesies <i>Anopheles</i> yang Menjadi Vektor Malaria di Indonesia	8
2.4 Klasifikasi Nyamuk <i>An. sundaicus</i>	10
2.5 Siklus Hidup dan Habitat <i>An. sundaicus</i>	11

2.6	Desa Bangsring sebagai Wilayah Endemik Malaria	12
2.7	Respon Imun Inang Terhadap Saliva Nyamuk	13
2.8	Deteksi dan Pengukuran Antibodi Antiprotein Saliva Nyamuk <i>Anopheles</i>	14
BAB 3.	METODE PENELITIAN	16
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2	Alat dan Bahan	16
3.3	Prosedur Penelitian	17
3.3.1	<i>Landing collection</i> dan <i>Rearing An. sundaicus</i>	17
3.3.2	Isolasi Kelenjar Saliva <i>An. sundaicus</i>	18
3.3.3	Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva <i>An. sundaicus</i>	18
3.3.4	Preparasi Serum Darah	19
3.3.5	Isolasi <i>Pheripheral Blood Mononuclear Cell</i> (PBMC)	19
3.3.6	Kultur <i>Pheripheral Blood Mononuclear Cell</i> (PBMC)	19
3.3.7	Prosedur <i>ELISA</i> (<i>Enzim Linked Imuno-Sorbent Assay</i>)	20
3.3.8	Analisis Data	21
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1	Hasil Identifikasi Nyamuk <i>An.sundaicus</i>	22
4.2	Isolasi Kelenjar Saliva <i>An. sundaicus</i>	24
4.3	Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) <i>An. sundaicus</i> ...	24
4.4	Pengukuran IgG Terhadap Antigen EPKS Nyamuk	25
4.5	Pengukuran Kadar IgG Terhadap EPKS Berdasarkan Umur	27
4.6	Pengukuran Kadar Sitokin IFN- γ dan IL-10 Secara <i>in vitro</i>	31
BAB 5.	PENUTUP	36
5.1	Kesimpulan	36

5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	44



DAFTAR TABEL

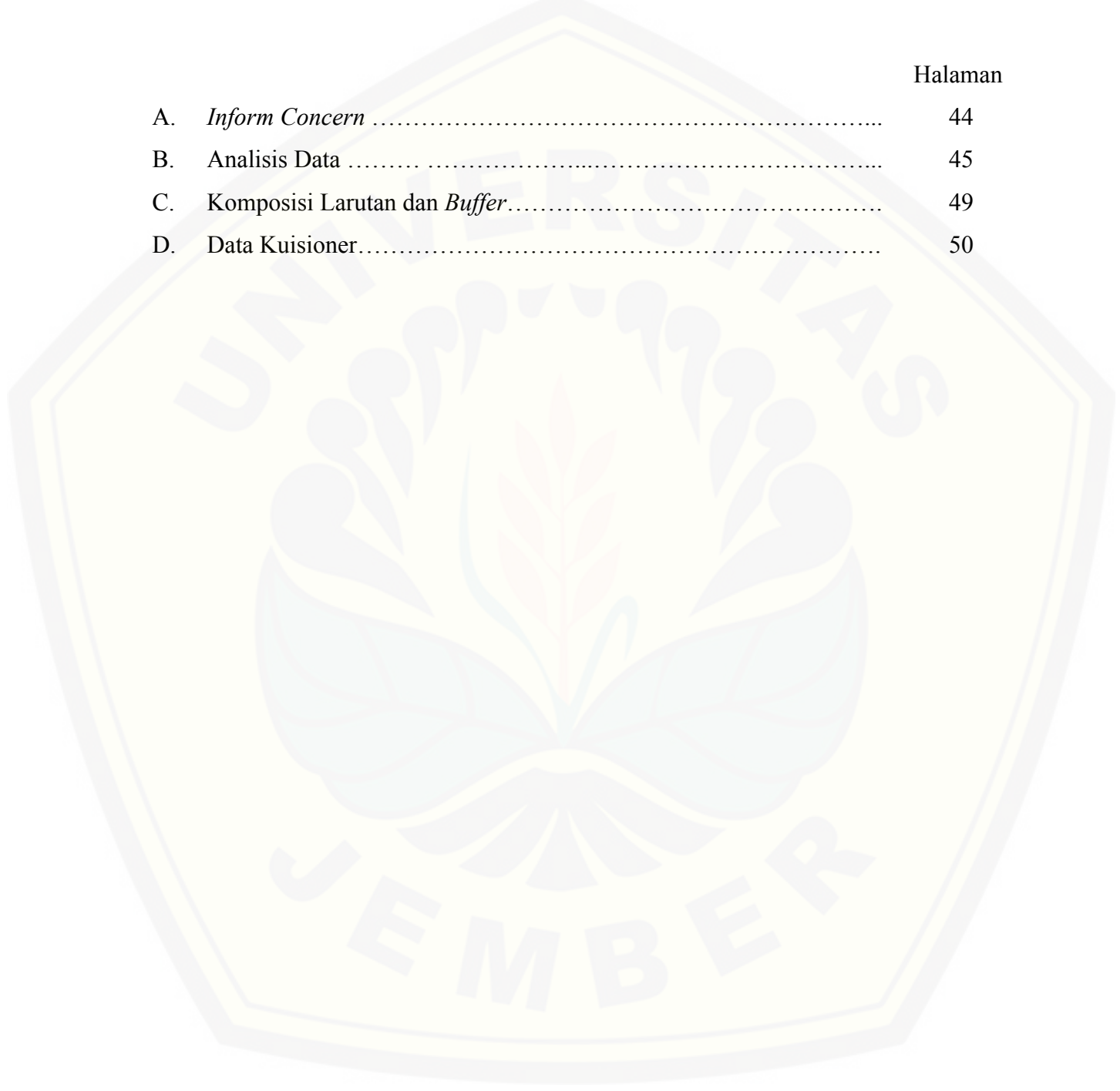
	Halaman
4.1 Rata-rata Kadar IgG anti protein Saliva Berdasarkan Antigen.....	26
4.2 Rata-rata Kadar IgG anti protein Saliva Berdasarkan Umur.....	28
4.3 Rata-rata Kadar IFN- γ dan IL-10 Terhadap EPKS <i>An. sundaicus</i>	31

DAFTAR GAMBAR

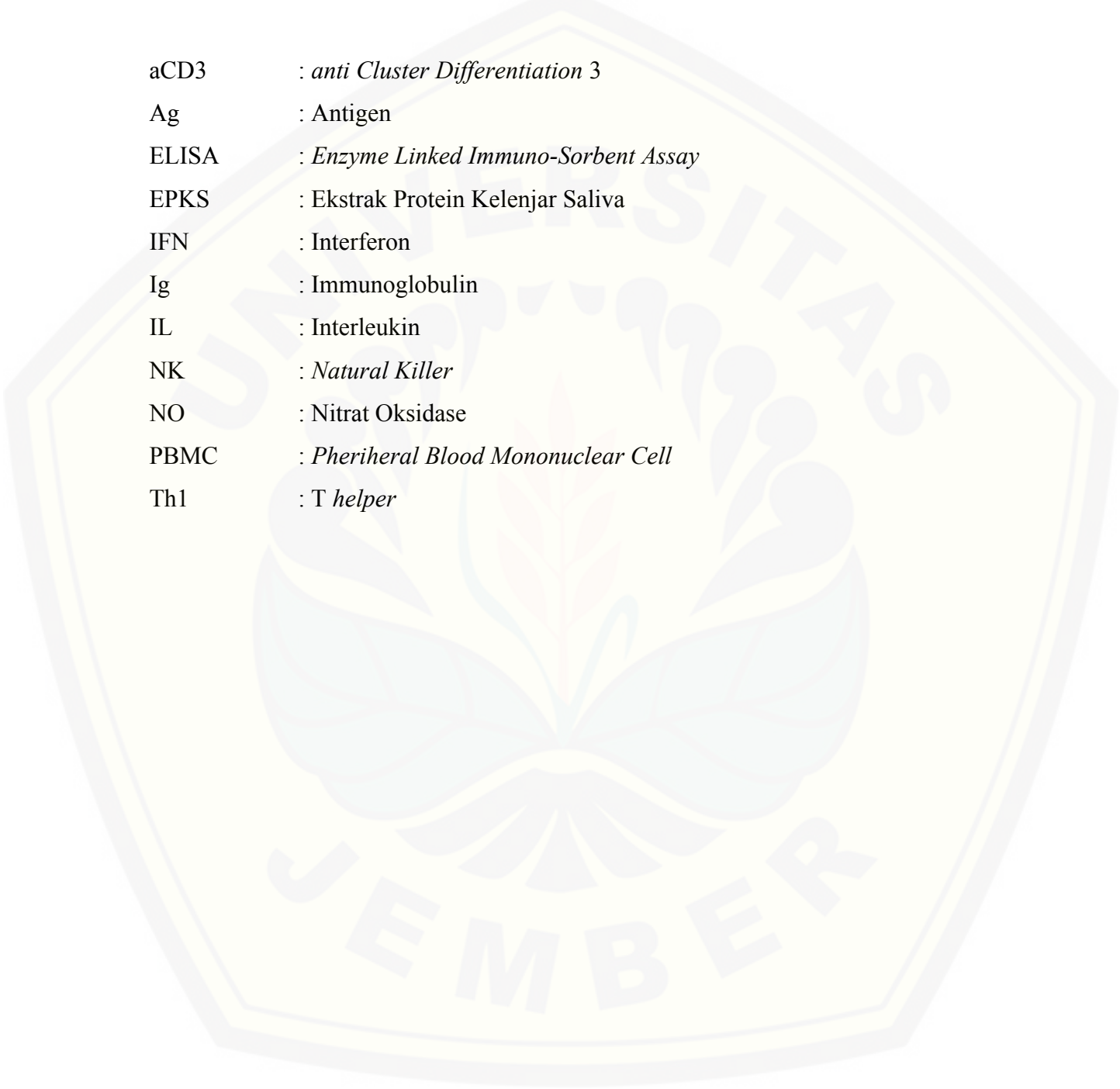
	Halaman
2.1 Peta stratifikasi kasus malaria di Indonesia 2009 berdasarkan API (<i>Annual Parasite Indeks</i>)	6
2.2 Siklus hidup <i>Plasmodium</i>	8
2.3 Peta Penyebaran Vektor Malaria di Indonesia.....	9
2.4 Peta penyebaran <i>An. sundaicus</i> di Indonesia	12
4.1 Perbedaan morfologi nyamuk jantan dan betina.....	22
4.2 Morfologi sayap nyamuk <i>An. sundaicus</i> betina.....	23
4.3 Kelenjar saliva <i>Anopheles</i> betina.....	24
4.4 Grafik Kadar IgG berdasarkan antigen protein saliva.....	27
4.5 Hasil pengukuran IgG berdasarkan pengelompokan umur.....	29
4.6 Kadar sitokin IFN- γ dan IL-10 pada kultur PBMC <i>in vitro</i> yang diinkubasi dengan EPKS <i>An. sundaicus</i> selama 24 jam.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. <i>Inform Concern</i>	44
B. Analisis Data	45
C. Komposisi Larutan dan <i>Buffer</i>	49
D. Data Kuisisioner.....	50



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN



aCD3	: <i>anti Cluster Differentiation 3</i>
Ag	: Antigen
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EPKS	: Ekstrak Protein Kelenjar Saliva
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobulin
IL	: Interleukin
NK	: <i>Natural Killer</i>
NO	: Nitrat Oksidase
PBMC	: <i>Pheriheral Blood Mononuclear Cell</i>
Th1	: <i>T helper</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria adalah penyakit infeksi menular yang mendapatkan perhatian serius di seluruh dunia. *World Health Organisation* memperkirakan 3,4 miliar orang secara global beresiko terinfeksi malaria. Kasus malaria pada tahun 2012 mencapai 207 juta kasus, dengan jumlah kematian sekitar 627 ribu orang. Kasus malaria tertinggi terjadi di Afrika dengan jumlah kematian mencapai 90% dan 77% dari korban meninggal merupakan anak usia dibawah 5 tahun (WHO, 2013). Indonesia merupakan salah satu negara endemik malaria, diperkirakan sekitar 70 juta atau 35% dari jumlah penduduk Indonesia beresiko tertular malaria, meskipun telah dilakukan program pemberantasan malaria sejak tahun 1959 (Wigati *et al.*, 2010).

Kabupaten Banyuwangi merupakan salah satu daerah endemik malaria di Jawa Timur. Pada tahun 2010 terdapat 1.474.404 penduduk yang beresiko tertular malaria dengan API (*Annual Parasite Incidence*) mencapai 0,07%. Pada tahun 2008, 2010 dan 2011 terjadi Kejadian Luar Biasa (KLB) malaria di Desa Bangsring, Banyuwangi (Dinkes Jatim, 2012). Pada tahun 2012 kasus kejadian malaria di Desa ini menurun (Anonim, 2012).

Nyamuk *Anopheles* merupakan vektor protozoa parasit penyebab Malaria yaitu dari genus *Plasmodium*. Terdapat 5 spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia yaitu, *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi* (Harijanto, 2010; Sabbatani *et al.*, 2010). Terdapat sekitar 424 spesies nyamuk *Anopheles* di dunia, namun hanya 70 spesies yang dapat menjadi vektor malaria (WHO, 2007). Di Indonesia khususnya di Pulau Jawa terdapat 3 spesies vektor utama yaitu, *Anopheles (An.) aconitus*, *An. maculatus* dan *An. sundaicus* (Stoops *et al.*, 2009). *An. sundaicus* merupakan vektor utama malaria di

pesisir pantai (Hadi & Koesharto, 2006) dan telah dikonfirmasi sebagai vektor utama malaria di daerah pesisir Desa Bangsring, Banyuwangi (Shinta *et al.*, 2003).

Penularan malaria dimulai ketika nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium* (fase sporozoit) menghisap darah manusia. Masuknya *Plasmodium* ke dalam tubuh manusia didukung oleh adanya aktivitas komponen saliva, yang dikeluarkan oleh nyamuk saat proses menghisap darah (Fontaine *et al.*, 2011). Saliva nyamuk mengandung komponen-komponen yang dapat mempengaruhi hemostasis inang antara lain vasomodulator dan immunomodulator (Lavazec *et al.*, 2007). Faktor vasomodulator dapat memanipulasi mekanisme hemostasis inang dengan cara mencegah vasokonstriksi, mencegah aktivasi dan agregasi platelet serta menghambat penggumpalan darah. Faktor immunomodulator bersifat immunosupresif yang mampu menekan sistem imun nonspesifik inang sehingga memodulasi perubahan dari T *helper* 1 (Th1) ke arah T *helper* 2 (Th2) (Titus *et al.*, 2006). Perubahan respon imun tersebut ditandai dengan penurunan produksi IFN- γ dan peningkatan Interleukin-4 (IL4), sehingga IL4 akan mempengaruhi proliferasi Sel B yang akhirnya membentuk antibodi humoral. Antibodi tersebut spesifik terhadap protein saliva. Oleh karena itu apabila di dalam saliva terdapat parasit, maka dengan mudah masuk ke dalam tubuh inang melalui gigitan nyamuk (Donovan *et al.*, 2007).

Gigitan nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium*, dapat menularkan penyakit malaria. Sebaliknya paparan berulang terhadap gigitan nyamuk yang steril dapat memberikan efek proteksi. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Morris *et al.* (2001) injeksi komponen saliva dengan dosis yang rendah mampu meningkatkan transmisi patogen, namun injeksi komponen saliva dengan dosis yang tinggi akan memberikan efek proteksi. Hal ini menjelaskan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik dan sering terpapar gigitan vektor akan memberikan efek proteksi terhadap patogen. Paparan berulang menyebabkan perubahan respon imun seperti keadaan semula, yaitu pengaktifan makrofag dan produksi Nitrat Oksidase (NO) sehingga dapat efektif membunuh parasit (Donovan *et al.*, 2007). Selain memberikan efek proteksi, inang juga akan membentuk antibodi terhadap protein saliva pada saat

terjadi paparan berulang berupa IgG (Fontaine *et al.*, 2011). Pengukuran kadar antibodi anti protein saliva (IgG) dapat dijadikan *biomarker* adanya paparan gigitan nyamuk *Anopheles*. Di Indonesia khususnya daerah endemik Bangsring, Banyuwangi belum pernah dilakukan analisis respon imun terhadap paparan protein saliva. Analisis respon imun inang terhadap protein kelenjar saliva *An. sundaicus* merupakan langkah yang penting untuk mengetahui keterkaitan antara paparan nyamuk dengan pembentukan antibodi spesifik yang dapat dijadikan sebagai *biomarker* adanya paparan. Lebih jauh lagi keterkaitan antara antibodi spesifik yang terbentuk dengan pengaruh protein saliva yang mampu memodulasi respon imun inang dengan menganalisis produksi sitokinnya.

1.2 Rumusan Masalah

Penelitian ini akan menjawab beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana kadar respon imun spesifik (IgG) berdasarkan antigen Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS)?
2. Bagaimana kadar respon imun spesifik (IgG) berdasarkan umur pada penduduk daerah endemik malaria terhadap Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *An. sundaicus*?
3. Apakah pemberian EPKS *An. sundaicus* pada kultur PBMC *in vitro* mampu merubah jalur respon imun dari Th1 menjadi Th2, dengan mengamati peningkatan kadar IL-10 dan penurunan IFN- γ ?

1.3 Batasan Penelitian

Respon imun spesifik yang diamati adalah kadar Immunoglobulin G (IgG) dari serum penduduk yang tinggal di wilayah endemik malaria terhadap EPKS dari spesies vektor dominan setempat yaitu *An. sundaicus*. Daerah endemik malaria yang dimaksud adalah Desa Bangsring, Kabupaten Banyuwangi. Lebih lanjut lagi, keterkaitan antara pembentukan IgG terhadap EPKS dengan produksi sitokin IFN- γ dan IL-10 diamati secara kuantitatif *in vitro*.

1.4.1 Tujuan Umum Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui respon imun manusia terhadap ekstrak protein kelenjar saliva nyamuk *An. sundaicus*.

1.4.2 Tujuan Khusus Penelitian

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengukur adanya antibodi IgG anti protein saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), lebih jauh lagi dilakukan pengamatan terhadap pengaruh EPKS *An. sundaicus* dalam produksi sitokin IFN- γ dan IL-10 secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

- a. Menambah wawasan keilmuan tentang protein saliva nyamuk yang dapat memicu respon imun inang,
- b. Dapat digunakan sebagai *marker* epidemiologi yang berbasis paparan vektor.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

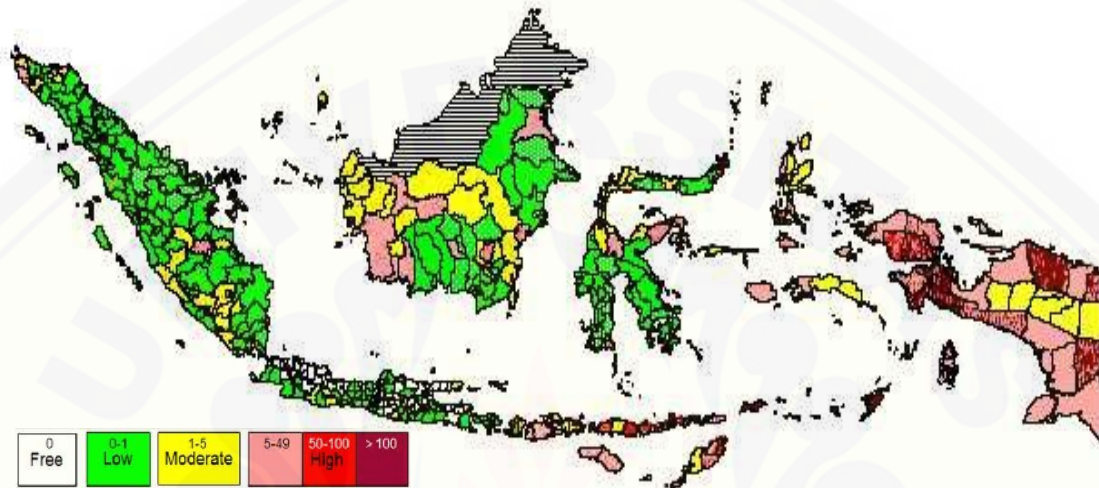
2.1 Epidemiologi Malaria di Indonesia

Penyakit berbasis vektor serangga (*vector-borne diseases*) diketahui masih menjadi kasus yang belum terselesaikan atau disebut *re-emerging disease*, seperti malaria. Malaria merupakan penyakit infeksi parasit dari genus *Plasmodium* yang menginfeksi sel darah merah manusia. Penyakit infeksi tersebut ditransmisikan melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina (Harijanto, 2007). Malaria merupakan salah satu fokus *Millenium Development Goals* (MDGs) yang menargetkan untuk menghentikan penyebaran dan mengurangi insiden malaria pada tahun 2015. Parameter keberhasilan program ini adalah menurunnya angka kesakitan dan kematian akibat malaria (WHO, 2013).

Peningkatan kasus malaria yang terjadi di berbagai daerah menjadi salah satu perhatian utama yang dilakukan oleh pemerintah Indonesia. Menurut data Kementerian Kesehatan RI, Indonesia merupakan negara yang masih tinggi resiko transmisi malaria, karena hingga tahun 2011 terdapat 374 Kabupaten endemik malaria. Jumlah kasus malaria mencapai 256.592 orang dari total 1.322.451 pasien suspek malaria yang diperiksa sediaan darahnya pada tahun 2011. *Annual Parasite Incidence (API)* sebesar 1,75 per seribu penduduk yang berarti setiap 1000 penduduk terdapat 2 orang terkena malaria (Kemenkes RI, 2011).

Penyebaran malaria di Indonesia dikatakan merata dari kawasan Indonesia barat sampai Indonesia timur. Kasus malaria tertinggi di Indonesia terjadi di Indonesia bagian timur seperti NTB, NTT, dan Papua. Pulau Jawa merupakan pulau dengan kepadatan penduduk tertinggi di Indonesia. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2010 menunjukkan angka API di Pulau Jawa dan Bali sejak tahun 2005–2009 cenderung stabil yaitu berkisar antara 0,15%-0,19%. Provinsi di Jawa yang memiliki API tertinggi adalah Provinsi Jawa Timur (0,71%) (Depkes RI, 2010).

Provinsi Jawa Timur memiliki 5 Kabupaten yang dinyatakan sebagai *High Case Incidence* (HCI) yaitu kabupaten Pacitan, Trenggalek, Tulungagung, Sumenep dan Banyuwangi (Yudhiastuti, 2008). Peta stratifikasi malaria di Indonesia berdasarkan API dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Peta Stratifikasi kasus malaria di Indonesia 2009 berdasarkan API (*Annual Parasite Indeks*) (Sumber : Kemenkes RI, 2011)

2.2 *Plasmodium* Penyebab Malaria dan Siklus Hidupnya

Malaria disebabkan oleh protozoa parasit dari genus *Plasmodium*. Terdapat lima spesies *Plasmodium* yang menjadi parasit pada manusia, yaitu : *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi*. Kasus malaria yang paling banyak disebabkan oleh *P. vivax* yang menyebabkan malaria tertiana, sedangkan *P. falciparum* menyebabkan malaria tropika. Kasus malaria yang disebabkan oleh *P. Ovale* dan *P. malariae* jarang ditemukan (Fauci *et al.*, 2008). Kasus malaria yang disebabkan oleh *P. Knowlesi* merupakan kasus baru di wilayah Asia tenggara. *P. Knowlesi* sebenarnya jenis spesies *Plasmodium* yang menginfeksi kera. Spesies ini dapat menginfeksi manusia dikarenakan adanya interaksi manusia dengan inang reservoirnya (Sabbatani *et al.*, 2010).

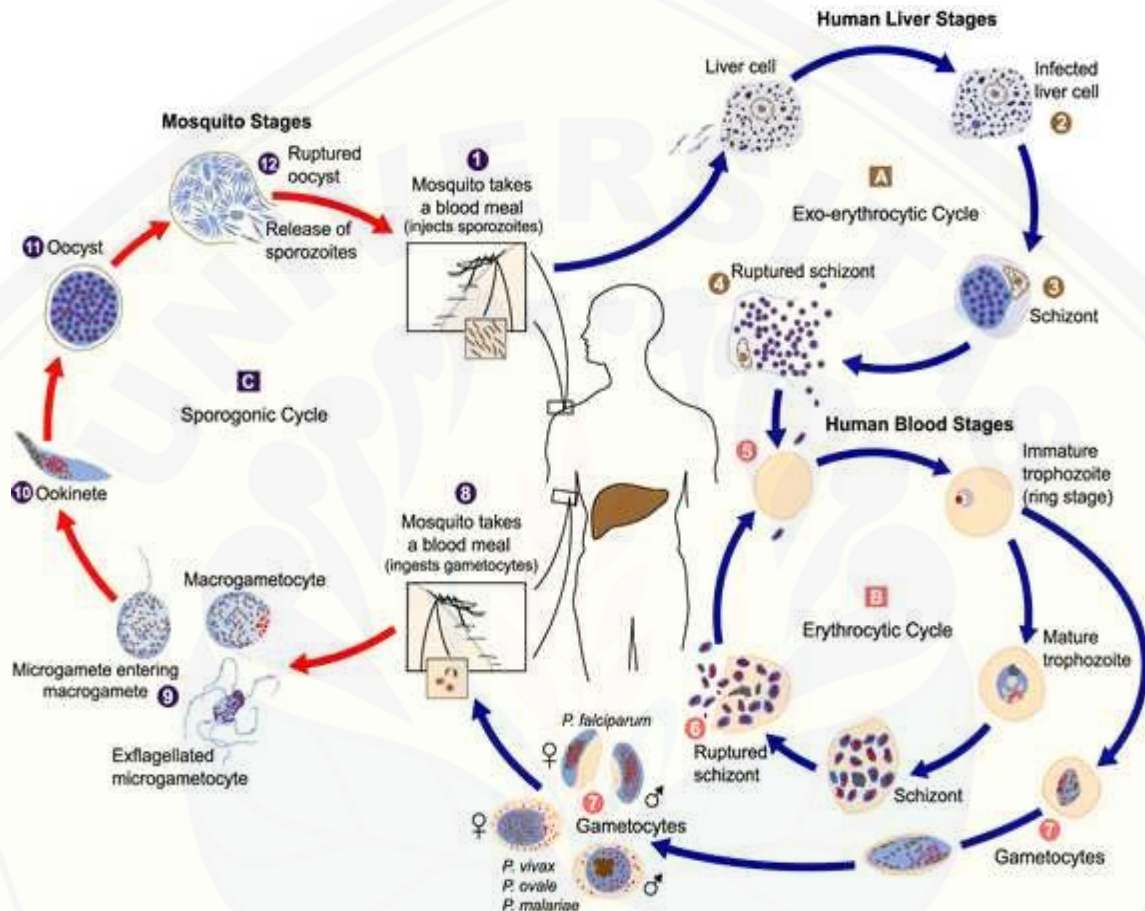
Daur hidup *Plasmodium* terdiri atas dua fase, yaitu fase aseksual (*skizogoni*) dalam tubuh manusia dan fase seksual (*sporogoni*) dalam badan nyamuk. Fase

aseksual terdiri dari dua fase yaitu fase infeksi sel hati (*pre-erythrocytic schizogony*) dan fase eritrosit (*erythrocytic schizogony*) (Harijanto, 2007). Siklus hidup seksual *Plasmodium (Sporogoni)* terjadi pada tubuh nyamuk diawali pada saat nyamuk menghisap darah penderita malaria (mengandung gametosit). Di dalam tubuh *Anopheles* betina gamet jantan akan membuahi gamet betina menjadi zigot yang nantinya akan berkembang menjadi ookinet kemudian menembus dinding lambung nyamuk. Pada dinding luar lambung ookinet akan menjadi ookista. Pada inti ookista akan membelah dan masing-masing inti diliputi oleh protoserum dan mempunyai bentuk memanjang (10-15 mikron) disebut sporozoit. Ookista yang sudah matang akan pecah, selanjutnya ribuan sporozoit akan memasuki kelenjar saliva. Sporozoit ini bersifat infeksius dan akan menjadi sumber baru penularan malaria yang akan ditularkan ke manusia (Harijanto, 2007).

Nyamuk yang terinfeksi parasit apabila menghisap darah manusia sehat maka akan terjadi transmisi patogen. Sporozoit yang terdapat pada kelenjar saliva nyamuk akan berpindah ke dalam aliran darah melewati probosis. Sporozoit menuju hati dan masuk ke dalam sel hati dan menjadi tropozoit hati. Kemudian tropozoit hati akan berkembang menjadi skizon hati (*skizogoni pre-eritrosit*) yang terdiri dari 10.000–30.000 merozoit hati. Siklus ekso-eritrositer ini akan berlangsung selama kurang lebih dua minggu. Pada siklus hidup *P. vivax* dan *P. ovale* sebagian tropozoit hati tidak langsung berkembang menjadi skizon, namun menjadi hipnozoit (bentuk dorman). Hipnozoit dapat tinggal di dalam sel hati selama berbulan-bulan hingga bertahun-tahun (Harijanto, 2007).

Skizon yang matang akan pecah dan melepaskan merozoit yang masuk ke peredaran darah dan menginfeksi eritrosit. Selanjutnya merozoit berubah bentuk menjadi tropozoit dan berkembang menjadi skizon (terdapat 8-30 merozoit, tergantung spesiesnya). Proses perkembangan secara aseksual ini disebut dengan skizogoni. Eritrosit yang telah terinfeksi akan pecah dan merozoit keluar untuk menginfeksi eritrosit lainnya. Siklus ini disebut siklus eritrositer yang terjadi pada eritrosit. Sebagian merozoit yang menginfeksi eritrosit akan membentuk stadium

seksual yaitu bentuk gametosit yang dapat dibedakan sebagai gametosit jantan (mikro gametosit) dan gametosit betina (makro gametosit) (Latief *et al.*, 2005). Gambaran mengenai siklus hidup *Plasmodium* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



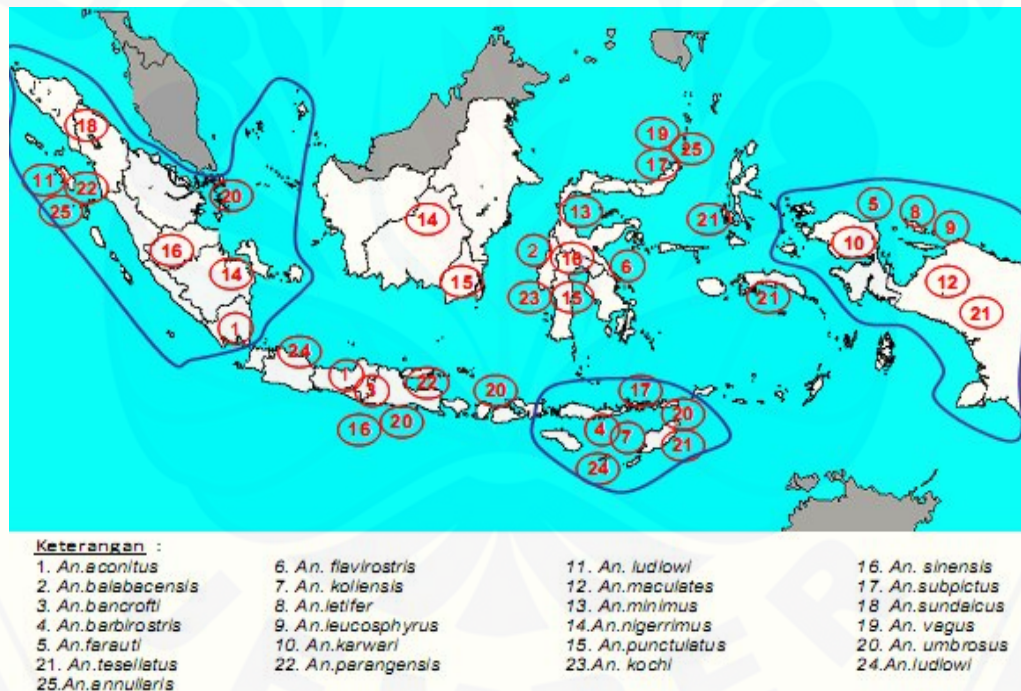
Gambar 2.2 Siklus Hidup *Plasmodium* (Sumber : CDC, 2010)

2.3 Penyebaran Spesies *Anopheles* yang Menjadi Vektor Malaria di Indonesia

Tingginya kasus malaria di Indonesia sangatlah berhubungan dengan banyaknya jenis spesies *Anopheles* yang mampu menjadi vektor malaria. Spesies *Anopheles* yang menjadi vektor utama malaria di seluruh dunia berjumlah sekitar 70 spesies dari total 424 spesies. Di Indonesia telah ditemukan 22 spesies *Anopheles* yang menjadi vektor malaria (Wigati *et al.*, 2010). Jumlah spesies yang menjadi

vektor malaria semakin bertambah melalui kegiatan identifikasi dan penelitian bionomik (WHO, 2007).

Studi bionomik mempelajari tentang penyebaran spesies *Anopheles* yang berpotensi menjadi vektor. Hasil studi bionomik menunjukkan hampir di seluruh Pulau di Indonesia ditemukan vektor malaria. Penyebaran spesies *Anopheles* sangatlah merata, dengan karakteristik pulau yang berbeda-beda menyebabkan adanya perbedaan jenis spesies yang menjadi vektor. Daerah Indonesia bagian barat khususnya Pulau Sumatera ditemukan tiga spesies *Anopheles* yang menjadi vektor malaria yang telah dikonfirmasi yaitu, *An. sudaicus*, *An. subpictus*, dan *An. vagus* (Ariati *et al.*, 2011 ; Sari *et al.*, 2008). Peta penyebaran vector malaria dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Peta Penyebaran Vektor Malaria di Indonesia (Sumber: Kemenkes RI, 2011)

Ditemukan 14 spesies *Anopheles* yang tersebar di Pulau Jawa. Jenis spesies tersebut meliputi, *An. aconitus*, *An. annularis*, *An. barbirostris*, *An. balabacensis*, *An. flavirostris*, *An. maculatus*, *An. kochi*, *An. indefinitus*, *An. minimus*, *An.*

peditaeniatus, *An. subpictus*, *An. vagus*, *An. tessellatus* dan *An. sundaicus* (Barodji *et al.*, 2003). Dari 14 spesies tersebut yang dikonfirmasi sebagai vektor malaria adalah nyamuk dengan populasi yang tinggi dan terdapat sepanjang tahun yaitu *An. aconitus*, *An. maculatus*, dan *An. sundaicus* (Stoops *et al.*, 2009).

Spesies *Anopheles* yang ditemukan di daerah Indonesia timur seperti Sulawesi, NTT, NTB meliputi *An. kochi*, *An. aconitus*, *An. sundaicus*, *An. annularis*, *An. barbirostris*, *An. anandalei*, *An. campestris*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*, *An. tessellatus*, *An. vagus*, *An. bancrofti*, *An. farauti* dan *An. kollensis*. Beberapa jenis spesies *Anopheles* yang ditemukan hasil studi bionomik, hanya terdapat 4 spesies yang menjadi vektor utama malaria yaitu, *An. kochi*, *An. bancrofti*, *An. sundaicus* dan *An. aconitus*. Keempat spesies tersebut memiliki populasi yang tinggi dan cenderung aktif pada pagi, sore dan malam hari. Kecendrungan nyamuk menghisap darah manusia (*Antrophofilik*) juga mempertinggi resiko penularan malaria (Arif, 2012).

Tingginya kasus penularan malaria juga dipengaruhi oleh tingginya populasi nyamuk *Anopheles* pada suatu daerah yang berbanding lurus dengan kelimpahan habitat larva (*breeding places*). Adanya perubahan lingkungan seperti penggundulan hutan dan perubahan geografis akibat aktivitas alam (tektonik/vulkanik) menyebabkan bertambahnya jumlah dan luas *breeding places* (Ahmad *et al.*, 2011).

2.4 Klasifikasi Nyamuk *An. sundaicus*

Kasus *Born-disease* yang terjadi di seluruh dunia sebagian besar disebabkan oleh nyamuk. Nyamuk termasuk ke dalam ordo diptera (serangga bersayap dua) dan merupakan famili Culicidae. Nyamuk mengalami metamorfosis sempurna dalam bentuk siklus hidup berupa telur, larva (beberapa instar/stadium), pupa dan dewasa (Sembel, 2009). Dalam klasifikasinya Ordo Diptera ini terbagi dalam 3 subfamili yaitu Anophelinae, Culicinae, Toxorhynchitinae. Subfamili Anophelinae memiliki genus *Anopheles* yang beberapa spesiesnya memiliki kemampuan untuk menjadi vektor transmisi Malaria (Dharmawan, 1993). Salah satu spesies yang berpotensi

menjadi vektor malaria di Indonesia adalah *An. sundaicus*. Berikut merupakan urutan klasifikasi *An. sundaicus* (Gandahusada *et al.*, 2000) :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Famili	: Culicidae
Genus	: <i>Anopheles</i>
Spesies	: <i>Anopheles sundaicus</i>

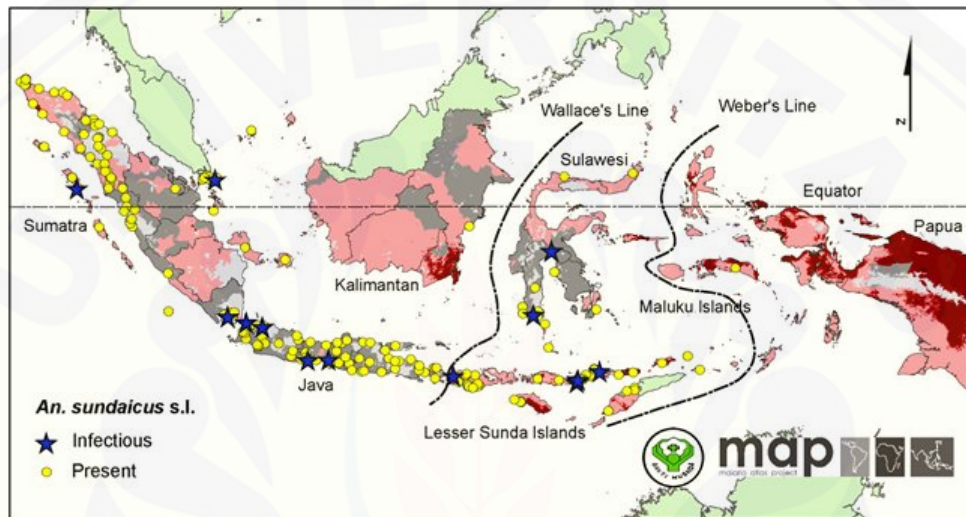
2.5 Siklus Hidup dan Habitat *An. sundaicus*

Nyamuk *An. sundaicus* memiliki perkembangan yang hampir sama dengan jenis *Anopheles* lainnya. Perkembangan telur nyamuk *An. sundaicus* bergantung pada temperatur, kelembapan dan salinitas air. *An. sundaicus* umumnya meletakkan telurnya pada air payau seperti laguna atau kubangan di tepi pantai (Dusfour *et al.*, 2004). Setelah 2-3 hari telur akan menetas dan menjadi larva (jentik). larva *Anopheles* memiliki ciri khusus yaitu posisi larva saat istirahat akan sejajar dengan permukaan air. Larva akan melakukan pergantian kulit sebanyak empat kali (Sembel, 2009). Selanjutnya larva akan berubah menjadi pupa yang berbentuk seperti koma, tidak makan, tetapi aktif bergerak dalam air. Pupa akan terus berkembang, apabila sudah sempurna kulit pupa akan pecah dan nyamuk dewasa akan keluar (Nurmaini, 2003).

Nyamuk dewasa yang baru keluar dari pupa akan beristirahat di atas permukaan air untuk mengeringkan tubuhnya terutama sayap-sayapnya. Nyamuk *Anopheles* memerlukan tempat perindukan (*breeding places*), tempat untuk mendapatkan makanan (*feeding places*) dan tempat untuk beristirahat (*resting places*). Nyamuk dewasa akan terbang untuk kawin dan mencari makan. *Anopheles* betina yang telah kawin, akan beristirahat 1-2 hari kemudian kembali mencari makan dengan menghisap darah. Darah dibutuhkan oleh nyamuk betina untuk memenuhi kebutuhan protein selama masa pematangan telur (Sembel, 2009). Nyamuk jantan

biasanya mencari nektar sebagai makanannya. Spesies *An. sundaicus* bersifat aktif pada malam hari (nokturnal) (CDC, 2010).

An. sundaicus ditemukan sepanjang tahun dan paling banyak ditemukan pada pertengahan sampai akhir musim kemarau (September - Desember). Menurut Hadi & Koesharto (2006) *An. sundaicus* merupakan vektor malaria utama di daerah pesisir pantai, terutama di Pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, NTB, dan NTT.



Gambar 2.4 Peta penyebaran *An. sundaicus* di Indonesia (Sumber: Elyazar *et al.*, 2013)

2.6 Desa Bangsring sebagai Wilayah Endemik Malaria

Desa Bangsring merupakan daerah endemik malaria yang terletak di kecamatan Wongsorejo, kabupaten Banyuwangi. Daerah fokus malaria terletak di dusun Parasputih di sekitar pesisir pantai. Desa Bangsring merupakan daerah berbukit kecil di bagian barat dan di sisi timur berbatasan dengan selat Bali, ketinggian daerah ini sekitar 60m di atas permukaan laut (Mardiana *et al.*, 2003).

Pada dusun Parasputih terdapat beberapa laguna dengan genangan air payau yang terbentuk akibat muara sungai yang menggenang di tepi pantai. Sebagian besar laguna pada daerah ini tidak terawat sehingga ditumbuhi oleh lumut, tumbuhan kangkung (*Ipomoea sp.*), serta beberapa tumbuhan air. Laguna-laguna tersebut antara lain adalah laguna kandang yang luasnya $\pm 4000 \text{ m}^2$, laguna kluwih luasnya $\pm 1000 \text{ m}^2$, laguna loji selatan $\pm 2000 \text{ m}^2$, dan laguna loji utara $\pm 2000 \text{ m}^2$. Laguna-laguna

tersebut merupakan habitat yang sesuai untuk larva *Anopheles*. Terdapat tujuh spesies *Anopheles* yang telah teridentifikasi di desa tersebut yaitu, *An. sundaicus*, *An. subpictus*, *An. barbirostris*, *An. vagus*, *An. flavirostris*, *An. indefinitus*, dan *An. annularis* (Shinta *et al.*, 2003).

Kasus malaria yang terjadi didukung adanya mobilitas penduduk yang tinggi dan keberadaan spesies yang berpotensi menjadi vektor. Sekitar 80% penduduk desa Bangsring merupakan tenaga kerja musiman di luar Pulau Jawa, seperti Bali, Lombok, Kalimantan dan Irian. Pada saat seseorang yang terkena malaria kembali ke desa tersebut, maka hal ini dapat menjadi sumber transmisi baru antar penduduk. Keberadaan spesies yang berpotensi menjadi vektor juga mempertinggi kemungkinan terjadinya transmisi patogen antar penduduk. Konfirmasi vektorial oleh Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur menunjukkan, dari tujuh spesies nyamuk *Anopheles* yang terdapat di desa tersebut, hanya *An. sundaicus* yang dinyatakan sebagai vektor malaria (Shinta *et al.*, 2003).

2.7 Respon Imun Inang Terhadap Saliva Nyamuk

Nyamuk betina akan menghisap darah manusia, disaat yang bersamaan nyamuk melepaskan komponen saliva. Sekresi komponen saliva selama *blood feeding* sangatlah penting untuk nyamuk dalam *blood feeding* tanpa menimbulkan respon berupa perilaku inang, seperti menepuk dan menggaruk. Terdapat dua faktor yang terkandung dalam saliva yaitu, faktor imunomodulator dan vasodilator yang mampu memanipulasi hemostasis inang (Gillespie *et al.*, 2000).

Pada umumnya inang memiliki mekanisme hemostasis berupa penggumpalan darah ketika terjadi pejanan, namun saat nyamuk mengeluarkan komponen saliva menyebabkan perubahan mekanisme hemostasis inang. Faktor vasomodulator dapat memanipulasi mekanisme hemostasis inang dengan cara mencegah vasokonstriksi, mencegah aktivasi dan agregasi platelet, serta menghambat penggumpalan darah. Faktor imunomodulator bersifat immunosupresif yang mampu menekan sistem imun nonspesifik inang sehingga memodulasi perubahan dari T *helper* 1 (Th1) ke arah T

helper 2 (Th2) (Titus *et al.*, 2006). Perubahan respon imun tersebut ditandai dengan peningkatan Interleukin 4 (IL-4), sehingga IL-4 akan mempengaruhi proliferasi Sel B yang akhirnya akan membentuk antibodi humoral. Antibodi yang terbentuk tidak efektif apabila bekerja pada jaringan. Dalam artian antibodi yang terbentuk tidak efektif membunuh parasit pada paparan awal gigitan nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium* (Fontaine *et al.*, 2011).

Paparan gigitan nyamuk yang terinfeksi *Plasmodium*, dapat menularkan penyakit malaria. Sebaliknya paparan berulang terhadap gigitan nyamuk yang steril dapat memberikan efek proteksi. Morris *et al.* (2001) menjelaskan bahwa injeksi komponen saliva vektor dengan dosis yang rendah mampu meningkatkan transmisi patogen, namun injeksi komponen saliva dengan dosis yang banyak akan memberikan efek proteksi terhadap inang. Hal ini menjelaskan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik dan sering terpapar gigitan vektor akan memberikan efek proteksi terhadap patogen. Paparan berulang menyebabkan perubahan respon imun seperti keadaan semula, yaitu melalui Th1 yang akan meningkatkan IFN- γ yang berperan dalam pengaktifan makrofag dan produksi Nitrat Oksidase (NO) sehingga dapat membunuh parasit (Donovan *et al.*, 2007). Selain memberikan efek proteksi, paparan berulang nyamuk juga akan membentuk antibodi anti protein saliva oleh inang (Titus *et al.*, 2006).

2.8 Deteksi dan Pengukuran Antibodi Antiprotein Kelenjar Saliva Nyamuk Anopheles

Banyak Penelitian yang telah melakukan deteksi dan pengukuran antibodi terhadap komponen saliva. Dalam penelitian Waitayakul *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa sekresi komponen saliva pada saat nyamuk melakukan *blood feeding* akan memicu produksi antibodi oleh inang. Antibodi yang terbentuk pada paparan gigitan nyamuk dapat berupa IgM dan IgG (Waitayakul *et al.*, 2006; Remoue *et al.*, 2007).

Antibodi IgM sangatlah sensitif terhadap paparan saliva namun kadarnya cepat menurun setelah paparan. IgG yang terbentuk pada paparan gigitan nyamuk

merupakan antibodi yang paling banyak terdapat dalam tubuh inang, hampir 70% dengan kadar yang dapat bertahan lama dibandingkan IgM setelah paparan. Sehingga IgG sangat sesuai untuk dijadikan sebagai penanda biologis (*biomarker*) paparan gigitan nyamuk (Fontaine *et al.*, 2011). Hal ini dapat dijadikan indikasi adanya suatu paparan gigitan nyamuk yang spesifik, sehingga dapat digunakan sebagai data komplut untuk survei entomologi. Pada saat populasi nyamuk tinggi maka antibodi anti protein saliva (IgG) seseorang meningkat, artinya jumlah nyamuk yang melakukan *blood feeding* banyak, sebaliknya ketika populasi nyamuk rendah maka antibodi anti protein saliva (IgG) akan menurun (Fontaine *et al.*, 2011).

Pengukuran IgG anti protein saliva juga dapat digunakan dalam evaluasi keefektifan penggunaan peralatan anti vektorial, seperti penggunaan kelambu berinsektisida. Menurut Drame *et al.* (2010) terdapat penurunan yang signifikan terhadap kadar IgG anti protein saliva pada serum penduduk endemik setelah penggunaan kelambu berinsektisida. Kadar IgG dapat berkorelasi dengan kepadatan nyamuk, selain itu juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu musim, lingkungan dan aktivitas individu (Fontaine *et al.*, 2011).

Pada penelitian-penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Waitayakul (2006); Peng & Simons (2004) menjelaskan terdapat metode yang dapat mengukur kadar respon imun spesifik inang (IgM, IgE dan IgG) akibat paparan komponen saliva arthropoda yaitu dengan menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent-Assay*). Dengan metode ELISA dapat diketahui karakteristik antibodi spesifik anti protein saliva seperti jenis, kadar, serta durasi antibodi dalam darah. ELISA merupakan metode analisis imunologi yang sering digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu protein (antibodi atau antigen) pada bahan cair dengan dasar pengukuran nilai OD (*Optical Density*) (Yang and Ma, 2009).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai bulan Desember 2014. Tempat penelitian dilaksanakan di Universitas Jember (Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biokimia Fakultas Farmasi), Politeknik Negeri Jember (Laboratorium Biosains) dan Uniklinikum Bonn, Germany (*Institute of Medical Microbiology Immunology and Parasitology*).

3.2 Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang dipakai pada penelitian ini antara lain kelenjar saliva *An. sondaicus*, kloroform, NaCl 0,05%, PMFS dalam PBS, lisis *buffer*, air es, tikus wistar, larutan gula, pakan mencit, PBS, 0,05% Tween, 1% BSA, serum darah, alkohol 70%, ddH₂O steril, Aquades, deH₂O, *buffer* bikarbonat, *buffer coating*, *buffer blocking*, *Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti human IgG* (1:5.000), *Tetra Methyl Benzidine*, H₂SO₄ 1M, *Aluminium foil*, D-PBS, Ficoll, medium RPMI+++ /media komplit (mengandung gentamisin, penisilin, dan L-Glutamin) dan *Fetal Calf Serum* (FCS).

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi kandang nyamuk, kandang tikus wistar, baki, cawan telur, cawan pupa, pipet plastik, aspirometer, jarum diseksi, mikroskop stereo, gelas plastik, kain kasa, *petridish*, *micropipet*, pipet *multi channel*, *microtube*, sentrifugasi, botol *scot*, pH meter, tabung *falcon*, kapas, *water sonicator*, *steroform*, lemari es (suhu -80°C, -20°C dan 4°C), vakutainer, *dissposable syring* 3 ml, *ELISA Plate*, *Culture Plate*, Inkubator CO₂, *Laminar Air Flow* dan *Elisa reader*.

3.3 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini dibagi menjadi beberapa langkah kerja yaitu: *landing collection* dan *rearing An. sondaicus*, isolasi kelenjar saliva *An. sondaicus*, ekstraksi protein kelenjar saliva, pengumpulan serum orang sehat endemik yang dibagi ke dalam tiga kelompok berdasarkan usia yaitu, usia <10 tahun, usia 11-40 tahun, usia >40 tahun yang selanjutnya dilakukan pengukuran kadar IgG dengan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Dilakukan juga isolasi sel PBMC yang dilanjutkan dengan mengkultur sel tersebut dengan diinkubasi bersama EPKS *An.sondaicus*, selanjutnya diukur kadar sitokin IFN- γ dan IL-10 menggunakan metode ELISA.

3.3.1 *Landing collection* dan *Rearing An. sondaicus*

Rearing Anopheles dilakukan di kandang nyamuk laboratorium Zoologi jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember. Proses *rearing* diawali dengan *landing collection* (penangkapan) nyamuk yang didapatkan dari habitatnya yaitu di desa Bangsring, kecamatan Wongsorejo, kabupaten Banyuwangi. *Landing collection* larva *Anopheles* dilakukan pada laguna-laguna yang terdapat di sekitar pesisir pantai, sedangkan nyamuk *An. sondaicus* dewasa diperoleh di sekitar kandang ternak yang dekat dengan rumah warga. Nyamuk ditangkap menggunakan aspirator pada saat nyamuk *blood feeding* atau pada saat *resting* disekitar kandang. Nyamuk yang didapatkan selanjutnya diidentifikasi secara morfologi menggunakan kunci determinasi insekta, yang kemudian dikembangbiakkan dalam skala laboratorium.

Pemeliharaan dimulai dari nyamuk dewasa yang dipelihara pada suhu ruang (25-28°C) dengan diberi larutan sukrosa 10% dan secara periodik diberi umpan tubuh tikus wistar sebagai sumber darah. Larutan sukrosa 10% dan umpan tubuh tikus wistar diberikan sejak hari pertama nyamuk tersebut mulai dikembangbiakkan. Kelembaban udara dijaga dengan menyelubungi kandang nyamuk menggunakan kain yang dibasahi. Di dalam kandang disediakan kendi dari tanah liat dan diisi air sebanyak sepertiga bagian kendi untuk tempat bertelur nyamuk.

Sedangkan larva yang terdapat pada baki berisi air yang diambil dari habitatnya dan menggantinya setiap tiga hari sekali, serta diberi tumbuhan air seperti alga yang terdapat pada laguna. Setiap hari diberi pakan berupa pelet “*Tetra Bits Complete*” yang sudah dihaluskan terlebih dahulu.

3.3.2 Isolasi Kelenjar Saliva *An. sundaicus*

An. sundaicus yang digunakan merupakan hasil *rearing*. Sebelum diisolasi kelenjar salivanya, nyamuk betina dewasa dianestesi terlebih dahulu menggunakan *chloroform*. Isolasi kelenjar saliva nyamuk betina dilakukan menggunakan metode Bruce-Chwatt (1980) yaitu, dengan meletakkan nyamuk di bawah mikroskop stereo pada sisi kanan slide yang telah ditetesi NaCl 0.5%. Selanjutnya nyamuk dibedah secara *microdissection*, jarum diseksi insekta di tangan kiri menekan dengan lembut pada bagian toraks dan jarum diseksi di tangan kanan menarik bagian kepala dengan perlahan-lahan, kelenjar saliva yang melekat pada bagian kepala (sepasang kelenjar saliva berjumlah 6 lobus) dipotong dan dikumpulkan dalam epi steril yang telah diisi 100 μ L PMSF dalam PBS steril yang selanjutnya disimpan pada suhu -20 °C.

3.3.3 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *An. sundaicus*

Kelenjar saliva *An. sundaicus* yang telah diisolasi secara *microdissection* ditambahkan dengan *buffer lysis* (dengan perbandingan 1:1). Kemudian sampel dihomogenisasi, kemudian sampel disonikasi menggunakan *water sonicator* selama 30 menit, kemudian sampel disentrifus 12.690 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Hasilnya supernatan dan pelet dipisahkan, lalu supernatan diambil dan disimpan pada suhu -80°C sebagai stok protein kelenjar saliva.

Protein saliva dipekatkan dengan cara mengambil stok protein dan disentrifus pada 10.000 rpm dengan suhu 4°C selama 30 detik, dilakukan sampai suspensi yang terdapat dalam epi membran sesuai dengan keinginan atau separuh dari total volume yang dimasukkan, selanjutnya hasil pemekatan protein disimpan dalam suhu – 80°C.

3.3.4 Preparasi Serum Darah

Sampel serum diambil dari darah orang sehat di wilayah endemik yang dikelompokkan ke dalam tiga kelompok berdasarkan umur yaitu, umur <10 tahun (anak-anak), umur 11-40 tahun (dewasa) dan umur >40 tahun (lanjut). Penentuan kawasan endemik berdasarkan data kejadian malaria dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur yaitu pada Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo, Banyuwangi. Sampel darah diambil dari pembuluh darah *vena branchialis* pada bagian lengan atas. Darah diambil sebanyak 3 mL dan ditampung dalam vakutainer tanpa heparin, kemudian darah didiamkan 15-45 menit, lapisan bening paling atas diambil dan disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C dan supernatannya merupakan serum darah, kemudian serum disimpan pada suhu -80°C.

3.3.5 Isolasi *Pheripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC)

Darah Manusia sehat yang didapatkan dari bank darah Uniklinikum Bonn, Germany, selanjutnya diencerkan menggunakan D-PBS (1:1). Darah yang sudah diencerkan selanjutnya dituangkan secara perlahan ke dalam falcon yang sebelumnya telah diisi 15 ml Ficoll. Langkah selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm pada 4°C tanpa *brake*. Selanjutnya lapisan PBMC (berwarna putih) diambil secara perlahan dan dipindahkan ke dalam falkon baru, selanjutnya ditambahkan medium RPMI+++ dan 10% FCS, dan disentrifugasi kembali selama 8 menit, kecepatan 1300 rpm pada 4°C, langkah ini diulangi sampai dua kali. Selanjutnya supernatant dibuang, dan pelet diresuspensi dengan medium RPMI+++ dan 10% FCS, dan selanjutnya dihitung jumlah selnya.

3.3.6 Kultur *Pheripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC)

Kultur dilakukan dengan memasukkan PBMC sebanyak 10.000 sel/ 100µl suspensi sel tiap well. Pada well kontrol ditambahkan medium komplit sebanyak 100µl. Pada well aCD3 ditambahkan 50 µl medium komplit dan 50 µl suspensi aCD3. Pada well aCD3+EPKS ditambahkan 50 µl suspensi aCD3 dan 50 µl suspensi

EPKS *An. sudaicus*. Pada well EPKS ditambahkan 50 µl suspensi medium komplet dan 50 µl suspensi EPKS *An. sudaicus*. Masing-masing kelompok dilakukan pengulangan dua kali, dan diinkubasi selama 24 jam pada Kultur Inkubator. Setelah inkubasi jam ke 24 supernatan diambil dan dilakukan metode selanjutnya yaitu, pengukuran sitokin menggunakan *ELISA-sandwich*.

3.3.7 Prosedur ELISA (*Enzim Linked Immuno-Sorbent Assay*)

a. ELISA *Indirect*

Untuk mengoptimalkan cara kerja ELISA, dilakukan optimasi *Checker Board Titration* untuk mengetahui konsentrasi antigen dan konsentrasi serum yang digunakan. Berdasarkan hasil optimasi, *plate* dilapisi dengan 5 µg/ml (50 µl/ well) EPKS *An. sudaicus* yang telah diencerkan dalam 0,1 M bikarbonat (pH 9,6), dilakukan *coating* antigen *overnight* pada suhu 4°C. Selanjutnya *plate* dicuci dengan 250 µL PBS (pH 7,4) ditambah 0,05 % Tween-20. *plate* diblok dengan 200 µL larutan blocking buffer yang terdiri dari PBS 0,05 % Tween dan 1% BSA selama 2 jam pada suhu 37°C. Serum diencerkan dengan perbandingan 1:25 dalam blocking buffer (50 µl /well) ke dalam *plate*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, diambil 50 µl *Horse Radish peroksidase (HRP)-conjugated Rabbit anti human IgG* (1:5.000) diencerkan dengan menambahkan blocking buffer, diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 50 µl substrat *tetramethylbenzidine* dalam ruang gelap, sehingga aktivitas enzim terdeteksi dengan indikasi perubahan warna menjadi biru diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan menggunakan 50µl H₂SO₄ 1M, yang diindikasikan dengan perubahan warna menjadi kuning. *Plate* segera dimasukkan ke dalam *ELISA reader*. Optikal Density (OD) ditentukan dengan pembaca *plate* pada panjang gelombang 450nm. Setiap sampel dilakukan pengulangan ganda. Pada well kontrol dibiarkan tetap kering tanpa agar kadar ODnya 0 (Fontaine *et al.*, 2011).

b. ELISA *Sandwich*

Pada metode ELISA *sandwich* ini menggunakan kit ELISA (eBiosciences, San Diego, USA) *Coating* penangkap antibodi 50 μ l (IFN- γ dan IL-10) *overnight* pada suhu 4°C. Selanjutnya *plate* dicuci dengan 250 μ L PBS (pH 7,4) ditambah 0,05 % Tween-20. *plate* diblok dengan 500 μ l *diluents assay* inkubasi 1 jam pada suhu ruang. Dicuci, lalu tambahkan standar dan sampel berupa supernatan hasil inkubasi kultur PBMC ditambahkan ke dalam well masing-masing 50 μ l, dan diinkubasi pada suhu 4°C *overnight*. Selanjutnya, ditambahkan 50 μ l antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan biotin sebanyak 50 μ l, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan enzim avidin yang terkonjugasi dengan *Horse Radish peroksidase (HRP)* sebanyak 50 μ l, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 50 μ l substrat *tetramethylbenzidine* dalam ruang gelap, sehingga Aktivitas enzim terdeteksi dengan indikasi perubahan warna menjadi biru diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan menggunakan 50 μ l H₂SO₄ 1M, yang diindikasikan dengan perubahan warna menjadi kuning. *plate* segera di masukkan ke dalam *ELISA reader*. Optikal Density (OD) ditentukan dengan pembaca *plate* pada panjang gelombang 450nm, setiap sampel dilakukan pengulangan ganda.

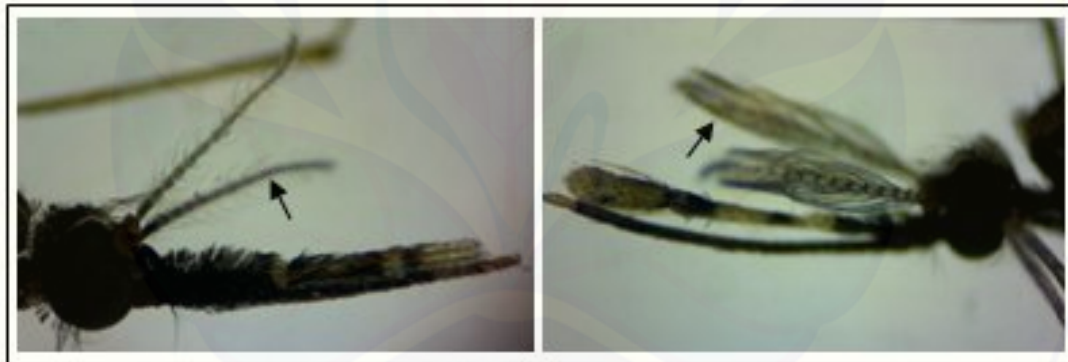
3.3.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS dan Graphpad Prism 5.0, dengan uji perbandingan *one way anova* $p < 0,05$, yang selanjutnya diuji menggunakan *Duncan* dan beberapa data dilakukan uji *t-test*.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Identifikasi Nyamuk *Anopheles sundaicus*

Dalam penelitian ini didapatkan total 2000 nyamuk *Anopheles* dewasa dari hasil *Landing Collection* nyamuk dewasa dan larva *Anopheles sp.* di desa Bangsring yang merupakan daerah endemik malaria. Identifikasi jenis kelamin nyamuk penting dilakukan, dikarenakan hanya nyamuk betina yang menjadi vektor malaria. Nyamuk betina akan melakukan *blood feed* untuk pematangan telurnya (Lyimo & Takken, 2008). Nyamuk betina dan nyamuk jantan dapat dibedakan dari morfologi antenanya, nyamuk jantan memiliki antena dengan rambut yang lebih tebal dari pada antena nyamuk betina. Perbedaan *An. sundaicus* jantan dan betina dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar. 4.1 Perbedaan morfologi nyamuk jantan dan betina. Ket: nyamuk *An. sundaicus* betina (kiri) nyamuk *An. sundaicus* jantan (kanan) (Mikroskop LW Scientific perbesaran 400x, Kamera Optilab)

Proses identifikasi spesies nyamuk *Anopheles* dilakukan untuk memastikan nyamuk yang akan diisolasi kelenjar salivanya adalah *An. sundaicus*, yang merupakan vektor malaria utama di daerah tersebut. Ciri morfologi khusus spesies *An. sundaicus* meliputi sayap yang terdiri atas 4 atau lebih bintik-bintik pucat.

Panjang probosisnya sama dengan panjang palpus. Palpus ditandai dengan 3 gelang pucat. Femur kaki belakang tanpa sikat dan berbercak bintik-bintik pucat. Tibia memiliki bercak bintik-bintik pucat. Persambungan tibia tarsus kaki belakang tidak terdapat gelang dan pada tarsus ke 5 kaki belakang sebagian atau seluruhnya berwarna gelap (O'Connor & Soepanto, 1999). Persamaan sayap *An. sundaicus* hasil landing dan *An. sundaicus* referensi dapat dilihat pada Gambar 4.2.

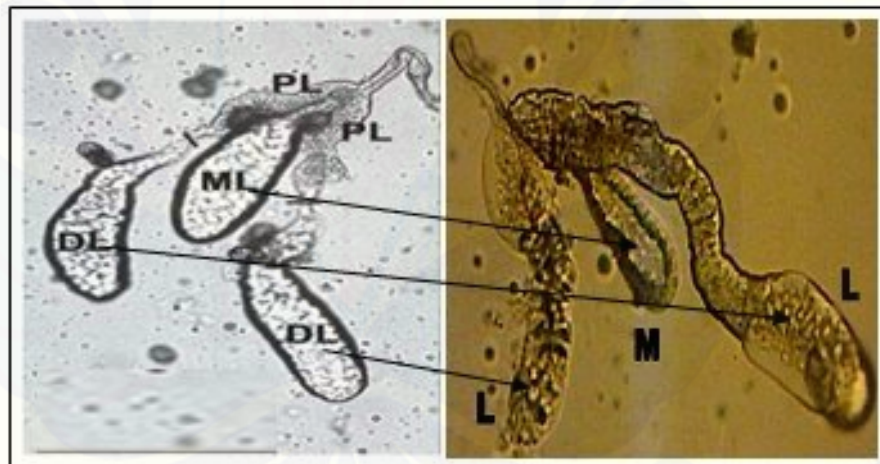


Gambar. 4.2 Morfologi sayap nyamuk *An. sundaicus* betina, terdapat 6 bintik pucat pada sayap dorsal. Ket: gambar atas, sayap *An. sundaicus* betina hasil landing (Mikroskop LW Scientific perbesaran 400x, Kamera Optilab), gambar bawah, sayap *An. sundaicus* betina (WRBU, 2015).

Hasil *landing collection* didapatkan beberapa spesies nyamuk *Anopheles* yang berhasil diidentifikasi yaitu; *An. annularis*, *An. vagus*, *An. subpictus*, *An. idenfinitus*, *An. barbirostris*, dan *An. sundaicus*. Spesies nyamuk yang paling dominan adalah *An. sundaicus*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyebutkan terdapat sedikitnya 7 spesies *Anopheles* yang ditemukan di desa Bangsring, dengan spesies dominannya adalah *An. sundaicus* (Mardiana *et al.*, 2003).

4.2 Isolasi Kelenjar Saliva *An. sundaicus*

Hasil isolasi kelenjar saliva didapatkan 800 pasang kelenjar saliva nyamuk *An. sundaicus* betina yang diisolasi dengan menggunakan tehnik *microdissection* (Bruce-Chwat, 1980). Pada *Anopheles* betina memiliki satu pasang kelenjar saliva yang terletak di setiap sisi esofagus pada toraks bagian anterior (Wright, 1969). Satu bagian kelenjar saliva terdiri dari 3 lobus, yaitu dua lobus lateral dan satu lobus medial. Terdapat *ductus salivarius* yang menghubungkan lobus medial dengan *salivary pump* yang terletak di dekat *hypopharynx*. Kelenjar saliva bagian lobus lateral dibagi menjadi daerah proksimal, intermediate dan distal (Dhar & Khumar, 2003). Gambar 4.3 menunjukkan bagian-bagian kelenjar saliva *An. sundaicus* betina yang dibandingkan dengan kelenjar saliva *An. gambiae* betina.



Gambar. 4.3 Kelenjar saliva *Anopheles* betina. Ket: PL: Lobus Proksimal, DL: Lobus Distal, ML: Lobus Medial. A: Kelenjar saliva *Anopheles* spp. (Jariyapan *et al.*, 2007). B: Hasil isolasi kelenjar saliva *An. maculatus* (Mikroskop LW Scientific perbesaran 400x, Kamera Optilab)

4.3 Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *An. sundaicus*

Hasil ekstraksi kelenjar saliva, didapatkan protein kelenjar saliva nyamuk *An. sundaicus*. Protein yang didapatkan merupakan ekstrak *whole protein* dari

kelenjar saliva *An. sundaicus* dengan konsentrasi sebesar 4,2 mg/ml. Proses ekstraksi protein kelenjar saliva dilakukan menggunakan metode ekstraksi kimia dan fisika. Ekstraksi kimia dilakukan dengan menambahkan buffer lisis (1:1), mengandung Nonidet P-40 yang berfungsi untuk pelarut protein membran, sehingga akan menyebabkan sel lisis dan protein akan keluar dari sel (Anonim, 2015). Ekstraksi fisika dilakukan dengan cara disonikasi menggunakan water sonikator, yaitu menggunakan prinsip frekuensi gelombang suara (ultrasonik) di konduksikan melalui air menyebabkan tekanan di dalam sampel sehingga dapat merusak stabilitas membran sel yang menyebabkan sel lisis (Anonim, 2015).

Pada penelitian ini digunakan ekstrak protein kasar (*whole protein*) pada umumnya spesies nyamuk yang berbeda dapat memiliki beberapa protein yang sama. Dalam penelitian Fontaine *et al.*, (2012), dari 6 jenis spesies nyamuk (*An. gambiae*, *An. albimanus*, *An. arabiensis*, *An. stephensi*, *An. darling* dan *An. funestus*) dari total 401 protein saliva yang didapatkan, sebanyak 272 protein ditemukan di keenam spesies tersebut yang disekresikan pada saat *blood feeding*. Beberapa protein yang memiliki sekuen yang ortholog (sekuen homolog dari nenek moyangnya) yaitu, seperti kelompok apyrase dan D7. Bahkan protein-protein tersebut dapat terkonservasi dari tingkat genus, famili, bahkan tingkat kelas (Fontaine *et al.*, 2011).

4.4 Pengukuran IgG Terhadap Antigen EPKS Nyamuk

Dalam penelitian ini digunakan dua antigen Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) nyamuk yang berbeda, yaitu EPKS *An. sundaicus* dan EPKS *Aedes(Ae.) Aegypti*. Hasil pengukuran IgG dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.4. Tujuan dilakukan perbandingan antar antigen adalah untuk mengetahui tingkat pengenalan IgG anti protein saliva terhadap EPKS *An. sundaicus*. Disamping itu karena protein yang digunakan merupakan ekstrak protein kasar yang dimungkinkan di dalamnya terdapat protein homolog dengan spesies lain, sehingga dibutuhkan protein saliva yang diambil dari genus yang berbeda yaitu dari *Ae. aegypti* sebagai pembanding.

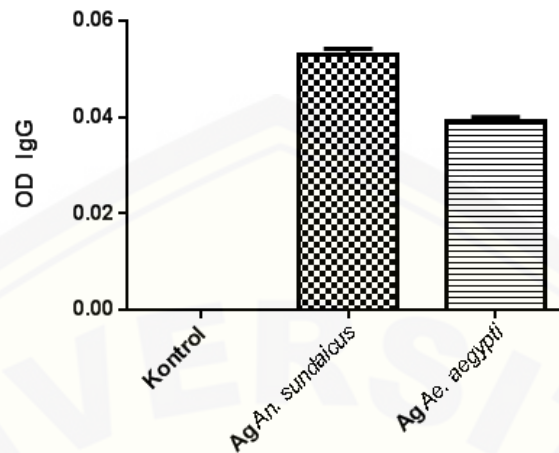
Tabel 4.1 Rata-rata Kadar IgG Anti Protein Saliva Berdasarkan Antigen

Antigen yang digunakan	Rata-rata \pm SD
Kontrol (tanpa antigen)	0.000 \pm 0.0000 ^a
Antigen <i>An. sundaicus</i>	0.503 \pm 0.0005 ^c
Antigen <i>Ae. aegypti</i>	0.337 \pm 0.0063 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan berbeda nyata (uji Duncan 5%)

Pada tabel 4.1 Rata-rata kadar IgG anti protein saliva \pm SD pada kelompok Kontrol, antigen *An. sundaicus*, antigen *Ae. aegypti* berturut-turut adalah 0.000 \pm 0.0000, 0.503 \pm 0.0005, dan 0.337 \pm 0.0063. Berdasarkan Uji Anava (lampiran B.1) diperoleh nilai $p=0,000 < 0.05$, hal ini menunjukkan terdapat perbedaan antara kontrol, antigen *An. sundaicus* dan *Ae. aegypti* yang digunakan. Perbedaan tersebut dikarenakan di wilayah Bangsring merupakan daerah endemik malaria yang ditunjukkan dengan Kejadian Luar Biasa (KLB) pada tahun 2008, 2010 dan 2011 (Dinkes Jatim, 2012). Perbedaan tersebut juga merupakan tanda bahwa IgG dapat berikatan dengan antigen saliva nyamuk. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fountain *et al.* (2011) & Remoue *et al.* (2007), yang menyatakan pengukuran kadar IgG dapat dijadikan sebagai marker imunologi paparan suatu spesies nyamuk.

Hasil tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan, yang menunjukkan kelompok antigen EPKS *An. sundaicus* memiliki nilai OD lebih tinggi daripada kelompok antigen EPKS *Ae. Aegypti*. Pada kelompok antigen EPKS *An. sundaicus* (Gambar 4.4) kadar IgG lebih tinggi dari pada kelompok antigen EPKS *Ae. aegypti*. Tingginya kadar IgG dikarenakan daerah tempat diambilnya serum merupakan daerah endemik malaria dengan populasi *An. sundaicus* yang tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Shinta *et al.*, (2003) yang menyatakan desa Bangsring, kecamatan Wongsorejo, Banyuwangi merupakan daerah endemik malaria dengan spesies utamanya adalah *An. sundaicus*.



Gambar 4.4 Grafik Kadar IgG berdasarkan antigen (Ag) protein saliva, terdapat perbedaan signifikan antar masing-masing kelompok (Anava $p=0,000 < 0.05$), dan kadar IgG anti protein saliva yang paling tinggi adalah antigen *An. sundaicus* (Duncan $p=0,000 < 0.05$)

IgG yang bereaksi dengan antigen EPKS *Ae. aegypti* juga menunjukkan nilai yang cukup tinggi kadarnya setelah antigen *An. sundaicus* (Gambar 4.4). Hal ini dikarenakan seluruh wilayah di Indonesia merupakan daerah penyebaran *Ae. aegypti*, terbukti dengan tingginya kasus demam berdarah di seluruh daerah di Indonesia yang disebabkan oleh spesies *Ae. aegypti* (Depkes RI, 2004). Cukup tingginya kadar IgG pada kelompok antigen EPKS *Ae. aegypti* juga dimungkinkan karena protein yang digunakan adalah ekstrak kasar (*whole extract*), sehingga dimungkinkan terdapat sekuen pengkode protein saliva yang homolog di tingkat famili Culicidae antara *Ae. aegypti* dan *An. sundaicus* sehingga dapat berikatan dengan IgG (Fontaine, 2011).

4.5 Pengukuran Kadar IgG terhadap (EPKS) Berdasarkan Umur

Penggolongan umur menurut Departemen Kesehatan RI (2009) yaitu, Balita (0-5 tahun), Anak-anak (5-11 tahun), Remaja awal (12-16 tahun), remaja akhir (17-25 tahun), dewasa awal (26-35 tahun), dewasa akhir (36-45 tahun), Lansia awal (46-55 tahun), Lansia akhir (56-65), Manula (>65 tahun). Dalam penelitian ini penggolongan kelompok umur diringkas menjadi 4 kelompok besar yaitu, kelompok neonatus (diambil dari plasenta bayi baru lahir), kelompok umur

<10 tahun, kelompok umur 11-40 tahun dan kelompok umur >40 tahun. Pengukuran IgG berdasarkan umur dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.5.

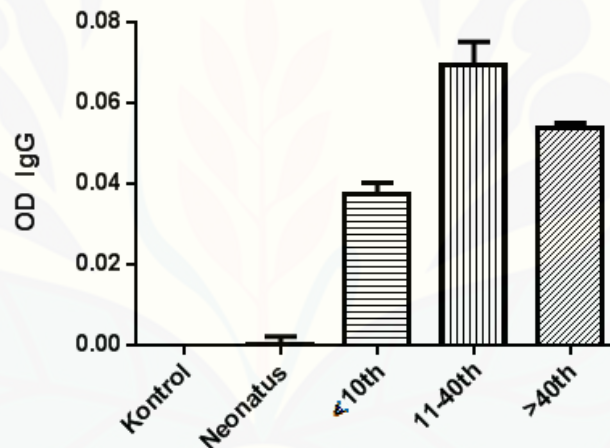
Tabel 4.2 Rata-rata Kadar IgG Anti Protein Saliva Berdasarkan Umur

Kelompok Umur	Rata-rata \pm SD
Kontrol	0.000 \pm 0.000 ^a
Neonatus	0.003 \pm 0.032 ^a
<10 tahun	0.037 \pm 0.005 ^b
11-40 tahun	0.069 \pm 0.010 ^c
>40 tahun	0.053 \pm 0.029 ^d

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan berbeda nyata (uji Duncan 5%)

Pada tabel 4.2 Rata-rata kadar IgG anti protein saliva \pm SD pada kelompok Kontrol, neonatus, umur <10 tahun, umur 11-40 tahun, dan umur >40 tahun berturut-turut adalah 0.000 \pm 0.000, 0.003 \pm 0.032, 0.037 \pm 0.005, 0.069 \pm 0.010, dan 0.053 \pm 0.029. Berdasarkan Uji Anava (lampiran B.2) diperoleh nilai $p=0,000 < 0,05$, hal ini menunjukkan terdapat perbedaan antara kontrol dan masing-masing kelompok umur. Perbedaan tersebut diduga adanya perbedaan tingkat paparan nyamuk *An. sundaicus* antara kelompok umur. Disamping itu umur dapat memberikan pengaruh terhadap terjadinya infeksi malaria ditinjau dari kematangan sistem imunnya. Usia anak-anak merupakan usia yang rentan untuk terinfeksi malaria jika dibandingkan dengan orang dewasa. Pada tahun 2012 penderita malaria usia anak-anak di dunia mencapai 75% (WHO, 2013). Penyebab rentannya anak-anak terinfeksi parasit seperti malaria disebabkan oleh sistem imun belum memiliki kemampuan untuk melawan antigen secara spesifik, sehingga anak-anak hanya menggunakan respon *innate immunity*. Pada sistem imun orang dewasa telah memiliki respon *adaptive immunity*, yaitu sistem imun spesifik seperti pembentukan protein Immunoglobulin (IgG), yang mampu melumpuhkan parasit yang pernah memaparnya (Palm & Medzhitof, 2009).

Hasil tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan, hasilnya menunjukkan bahwa kadar IgG anti protein saliva pada kelompok kontrol tidak berbeda nyata dengan kelompok neonatus, namun berbeda nyata dengan ketiga kelompok umur lainnya. Kadar IgG anti protein saliva berbeda nyata pada masing-masing kelompok umur. Kadar IgG anti protein saliva tertinggi pada kelompok umur 11-40 tahun dan terendah pada kelompok kontrol dan neonatus. Pada kelompok umur 11-40 tahun (Gambar 4.5) kadar IgG lebih tinggi dari pada kelompok umur lainnya. Tingginya kadar IgG dikarenakan pada usia 11-40 tahun sistem imunnya telah matang juga dimungkinkan kelompok ini sering terpapar gigitan nyamuk *An. sondaicus* dikarenakan mereka banyak melakukan aktivitas di luar rumah pada malam hari pada saat spesies vektor aktif melakukan *blood feed* (data hasil kuisioner).



Gambar 4.5 Hasil pengukuran IgG berdasarkan pengelompokan umur, dari kelima kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan signifikan (Anava $p=0,000 < 0.05$), selanjutnya kadar IgG anti protein saliva yang paling tinggi pada kelompok umur 11-40th (Duncan $p=0,000 < 0.05$)

Pada kelompok kontrol tidak terdapat kadar IgG atau kadar IgG sama dengan nol. Hal ini karena pada kelompok kontrol tidak terdapat antigen sehingga antibodi dalam serum tidak dapat berikatan dengan antigen spesifiknya. Sedangkan kelompok neonatus menunjukkan hasil dengan nilai OD yang sangat rendah, diperkirakan pada serum neonatus terdapat IgG anti protein saliva dari

ibunya. Pada kelompok umur 11-40 tahun menunjukkan kadar IgG yang paling tinggi diantara kelompok umur lainnya. Tingginya nilai OD pada kelompok umur 11-40 tahun diduga dua sebab yaitu, pertama adanya pengaruh umur yang dapat mempengaruhi aktivasi sel T memori dan mempengaruhi produksi pembentukan antibodi spesifik (Miller, 1996). Pada kelompok umur yang aktif (11-40 tahun) respon imunnya lebih matang sehingga lebih tinggi kadar IgGnya sedangkan kelompok umur >40 tahun tingkat produksi antibodinya telah menurun, dan sebaliknya pada kelompok umur <10 tahun respon imunnya masih dalam perkembangan ke tahapan pematangan (Bratawidjaja & Rengganis, 2014). Kemungkinan kedua yaitu, didukung oleh hasil kuisisioner sebelum dilakukan sampling darah. Sebagian besar masyarakat desa Bangsring yang berusia 11-40 tahun lebih banyak melakukan aktivitas di luar rumah pada saat malam hari, hal ini juga berhubungan dengan spesies *An. sundaicus* bersifat aktif pada malam hari (nokturnal) (CDC, 2010) dan dari hasil survei peneliti spesies *An. sundaicus* lebih banyak ditemukan di luar rumah dari pada di dalam rumah.

Seseorang yang lebih banyak terpapar gigitan nyamuk akan memiliki kadar IgG anti protein saliva lebih tinggi jika dibandingkan dengan seseorang yang jarang terpapar gigitan nyamuk. Hasil Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Waitayakul *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik malaria yang sering terkena paparan saliva *Anopheles* akan meningkatkan kekebalan dengan membentuk antibodi berupa IgG anti protein saliva. Data kuisisioner menyebutkan pada kelompok umur <10 tahun lebih banyak menghabiskan waktu pada malam hari di dalam rumah dengan memakai perlindungan anti vektorial seperti kelambu berinsektisida, *lotion* anti nyamuk, dan obat nyamuk bakar yang mampu melindungi dari paparan nyamuk. Data ini mengindikasikan relevansi antara analisis antibodi menggunakan EPKS sebagai biomarker paparan. Hal ini penting karena biomarker dapat dijadikan sebagai indikator tingkat paparan suatu spesies vektor dan juga sebagai indikator keefektifan usaha anti vektorial (Ali *et al.*, 2012 ; Drame *et al.*, 2010).

4.6 Pengukuran kadar sitokin IFN- γ dan IL-10 secara *in vitro*

Pada penelitian ini ingin membuktikan adanya perubahan subset dari Th1 menjadi Th2, yaitu dengan mengamati sitokin spesifik yang diproduksi oleh sel T *helper*. Menurut penelitian yang dilakukan Donovan *et al.* (2007) pergeseran subset dari Th1 ke Th2 ditunjukkan dengan peningkatan sitokin seperti IL-4 atau IL-10, sedangkan sitokin IFN- γ kadarnya menurun. Pada penelitian ini dilakukan secara *in vitro* yaitu, menggunakan kultur *Peripheral Blood mononuclear Cell* (PBMC). PBMC terdiri dari beberapa sel seperti sel limfosit (T, sel B dan sel NK), monosit dan sel dendritik, populasi sel yang paling banyak adalah sel limfosit T dan sel B (75%) (Anonim, 2015 ; Bushe *et al.*, 2011).

Penggunaan kultur PBMC pada penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian antigen EPKS *An. sundaicus* terhadap produksi sitokin IFN- γ dan IL-10. Dalam penelitian ini juga digunakan aCD3 atau Antibodi *anti Cluster of Differentiation 3* merupakan kompleks protein multimerik yang dapat secara efektif mengaktivasi sel T (Garvin *et al.*, 2009). Terdapat satu kelompok kontrol (medium) dan tiga kelompok perlakuan yang digunakan yaitu, kelompok yang distimulasi dengan aCD3, kelompok campuran yang distimulus dengan aCD3+ EPKS *An. sundaicus*, dan kelompok yang hanya distimulus dengan antigen EPKS *An. sundaicus*. Hasil pengukuran kadar sitokin IFN- γ dan IL-10 pada kultur PBMC dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.6.

Tabel 4.3 Rata-rata Kadar IFN- γ dan IL-10 Berdasarkan Antigen

Antigen	Rata-rata \pm SD	Rata-rata \pm SD
Medium (Kontrol)	31.8165 \pm 2.98753	63.5600 \pm 0.98995
EPKS <i>An. sundaicus</i>	19.9725 \pm 9.06864	149.6610 \pm 56.64067
aCD3	566.6810 \pm 22.83106 ^b	224.9685 \pm 287.7210 ^a
aCD3 + EPKS <i>An. sundaicus</i>	251.646 \pm 27.31200 ^a	376.0825 \pm 303.68186 ^b

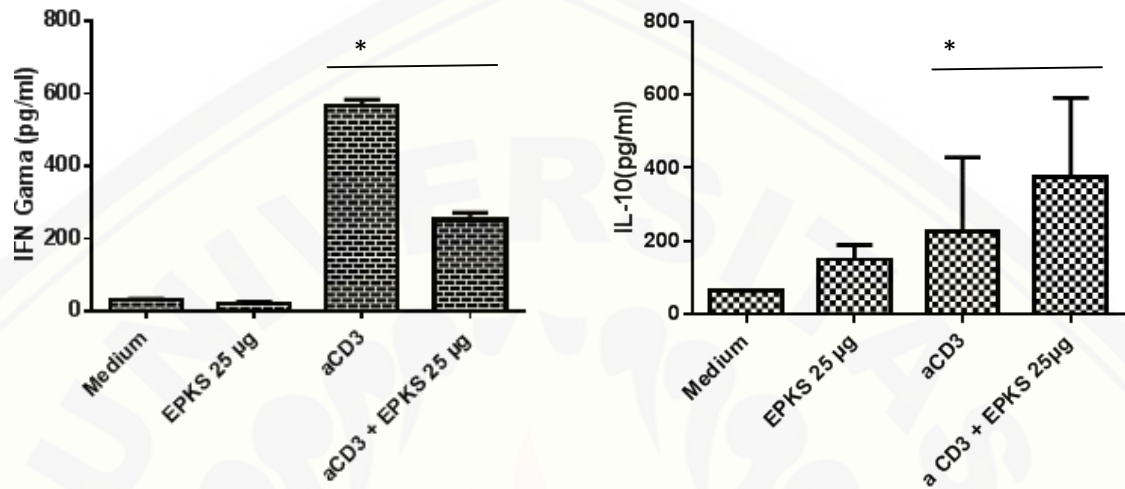
Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan hasil berbeda nyata (uji t-test)

Pada tabel 4.3 Rata-rata kadar IFN- γ \pm SD pada kelompok Kontrol, aCD3, aCD3+EPKS *An. sundaicus* dan EPKS *An. sundaicus* berturut-turut adalah 31.8165 \pm 2.98753, 19.9725 \pm 9.06864, 566.6810 \pm 22.83106 dan 251.646 \pm 27.31200. Berdasarkan Uji t-test (lampiran B.3) antara kultur PBMC yang terstimulasi oleh aCD3 dan yang terstimulasi oleh aCD3+EPKS *An. sundaicus* diperoleh nilai $p=0,001<0.05$, hal ini menunjukkan adanya perbedaan. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh EPKS *An. sundaicus* yang dapat mensupresi produksi IFN- γ , yang terbukti pada saat kultur diinduksi dengan aCD3 produksi IFN- γ tinggi namun pada kultur yang diinduksi aCD3+EPKS *An. sundaicus* hasil produksi sitokin IFN- γ menurun. Penurunan kadar IFN- γ dapat dilihat pada gambar 4.6 (a).

Pada tabel 4.3 Rata-rata kadar IL-10 \pm SD pada kelompok Kontrol, aCD3, aCD3+EPKS *An. sundaicus*, dan EPKS *An. sundaicus* berturut-turut adalah 63.5600 \pm 0.98995, 149.6610 \pm 56.64067, 224.9685 \pm 287.7210 dan 376.0825 \pm 303.68186. Berdasarkan Uji t-test (lampiran B.3) antara kultur PBMC yang terstimulasi oleh aCD3 dan yang terstimulasi oleh aCD3+EPKS *An. sundaicus* diperoleh nilai $p=0.001>0.05$, hal ini menunjukkan adanya perbedaan. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh EPKS *An. sundaicus* yang dapat meningkatkan produksi IL-10, yang terbukti pada saat kultur diinduksi dengan aCD3 produksi IL-10 rendah namun pada saat kultur diinduksi dengan aCD3+EPKS *An. sundaicus* kadar sitokin IL-10 meningkat. Peningkatan kadar IL-10 dapat dilihat pada gambar 4.6 (b).

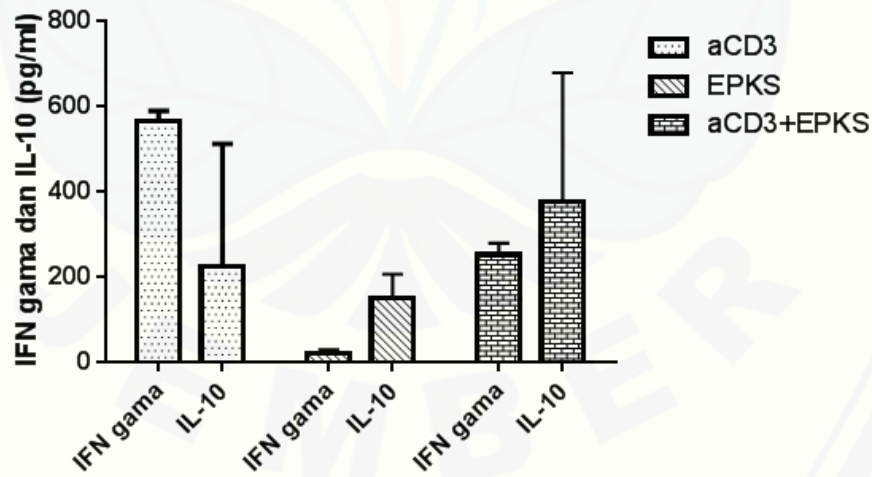
Dalam penelitian ini konsentrasi EPKS yang digunakan untuk inkubasi kultur PBMC adalah 25 μ g/ml. Pada pengukuran kadar sitokin IFN- γ yang distimulus oleh aCD3 menunjukkan produksi sitokin yang tinggi. Pada kelompok PBMC yang distimulus dengan aCD3+EPKS *An. sundaicus* (25 μ g/ml) menunjukkan kadar sitokin IFN- γ yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok PBMC yang hanya distimulus aCD3. Hal tersebut menunjukkan adanya penurunan produksi sitokin pada kelompok yang distimulus menggunakan aCD3+EPKS *An. sundaicus*. Pada

kelompok PBMC yang hanya distimulus dengan EPKS *An. sundaicus* menunjukkan kadar sitokin yang sangat rendah.



(a) Kadar sitokin IFN- γ , terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok aCD3 dan aCD3+EPKS *(t-test $p=0,001 < 0.05$)

(b) Kadar sitokin IL-10, terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok aCD3 dan aCD3+EPKS*(t-test $p=0,001 < 0.05$)



(C) Perbandingan kadar sitokin antara IFN- γ dan IL-10

Gambar 4.6 Kadar sitokin IFN- γ dan IL-10 pada kultur PBMC *in vitro* yang di inkubasi dengan EPKS *An. sundaicus* dalam waktu inkubasi 24 jam.

Pada pengukuran sitokin IL-10 menunjukkan adanya peningkatan kadar produksi IL-10 jika dibandingkan antara kelompok yang hanya distimulus oleh aCD3 dengan kelompok yang distimulus dengan campuran aCD3 dan EPKS *An. sundaicus*. Sedangkan pada kelompok PBMC yang hanya distimulus dengan EPKS *An. sundaicus* memiliki jumlah produksi sitokin IL-10 yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan produksi sitokin IFN- γ dalam well perlakuan yang sama. Pada kelompok yang distimulus dengan EPKS *An. sundaicus* menunjukkan kadar sitokin yang tinggi.

Sitokin yang diproduksi oleh Th1 dan Th2 sifatnya antagonis, misalkan pada saat IFN- γ tinggi maka produksi IL-4/IL-10 akan menurun (Chomarat *et al.*, 1993). Pada paparan awal antigen secara umum, antigen yang masuk akan direspon oleh inang melalui jalur Th1, yaitu dengan aktivasi makrofag. Pada paparan awal antigen secara umum, sitokin yang paling banyak diproduksi adalah IL-2 dan IFN- γ (respon Th1). Pada paparan berikutnya (sekunder) maka respon imun akan melewati jalur respon Th2 yaitu dengan peningkatan produksi sitokin seperti IL-4 dan IL-10 yang dapat mengaktivasi sel B untuk membentuk sel plasma yang akan membentuk respon imun spesifik (seperti IgG). Hal tersebut berbeda pada paparan awal saliva arthropoda, menurut Fuchsberger *et al.* (1995) pada paparan awal saliva arthropoda akan menyebabkan pergeseran subset dari Th1 menuju Th2, yang ditunjukkan dengan menurunnya produksi sitokin proinflamatori seperti IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-5, IL-6, IL-7, dan IL-8 yang didemonstrasikan secara invitro menggunakan kultur sel leokosit manusia. Dalam penelitian ini pada pengukuran IFN- γ dan IL-10 yang masing-masing perlakuan diambil dari well yang sama saat dikulturkan. Hal ini menunjukkan kesesuaian dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan paparan awal arthropoda akan meningkatkan produksi sitokin seperti IL-4 dan IL-10 sedangkan sebaliknya menekan produksi sitokin proinflamatory seperti IFN- γ . Pada Gambar 4.6 (c) dapat dilihat, apabila dibandingkan antara kelompok PBMC yang diinkubasi menggunakan aCD3+EPKS *An. sundaicus* menunjukkan rendahnya kadar sitokin IFN- γ jika dibandingkan kadar produksi IL-10. Begitu juga pada kelompok yang

diinkubasi menggunakan EPKS *An.sundaicus* menunjukkan hal yang sama yaitu IL-10 kadarnya lebih tinggi dibandingkan dengan kadar IFN- γ dalam satu well perlakuan yang sama. Sedangkan pada kelompok yang diinkubasi tanpa EPKS, yaitu kelompok aCD3 menunjukkan hasil yang berbeda, kadar IFN- γ lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar IL-10.

Hasil penelitian ini menunjukkan kesesuaian dengan konsep yang dipaparkan oleh Donovan *et al.* (2007) & Fontaine *et al.* (2011) yang menyebutkan paparan saliva arthropoda akan menyebabkan polarisasi system imun inang menjadi respon Th2, perubahan respon tersebut ditunjukkan dengan meningkatnya kadar sitokin IL-4 dan IL-10 (sitokin yang menginduksi Th2) dan menurunnya kadar sitokin proinflamatori seperti IFN- γ dan IL-12. Dari hasil penelitian ini dapat dibuktikan bahwa dengan adanya paparan awal saliva nyamuk *An. sundaicus* terbukti dapat menekan produksi sitokin IFN- γ dan sebaliknya dapat meningkatkan produksi sitokin IL-10 sebagai aktifator sel Th 2 untuk menginduksi sel B yang pada akhirnya dapat membentuk antibodi spesifik seperti IgG.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan paparan *An. sondaicus* mampu menginduksi tingginya kadar IgG. Kadar IgG anti protein saliva *An. sondaicus* terbukti lebih tinggi dibandingkan kadar IgG anti protein saliva *Ae. aegypti*. Lebih lanjut, kelompok umur 11-40 tahun memiliki kadar IgG tertinggi dibandingkan dengan kelompok umur lainnya. Inkubasi kultur PBMC dengan EPKS *An. sondaicus* mampu memodulasi jalur respon imun dari Th1 menjadi Th2 yang ditunjukkan dengan penurunan kadar sitokin IFN- γ dan peningkatan kadar sitokin IL-10. Hal ini menunjukkan bahwa EPKS *An. sondaicus* terbukti memiliki peranan dalam memodulasi jalur respon imun inang secara *in vitro*.

5.2 Saran

EPKS yang digunakan sebagai antigen lebih baik dalam keadaan *fresh*, apabila EPKS terlalu lama disimpan maka akan mengurangi kualitas proteinnya. Pada saat isolasi PBMC diusahakan agar yang diambil hanya sel-sel *mononuclear* (PBMC) saja, karena ketika terdapat sel darah merah dalam jumlah banyak maka sel tidak dapat dikulturkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, U.F. 2005. *Manajemen Penyakit Berbasis Wilayah*. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- Ahmad, R., Wan, A., Zurainee M., Zamree I., Azahari A., Mohd N., & Lee H. 2011. Mapping of Mosquito Breeding Sites In Malaria Endemic Areas in Pos Lenjang, Kuala Lipis, Pahang, Malaysia. *J. of Malaria*. Vol.10:361
- Ali, Z.M., Bakli, M., Fontaine, A., Bakkali, N., Hai, V., Audebert, S., Boublik, Y., Pages, F., Remoue, F., Rogier, C., Fraiser, C., & Almeras, L. 2012. Assessment Of Anopheles Salivary Antigens As Individual Exposure Biomarkers to Species-Specific Malaria Vector Bites. *J. of Malaria*. Vol.11:439
- Anonim. 2012. *Daftar kasus Kejadian Malaria di Desa Bangsring*. Tidak Diterbitkan. Laporan Tahunan. Banyuwangi: Puskesmas Wongserejo
- Anonim. 2015. <http://lifescience.roche.com/shop/products/nonidet-p40-substitute/>[diakses tanggal 18 Maret 2015].
- Anonim. 2015. <http://www.acdbio.com/applications/research-solutions/peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmcs/>. [diakses tanggal 18 Maret 2015].
- Anonim. 2015. <http://www.diagenode.com/en/topics/sonication/more-about.php>. [diakses tanggal 18 Maret 2015]
- Ariati, Y., Wigati., Andris,H., & Sukowati, S. 2011. Bioekologi Vektor Malaria Nyamuk *Anopheles sunaicus* di Kecamatan Nongsa, Kota BATAM, Tahun 2008. *J. Ekologi Kesehatan*. Vol.10(1): 29-37
- Arif, N. 2012. *Plasmodium yang Dominan Dalam Nyamuk Anopheles Betina (Anopheles spp.) Pada Beberapa Tempat di Distrik Manokwari Barat*. http://eprints.unipa.ac.id/90/1/Arif/2CNurhaedah_Plasmodium/20yg/20domissan/20dml/20nyamuk/20Anopheles/20Betina/20.pdf. [diakses tanggal 2 maret 2014].

- Barodji, D.T.B, Boesri, H., & Sudini, S.2003. Bionomik Vektor dan Situasi Malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta. *J. Ekologi Kesehatan*. Vol.2(2): 209-216
- Bratawidjaja, K.G., & Rengganis, I. 2014. *IMUNOLOGI DASAR Edisi ke-11(Cetakan ke-2)*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Bruce-Chwatt, L. J. 1980. *Essential Malariology*. London: William Heinemann Medical Books Ltd.
- Busch, W., Bastian, S., Trahorch, U., Iwe, M., Kuehnel, D., Meissner, T., Springer, A., Gelinsky, M., Richter, V., Ikonomidou, C., Potthoff, A., Lehmann, I., & Schirmer, K. 2011. Internalisation Of Engineered Nanoparticles Into Mammalian Cells In Vitro: Influence Of Cell Type And Particle Properties. *J. Nanopart*. Vol.13:293-310.
- CDC. 2004. National Center For Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases (ZVED) Glossary. Content Source: Division Of Parasitic Diseases. Page Last modified.
- CDC. 2010. *Anopheles Mosquitoes*. [http://www.Centers_for_Disease_Kontrol_and_Prevention_\[CDC\]/Anopheles](http://www.Centers_for_Disease_Kontrol_and_Prevention_[CDC]/Anopheles) [diakses tanggal 27 Februari 2014]
- Chomarat, P., Rissoan, M.C., Banchereau, J., & Miossec, P.1993. Interferon γ Inhibits Interleukin 10 Production by Monocytes. *Brief Definitie Report*. Vol.177:523-527
- Depkes RI. 2009. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes RI. 2010. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Dhar, R. & Kumar, N. 2003. Role of Mosquito Salivary Gland. *Current Science*. Vol. 85(9):1308-1313.
- Dharmawan, R. 1993. *Metode Identifikasi Spesies Kembar Nyamuk Anopheles*. Solo: Sebelas Maret University Press

- Dinkes Jatim. 2012. *Pembangunan Kesehatan Provinsi Jawa Timur Tahun 2010-2011*. Surabaya: Dinas Kesehatan Jawa Timur
- Donovan, JM., Messmore, AS., Scrafford, DA., Sacks, DL., Kamhawi S., & McDowell MA. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection With Malaria Parasites. *J. of Infection and Immunity*. Vol.75:2523-2530.
- Drame, PM, Poinsignon A, Besnard P, Le Mire J, Dos-santos MA, Sow CS, Cornelié S, Foumane V, Toto JC, & Sembene M. 2010. Human Antibody Response To *Anopheles Gambiae* Saliva: An Immune-Epidemiological Biomarker To Evaluate The Efficacy Of Insecticide-Treated Nets In Malaria Vector Kontrol. *J. of Tropical Medicine And Hygiene*. Vol.83:115-121
- Dusfour, I., Harbach R.E., & Manguin Sylvie. 2004. Bionomics And Systematic Of The Oriental *Anopheles Sundaicus* Complex In Relation To Malaria Transmission And Vector Control. *J. of Tropical Medicine And Hygiene*. Vol.71(4): 518-524
- Elyazar, I.R.F., Sinka, M., Gething, P., Tarmidzi, S., Surya, A., Kusriastuti, R., Winarno., Baird, K., Hay, s., & Bangs, M. 2013. The Distribution and Bionomics of *Anopheles* Vector Mosquitoes in Indonesia. *J. Advances in Parasitology*. Vol.83 : 218
- 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, A., Fusai, T., Brioland, S., Buffet, S., Villard, C., Baudelet, E., Pophillat, M., Granjeaud, S. Rogier, C., & Almeras, L. 2012. *Anopheles* Salivary Gland Proteomes From Major Malaria Vectors. *J.of BMC Genomics*. Vol.13:614
- Fontaine, A., Pascal, A., Orlandi-Paradines, E., Diouf, I., Remoue, F., Pages., F., Fusai, T., Rogier, C., & Almeras, L. 2011. Relationship Between Exposure To Vector Bites And Antibody Responses to Mosquito Salivary Glands Extracts. *J. of Immunological Markers of Exposure*. Vol.6(12):1-10

- Fontaine,A., Diouf., I, Bakkali., M.D., Pages F., Fusai, T., Rogier, C., & Almeras, L. 2011. Implication of Haematophagous Arthropod Salivary Proteins in Host-Vector Interaction. *J Parasite & Vectors*. Vol.4: 187
- Fuchsberger N.,Kita M., Hajnicka, V., Imanishi, J., Labuda, M., & Nutttal, P.A. 1995. Ixodid Tick Salivary Gland Extracts Inhibit Production Of Lipopolysaccharide-Induced Mrna Of Several Different Human Cytokines. *J.of Experimental and Applied Acarology*. Vol.19: 671-676.
- Gandahusada, S., Ilahude, H.D., & Pribadi, W. 2000. *Parasitologi Kedokteran*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI
- Garvin, J.E., Koretzky, G.A., & Jordan, M.S. 2009. T cell Activation. *J.Annual Review Immunology*. Vol.27:591-619.
- Gillespie R. D, Mbow M. L., & Titus R. G. 2000. The Immunomodulatory Factors of Bloodfeeding Arthropod Saliva. *J.Parasite Immunology*. Vol.22: 319-331.
- Hadi, U.K & Koesharto, FX. 2006. *Insektisida Permukiman Dalam Sigit, H.S Dan Upik, U.K. Hama Permukiman Indonesia Pengenalan, Biologi Dan Pengendalian*. Bogor: Unit Kajian Pengendalian Hama Permukiman fakultas Kedokteran Hewan, IPB.
- Harijanto, P.N. dalam PAPDI. 2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi IV*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Harijanto, P.N., Agung ., & Gunawan. 2010. *Malaria dari Molekuler ke Klinis Edisi 2*. Jakarta: EGC Press
- Kemenkes RI. 2011. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan mengenai Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Jakarta: Tim Redaksi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Latief, N., Pudjiadi., & Ghazali, P.2005. *Ilmu Kesehatan Anak*. Jakarta : Infomedika
- Lavazec C., Boudin C, Lacroix, B.S., Diop, T.S., Boisson., Tahar R., & Bourguoin. 2007. Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *J. of Infection and Immunity*. Vol.75:4

- Lyimo, E., & Takken, W. 2008. Effects Of Adult Body Size On Fecundity And The Pre-Gravid Rate Of *Anopheles Gambiae* Females In Tanzania. *J. of Medical and Veterinary Entomology*. Vol.7 : 328-332
- Mardiana, W., Wigati, W., & Suwaryono T. 2003. Aktivitas Menggigit *Anopheles sundaicus* di Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. *J. Media Litbang Kesehatan*. Vol.13(2):26-30
- Miller, R.A.1996.The Aging Immune System: Primer and Prospectus. *J. Science*. Vol:273:70-74
- Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC & Titus RG. 2001. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection With Leishmania Major And Vaccinating Against It Protects Against L. Major Infection. *J immunol*. Vol.167:5226-5230.
- Nurmaini. 2003. *Mengidentifikasi Vektor dan Pengendalian Nyamuk Anopheles. aconitus Secara sederhana.*
<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/3705/1/fkm-nurmaini1.pdf>.
[diakses tanggal 10 Februari 2014].
- O'Connor C.T & A. Soepanto, 1999. *Kunci Bergambar Nyamuk Anopheles Dewasa di Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Palm N., & Medzhitov R. 2009. Pattern Recognition Receptors and Control of Adaptive Immunity. *J. Immunological Review*. Vol.327(5963):221-233
- Peng Z., & Simon F.E.R. 2004. Mosquito Allergy: Immune Mechanisms and Recombinant Salivary Allergens. *J. of International Archives of Allergy and Immunology*. Vol.133: 198-209
- Remoue, F., Eric A., Sylvie, c., Cheikh, s., badara, c., Souleymane, d., Francois, m., Boulanger, D., & Simondon, f. 2007. IgE and IgG4 Antibodi Responses To *Aedes Saliva* In African Children. *J.of Elsevier*. Vol.104:108-115.

- Sabbatani S., Florino S., & Manfredi R. 2010. The Emerging of the Fifth Malaria Parasite (*Plasmodium Knowlesi*) A public health concern Brazil. *J. of Infect Disease*. Vol.45: 1-20
- Sari W., Zanaria TM., & Agustina E. 2008. *Studi Jenis Nyamuk Anopheles pada Tempat Perindukannya di desa Rukoh Kecamatan Syiah Kuala Kota Banda Aceh*. <http://jurnal.unsyiah.ac.id/JBE/article/view/456>. [diakses tanggal 14 Maret 2014]
- Sembel, DT. 2009. *Entomologi Kedokteran*. Yogyakarta: Penerbit Andi
- Shinta, S.S., Supratman, S., & Mardiana. 2003. Komposisi Spesies Dan Dominasi Nyamuk *Anopheles* di Daerah Pantai Banyuwangi, Jawa Timur. *J. Media Litbang Kesehatan*. Vol.8(3):1-8
- Stoops, C.A., Dwiko., Amurl., Heri., Kathryn., & Supratman, S. 2009. Bionomics of *Anopheles spp.* (Diptera: Culicidae) in malaria Endemic Region of Sukabumi, west Java, Indonesia. *J. of Vector Ecology*. Vol.34 (2): 200-207
- Titus R.G, Bishop J.V, & Mejia J.S. 2006. The Immunomodulatory Factors Of Arthropod Saliva And The Potential For These Factors To Serve As Vaccine Targets To Prevent Pathogen Transmission. *J. Parasite Immunology*. Vol.28:131-141
- Waitayakul A., Somsri S., Sattabongkot J., Looareesuwan S., Cui L., & Udomsangpetch R. 2006. Natural Human Humoral Response To Salivary Gland Proteins Of *Anopheles* Mosquitoes In Thailand. *J. of Acta Tropica*. Vol.98:66-73
- WHO. 2000. *Malaria Transmission Blocking Vaccine: an Ideal Public Good*. Geneva: World Health Organization Press
- WHO. 2007. *World Malaria Report 2007*. Geneva: World Health Organization Press
- WHO. 2011. *World Malaria Report 2011*. Geneva: World Health Organization Press
- WHO. 2013. *World Malaria Report 2013*. Geneva: World Health Organization Press
- Wigati, R.A., Mardiyana., Mujiyono., & Alfiah. 2010. Deteksi Protein circum Sporozoite pada spesies nyamuk *Anopheles vagus* tersangka Vektor malaria di

- Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo dengan uji *EnzymLinked Imunosorbent Assay (ELISA)*. *J.Media Litbang Kesehatan*. Vol.20(3):118-123
- WRBU. 2015. http://www.wrbu.org/SpeciesPages_ANO/ANO_A-det/ANsun_A-det.html [diakses tanggal 16 Maret 2015]
- Wright, K.A. 1969. The Anatomy of Salivary Glands of *Anopheles stephensi* Liston. *Canadian J. of Zoologi*. Vol:47:579-587
- Yang Y., & Ma H. 2009. Western Blotting and ELISA Techniques. *J.Researcher*. Vol.1(2):67-86
- Yudhiastuti, Ririh. 2008. Gambaran Faktor Lingkungan Daerah Endemik Malaria di Daerah Berbatasan (Kabupaten Tulungagung dengan Kabupaten Trenggalek). *J. Kesehatan Lingkungan*. Vol.4(2):9-20

A. Inform Concern**LEMBAR PERSETUJUAN PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : _____

Umur/ Kelamin : _____ Th. / Laki-laki Perempuan *)

Alamat : _____

Dengan ini sesungguhnya saya menyatakan:

PERSETUJUAN

Untuk diambil darah sebanyak 3 ml untuk tujuan penelitian “KARAKTERISASI FAKTOR IMUNOMODULATOR DARI KELENJAR SALIVA VEKTOR MALARIA *Anopheles*”.

Saya telah mengerti sepenuhnya tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan di atas dan yang telah dijelaskan oleh tim peneliti tentang tujuan dan manfaat penelitian serta risiko yang ditimbulkan oleh tindakan medis tersebut.

Saya telah diberikan kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan telah diberikan jawaban dengan jelas dan benar. Dengan ini saya menyatakan bahwa saya bersedia secara sukarela untuk ikut serta menjadi salah satu subyek dalam penelitian ini.

Peneliti

.....
Yang Membuat Pernyataan

(Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.)

()

B.1. Analisis Data IgG Berdasarkan Antigen

Deskriptif

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	.0000	.00000	.0000	.0000	.0000	.00	.00
Ag. An. Sundaicus	3	.0503	.00058	.0003	.0489	.0518	.05	.05
Ag. Ae. Aegypti	3	.0337	.00635	.0036	.0179	.0494	.03	.04
Total	9	.0280	.02243	.0074	.0108	.0452	.00	.05

Uji Anova

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	2	.002	145.500	.000
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.004	8			

Uji Duncan

OD

Antigen	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a Kontrol	3	.0000		
Ag. Ae. Aegypti	3		.0337	
Ag. An. Sundaicus	3			.0503
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

B.2. Analisis Data IgG Berdasarkan Kelompok Umur

Deskriptif

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	.00000	.000000	.000000	.00000	.00000	.000	.000
neonatus	3	.00033	.003215	.001856	-.00765	.00832	-.002	.004
0-10th	3	.03733	.005033	.002906	.02483	.04984	.032	.042
11-40th	3	.06933	.010017	.005783	.04445	.09422	.059	.079
>40th	3	.05367	.002309	.001333	.04793	.05940	.051	.055
Total	15	.03213	.029323	.007571	.01589	.04837	-.002	.079

Uji Anova

ANOVA

OD

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.012	4	.003	103.966	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.012	14			

Uji Duncan

OD

Umur		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	Kontrol	3	.00000			
	neonatus	3	.00033			
	0-10 th	3		.03733		
	>40 th	3			.05367	
	11-40 th	3				.06933
	Sig.		.940	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

B.3. Analisis Data Sitokin Berdasarkan Antigen

Deskriptif IFN- γ

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Medium (Kontrol)	2	31.8165	2.98753	2.11250	4.9746	58.6584	29.70	33.93
EPKS 25	2	19.9725	9.06864	6.41250	-61.5060	101.4510	13.56	26.39
aCD3	2	566.6810	22.83106	16.14400	361.5520	771.8100	550.54	582.83
aCD3 + EPKS 25	2	251.6465	27.31200	19.31250	6.2579	497.0351	232.33	270.96
Total	8	217.5291	237.40743	83.93620	19.0515	416.0067	13.56	582.83

Uji T – Test

aCD3 & aCD3+EPKS *An. sundaicus*

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Antigen	4	3.5000	.57735	.28868

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Antigen	12.124	3	.001	3.50000	2.5813	4.4187

Deskriptif IL-10

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Medium (Kontrol)	2	63.5600	.98995	.70000	54.6657	72.4543	62.86	64.26
EPKS 25	2	149.661	56.64067	40.05100	-359.2352	658.5572	109.61	189.71
aCD3	2	224.968	287.72104	203.44950	-2360.102	2810.039	21.52	428.42
aCD3 + EPKS 25	2	376.082	303.68186	214.73550	-2352.390	3104.555	161.35	590.82
Total	8	203.568	201.30648	71.17259	35.2716	371.8644	21.52	590.82

UJI T-test

aCD3 & aCD3+EPKS *An. sundaicus*

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Antigen (IL10)	4	3.5000	.57735	.28868

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Antigen (IL10)	12.124	3	.001	3.50000	2.5813	4.4187

C. KOMPOSISI LARUTAN DAN BUFFER

C.1 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva Nyamuk

Buffer Lisis : 1,5 mM MgCl₂; 10mM Tris-HCl; 2 mM EDTA-NaOH; 10 mM NaCl; 1% Nonidet P-40

C.2 Isolasi dan Kultur Pheripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

Medium Komplit : 500 ml Medium RPMI; 5 ml Penisilin; 5 ml L-Glutamin; 500 µl Gentamisin; 10 % FCS (*Fetal Calf Serum*)

C.3 Uji ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*)

- a. Larutan PBS (Volume total 10 L, pH 7,2) : 80 gr NaCl; 14,4 gr Na₂HPO₄; 2,4 gr KH₂PO₄; 2,0 gr KCl
- b. *Buffer* Pencuci (PBS-T) : Larutan PBS; 0,005% Tween 20
- c. *Coating Buffer* (Volume total 50 ml, pH 9,6) : 0,0795 gr Na₂CO₃; 0,01464 NaHCO₃; 0,01 gr NaN₃; 30 ml DeIH₂O
- d. *Blocking Buffer* : PBS-T ; 1% BSA (*Bovine Serum Albumine*)

D. Data Kuisiner

Nama	Umur	Jarak rumah dengan kandang	Aktivitas luar rumah (Malam Hari)	Riwayat malaria	Bepergian ke luar jawa	Riwayat digigit nyamuk	Dimana digigit nyamuk	Waktu digigit Nyamuk	Upaya pencegahan vektor
Siti Kholifah	7 tahun	Dekat	tidak	ya (2010)	tidak	sering	di luar dan di dalam rumah	malam hari	obat nyamuk bakar
Farin Yudha Prasetya	7 tahun	Dekat	tidak	ya (2011)	tidak	sering	di dalam rumah	malam hari	obat nyamuk semprot
Sofiatun Rohmatullah	10 tahun	dekat	tidak	ya (2012)	tidak	jarang	di dalam rumah	malam hari	obat nyamuk bakar
Effendi Purwanto	27 tahun	dekat	Ya (Pekerja proyek)	ya (2011)	tidak	sering	di luar rumah	malam hari	tidak
Addul Wafi	23 tahun	dekat	ya (satpam di pabrik)	tidak	tidak	sering	di luar rumah	malam hari	lotion anti nyamuk
Abdul Ghofur	35 tahun	dekat	ya (satpam di pabrik)	ya (2012)	ya (pulau bali)	sering	di luar rumah	malam hari	lotion anti nyamuk
Mochammad Fadli	36 tahun	dekat	ya (berkumpul di warung)	tidak	tidak	sering	di luar dan di dalam rumah	malam hari	obat nyamuk bakar
Danang	31 tahun	jauh	ya (memancing)	tidak	tidak	sering	di luar rumah	malam hari	lotion anti nyamuk
Suliyati	45 tahun	dekat	ya (berkumpul di luar)	tidak	tidak	sering	di dalam rumah	pagi hari	obat nyamuk bakar
Busairi	47 tahun	dekat	ya (berkumpul di luar)	ya (2011)	ya (Irian)	sering	di dalam dan di luar rumah	malam hari	obat nyamuk bakar
Sahwani	65 tahun	dekat	ya (berkumpul di luar)	ya (2011)	tidak	sering	di dalam rumah	malam hari	lotion anti nyamuk
Sulaiman	44 tahun	jauh	ya (mancing)	ya (2011)	tidak	sering	di luar rumah	malam hari	lotion anti nyamuk
Bunarjo	65 tahun	dekat	ya (mengontrol kelapa)	ya (2011)	ya (pulau bali)	sering	di dalam rumah	malam hari	obat nyamuk bakar