
KONFIRMASI *ANOPHELES BARBIROSTRIS* SEBAGAI VEKTOR MALARIA DI WAIKABUBAK MELALUI DETEKSI PROTEIN CIRCUM SPOROZOITE

Anopheles barbirostris Confirmation as Malaria Vector in Waikabubak Through The Detection of Circum Sporozoite Protein

Mara Ipa¹, Heni Prasetyowati¹, Yuneu Yuliasih¹

Abstract. *Anopheline species confirmed as malaria vector if the salivary gland contained sporozoites. One of the method to confirmed it was through an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The aim of this study was to investigate the presence of circum sporozoite protein (CSP) in the mosquito of Anopheles barbirostris with ELISA method. The study was conducted in malaria endemic area named Modu Waimaringu Village, Waikabubak District, Sumba Barat Regency in March 2011. The study design was cross-sectional study, mosquito for the ELISA test were collected only from animal bait. ELISA method examination used on An. barbirostris body parts (i.e. the head-thorax) where sporozoites of P. falciparum or P. Vivax possibly be found. The results showed that 40 samples of An. barbirostris mosquitoes which acquired from the mosquito bait in Modu Waimaringu Village was negative (100%). It means that there was no CSP found and An. barbirostris was not a malaria vector in the area.*

Key words: *circum sporozoite protein, Anopheles barbirostris, ELISA*

Abstrak. Nyamuk *Anopheles* spp. dinyatakan sebagai vektor malaria apabila ditemukan sporozoit di kelenjar ludahnya dan salah satu metode yang dapat dilakukan adalah melalui uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi protein circum sporozoite pada tersangka vektor malaria *Anopheles barbirostris* melalui metode ELISA. Penelitian ini dilakukan di daerah endemis malaria di Desa Modu Waimaringu, Kecamatan Waikabubak, Kabupaten Sumba Barat pada bulan Maret 2011. Desain studi penelitian ini adalah *cross sectional*, nyamuk uji diperoleh melalui penangkapan nyamuk sekitar kandang. Uji ELISA dilakukan pada bagian kepala dan dada nyamuk *An. barbirostris* yang potensial mengandung sporozoit *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Hasil penelitian menunjukkan dari 40 sampel *An. barbirostris* yang diuji di Desa Modu Waimaringu seluruhnya negatif (100%). Hal ini berarti tidak ditemukannya protein circum sporozoite dan *An.barbirostris* bukan vektor pada daerah tersebut.

Kata Kunci: *protein circum sporozoite, Anopheles barbirostris, ELISA*

Naskah masuk: 23 Mei 2012 | Review 1: 5 Juni 2012 | Review 2: 17 Juni 2012 | Naskah layak terbit: 21 Juni 2012

1. Loka Penelitian dan Pengembangan Penyakit Bersumber Binatang. Pangandaran Kab. Ciamis 46396, Indonesia. Alamat koresponden: email: tiarmara@gmail.com

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit berbahaya yang disebabkan oleh parasit dari genus Plasmodium dan ditularkan oleh nyamuk betina dari genus Anopheles sebagai vektornya. Terdapat 4 jenis malaria pada manusia yaitu malaria tertiana yang disebabkan oleh *P. vivax*, malaria tropika yang disebabkan oleh *P. falciparum*, malaria kuartana yang disebabkan oleh *P. malariae*, dan malaria ovale yang disebabkan oleh *P. ovale*.

Berdasarkan data dari profil Dinas Kesehatan Kabupaten Sumba Barat pada tahun 2009, Kabupaten Sumba Barat merupakan daerah endemis malaria, yang setiap tahunnya mengalami peningkatan jumlah kasus. Data tahun 2007 sebesar 10.382 kasus dengan *Annual Malaria Incidence* (AMI) 104% dan tahun 2008 mengalami kenaikan sebesar 14.879 kasus dengan AMI 143%. Apabila dilihat berdasarkan *Annual Parasite Incidence* (API) tahun 2007 yaitu sebesar 15% dan mengalami kenaikan pada tahun 2008 sebesar 30%. Hal ini menunjukkan bahwa ada peningkatan kasus positif malaria yang ditemukan pada saat pemeriksaan mikroskop terhadap sediaan darah penderita malaria. Angka kematian penderita malaria yang dirawat inap di Rumah Sakit Umum Sumba Barat pada tahun 2007 sebanyak 20 penderita, tahun 2008 sebanyak 14 penderita, dan tahun 2009 sebanyak 4 penderita.¹

Hasil penangkapan nyamuk yang dilakukan di Desa Weehura, Kecamatan Wanokaka, Kabupaten Sumba Barat

diperoleh jenis nyamuk antara lain *An. subpictus*, *An. anullaris*, *An. vagus*, dan sebagai vektor penularnya *An. subpictus* dan *An. aconitus*. Sedangkan hasil penangkapan nyamuk di Desa Baliloku adalah *An. subpictus*, *An. tesselaus*, *An. anullaris*, *An. idenfinicus*, dan *An. barbirostris*. Sebagai vektor penularnya adalah *An. barbirostris* dan *An. subpictus*.²

Spesies Anopheles dinyatakan sebagai vektor malaria di suatu daerah apabila terbukti mengandung sporozoit di dalam kelenjar ludahnya. Spesies Anopheles vektor malaria di suatu daerah, belum tentu sebagai vektor malaria di daerah lain. Keberadaan sporozoit dapat diperiksa dengan cara pembedahan kelenjar ludah nyamuk dan dapat juga dengan cara *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).²

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay telah digunakan sebagai salah satu cara epidemiologi untuk mengidentifikasi nyamuk terinfeksi malaria. Antibodi monoklonal dipakai sebagai fase padat dan dikonjugasikan dengan enzim, sebagai penanda terdapatnya protein *circumsporozoite* dalam homogenat nyamuk yang diinkubasi pada sumur *microplate*. Penggunaan zat antibodi monoklonal terhadap sporozoit dengan ELISA bertujuan untuk mengetahui berbagai spesies vektor malaria di berbagai daerah endemik malaria, *Immunofluorescent Assay* (IFA) dan *Immuno-radiometric Assay* (IRA) merupakan tes imunologis yang bersifat spesifik spesies dari antibodi monoklonal

yang dihasilkan terhadap antigen membran permukaan sporozoit malaria.³

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya protein circumsporozoite pada nyamuk *An. barbirostris* yang merupakan tersangka vektor di Desa Modu Waimaringu, Kecamatan Kota Waikabubak, Kabupaten Sumba Barat dengan uji ELISA dari potongan kepala-dada.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tempat dan waktu penelitian dilakukan di desa Modu Waimaringu, Kecamatan Kota Waikabubak, Kabupaten Sumba Barat. Penelitian merupakan penelitian *cross-sectional*, dilakukan sebagai survei lapangan. Jenis penelitian adalah eksploratif epidemiologis-analisis dengan menggunakan metode survei. Eksploratif artinya menggali informasi sebanyak-banyaknya dan seakurat mungkin.

Nyamuk yang digunakan didapat dari hasil penangkapan di sekitar kandang kemudian dilakukan pembedahan ovarium. *An. barbirostris parous* hasil tangkapan kemudian dipotong kaki-kakinya lalu dipisahkan dari kepala-dada untuk dilakukan uji ELISA. Bagian kepala-dada dimungkinkan mengandung sporozoit *P. falciparum* atau *P. vivax*.

Bahan yang digunakan dalam pengujian ELISA yaitu nyamuk *An. barbirostris* hasil koloni laboratorium yang tidak terinfeksi sebagai kontrol negatif. *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,2; *Blocking Buffer* (BB); *Casein*,

ABTS *Peroxidase Substrate*, Larutan *Nonidet P-40*, Larutan *Tween 20*, *MAb Pf*, *MAb Pv*, *Peroxidase-conjugated MAb Pf*, dan *Peroxidase-conjugated MAb Pv210* sebagai bahan pengujian ELISA.

Nyamuk *An. barbirostris* betina parous dipotong menjadi dua bagian yaitu kepala-dada dan perut. Hanya bagian kepala-dada yang diuji secara ELISA. Nyamuk diuji dalam *pool* (dikumpulkan sebanyak 5 ekor) ke dalam *vial eppendorf* lalu ditambahkan 100 μ l *grinding solution* (*Blocking Buffer* ditambah NP-40). Selanjutnya, nyamuk digerus dengan *electric grinder*, setelah nyamuk hancur, dicuci dengan 2×75 μ l *grinding solution* hingga volume akhir sampel 250 μ l. Homogenat nyamuk disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya untuk diuji. *Coating microplate* dengan PBS 50 μ l ditambah *capture monoclonal antibody P. falciparum* 0,10 μ g, *capture monoclonal antibody P. vivax*₂₁₀ 0,025 μ g dan *capture monoclonal antibody P. vivax*₂₄₇ 0,05 μ g. Homogenisasi, diambil, dan dimasukkan dalam setiap sumuran *microplate* 50 μ l. *Microplate* ditutup dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. *Capture* dalam sumuran dibuang, ditambahkan BB 200 μ l tiap sumuran, inkubasi selama 60 menit (tertutup dengan *aluminium foil*). *Blocking buffer* dalam sumuran dibuang, 50 μ l homogenat nyamuk *Anopheles* dimasukkan dalam sumuran, juga untuk kontrol positif (A1) dari *P. falciparum*, *P. vivax*, dan kontrol negatif (dari nyamuk *Anopheles sp* hasil koloni laboratorium yang tidak terinfeksi).

Inkubasi selama 2 jam (tertutup dengan *aluminium foil*). Sumuran dicuci dengan PBS-Tween 20 sebanyak 2×. Konjugat peroksidase (*peroksidase P. falciparum*, *P. vivax*₂₁₀, dan *P. vivax*₂₄₇ sebanyak 0,05 µg ditambahkan 50 µl BB) 5µl konjugat dengan 100 µl substrat ditambahkan dalam tiap sumuran. Inkubasi selama 1 jam dalam keadaan gelap (tertutup *aluminium foil*). Sumuran dicuci PBS-Tween 20 sebanyak 3×. Selanjutnya, 100 µl larutan substrat campuran ABTS (larutan A) dan H₂O₂ (larutan B) perbandingan 1 : 1 (20 ml : 20 ml) dimasukkan dalam tiap sumuran, ditutup *aluminium foil*, diinkubasi selama 30–60 menit pada panjang gelombang 405 nm. Hasil positif secara visual terlihat warna hijau.

HASIL

Kabupaten Sumba Barat merupakan salah satu kabupaten di Provinsi Nusa Tenggara Timur yang memiliki 6 kecamatan, salah satu yaitu Kecamatan Waikabubak. Berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Kabupaten Sumba Barat, di wilayah ini ditemukan kasus malaria. **Tabel 1** menunjukkan hasil uji ELISA negatif *P. falciparum* dan *P. vivax* dengan menggunakan ELISA *reader* sehingga diperoleh nilai absorben (OD) untuk kontrol positif dan negatif pada panjang gelombang 405 nm. Pada uji ELISA digunakan 1 *microplate*, keseluruhan lubang/sumuran pada uji ELISA ini (1 *microplate* ada 96 sumuran).

Tabel 1 Hasil Pemeriksaan Uji ELISA terhadap *An. barbirostris* yang Tertangkap Hinggap di Sekitar Kandang di Desa Modu Waimaringu, Kecamatan Kota Waikabubak, Kabupaten Sumba Barat

No.	Mab Solution	Jumlah Nyamuk dalam Sumuran	Nilai Absorben			
			Kontrol +	Kontrol -	Kandang 1	Kandang 2
1	A	5	1,983	0,163	0,144	0,139
2	B	5	1,858	0,151	0,095	0,101
3	C	5	0,792	0,162	0,121	0,127
4	D	5	0,780	0,137	0,115	0,124
5	E	5	0,031	0,035	0,034	0,028
6	F	5	0,030	0,031	0,029	0,029
7	G	5	0,033	0,031	0,035	0,030
8	H	5	0,029	0,028	0,028	0,026

Hasil uji dinyatakan positif apabila nilai absorben lebih tinggi dari nilai absorben kontrol positif. Dari hasil uji ELISA terhadap *An. barbirostris* di Desa

Modu Waimaringu, Kecamatan Kota Waikabubak, Kabupaten Sumba Barat didapatkan nilai negatif.

PEMBAHASAN

Anopheles merupakan salah satu genera nyamuk dan terdapat 400 spesies di kelompok ini. Berbagai laporan penelitian menyebutkan bahwa nyamuk *Anopheles* merupakan vektor berbagai penyakit. Sekitar 30–40 spesies nyamuk *Anopheles* menyebarkan malaria secara alami. Di Indonesia, *Anopheles* yang telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria sebanyak 20 spesies. Tiga spesies telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria di Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT), yaitu *An. barbirostris*, *An. subpictus*, dan *An. sundaicus*.⁴

Metode penentuan vektor malaria dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu pembedahan dan pemeriksaan kelenjar ludah, uji ELISA, dan metode sediaan toraks. Teknologi ELISA mempunyai tiga terapan dalam penelitian malaria, yaitu deteksi antibodi (seroepidemiologi), deteksi antigen (diagnosis), dan deteksi antigen (epidemiologi). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* telah digunakan sebagai salah satu cara epidemiologi untuk mengidentifikasi nyamuk terinfeksi malaria. Burkot⁵ mengemukakan penggunaan antibodi monoklonal spesifik untuk protein *circum sporozoite P. knowlesi*. Antibodi monoklonal ini dipakai sebagai fase padat dan dikonjugasikan dengan enzim, sebagai penanda terdapatnya protein *circum sporozoite* dalam homogenat nyamuk yang diinkubasi pada sumuran *microplate*.

Circum Sporozoite Protein (CSP) merupakan antigen terpenting yang terdapat pada permukaan sporozoit, memainkan peranan dalam memicu pembentukan antibodi terhadap parasit.⁶ Antibodi monoklonal diproduksi dengan spesifisitas yang telah ditentukan. ELISA dengan penangkapan antigen merupakan metode yang bermanfaat untuk mendeteksi secara cepat antigen protein spesifik seperti halnya homogenat nyamuk (gerusan nyamuk). ELISA menggunakan enzim yang direaksikan dengan substrat, menghasilkan produk dengan intensitas warna sebanding dengan kadar homogenat nyamuk yang diperiksa. Produk yang dihasilkan pada uji ELISA dapat dibaca dengan ELISA *reader* berdasarkan kerapatan optik yang hasilnya dapat dicetak melalui komputer.⁷

Nyamuk *An. barbirostris* dikenal berperan sebagai vektor malaria di Kabupaten Sumba Barat. *Anopheles barbirostris* merupakan vektor potensial untuk penyakit malaria, selain *An. sundaicus* dan *An. subpictus*. Spesies ini terdapat di seluruh Indonesia, baik di dataran tinggi maupun di dataran rendah.² *Anopheles barbirostris* pernah ditemukan positif mengandung sporozoit di daerah benteng (1938) dan Wonorejo (1939), Provinsi Sulawesi Selatan dilaporkan bahwa indeks sporozoit masing-masing 11 dan 13,15 %.⁸

Hasil penelitian di Kabupaten Sikka Flores, berdasarkan pembedahan saliva

dan uji ELISA terhadap *An. barbirostris* diperoleh hasil positif dengan metode penangkapan nyamuk uji dengan *landing collection*.⁹ Hasil tersebut berbeda dengan yang diperoleh di Kabupaten Sumba Barat, meskipun *An. barbirostris* merupakan vektor yang potensial untuk malaria tetapi dalam penelitian ini tidak didapatkan *An. barbirostris* yang mengandung protein *circum sporozoite*.

KESIMPULAN

Anopheles barbirostris hasil penangkapan di Desa Modu Waimaringu tidak ditemukan positif mengandung protein *circum sporozoite*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. *Profil Dinas Kesehatan Kabupaten Sumba Barat Tahun 2009*. 2009. DKK Sumba Barat.
2. Loka P2B2 Waikabubak. *Studi Kebijakan Dinamika Penularan Malaria di Kecamatan Wanokaka Kabupaten Sumba Barat*. JKPKBPPK. 2011.
3. Dit.Jen P2M & PLP. 1987. *Petunjuk Melakukan Macam-macam Uji Entomologi yang Diperlukan untuk Menunjang Operasional Program Pemberantasan Penyakit Ditularkan Serangga*. Jakarta. 7 hal .
4. Bangs, M.J. 1989. *The Sporozoite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Application in Malaria Epidemiology*. Buletin Penelitian Kesehatan 17(2): 197–205
5. Burkot, T.R., P.M. Graves, J.A. Cattan, R.A. Wirtz, dan F.D. Gibson. 1987. *The Efficiency of Sporozoite Transmission in The Human Malaria, P. falciparum and P. vivax*. Bulletin of the WHO 65(3): 375–380.
6. Dachlan, Y.P. 1997. *Malaria dan Penggunaan Teknologi Molekuler untuk Kepentingan Diagnostik dan Kajian Pola Epidemiologik serta Patofisiologi dalam Biologi Molekuler Kedokteran*. Editor: Suhartono, T.P. Airlangga University Press. Surabaya. 40–42 hal.
7. Wirtz, R.A., T.R. Burkot, P.M. Graves, dan R.G. Andre. 1987. *Field Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for P. falciparum and P. vivax Sporozoites in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea*. Journal Medical Entomology 24 (4): 433–437.
8. Van Hell J.C. *Lets Over d Anophelinen Fauna Van Zuid-Celebes met Vermeld*. Ing van de malaria-overbrengsters in dit gebied. Med.Maandbl.1950: 379–394.
9. Harijani A.M. Omposungu Sahat, Suyitno, dan Mursiatno. 1992. *Penelitian Pemberantasan Malaria di Kabupaten Sikka-Flores*. Cermin Dunia Kedokteran No. 79.