

DETEKSI PROTEIN *CIRCUM SPOROZOITE* PADA SPESIES NYAMUK *Anopheles vagus* TERSANGKA VEKTOR MALARIA DI KECAMATAN KOKAP, KABUPATEN KULON PROGO DENGAN UJI *ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)*

R.A.Wigati,* Mardiana,* Mujiyono,** Siti Alfiah**

CIRCUM SPOROZOITE PROTEIN DETECTION IN MOSQUITO SPECIES MALARIA VECTOR Anopheles vagus SUSPECTED IN KOKAP SUBDISTRICT, KULON PROGO REGENCY WITH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Abstract

Anopheles species as malaria vector, as if tested in the salivary gland containing sporozoites existence which could be checked in the mosquito salivary gland and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This study aimed to investigate the circum sporozoite protein in the mosquito of Anopheles vagus with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The study was conducted in malaria endemic area namely Hargorejo, Kalirejo, Hargowilis, and Hargotirto villages, Kokap subdistrict, Kulon Progo Regency in June-October 2005. The study design was cross-sectional study. ELISA performed on the An.vagus which is in ovaries shown parous. An.vagus parous body parts for the ELISA are the head-thorax, where it is possible to contain the sporozoites of Plasmodium falciparum or Plasmodium vivax. The results of ELISA to An.vagus in four research areas, showed that 41 samples of An.vagus mosquitoes in Hargorejo village, three positive (7,32%) circum sporozoites protein of Plasmodium falciparum, five samples of An.vagus mosquito in Kalirejo village, there is one positive (20%) circum sporozoites protein of P.falciparum. 16 samples of An.vagus mosquito in Hargowilis village, found one positive (6,25%) circum sporozoite protein of P.falciparum, one sample of An.vagus mosquito in Hargotirto village was not found circum sporozoite protein of P.falciparum (0%) and circum sporozoite protein of P.vivax (0%). The number of samples from four villages are 63 samples of mosquitoes, found five positive circum sporozoites protein of P.falciparum (7,94%) and not found circum sporozoite protein of P.vivax (0%). The results of ELISA showed more specimens found positive in mosquitoes containing circum sporozoite protein of P.falciparum in the animal cage, not in human, there were because of choice possibility is not selective. At a wavelength of 405 nm in the ELISA results were absorbent for An.vagus mosquitoes tested positive, ranging from 0,257 to 0,632. Value of absorbent positive control was 0,449 and negative control absorbent value were 0,208; 0,228; 0,202; 0,204; 0,207; 0,223; 0,206. The value of cut-off point is taken from the highest absorbent value of negative control is 0,228.

Keywords: Detection, Circum Sporozoite Protein, An.vagus, Kokap subdistrict, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

* Peneliti pada Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan

** Peneliti pada Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga

Pendahuluan

Malaria masih merupakan penyakit utama penyebab kesakitan dan kematian di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Saat ini diperkirakan 70 juta (35%) jumlah penduduk Indonesia tinggal di daerah berisiko tertular malaria.¹

Kabupaten Kulon Progo merupakan daerah endemis malaria, dan saat ini telah dilaporkan di seluruh wilayah Bukit Menoreh, meliputi; Kecamatan Kokap, Girimulyo, Samigaluh, Kalibawang dan Temon.²

Beberapa *Anopheles* sp merupakan vektor malaria di Kawasan Bukit Menoreh, dan spesies *Anopheles* telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria di Bukit Menoreh antara lain; *Anopheles aconitus*, *An. balabacensis* di Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang,³ *An. maculatus* di Kabupaten Kulon Progo.⁴

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. Adanya sporozoit dapat diperiksa dengan cara pembedahan kelenjar ludah nyamuk dan dapat juga dengan cara *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).⁵

Dalam bidang entomologi, penggunaan zat antibodi monoklonal terhadap sporozoit dengan *ELISA* bertujuan untuk mengetahui berbagai spesies vektor malaria di berbagai daerah endemik malaria, *Immunofluorescent* (IFA) dan *Immuno-radiometric Assay* (IRA) yang merupakan tes imunologis bersifat spesifik spesies dari antibodi monoklonal yang dihasilkan terhadap antigen membran permukaan sporozoit malaria.⁶

Antibodi monoklonal ini dipakai sebagai fase padat dan dikonjugasikan dengan enzim, sebagai penanda terdapatnya protein *Circum Sporozoite* (CS) dalam homogenat nyamuk yang diinkubasikan pada sumuran. Nyamuk yang ditangkap di berbagai daerah, dikeringkan dan disimpan sampai saatnya untuk pemeriksaan. Cara ini mempunyai kelebihan dibandingkan dengan teknik yang ada sekarang ini didalam pengumpulan data epidemiologi.

Metodologi

Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di desa endemis malaria yaitu Desa Hargorejo, Desa Kalirejo, Desa Hargowilis dan Desa Hargotirto, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, pada bulan Juni-Oktober 2005. 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.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya protein *Circum Sporozoite* pada nyamuk *Anopheles vagus* dengan uji *ELISA* dari potongan kepala-dada. Uji *ELISA* dilakukan pada *Anopheles vagus* tertangkap yang pada pembedahan ovarium terbukti parous. *Anopheles vagus* parous hasil tangkapan kemudian dipotong kaki-kakinya dan abdomen dipisahkan dari kepala-toraks (dada). Bagian tubuh *Anopheles vagus* parous yang dipergunakan untuk uji *ELISA* adalah kepala-toraks, dimana di bagian ini dimungkinkan mengandung sporozoit *Plasmodium falciparum* atau *Plasmodium vivax*. Nyamuk *Anopheles vagus* hasil koloni laboratorium yang tidak terinfeksi sebagai kontrol negatif. *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4; *Blocking Buffer* (BB); Casein, ABTS *Peroxidase Substrate*, Larutan Nonidet P-40, Larutan Tween 20, MAb Pf, MAb Pv, *Peroxidase-conjugated* MAb Pf, *Peroxidase-conjugated* MAb Pv₂₁₀.

Nyamuk *Anopheles vagus* 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 1-5 ekor) ke dalam vial *eppendorf* ditambahkan 50 µl *Blocking Buffer*/NP-40. Kemudian nyamuk digerus dengan *electric grinder*. Setelah nyamuk hancur, ditambahkan 250 µl larutan *Blocking Buffer* (BB). Homogenat nyamuk disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya untuk diuji. *Coating microplate* dengan PBS 5 ml ditambah *capture* monoklonal antibodi *P.falciparum* 20 µl dan *capture* monoklonal

antibodi *P.vivax*₂₁₀ 5 µl. dihomogenkan, diambil, dimasukkan dalam masing-masing sumuran *plate* 50 µl. *Microplate* ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Capture dalam sumuran dibuang, ditambahkan BB 200 µl tiap sumuran, inkubasi selama 60 menit (tertutup dengan aluminium foil). *Blocking Buffer* dalam sumuran dibuang, 50 µl homogenat nyamuk *Anopheles* dimasukkan dalam sumuran, juga untuk kontrol positif (A1) dari *P.falciparum* dan *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 3x. Konjugat peroksidase (peroksidase *P.falciparum* dan *P.vivax*₂₁₀ sebanyak 10 µl ditambahkan 5 ml BB) 50 µl ditambahkan dalam tiap sumuran. Inkubasi selama 1 jam (tertutup aluminium foil). Sumuran dicuci PBS-Tween 20 sebanyak 3x. 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. Hasil positif secara visual terlihat warna hijau.

Hasil dan Pembahasan

Malaria pada manusia hanya dapat ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Dari lebih 400 spesies *Anopheles* di dunia, hanya sekitar 67 spesies terbukti mengandung sporozoit dan dapat menularkan malaria. Di Indonesia telah ditemukan 22 spesies *Anopheles* yang menjadi vektor malaria, diantaranya; *Anopheles aconitus*, *Anopheles maculatus*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles sundaicus*, *Anopheles balabacensis* dan lain sebagainya.

Anopheles vagus dicurigai merupakan tersangka vektor malaria di Kawasan Bukit Menoreh, dimana Kabupaten Kulon Progo merupakan wilayah yang termasuk dalam kawasan ini sebagai daerah endemis malaria. Menurut Wicaksono⁷ dikatakan bahwa *Anopheles vagus* ditemukan positif mengandung *Plasmodium falciparum* dan juga *Plasmodium vivax* dari hasil *ELISA* di Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah, karena letak Purworejo berdekatan dengan Kabupaten Kulon Progo maka dapat diasumsikan akan terjadi hal serupa. Hal tersebut perlu dilakukan konfirmasi dengan pembuktian adanya sporozoit yang dapat diperiksa dengan cara pembedahan kelenjar ludah nyamuk

Anopheles dan cara *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (*ELISA*).⁵

Teknologi *ELISA* mempunyai tiga terapan dalam penelitian malaria yaitu; deteksi antibodi (seroepidemiologi), deteksi antigen (diagnosis) dan deteksi antigen (epidemiologi).

ELISA telah digunakan sebagai salah satu cara epidemiologi untuk mengidentifikasi nyamuk terinfeksi malaria. Burkot dkk.⁸ mengemukakan penggunaan antibodi monoklonal spesifik untuk protein *Circum Sporozoite Plasmodium 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 menimbulkan perlindungan diperantarai antibodi terhadap parasit.⁹

Antibodi monoklonal diproduksi terhadap antigen dengan spesifisitas yang telah ditentukan. *ELISA* dengan penangkapan antigen merupakan metode yang bermanfaat untuk mendeteksi secara cepat dari antigen protein spesifik seperti halnya dalam homogenat nyamuk (pul 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 (OD) yang hasilnya dapat dicetak melalui computer.¹⁰

Hasil pemeriksaan uji *ELISA* terhadap *Anopheles vagus* tertangkap di empat desa daerah penelitian, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta disajikan pada Tabel 1.

Dari tabel 1, ditunjukkan bahwa melalui uji *ELISA*, dari 41 sampel nyamuk *An.vagus* tertangkap di Desa Hargorejo, terdapat 3 positif (7,32%) mengandung protein *circum sporozoite* dari *Plasmodium falciparum*; 5 sampel nyamuk *An.vagus* penangkapan di Desa Kalirejo, terdapat 1 positif (20,00%) mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum*; 16 sampel nyamuk *An.vagus* penangkapan di Desa Hargowilis, ditemukan 1 positif (6,25%) mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum*; sedangkan 1 sampel nyamuk *An.vagus* penangkapan di Desa

Hargotirto tidak ditemukan protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* (0,00%) maupun protein *circum sporozoite* dari *P.vivax* (0,00%). Jumlah sampel dari empat desa daerah penelitian secara keseluruhan sebanyak 63 sampel, ditemukan 5 positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* (7,94%) dan tidak mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.vivax* (0,00%).

Tabel 2 memperlihatkan hasil uji *ELISA* positif *Plasmodium falciparum* terhadap *Anopheles vagus* dengan menggunakan *ELISA Reader* sehingga diperoleh nilai absorben (OD) untuk kontrol negatif dan kontrol positif pada panjang gelombang 405 nm di empat desa daerah penelitian.

Pada Tabel 2, ditunjukkan bahwa *An.vagus* terbukti positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* dengan uji *ELISA*. Pada uji *ELISA* digunakan 6 *microplate*, yang

dibagi menjadi 2 bagian, masing-masing untuk *P.falciparum* dan *P.vivax*, sehingga ada 3 *microplate P.falciparum* dan 3 *microplate P.vivax*. Keseluruhan lubang/sumuran pada uji *ELISA* ini (1 *microplate* ada 96 sumuran sehingga 6 *microplate* ada 576 sumuran), didapat hasil bahwa *An.vagus* mengisi 5 lubang/sumuran. Paling tidak 1 spesimen positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* setiap sumurnya. Pada penelitian ditemukan 5 sumuran yang positif dengan uji *ELISA*, berarti minimal 5 spesimen positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum*. Dengan perhitungan minimal positif *ELISA* yaitu 5 nyamuk mengandung protein *circum sporozoite* (7,94%). Hal tersebut lebih tinggi dari penelitian Widyastuti,³ pada *An.aconitus* dari 1395 nyamuk yang diperiksa hanya ditemukan 1 nyamuk positif mengandung protein *circum sporozoite*. Akan tetapi berbeda halnya dengan *An.balabacensis*

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan uji *ELISA* Terhadap *An.Vagus* Yang Tertangkap Hinggap di Sekitar Kandang di 4 Desa Daerah Penelitian, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta, Juni-Oktober 2005

No.	Lokasi Penelitian	Jumlah <i>An.vagus</i>	<i>ELISA</i> (+/-)	
			<i>P.falciparum</i> (%)	<i>P.vivax</i> (%)
1.	Desa Hargorejo	4)	+ 3 (7,32)	0 (0,00)
2.	Desa Kalirejo	5	+ 1 (20,00)	0 (0,00)
3.	Desa Hargowilis	16	+ 1 (6,25)	0 (0,00)
4.	Desa Hargotirto	1	0 (0,00)	0 (0,00)
	Ke-4 desa	63	+ 5 (7,94)	0 (0,00)

Tabel 2. Hasil Uji *ELISA* Positif *Plasmodium falciparum* Spesimen *An.vagus* dengan Panjang Gelombang 405 nm di 4 Desa Daerah Penelitian, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta, Juni-Oktober 2005

No.	Spesies	Jumlah nyamuk dalam sumuran	Nilai absorben	Tempat Penangkapan	Lokasi
1.	<i>An.vagus</i>	5	0,632	Kandang	Hargorejo
2.	<i>An.vagus</i>	1	0,317	Kandang	Hargowilis
3.	<i>An.vagus</i>	2	0,281	Kandang	Hargorejo
4.	<i>An.vagus</i>	5	0,257	Kandang	Hargorejo

Keterangan: Nilai absorben kontrol positif: 0,449

Nilai absorben kontrol negatif: 0,208; 0,228; 0,202; 0,204; 0,207; 0,223; 0,206

di Kecamatan Borobudur dari 28 ekor yang diperiksa 1 nyamuk positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum*. Hasil uji *ELISA* lebih banyak ditemukan spesimen nyamuk yang positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* di kandang, tidak di manusia, hal ini dimungkinkan karena pemilihan hospes yang tidak selektif.

Dengan uji *ELISA*, suatu nyamuk *Anopheles* sp dinyatakan mengandung protein *circum sporozoite* apabila secara visual berubah warna menjadi hijau. Pada panjang gelombang 405 nm didapatkan nilai absorben untuk nyamuk *An.vagus* yang terbukti positif berkisar antara 0,257-0,632. Nilai absorben kontrol positif 0,449 dan nilai absorben kontrol negatif 0,208; 0,228; 0,202; 0,204; 0,207; 0,223; 0,206. Nilai *cut off point* diambil dari nilai absorben kontrol negatif yang paling tertinggi yaitu 0,228¹¹⁾. Berdasarkan penelitian Namru-2 selama tahun 2001-2003 di Kabupaten Purworejo (Kawasan Bukit Menoreh), *An.vagus* positif mengandung protein *circum sporozoite* untuk *P.falciparum* dan *P.vivax* dengan uji *ELISA*⁷⁾. Penelitian Atasti¹²⁾ dan Namru-2⁴⁾ menunjukkan bahwa *An.maculatus* terbukti positif mengandung protein *circum sporozoite* dari *P.falciparum* dengan uji *ELISA* di Kecamatan Kokap, sedangkan *An.balabacensis* juga terbukti positif mengandung protein *circum sporozoite* dengan *ELISA* di Kecamatan Kokap¹³⁾.

Kesimpulan

An.vagus ditemukan positif mengandung protein *circum sporozoite* *P.falciparum*, sehingga potensial sebagai vektor malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta (Wilayah Bukit Menoreh).

Ucapan Terima Kasih

Kami haturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada: Badan Pembangunan Daerah (BAPEDA) Kabupaten Dati II Kulon Progo yang telah memberikan izin penelitian di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta; Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Dati II Kulon Progo beserta staf, yang telah memberikan izin penelitian di Kecamatan Kokap dan membantu dalam melengkapi data-data yang dibutuhkan selama penelitian; Kepala Puskesmas Kokap I dan Kokap II beserta staf, yang telah banyak membantu penelitian di lapangan; Kepala

Balai Besar Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga, Bp.Dr.Damar Tri Boewono,MS (Periode 1999-2005) dan staf yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas laboratorium dan pustaka, membantu dan memberikan kemudahan selama penelitian; Bapak Mayar Sutaji dan keluarga di Dusun Tegiri, Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, yang telah banyak membantu selama penelitian di lapangan; Bapak Mujiyono, Bapak Widiratno, Bapak Sumardi, Bapak Bernadus Yuliadi dan Ibu Siti Alfiah yang telah banyak membantu di lapangan dan laboratorium.

Daftar Pustaka

1. Dit.Jen P2M & PLP. 1999. Gebrak Malaria. Konsep Program Nasional Pemberantasan Malaria di Indonesia melalui Gerakan Basmi Kembali Malaria. DepKes RI. Jakarta. 10 hal.
2. Dinas Kesehatan Kabupaten Kulon Progo. 2002. Rencana Strategik Dinas Kesehatan Kabupaten Kulon Progo tahun 2001-2005
3. Widyastuti, U. 2001. Kompetensi Vectorial *Anopheles aconitus* Donitz (Diptera: Culicidae) di Kecamatan Borobudur, Kabupaten Magelang. Tesis S-2 Program Studi Kedokteran Tropis. Minat Utama: Imunologi dan Biologi Molekuler Penyakit Tropis Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
4. NAMRU-2. 1999. Post War II Location of Malaria Vector's in Indonesia. Jakarta
5. Dit.Jen P2M & PLP. 1987. Petunjuk melakukan macam-macam uji entomologi yang diperlukan untuk menunjang operasional program pemberantasan penyakit ditularkan serangga. Jakarta. 7 hal
6. Bangs, M.J.1989. The sporozoit *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*: application in malaria epidemiology. Buletin Penelitian Kesehatan 17(2): 197-205
7. Wicaksono. 2004. Komunikasi pribadi (NAMRU-2)
8. Burkot, T.R., P.M.Graves, J.A. Cattan, R.A. Wirtz and F.D.Gibson. 1987. The efficiency of sporozoite transmission in the human malaras, *P.falciparum* and *P.vivax*. *Bulletin of the WHO* 65(3): 375-380
9. 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
10. Wirtz, R.A., T.R.Burkot, P.M. Graves and 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
 11. Sucharit, S. and S.Supavej. 1987. Practical Entomology Malaria and Filariasis. Faculty of Tropical Medicine. Mahidol University. 139 p
 12. Atasti, L.1995. Beberapa aspek bionomik nyamuk *Anopheles* spp dalam rangka perencanaan pengendalian vektor malaria di Kecamatan Kokap Kabupaten Kulon Progo (Desember 1994 sampai dengan Maret 1995). Tesis S2-FETP IKM Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 13. Adrial, 2000. Penentuan status vektor malaria nyamuk *An.balabacensis* (Diptera:Culicidae) di Kokap, Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta. Tesis S2 Program Studi Kedokteran Tropis, Minat Utama: Imunologi dan Biologi Molekuler Penyakit Tropis. Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta