

KETERKAITAN PROTEIN YANG MENGANDUNG THIOESTER (TEP) DENGAN IMUNITAS DARI NYAMUK *ANOPHELES* TERHADAP *PLASMODIUM*

Presticilla D. Irawan¹⁾ dan Beivy J. Kolondam¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi FMIPA, Universitas Sam Ratulangi Manado
E-mail: presticilla@ymail.com ; beivy.kolondam@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Protein thioester (TEP) merupakan promotor terjadinya fagositosis bakteri Gram positif dan Gram negatif dalam sistem imun serangga. Salah satu TEP, yaitu TEP1 pada nyamuk *Anopheles* berfungsi sebagai faktor komplemen yang membunuh *Plasmodium*. TEP1 nyamuk disintesis pada hemosit dan disekresikan dari hemolimfa. Hubungan TEP1 dengan protein dan enzim lain dapat menghalangi perkembangan ookista dan ookinet pada lambung nyamuk betina. TEP1 nyamuk terdiri dari dua alel yaitu alel R (*refractory/resisten*) dan alel S (*susceptible/rentan*). Efektivitas kematian ookinet pada nyamuk TEP-S hanya 80% dan pada nyamuk TEP-R terjadi 100%. Respon imun nyamuk beralel R efektif mematikan *Plasmodium*, namun nyamuk beralel S mendominasi populasi.

Kata-kata kunci: TEP, *Anopheles*, *plasmodium*, immunitas, malaria

CONNECTION OF THIOESTER PROTEIN (TEP) AND IMMUNITY OF *ANOPHELES* MOSQUITO TO *PLASMODIUM*

ABSTRACT

Protein thioester (TEP) is the promotor of phagocytosis for Gram Positive and Gram negative bacteria in insects immune system. One of the TEPs, the TEP1 are acting as complement factor to eliminate *Plasmodium*. TEP1 is synthesized in hemocyte and secreted from hemolymph. The connection of TEP1 with other proteins and enzymes are able to inhibit the oocyst and ookinete in the gastric of female mosquitos. The TEP is consist of two alleles; The R (*refractory*) and the S (*susceptible*). The death of ookinete in TEP-S and TEP-R mosquitos are 80% and 100%, respectively. Immune respond of mosquitos with R-allele are effective to kill *Plasmodium* but the S-allele are dominant in the population.

Kata-kata kunci: TEP, *Anopheles*, *Plasmodium*, immunity, malaria

PENDAHULUAN

Epidemi penyakit malaria di wilayah tropis dan subtropis dipengaruhi oleh kepadatan vektor pembawa parasit malaria seperti nyamuk *Anopheles*. Kepadatan vektor tersebut dapat disebabkan oleh kelembaban dan curah hujan yang tinggi pada kedua daerah tersebut (Epstein *et al.*, 1998 dalam Suwito *et al.*, 2010). Malaria merupakan penyebab kematian utama di 75% di Afrika dan 25% di Asia Tenggara (Munif, 2009). Penyakit malaria disebabkan oleh *Plasmodium* yang menyerang hati dan darah

inang (Sreenivasamurthy *et al.*, 2013; Arsin, 2012). Pengendalian pada tingkat vektor dan parasit hingga saat ini masih ditekankan pada penggunaan insektisida maupun produksi obat-obat antimalaria. Di sisi lain, terjadinya resistensi parasit terhadap zat kimia dalam insektisida dan obat-obatan yang disebabkan mutasi gen mengakibatkan peluang berkembangnya kemampuan parasit resisten untuk tumbuh dalam tubuh inang sehingga dapat meningkatkan jumlah kasus malaria (Simamora dan Fitri, 2007).

Penelitian pada tingkat genom dapat menjadi salah satu cara untuk mengontrol

penyakit malaria. Banyak penelitian mengenai genom pada *Anopheles* menghasilkan gen yang potensial yang memiliki fungsi imunitas bagi nyamuk untuk menghilangkan berbagai mikrobiota, salah satunya *Plasmodium*. Beberapa penelitian diantaranya yaitu dikutip dari Li *et al.* (2013) berupa gen reseptor (pendeteksi) yang memiliki kemampuan untuk menghalangi pembentukan oosit *Plasmodium* seperti *leucine-rich-repeats protein* (APL1C dan LRIM1), protein dalam golongan fibrinogen (FREPs dan FBNS), protein yang mengandung thioester (TEPs), dan *C-type lectins* (CTLs).

TEP1 (*Thioester-containing Protein 1*) adalah glikoprotein yang dihasilkan dari hemosit (sel darah nyamuk). Dalam imunitas nyamuk *Anopheles* betina, TEP1 berfungsi melawan infeksi mikroorganisme, termasuk sel *Plasmodium*. Protein TEP1 nyamuk berperan sebagai zat komplemen (zat yang dapat melawan infeksi) yang dapat membuat sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif mengalami fagositosis (Levashina *et al.*, 2001). Peran yang lain ialah interaksi TEP1 dengan protein lain seperti APL1C (*Anopheles Plasmodium responsive leucine-rich repeat 1 C*) dan LRIM1 (*Anopheles gambiae leucine-rich repeat immune protein*), serta enzim seperti HPX2 (*heme peroxidase*) dan NOX5 (*NADPH oxidase 5*), yang dapat mencegah perkembangan sel *Plasmodium* (Oliveira *et al.*, 2012; Povelones *et al.*, 2009).

Peran TEP1 tersebut berkembang dengan munculnya publikasi mengenai alel TEP1 yang bersifat rentan (TEP1-S) dan resisten (TEP1-R) terhadap infeksi *Plasmodium*. Selain pada nyamuk betina, TEP1 juga terdapat pada nyamuk jantan, di mana diekspresikan pada testis. TEP1 dan alelnya dalam penelitian Pompon dan Levashina (2015) memiliki peran untuk menentukan fertilitas nyamuk jantan. Peran TEP1 pada nyamuk jantan secara tidak langsung berkaitan dengan penghasilan keturunan betina yang membawa kedua sifat tersebut. Ini berpotensi menjadi solusi langkah selanjutnya untuk pengendalian penyebaran penyakit malaria pada tingkat vektor.

IMUNITAS SERANGGA DAN PROTEIN YANG MENGANDUNG THIOESTER (TEP)

Kelas Insekta (Invertebrata) tidak memiliki respon imun adaptif seperti hewan Vertebrata, sehingga hewan ini menggunakan kekebalan bawaan (*innate immunity*) untuk imunitasnya (Christophides *et al.*, 2002). Kekebalan bawaan Insekta diperlukan dalam melawan mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuhnya (Levashina *et al.*, 2003). Respon imun pada Insekta terdiri atas respon sel (*cellular reactions*) dan respon humoral (*humoral reactions*). Respon humoral terdiri atas melanisasi, penggumpalan hemolimfa, dan sintesis peptida antimikroba. Respon sel, dalam hal ini mikroorganisme parasit atau sel apoptosis, dapat mengalami fagositosis, terperangkap dalam formasi nodul, dan kapsulasi oleh hemosit (Vilmoz dan Kurucz, 1998).

Protein thioester (TEP) terdapat dalam sel banyak spesies nematoda, insekta, moluska, pisces, aves, dan mamalia. TEP memiliki karakteristik sekuens homolog, termasuk rantai intra β -cysteiny- γ -glutamyl thioester, dan kecenderungan menghasilkan interaksi yang sensitif terhadap konformasi ikatan ganda, sangat reaktif, dan mudah dihidrolisis oleh air (Blandin dan Levashina, 2004; Levashina *et al.*, 2003).

TEP pada insekta pertama kali ditemukan pada lalat buah *Drosophila melanogaster*. Lagueux *et al.* (2000) membandingkan sekuens *Drosophila* dengan sekuens asam amino rantai α pada sekuens komplemen C3 manusia. Dari penelusuran tersebut dihasilkan ada lima gen yang memiliki kesamaan pada protein thioester dengan gen pada kelompok C3 dan α 2M. Dari kelima gen tersebut hanya 4 yang termasuk dalam TEP, yang masing-masing diberi kode TEP1, TEP2, TEP3, dan TEP4. Ekspresi gen TEP larva dan lalat dewasa berada pada level rendah, namun ekspresi mengalami peningkatan ketika terjadi imunitas. Salah satu gen, yaitu TEP1, diproduksi di lemak tubuh.

Penelitian imunitas protein thioester nyamuk *Anopheles gambiae* dilakukan oleh Levashina *et al.* (2001) terhadap bakteri. Eksperimen dilakukan dengan menginkubasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* pada medium aTEP1 (protein thioester pada *Anopheles*) terkondisi MA dan

tanpa MA, kemudian diikuti dengan proses *immunoblotting* pada ekstrak dinding sel bakteri, menghasilkan adanya sinyal aTEP1 pada dinding sel. Hasil ini mengindikasikan adanya ikatan thioester yang terbentuk antara TEP1 dengan sel bakteri.

TEP yang berikatan dengan sel bakteri dapat berperan sebagai promotor untuk mendorong terjadinya fagositosis. Dari uji selanjutnya yang dilakukan dengan menggunakan sel nyamuk 5.1* dan bakteri (Gram negatif: *Eschericia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*; Gram positif: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) dengan penanda *fluorescent* yang diinkubasi pada medium terkondisi aTEP1 serta diikuti dengan proses *dsRNA knockout* pada TEP1. Nilai PI (*phagocytic index*/indeks fagositosis) pada bakteri Gram negatif lebih tinggi daripada bakteri Gram positif, mengindikasikan fagositosis dengan aTEP1 terjadi pada bakteri Gram negatif dibandingkan dengan bakteri Gram positif (Levashina *et al.*, 2001).

PROTEIN TEP1 PADA NYAMUK BETINA

TEP1 pada nyamuk *Anopheles* (aTEP1) memiliki massa molekul sebesar 165 kDa. Sekuens TEP1 terdiri dari segmen N-terminal dengan signal peptida yang bersifat hidrofobik. Seperti golongan protein thioester lain, TEP1 disintesis oleh hemosit lalu disekresikan dari hemolimfa (Levashina *et al.*, 2003).

Fungsi imunitas gen TEP1 pada nyamuk *Anopheles gambiae* pada awalnya dijelaskan pada nyamuk betina. Menurut Blandin *et al.* (2004), TEP1 merupakan faktor yang terlibat untuk membunuh parasit pada nyamuk dan menentukan kapasitas vektor nyamuk. TEP1 mengikat permukaan ookinet setelah ookinet melewati jaringan epitel lambung. Ikatan tersebut berhubungan dengan dua puncak regulasi transkripsi. Ikatan langsung TEP1 tersebut didemonstrasikan dengan penggunaan strain *Plasmodium berghei* yang mengekspresikan GFP (*Green fluorescent protein*). Ookinet yang berikatan dengan TEP1 kehilangan GFP sebagai penanda vital, kemudian terjadi perubahan morfologi secara abnormal.

Kematian parasit tersebut dikontrol oleh protein lain selain TEP1. Spekulasi menyebutkan TEP1 berfungsi sebagai faktor

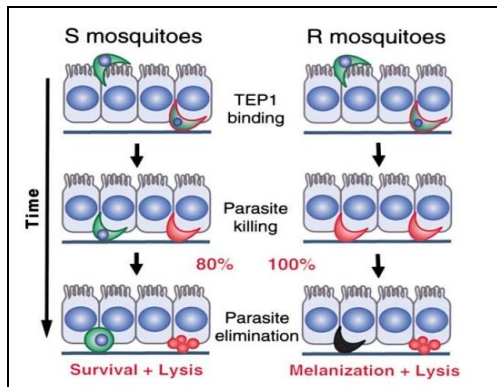
komplemen. Protein lain tersebut dapat membuat TEP1 berikatan pada parasit. Sebuah penelitian lain menyimpulkan pembentukan kompleks untuk aktivasi sistem komplemen pada hemolimfa dengan interaksi TEP1 dengan protein APL1C (*Anopheles Plasmodium responsive leucine-rich repeat 1 C*), dan LRIM1 (*Anopheles gambiae leucine-rich repeat immune protein*), dapat menghalangi perkembangan ookista *Plasmodium* pada lambung. Kedua protein tersebut merupakan protein antagonis yang membentuk jembatan disulfida dengan berat molekul yang tinggi dalam sirkulasi hemolimfa (Povelones *et al.*, 2009). Hubungan enzim HPX2 (*heme peroxidase*) dan NOX5 (*NADPH oxidase 5*) sebagai mediator nitrasi jaringan epitel lambung dengan TEP1 pada *Anopheles gambiae* dapat menargetkan ookinet *Plasmodium* serta membuat sel tersebut terdeteksi sistem komplemen dan mengalami lisis (Oliveira *et al.*, 2012).

AELE GEN TEP1 DAN IMUNITAS NYAMUK ANOPHELES TERHADAP PLASMODIUM

Protein TEP1 nyamuk dikode dua alel yang berbeda, yaitu alel R (*refractory/resisten*) dan alel S (*susceptible/rentan*). Perbedaan peran kedua alel (S dan R) dalam membunuh parasit diuji dengan menghilangkan ekspresi TEP1 menggunakan eksperimen *dsRNA knockdown*, menghasilkan jumlah oosit dalam tubuh nyamuk betina yang rentan mengalami peningkatan 5 kali lipat di perut, dan pada nyamuk resisten eksperimen tersebut mencegah melanisasi parasit, sehingga resistensi nyamuk tersebut hilang (Blandin *et al.*, 2004).

Parasit melakukan kontak dengan komponen hemolimfa setelah melewati epitel lambung. Salah satu komponen adalah TEP1, mengenal ookinet lalu mengikat sel tersebut. Kematian parasit tersebut ditentukan dengan cara lisis maupun dengan melanisasi. Blandin *et al.* (2004) menjelaskan dua model respon imun berdasarkan alel TEP. Berdasarkan perbedaan efektivitas kematian ookinet, hanya 80% ookinet yang mati pada nyamuk S dan 100% pada nyamuk R. Pada nyamuk S, kematian hanya terjadi pada proses lisis sedangkan pada nyamuk R kematian meliputi

lisis dan melanisasi. Dua model tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Dua model TEP1 pada nyamuk S dan R (Blandin *et al.*, 2004)

Dari penjelasan dua model tersebut menyebutkan bahwa respon imun dari nyamuk beralel R efektif mematikan parasit *Plasmodium*, namun nyamuk dengan alel S mendominasi populasi dan menjadi vektor yang menyebabkan epidemi malaria di berbagai wilayah. Penelitian terbaru dilakukan oleh Pompon dan Levashina (2015) menjawab fenomena tersebut. Alel TEP1 tertentu memiliki fungsi dalam spermatogenesis jantan, di mana mekanisme yang terjadi adalah TEP1 dapat menandai dan berikatan dengan sel sperma yang rusak.

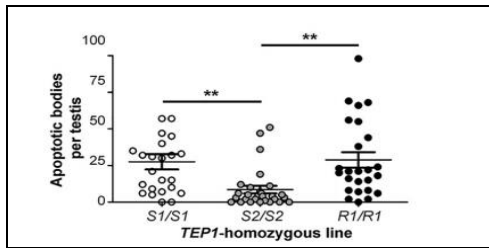
TEP1 di dalam testis terdeteksi pada spermatogonium dan spermatozoa (kepala dan ekor). Perkembangan nyamuk dari fase larva hingga dewasa mempengaruhi adanya gen TEP1 pada testis. Berdasarkan analisis *immunofluorescence* pada testis jantan pasca-kawin yang dibedah, penurunan sinyal TEP1 pada testis terjadi satu minggu setelah dewasa diikuti dengan fase terminasi. Peningkatan spermatogonium dengan sinyal TEP1 terjadi setelah kawin (Pompon dan Levashina, 2015).

Mekanisme pengikatan TEP1 pada sel sperma terjadi dengan mekanisme yang sama dengan TEP1 pada ookinet di lambung nyamuk betina. Salah satu eksperimen dilakukan dengan radiasi untuk menguji pengaruhnya terhadap fertilitas nyamuk jantan. Penggunaan radiasi menyebabkan adanya penurunan fertilitas nyamuk jantan, di mana terjadi peningkatan jumlah sel sperma yang rusak. Hal ini berakibat pada menurunnya produksi telur (ovulasi) pada nyamuk betina dan tingkat penetasan

keturunan (*hatching progeny*) (Pompon dan Levashina, 2015). TEP1 yang berikatan dengan sel sperma yang rusak dibuktikan kembali dari hasil uji dengan mengeliminasi protein LRIM1 dan HPX2 yang terdeteksi pada testis. Hasil menunjukkan hilangnya ikatan TEP1 dengan sel tetapi tidak berpengaruh terhadap ekspresi gen TEP1 (Pompon dan Levashina, 2015). Hal ini membuktikan bahwa TEP1 merupakan faktor komplemen yang membutuhkan interaksi dengan protein (Povelones *et al.*, 2009) dan enzim lain (Oliveira *et al.*, 2012) agar berikatan dengan sel *Plasmodium*.

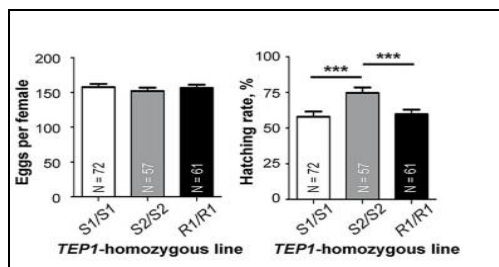
Spermatogenesis berakhir dengan proses apoptosis, yaitu kematian sel terprogram. Apoptosis terjadi dengan pembentukan sel apoptosis, yaitu sel embrionik mati dengan nukleus dan sitoplasma yang telah terkondensasi. Setelah itu sel tersebut ditelan oleh sel fagositosis. Uji TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick-end labelling*) dilakukan pada testis kontrol dengan testis keturunan F1 dari perkawinan nyamuk DSX dan nyamuk transgenik 7b yang telah dimatikan ekspresi TEP1-nya. Perbandingan hasil uji TUNEL antara menunjukkan bahwa jumlah sel positif apoptosis pada testis keturunan F1 (DSX-7b) lebih tinggi. Sehingga ini menunjukkan kemampuan komplemen TEP1 dalam berikatan dengan sel sperma dan mendorong apoptosis sel tersebut (Abrams *et al.*, 1993; Pompon dan Levashina, 2015).

TEP1 nyamuk terdiri dari dua alel, yaitu alel resisten (TEP1-R) dan alel rentan (TEP1-S) yang memiliki perbedaan dari tingkat imunitas terhadap patogen. Uji TUNEL dilakukan pada masing-masing testis nyamuk homozygot beralel S1/S1 (rentan), S2/S2 (rentan), dan R1/R1 (resisten) yang telah dipapar radiasi. Proporsi testis dengan sel-sel yang mengalami apoptosis pada nyamuk S2/S2 paling rendah di antara yang lain (Gambar 2). Hasil ini mengindikasikan bahwa TEP1 alel S2 lebih efektif mencegah radiasi yang menyebabkan penurunan kesuburan nyamuk jantan. Ketiga jenis nyamuk diuji kembali dengan penanda TUNEL pada kondisi normal (tanpa radiasi). Tingkat penetasan keturunan nyamuk S2/S2 paling tinggi (Gambar 3), menandakan nyamuk beralel TEP1 S2 memiliki tingkat fertilitas yang tinggi (Pompon dan Levashina, 2015).



Gambar 2. Proporsi sel-sel apoptosis pada testis setiap alel TEPI, pada satu titik menunjukkan satu testis (Pompon dan Levashina, 2015)

Dengan melihat potensi alel TEPI tertentu yang dapat membunuh parasit *Plasmodium* secara efektif, serta hasil penelitian mengenai penyebab keberadaan nyamuk terinfeksi parasit yang disebabkan oleh dominasi alel rentan, maka proyeksi ke depannya adalah bagaimana mengembangkan metode yang efektif untuk membuat alel efektif tersebut masuk dalam populasi alami.



Gambar 3. Tingkat ovulasi dan penetasan larva dari tiga jenis alel (Pompon dan Levashina, 2015)

Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk pengendalian vektor yaitu rekayasa genetika untuk menghasilkan nyamuk *Anopheles* transgenik yang membawa alel R. Serangga resisten parasit hasil rekayasa genetika memiliki peran dalam populasi sebagai pengganti serangga yang rentan, dan selanjutnya dapat menghilangkan penyebaran penyakit akibat transmisi parasit (Aksoy, 2003). Keberhasilan kontrol genetik dengan metode tersebut tidak terlepas dari penelusuran lebih lanjut tentang struktur populasi secara genetik dan aliran gen vektor tersebut (Collins *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Gen TEPI berfungsi sebagai faktor komplemen dalam imunitas nyamuk *Anopheles* terhadap infeksi *Plasmodium*. Kedua alel TEPI memiliki tingkat imunitas yang berbeda di mana alel R (TEPI-R) berpotensi membunuh ookinet *Plasmodium* dan alel S (TEPI-S) berpotensi menjadi faktor yang membuat nyamuk rentan terinfeksi *Plasmodium*. Melihat pengaruh TEPI-S yang menyebabkan nyamuk *Anopheles* rentan terhadap serangan parasit, dominasi TEPI-S dalam populasi nyamuk *Anopheles*, serta potensi TEPI-R dalam membunuh parasit, penelitian di masa depan dalam rekayasa genetika alel TEPI-R dapat dijadikan solusi untuk mengatasi penyebaran nyamuk *Anopheles* yang membawa parasit *Plasmodium* sebagai penyebab penyakit malaria.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I., Steller, H. 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117(1): 29-43.
- Aksoy, S. 2003. Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics. *Veterinary Parasitology* 115(2): 125-145.
- Arsin, A.A. 2012. *Malaria Di Indonesia: Tinjauan Aspek Epidemiologi*. Masagena Press, Makassar
- Blandin, S., Levashina, E.A. 2004. Thioester-Containing Protein and Insect Immunity. *Molecular Immunology* 40(12): 903-908.
- Blandin, S., Shiao, S.H., Moita, L., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C., Levashina, E. 2004. Complement-Like Protein TEPI is a Determinant of Vectorial Capacity in The Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116(5): 661-670.

- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F. 2002. Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. *SCIENCE* 298(5591): 159-165.
- Collins, F.H., Kamau, L., Ranson, H.A., Vulule, J.M. 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* 78 (12): 1412-1423.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E., Capovilla, M., Hoffman, J.A. 2000. Constitutive Expression of A Complement-like Protein in Toll and JAK Gain-of-function mutants of *Drosophila*. *PNAS* 97(21): 11427-11432.
- Levashina, E.A., Blandin, S., Moita, L.F., Lagueux, M., Kafatos, F.C. 2003. Thioester-Containing of Protostomes. *Innate Immunity*. Humana Press, New Jersey
- Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., Kafatos, F. 2001. Conserved Role of a Complement-like Protein in Phagocytosis Revealed by dsRNA Knockout in Cultured Cells of The Mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104(5): 709-718.
- Li, J., Wang, X., Zhang, G., Githure, J.I., Yan, G., James, A.A. 2013. Genome-block expression-assisted association studies discover malaria resistance genes in *Anopheles gambiae*. *PNAS* 110 (51): 20675 – 20680.
- Munif, A. 2009. Nyamuk Vektor Malaria dan Hubungannya Dengan Aktivitas Kehidupan Manusia di Indonesia. *Aspirator* 1(2): 94 – 102.
- Oliveira, D., Lieberman, J., Barillas-Mury, C. 2012. Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. *Science* 335 (6070): 856-859.
- Pompon, J., Levashina, E.A. 2015. A New Role of the Mosquito Complement-like Cascade in Male Fertility in *Anopheles gambiae*. *PLOS Biology* 13(9): e1002255.
- Povelones, M., Waterhouse, R.M., Kafatos, F.C., Christophides, G.K. 2009. Leucine-rich repeat preprotein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science* 324(5924): 258-261.
- Simamora, D., Fitri, L.E. 2007. Resistensi Obat Malaria: Mekanisme dan Peran Obat Kombinasi Obat Antimalaria Untuk Mencegah. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 23(2): 82-91.
- Sreenivasamurthy, S., Dey, G., Ramu, M., Kumar, M., Gupta, M.K., Mohanty, A.K., Harsha, H.C., Sharma, P., Kumar, N., Pandey, A., Kumar, A., Prasad, T. K. 2013. A compendium of molecules involved in vector-pathogen interactions pertaining to malaria. *Malaria Journal* 12: 216.
- Suwito, Hadi, U.K., Sigit, S.H., Sukowati, S. 2010. Hubungan Iklim, Kepadatan Nyamuk *Anopheles* dan Kejadian Penyakit Malaria. *J. Entomol. Indon.* 7(1): 42-53.
- Vilmoz, P., Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62(2): 59-66.