

Respon Humoral terhadap Protein Kelenjar Saliva Nyamuk *Anopheles maculatus* dan *Anopheles sundaicus*

Humoral Response to Anopheles maculatus and Anopheles sundaicus Salivary Gland Proteins

Yunita Armiyanti¹, Widodo², Loeki Enggar Fitri³, Teguh Wahyu Sardjono³

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya

³Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121

e-mail korespondensi: yunita.fk@unej.ac.id

Abstrak

Kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* betina memiliki peranan penting dalam transmisi malaria melalui protein-protein saliva yang meningkatkan transmisi *Plasmodium*. Saliva nyamuk mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator yang menghambat respons fisiologis inang, sehingga patogen dapat menginfeksi inang tanpa ada perlawanan. Protein saliva juga menginduksi produksi antibodi IgG di inang setelah terpapar gigitan nyamuk *Anopheles* berulang kali. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur respon antibodi penduduk yang hidup di daerah endemik malaria (desa Kalirejo, Kokap, Kulonprogo) terhadap protein kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dan *Anopheles sundaicus*. Tingkat respon antibodi diukur dengan ELISA dan dianalisis dengan uji T atau uji Anova untuk distribusi data normal dan uji Mann Whitney atau uji Kruskal Wallis untuk data yang tidak terdistribusi secara normal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respon IgG anti-homogenat kelenjar saliva dari serum penduduk yang tinggal di daerah endemik malaria secara signifikan lebih tinggi daripada orang yang hidup di daerah non-endemik malaria dan kontrol negatif ($p < 0,05$). Serum dari penduduk yang tinggal di desa Kalirejo menunjukkan adanya respons antibodi terhadap homogenate kelenjar saliva *An.sundaicus* maupun *An.maculatus* tidak berbeda nyata ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa paparan gigitan nyamuk *An.maculatus* dan *An.sundaicus* berulang kali dapat memicu produksi antibodi IgG anti-protein kelenjar saliva yang mengenali protein- protein antigenik dari kelenjar saliva.

Kata kunci: kelenjar ludah, *Anopheles*, antibodi, paparan

Abstract

The salivary gland of female *Anopheles* mosquito has important role in malaria transmission by salivary proteins that enhancing *Plasmodium* transmission. The mosquito saliva contains vasomodulatory and immunomodulatory components that inhibit the physiological response of the host. Therefore, the pathogen infects the host without any resistance. The salivary proteins also induce the production of antibody IgG in the host after exposed by the *Anopheles* mosquito bites repeatedly. This study aims to measured the antibody response of inhabitants living in malaria endemic areas (Kalirejo viilages, Kokap, Kulonprogo) to salivary gland proteins of *An. maculatus* and *An.sundaicus*. The level of antibody response was measured by ELISA and analyzed with T test or Anova test for normal distribution of data and Mann Whitney test or Kruskal Wallis test for the data were not normally distributed. The result showed that the level of anti-salivary gland homogenate IgG from sera of people living in malaria endemic area was significantly higher than people living in non-malaria endemic area and negative control ($p < 0.05$). Sera from inhabitants living in Kalirejo village showed that the level of antibody response to both salivary gland homogenate of *An.sundaicus* and *An.maculatus* were not significantly different ($p < 0.05$). It was concluded that exposure to *An.maculatus* and *An.sundaicus* bites repeatedly could trigger the production of anti-salivary gland proteins IgG antibodies that recognized antigenic proteins from the salivary glands.

Keywords: salivary gland, *Anopheles*, antibody, exposure

Pendahuluan

Kelenjar saliva nyamuk betina *Anopheles* berperan penting dalam transmisi patogen ke tubuh inang. Bila nyamuk betina menggigit inang, kelenjar ludah mengeluarkan zat dalam saliva yang menghambat respons fisiologis host, seperti hemostasis, respons inflamasi dan imunologis. Kondisi ini memberi manfaat bagi patogen untuk menginfeksi inang tanpa adanya resistensi (Fontaine et al., 2011a). Komponen imunomodulator dalam saliva akan menekan respon imunologis inang baik respon imun alami dan adaptif. Respon imun alami ditekan melalui penghambatan sekresi mediator pro-inflamasi oleh sel endotel, leukosit, sel mast, neutrofil, dan trombosit. Respon imun adaptif dimodulasi dengan menghambat sekresi sitokin Th1 seperti IFN- γ dan IL-2, sehingga respon imun bergeser ke respons Th2 dengan menghasilkan antibodi. Polarisasi respon imun terhadap Th2 tidak hanya bermanfaat untuk proses penghisapan darah, namun juga memungkinkan terjadinya transmisi patogen (Fontaine et al., 2011a). Respons kekebalan Th2 di lokasi gigitan kurang efektif melawan patogen dibandingkan dengan respons kekebalan seluler yang dimediasi oleh Th1 (Andrade et al., 2005).

Injeksi saliva ke kulit inang juga mempengaruhi respons humoral inang dengan menginduksi produksi antibodi terhadap protein saliva. Paparan berulang terhadap gigitan nyamuk betina akan memicu produksi antibodi anti-protein saliva (King et al., 2011). Beberapa penelitian telah menunjukkan antigenisitas protein saliva dengan adanya IgG, IgM dan IgE terhadap protein saliva dalam darah individu yang terpapar gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang diukur oleh ELISA (Peng dan Simon, 2004; Remoue et al., 2006; Waitayakul et al., 2006). Produksi IgE berhubungan dengan reaksi alergi yang disebabkan oleh gigitan nyamuk seperti reaksi hipersensitivitas tipe I yang dimediasi oleh IgE. Reaksi alergi menyebabkan pembengkakan dan kemerahan ditempat gigitan (Peng dan Simons, 2004). Produksi IgM dan IgG anti-protein saliva juga ditemukan pada pasien malaria dan penduduk di daerah endemik malaria dengan titer yang signifikan lebih tinggi daripada populasi yang tinggal di daerah non-endemik malaria, namun titer IgG lebih tinggi pada pasien

dengan infeksi malaria akut (Waitayakul et al., 2006).

Respon antibodi IgG terhadap protein saliva dipengaruhi oleh paparan gigitan nyamuk. Tingkat respon antibodi IgG anti-WSE (*whole salivary extract*) memiliki hubungan positif dengan intensitas paparan gigitan nyamuk di Senegal sesuai dengan hasil evaluasi menggunakan metode entomologi konvensional (Remoue et al., 2006). Korelasi positif juga ditunjukkan oleh hubungan antara tingkat respon IgG anti-ekstrak kelenjar saliva *Aedes caspius* dengan densitas nyamuk tersebut, yaitu rata-rata tingkat respon IgG meningkat secara signifikan pada puncak paparan nyamuk *Ae.caspius* (Fontaine et al., 2011b). Respon IgG spesifik terhadap gSG6-P1, protein rekombinan gSG6, bahkan dapat mendeteksi paparan gigitan nyamuk *An.gambiae* pada tingkat yang sangat rendah (Poinsignon et al., 2009). Fakta ini mendasari pengembangan protein saliva nyamuk *Anopheles* sebagai biomarker terhadap paparan gigitan nyamuk *Anopheles*, sebagai evaluasi keberhasilan program pengendalian vektor malaria yang efektif, efisien dan aman serta menjadi indikator risiko malaria (Drame et al., 2010). Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengukur respon IgG pada serum penduduk yang tinggal di daerah endemik malaria terhadap protein kelenjar saliva vektor malaria utama di Indonesia, yaitu *An.maculatus* dan *An.sundaicus*.

Metode

Preparasi Nyamuk *Anopheles maculatus* dan Isolasi Kelenjar Saliva

Nyamuk *Anopheles maculatus* betina dikoleksi dari *landing collection* dengan menggunakan umpan sapi di Desa Kalirejo, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, DIY. Nyamuk *Anopheles maculatus* merupakan vektor utama malaria di wilayah tersebut. Nyamuk yang didapat dimasukkan ke dalam *paper cup*. Nyamuk diidentifikasi secara morfologi menggunakan kunci identifikasi Reid, (1968) dalam keadaan teranestesi dengan kloroform dan di bawah mikroskop stereo. Nyamuk dipelihara pada kondisi standar, yaitu pada suhu $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan $70\% \pm 10\%$

kelembapan relatif dan diberi larutan sukrosa 10% di dalam kandang di Laboratorium Entomology, Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gajah Mada. Kelenjar saliva nyamuk diisolasi dengan menggunakan jarum entomologi di bawah mikroskop stereo (M=4x) dan dikumpulkan dalam *eppendorf* steril yang telah diisi 100µL *phosphate buffer saline* (PBS) dalam *phenylmethylsulfonylfluoride* (PMSF) steril dan disimpan dalam -80°C sampai digunakan.

Homogenisasi Kelenjar Saliva dan Pengukuran Protein

Kelenjar saliva sebanyak 50-100 pasang yang telah diisolasi dimasukkan dalam *eppendorf* yang berisi PMSF dalam PBS 100 µL (perbandingan 1:1). Selanjutnya *buffer lysis* [1.5 mM magnesium klorida (MgCl₂), 10 mM Tris-HCl, 10 mM natrium klorida (NaCl), dan 1% Nonidet P-40] ditambahkan pada kelenjar saliva tersebut. Campuran tersebut dihomogenisasi dengan *micropistile* dan sonikator dalam *es-water bath* selama 30 menit. Campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12.690 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, selanjutnya supernatan diambil dan dipindahkan ke *eppendorf* baru. Supernatan dipisahkan dengan menggunakan *spin concentrator* dengan *cutt-off* 10 kDa dan disimpan sebagai stok dalam suhu -80°C. Konsentrasi protein dalam homogenat kelenjar saliva diukur menggunakan nanophotometer (Nanophotometer Implen P 360, Germany).

Preparasi Sampel Serum

Serum diambil dari 24 penduduk Desa Kalirejo, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta dengan metode sentrifugasi. Protokol terhadap subyek manusia pada penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Individu yang akan diambil darahnya mendapat penjelasan lebih dahulu mengenai tindakan yang akan dilakukan dan tujuannya (*informed consent*). Darah diambil dengan cara aseptis menggunakan *sprit disposable* 3 mL sebanyak 3mL dan dimasukkan dalam vakutainer steril tanpa antikoagulan. Darah didiamkan sampai terpisah antara serum dan sel-sel darah. Serum diambil

secara steril dengan menggunakan *micropipet* dan dimasukkan ke dalam tabung untuk disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan disimpan dalam suhu - 20 °C sampai digunakan.

ELISA

Untuk mengoptimasi kondisi ELISA, dilakukan titrasi *checkerboard* menggunakan homogenat kelenjar saliva *An.sundaicus* dengan konsentrasi 1,2,4 dan 7 µg/ml serta sampel serum yang diencerkan secara serial (1:25, 1:50, dan 1:100). Hasilnya didapatkan hasil optimal dengan konsentrasi antigen 7 µg/ml dan perbandingan antibodi primer 1:25. *Microplate (microtiter immunoplates)* dilapisi dengan homogenat kelenjar saliva nyamuk *An.maculatus* (konsentrasi 1,139 mg/ml) atau *An.sundaicus* (konsentrasi 2,039 mg/ml) yang diencerkan dengan bufer bikarbonat 0,1 M (pH 9,6) sampai mencapai konsentrasi 7 µg/ml (50µl/ sumuran) menggunakan rumus $V1.M1=V2.M2$ dan diinkubasi semalam (*overnight*) pada suhu 4°C. Selanjutnya dicuci dengan memasukkan 250 µl PBS-Tween (0,05%) ke dalam sumuran *microplate* dan langsung dibuang sebanyak empat kali. Setelah pencucian yang terakhir, *microplate* dikeringkan dengan diketuk-ketukan di atas tisu yang dilipat pada posisi dibalik. Pencucian dilakukan diantara inkubasi. *Microplate* diblok selama tiga jam pada suhu 37°C dengan 200 µL *blocking solution buffer* yang terdiri dari PBS, 0,1% Tween dan 0,05% BSA. Serum diencerkan dengan *blocking buffer* dengan perbandingan 1:25 dan dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 50µl, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Selanjutnya 50µl antibodi sekunder (*horse radish peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG*) yang diencerkan dalam *blocking buffer* dengan perbandingan 1:5000 ditambahkan ke dalam sumuran dan diikuti dengan inkubasi selama satu jam pada suhu ruang. Substrat *tetrametilbenzidin* (TMB) ditambahkan sebanyak 50µl ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan ditambahkan 50µl H₂SO₄ 1 M. Densitas optik diukur dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Tingkat (*level*) respon IgG anti-homogenat kelenjar saliva dinyatakan dengan

adjusted Optical Density (aOD) yang dihitung berdasarkan rumus nilai rata-rata OD sampel yang direaksikan dengan homogenat kelenjar saliva dikurangi dengan nilai OD dari sumuran kontrol yaitu yang tidak direaksikan dengan homogenat kelenjar saliva. Data sampel serum yang digunakan adalah sampel serum yang duplikasinya menunjukkan koefisien variasi dibawah 20%.

Hasil

Pengambilan sampel serum di wilayah Desa Kalirejo, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo mendapatkan 24 sampel serum dengan karakteristik seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Jenis Kelamin dan Distribusi Usia Penduduk Desa Kalirejo

Jenis Kelamin		Penduduk Desa Kalirejo
Wanita		16
Laki-laki		8
Jumlah		24
Distribusi Usia (tahun)		
17 – 20		3
21 – 30		3
31 – 40		5
41 – 50		8
51 – 60		5
Jumlah		24

Hasil pengukuran tingkat respon antibodi IgG anti-homogenat kelenjar saliva *An.maculatus* dari serum penduduk Desa Kalirejo, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, DIY sebagai wilayah endemis malaria yang terpapar gigitan nyamuk *An. maculatus* menunjukkan rerata yang lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata IgG pada serum individu yang tinggal di wilayah non-endemis malaria dan kontrol negatif (Gambar 1).

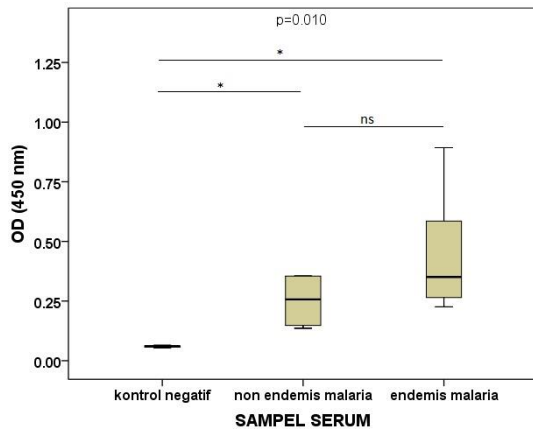
Rata-rata tingkat IgG berdasarkan angka OD kelompok wilayah endemis malaria adalah sebesar 0.423 ± 0.1985 , rata-rata IgG kelompok wilayah non endemis malaria sebesar 0.251 ± 0.1196 dan rata-rata IgG kelompok kontrol negatif sebesar 0.059 ± 0.0060 (Tabel 2).

Tabel 2. Rerata OD IgG Anti-homogenat kelenjar Saliva *Anopheles maculatus* pada Kelompok Wilayah Endemis Malaria (Desa Kalirejo), Non-endemis Malaria dan Kontrol Negatif

Kelompok	Rata-rata OD
Kontrol negatif	0.059 ± 0.0060
Non endemis malaria	0.251 ± 0.1196
Endemis malaria	0.423 ± 0.1985

Hasil pengujian normalitas Shapiro Wilk (lampiran) didapatkan nilai signifikansi kelompok wilayah non endemis (0.069) dan kontrol negatif (0.817) lebih besar dari α 5%, tetapi kelompok wilayah endemis (0.012) lebih kecil dari α 5%, maka dapat disimpulkan bahwa data tidak berdistribusi normal dan dilanjutkan ke uji pengganti dengan Kruskal Wallis.

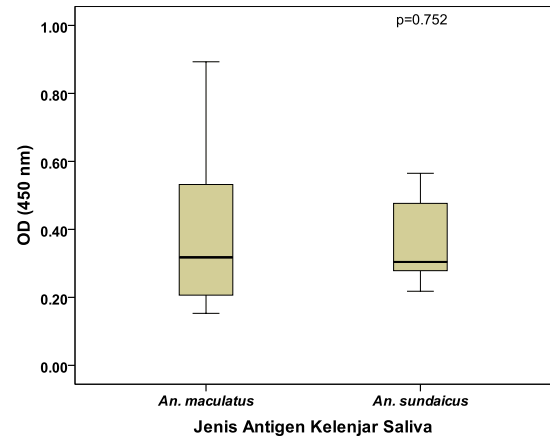
Hasil pengujian Kruskal Wallis didapatkan nilai signifikansi lebih kecil dari α ($0.010 < 0.05$), maka terdapat perbedaan nyata antara rata-rata angka OD kelompok wilayah non endemis, endemis malaria, dan kontrol negatif. Hasil uji beda antara dua kelompok dengan Mann-Whitney menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok wilayah non endemis malaria dengan kelompok kontrol negatif ($p=0.034$), demikian juga antara kelompok wilayah endemis malaria dan kelompok kontrol negatif terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0.007$). Hasil uji antara kelompok wilayah non endemis dan endemis malaria menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p=0.152$).



Gambar 1. Boxplot hasil pengukuran OD IgG anti-homogenat kelenjar saliva *Anopheles maculatus* pada serum penduduk di wilayah endemis malaria (Desa Kalirejo) dan non-endemis malaria dibandingkan dengan kontrol negatif. Boxplot menunjukkan nilai median OD, persentil 25 pada kuartil bawah dan persentil 75 pada kuartil atas. Whiskers menunjukkan persentil 0-100.

Hasil pengukuran OD IgG anti-homogenat kelenjar saliva pada serum penduduk Desa Kalirejo, Kokap terhadap homogenat kelenjar saliva (SGH) *An. maculatus* dan *An. sundaicus* mendapatkan rerata OD IgG anti-homogenat kelenjar saliva *An. maculatus* sebesar 0.395 ± 0.2503 dan rerata OD IgG anti-homogenat kelenjar saliva *An. sundaicus* sebesar 0.363 ± 0.1264 .

Hasil uji normalitas dengan Shapiro Wilk menunjukkan distribusi yang normal antara OD IgG terhadap SGH *An. maculatus* dan SGH *An. sundaicus* dari serum penduduk Desa Kalirejo, Kokap, sehingga dilanjutkan dengan uji T. Hasil uji T menunjukkan diantara kedua kelompok tersebut tidak berbeda bermakna ($p=0.752$) (Gambar 2). Hal ini berarti antibodi IgG anti-protein kelenjar saliva dari serum penduduk desa Kalirejo dapat bereaksi dengan kedua jenis antigen tersebut.



Gambar 2. Boxplot respon IgG terhadap antigen yang berbeda (homogenat kelenjar saliva *Anopheles maculatus* dan *Anopheles sundaicus*) pada serum penduduk Desa Kalirejo, Kokap. Boxplot menunjukkan nilai median OD, persentil 25 pada kuartil bawah dan persentil 75 pada kuartil atas. Whiskers menunjukkan persentil 0-100.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan penduduk yang tinggal di wilayah endemis malaria dan terpapar dengan gigitan nyamuk *Anopheles*, secara alami akan memicu respon humoral dengan diproduksi antibodi IgG anti-protein saliva. Hal ini dibuktikan dengan kadar IgG anti-homogenat kelenjar saliva dari serum penduduk Desa Kalirejo lebih tinggi dibandingkan dengan individu di wilayah non-endemis malaria dan kontrol negatif. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Waitayakul *et al.*, (2006) yang membuktikan bahwa IgG-anti protein saliva *Anopheles* terdeteksi pada pasien malaria akut dan orang sehat yang tinggal di wilayah endemis malaria.

Paparan gigitan nyamuk *Anopheles* secara berulang telah banyak dibuktikan dapat memicu produksi antibodi anti-protein saliva pada inang. Hewan coba yang dipapar dengan gigitan nyamuk *An. gambiae* selama tiga atau enam minggu serumnya mengandung IgG-anti saliva yang bisa mengenali protein SGS sebagai protein imunogenik (King *et al.*, 2011). Pada anak-anak usia enam minggu sampai dengan lima tahun di Senegal yang

merupakan wilayah endemis malaria, didapatkan 70,2% anak-anak menunjukkan respon IgG anti-saliva *An.gambiae* yang positif terutama pada anak-anak usia 1-2 tahun dengan respon yang paling tinggi (Remoue *et al.*, 2006). Beberapa penelitian lain bahkan membuktikan adanya respon antibodi spesifik terhadap protein saliva, yaitu protein gSG6 dari *An.gambiae* yang juga bisa bereaksi dengan bentuk rekombinannya, yaitu gSG6-P1 (Poinsignon *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2011; Badu *et al.*, 2012). Respon IgG terhadap protein saliva nyamuk *An.gambiae* juga dapat memprediksi kasus klinis malaria karena pada anak-anak yang terkena malaria mempunyai tingkat IgG yang lebih tinggi sejak tiga bulan sebelum sakit (Remoue *et al.*, 2006). Penelitian lain menggunakan respon IgG untuk mengetahui intensitas paparan *An.gambiae* setelah pemakaian kelambu berinsektisida (*insecticide-treated nets/ITN*) (Drame *et al.*, 2010). Oleh karena itu, protein saliva nyamuk *Anopheles* bisa dikembangkan sebagai biomarker paparan gigitan nyamuk dan risiko penyakit malaria serta alat evaluasi program-program pengendalian vektor malaria.

Paparan gigitan nyamuk *Anopheles* betina dapat memicu produksi IgG merupakan fakta yang telah banyak dibuktikan, namun bagaimana mekanismenya dikaitkan dengan transmisi patogen dan patogenesis malaria masih belum jelas. Berdasarkan tahapan-tahapan respon imun fisiologis pada orang yang digigit nyamuk (lima tahapan), produksi antibodi kemungkinan merupakan bagian dari respon imun tersebut. Pada tahapan ketiga dan kelima paparan antigen protein saliva menyebabkan respon imun humoral berupa aktivasi sel-sel limfosit B yang memproduksi IgE dan IgG. Pada tahapan ketiga respon IgE berkaitan dengan reaksi alergi melalui degranulasi sel mast yang berikatan dengan IgE (Andrade *et al.*, 2005). Pada tahapan kelima paparan antigen protein saliva di kulit yang terus berlanjut menyebabkan maturasi respon imun menjadi subtype IgG yang berbeda, yaitu IgG1 dan IgG4 yang sudah dibuktikan kadarnya meningkat pada orang yang digigit nyamuk (Peng and Simons, 2004).

Pada penelitian ini respon IgG penduduk Desa Kalirejo lebih tinggi dari respon IgG individu dari wilayah non-endemis malaria, tetapi berbeda tidak signifikan. Hal ini bisa disebabkan karena saat pengambilan sampel serum yaitu di bulan April 2014, densitas nyamuk *An.maculatus* dalam keadaan turun. Kepadatan populasi tertinggi nyamuk *An.maculatus* ditemukan sekitar bulan Juni-Agustus atau awal musim kemarau (Barodji *et al.*, 2003). Adanya pemanasan global menyebabkan perubahan iklim, sehingga waktu peralihan dari musim hujan ke musim kemarau dan sebaliknya juga berubah. Pada bulan April 2014 yang seharusnya sudah memasuki musim kemarau, masih terjadi hujan, sehingga belum terbentuk tempat perindukan nyamuk *An.maculatus* berupa genangan-genangan air di sekitar sungai. Kepadatan nyamuk *An.maculatus* yang rendah menyebabkan paparan gigitan *An.maculatus* juga turun, sehingga respon IgG yang terbentuk juga rendah.

Respon IgG pada individu dari wilayah non-endemis malaria yang berbeda tidak signifikan dengan Desa Kalirejo bisa disebabkan oleh reaksi silang dengan protein saliva dari spesies nyamuk yang lain. Saliva nyamuk merupakan campuran berbagai komponen molekuler dengan fungsi biologi yang berbeda. Beberapa komponen bersifat spesifik pada nyamuk *Anopheles*, namun komponen yang lain bisa terdistribusi dalam genus, famili, ordo atau kelas dari Diptera penghisap darah atau Arthropoda (Drame *et al.*, 2013). Beberapa protein saliva *Anopheles* bisa ditemukan di genus nyamuk yang lain seperti *Aedes* dan *Culex* karena memang terkonservasi di tingkat nyamuk (Calvo *et al.*, 2009). Individu yang berasal dari wilayah non-endemis malaria bisa terpapar gigitan nyamuk lain seperti *Culex* atau *Aedes* sehingga memicu respon IgG terhadap protein saliva yang bisa bereaksi dengan protein yang sama dari nyamuk *Anopheles*. Hal ini bisa terjadi karena pada penelitian ini antigen yang digunakan merupakan keseluruhan kelenjar saliva yang dihomogenisasi, sehingga berpotensi terjadinya reaksi silang dengan epitop protein saliva dari serangga hematofagi lainnya (Remoue *et al.*, 2006; Drame *et al.*, 2013).

Respon IgG terhadap homogenat kelenjar saliva *An. maculatus* dan *An. sudaicus* pada serum penduduk Desa Kalirejo tidak berbeda signifikan. Hal ini membuktikan bahwa terdapat reaksi silang antara protein kelenjar saliva *An. maculatus* dengan *An. sudaicus*. Hasil yang sama juga didapatkan pada respon IgG penduduk Desa Bangsring terhadap homogenat kelenjar saliva *An. maculatus* dan *An. sudaicus*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa protein gSG6-P1, protein rekombinan dari gSG6 yang berasal dari kelenjar saliva *An. gambiae*, bisa bereaksi positif dengan respon IgG pada anak-anak yang terpapar gigitan nyamuk *An. funestus* di Senegal. Penelitian tersebut dilaksanakan sebelum musim hujan dengan *An. funestus* sebagai satu-satunya vektor. Lebih jauh dijelaskan respon spesifik IgG terhadap gSG6-P1 tersebut meningkat selama musim paparan gigitan nyamuk *An. funestus* dan terdapat hubungan positif antara tingkat respon IgG dengan tingkat paparan gigitan (Poinsson *et al.*, 2010).

Reaksi silang antara protein kelenjar saliva *An. maculatus* dan *An. sudaicus* bisa terjadi karena beberapa protein saliva nyamuk *Anopheles* ada yang terkonservasi di tingkat genus, subgenus, spesies kembar (*species complex*) dan spesies. Tingkat konservasi suatu protein saliva tergantung kepada seberapa besar presentase kesamaan *identity* atau homologinya. Reaksi silang dapat terjadi apabila protein antigenik mempunyai kesamaan *identity* asam amino lebih dari 70% (Aalberse, 2000). Pada protein saliva yang terkonservasi di tingkat spesies kembar, tingkat homologinya sangat tinggi yaitu mencapai 90%, seperti protein saliva dari *An. gambiae* dan *An. arabiensis*. Keduanya mempunyai kelenjar saliva dengan profil protein dan kandungan protein yang sangat mirip (Fontaine *et al.*, 2012). Oleh karena itu, bisa terjadi reaksi silang diantara keduanya dengan antigen gSG6 (Rizzo *et al.*, 2011). Pada tingkat subgenus, protein saliva mempunyai kesamaan *identity* sekuen asam amino sebesar antara 70%-90%. Kesamaan *identity* sekuen asam amino di tingkat genus lebih rendah lagi yaitu kurang dari 70%, sehingga menurunkan kemungkinan adanya epitop yang terkonservasi pada Genus *Anopheles*, Demikian halnya di tingkat spesies, protein saliva yang tidak mempunyai

ortholog dengan protein spesies *Anopheles* yang lain adalah protein dengan *identity* sekuen asam amino pada batas yang paling rendah yaitu 40% (Fontaine *et al.*, 2012).

Nyamuk *An. maculatus* dan *An. sudaicus* merupakan satu subgenus, yaitu Subgenus *Cellia*. Dengan kesamaan *identity* sekuen asam amino dari protein saliva di tingkat subgenus sebesar 70%-90%, maka bisa terjadi reaksi silang pada protein-protein saliva yang bersifat imunogenik pada kedua spesies tersebut. Reaksi silang tersebut merupakan hasil dari kesamaan (*sharing*) epitop diantara protein-protein yang ortholog. Beberapa protein yang terkonservasi di tingkat Subgenus *Cellia* adalah *apyrase*, *anophensin*, protein D7 dan protein TRIO. Hasil penelitian pada nyamuk vektor malaria di Afrika Subgenus *Cellia*, yaitu *An. gambiae*, *An. funestus* dan *An. stephensi* dengan analisis *in silico* menunjukkan protein famili gSG2 dan gSG6 sangat terkonservasi dengan *identity* minimal 67% dan 77% (Fontaine *et al.*, 2012). Protein gSG6 dari *An. gambiae* merupakan kandidat protein yang dapat dipercaya untuk biomarker paparan gigitan nyamuk *An. gambiae* dan juga merupakan indikator yang baik untuk paparan gigitan terhadap tiga nyamuk vektor utama malaria di Afrika, yaitu *An. gambiae*, *An. arabiensis* dan *An. funestus* dari Subgenus *Cellia* (Rizzo *et al.*, 2011). Nyamuk *Anopheles* vektor malaria di wilayah Asia yang termasuk dalam Subgenus *Cellia* seperti *An. maculatus*, *An. balabacensis*, *An. dirus*, *An. annularis*, *An. aconitus*, *An. subpictus* dan *An. sudaicus* sampai saat masih belum ada laporannya tentang tingkat konservasi protein gSG6 karena transkriptom dan proteom nyamuk-nyamuk tersebut banyak yang belum diteliti.

Reaksi silang antara protein kelenjar saliva *An. maculatus* dan *An. sudaicus* memberikan keuntungan untuk pengembangan protein kelenjar saliva sebagai biomarker paparan gigitan nyamuk *Anopheles* maupun sebagai vaksin. Reaksi silang tersebut menunjukkan bahwa protein saliva bisa bersifat universal, yaitu bisa diterapkan pada beberapa spesies nyamuk *Anopheles*, paling tidak pada tingkat subgenus yang sama. Untuk mendukung tujuan tersebut, protein saliva yang bisa menjadi kandidat biomarker maupun vaksin

merupakan protein yang terkonservasi di tingkat genus atau subgenus dan spesifik untuk nyamuk *Anopheles*, sehingga tidak akan terjadi reaksi silang dengan serangga hematofagus yang lain.

Kesimpulan

Paparan gigitan nyamuk *Anopheles* betina secara berulang dapat memicu terbentuknya antibodi spesifik terhadap protein-protein saliva nyamuk. Kadar antibodi tersebut dipengaruhi oleh intensitas paparan yang tergantung pada populasi nyamuk. Fakta ini mendasari pengembangan protein saliva nyamuk *Anopheles* betina sebagai antigen atau biomarker untuk mendeteksi ada tidaknya paparan gigitan dari nyamuk *Anopheles*. Biomarker tersebut bisa diaplikasikan untuk mengevaluasi keberhasilan program pengendalian vektor malaria yang bertujuan mencegah terjadinya penularan malaria.

Daftar Pustaka

- Aalberse R.C. 2000. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 106(2): 228-238.
- Andrade, B.B, Teixeira, C.R., Barral, A., Barral-Netto, M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc*. 77(4), 665-693.
- Andrade B.B., Rocha B.C., Reis-Filho A., Camargo L.M.A., Barral A., Barral-Netto M. 2009. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of Plasmodium vivax infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malaria Journal* 8:121
- Badu K., Siangla J., Larbi J., Lawson B.W., Afrane Y., Ong'echa J., Remoue F., Zhou G., Githeko A.K., Yan G. Variation in exposure to *Anopheles gambiae* salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. *Malaria Journal*, 11:318.
- Barodji, Boewono D.T., Boesri H., Sudini dan Sumarti. 2003. Bionomik Vektor dan Situasi Malaria di kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 2(2): 209-216.
- Calvo E., Pham V.M., Marinotti O., Andersen J.F., Ribeiro J.M.C. 2009. The salivary gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevant to hemophagy. *BMC Genomics*, 10:57.
- Drame P.M., Poinignon A., Besnard P., Mire J.L., Dos-Santos M.A., Sow C.S., Cornélie S., Fomane V., Toto J., Sembene M., Boulanger D., Simondon F., Fortes F., Carnevale P., Remoue F. 2010. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immunological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 83(1): 115-121.
- Drame P.M., Poinignon A., Marie A., Noukpo H., Doucoure S., Cornélie S., Remoue F. 2013. New Salivary Biomarkers of Human Exposure to Malaria Vector Bites in *Anopheles* Mosquitoes- New Insights Into Malaria Vectors. Edited by Sylvie Manguin. In Tech, Croatia, pp: 755-795.
- Fontaine A., Diouf I., Bakkali N., et al. 2011a. Implication of haematophagous salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors*, 4: 1-17.
- Fontaine A., Pascual A., Orlandi-Pradines E., Diouf I., Remoue F., Pages F., Fusai T., Rogier C., Almeras L. 2011b. Relationship between exposure to vector bites and antibody response to mosquito salivary gland extracts. *PLoS ONE*, 6(12): e29107.
- Fontaine A., Fusai T., Briolant S., Buffet S., Villard C., Baudelet E., Pophillat M., Granjeaud S., Rogier C., Almeras L. 2012. *Anopheles* salivary gland proteomes for major malaria vectors. *BMC Genomics*, 13:614.
- King J.G., Vernick K.D., Hillyer J.F. 2011. Members of the salivary gland surface protein family (SGS) are major immunogenic components of mosquito saliva. *JBC Papers in Press*. Manuscript M111.280552.

- Peng Z., and Simon F.E.R. 2004. Mosquito Allergy: Immune Mechanisms and Recombinant Salivary Allergens. *Internasional Archives of Allergy and Immunology*, 133: 198-209.
- Poinsignon A., Cornelié S., Ba F., Boulanger D., Sow C., Rossignol M., Sokhna C., Cisse B., Simondon F., Remoue F. 2009. Human IgG respon to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites. *Malaria Journal.*, 8:198.
- Poinsignon A., Samb B., Doucoure S., Drame P., Sarr J.B., Sow C., Cornelié S., Maiga S., Thiam C., Rogerie F., Guindo S., Hermann E., Simondon F., Dia I., Riveau G., Konate L., Remoue F. 2010. First attempt to validate the gSG6-PI salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Tropical Medicine and International Health*, 15(10): 1198-1203.
- Reid J.A. 1968. Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo. Government of Malaysia. Staples Printers Limited, England, pp: 41-52.
- Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J-P., Boulanger D., Simondon F. 2006. Evaluation of antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 363-370.
- Rizzo C., Ronca R., Fiorentino G., Verra F., Mangano V., Poinsignon A., Sirima S.B., Nebie I., Lombardo F., Remoue F., Coluzzi M., Petrarca V., Modiano D., Arca B. 2011. Humoral Response to the *Anopheles gambiae* Salivary Protein gSG6: A Serological Indicator of Exposure to Afrotropical Malaria Vectors. *PLoS ONE*, 6(3): e17980.
- Waitayakul A., Somsri S., Sattabongkot J., Looraesuwan S., Cui L., Udomsangpetch R. 2006. Natural human humoral response to salivary gland protein of Anopheles mosquitoes in Thailand. *Acta tropica* 98: 66-73