

# Deteksi Mikrofilaria/Larva Cacing *Brugia malayi* pada Nyamuk dengan Polimerase Chain Reaction

DYAH HARYUNINGTYAS dan DIDIK TULUS SUBEKTI

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 13 April 2008)

## ABSTRACT

HARYUNINGTYAS, D. and D.T. SUBEKTI Detection of *Brugia malayi* microfilaria/Larvae in mosquito using *Polimerase Chain Reaction*. *JITV* 13(3): 240-248.

Lymphathic filariasis that is also known as elephantiasis is caused by infestation of 3 species nematode *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori*. In Indonesia 70% filariasis case caused by *Brugia malayi*. Mosquito species from genus *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia* and *Armigeres* are known as vector of this disease. Microfilaria detection on mosquito is one methode to know infection rate in vector population in endemic area. The objectives of the research were to study the ability of *Hha1* repeat applicable to detect microfilaria/larvae in a pool of mosquitoes and to get description of adult mosquito night biting population lived in endemic area of filariasis brugian. Mosquito as positive control used in this research come from laboratory of parasitology of FKUI. Mosquito sample from the field was from Binawara and Kolam Kiri villages, South Kalimantan province. Mosquito were trapped then identified by its species. DNA of mosquitoes was extracted and then run by the PCR using *Hha 1* repeat primer. Result of the research indicated that adult mosquitoes night biting from Binawara village consist of *Culex*, *Mansonia*, *Anopheles* genus and from Kolam Kiri village only from *Mansonia* genus. *Hha 1* repeat primer is applicable to detect 1 mosquito infected with microfilaria/larvae in a pool of negative mosquitoes. Mosquito samples from the two villages showing negative PCR.

**Key Words:** Filariasis, *Brugia Malayi*, Vector, Microfilaria, Filaria Larve, PCR

## ABSTRAK

HARYUNINGTYAS, D. dan D.T. SUBEKTI. 2008. Deteksi Mikrofilaria/Larva Cacing *Brugia malayi* pada Nyamuk dengan *Polimerase Chain Reaction*. *JITV* 13(3): 240-248.

Filariasis limfatik atau dikenal dengan penyakit kaki gajah (*Elephantiasis*) disebabkan oleh 3 spesies utama cacing filaria yaitu *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* dan *Brugia timori*. Di Indonesia sebanyak 70% kasus filariasis disebabkan oleh *Brugia malayi*. Nyamuk dari genus *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia* dan *Armigeres* diketahui merupakan vector dari penyakit ini. Deteksi microfilaria pada nyamuk merupakan salah satu cara untuk mengetahui terjadinya infeksi pada populasi vector di daerah endemis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah amplifikasi *Hha1 repeat* dapat digunakan untuk mendeteksi mikrofilaria/larva filaria pada pool nyamuk dan untuk mendapatkan gambaran populasi nyamuk dewasa pada malam hari yang terdapat di daerah endemis filariasis brugian. Nyamuk kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari laboratorium parasitologi FKUI. Sementara itu, nyamuk sample berasal dari desa Binawara dan desa Kolam Kiri, Propinsi Kalimantan Selatan. Nyamuk yang telah diperoleh diidentifikasi spesiesnya dan diisolasi DNANYA selanjutnya dilakukan PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi nyamuk dewasa pada malam hari yang berasal dari desa Binawara terdiri dari genus *Culex*, *Mansonia* dan *Anopheles*, sedang dari desa Kolam Kiri adalah genus *Mansonia* dan *Anopheles*. Primer *Hha 1 repeat* dapat digunakan untuk mendeteksi pool nyamuk yang mengandung 1 ekor nyamuk positif mikrofilaria/larva filaria. Nyamuk yang berasal dari kedua desa tersebut menunjukkan hasil negatif PCR.

**Kata Kunci:** Filariasis, *Brugia Malayi*, Vektor, Mikrofilaria, Larva Filaria, PCR

## PENDAHULUAN

Di dunia 90% kasus filariasis disebabkan oleh *W. bancrofti* diikuti *B. malayi* dan *B. timori* (DAS *et al.*, 2002). Berbeda dengan *W. bancrofti* dan *B. timori*, *B. malayi* diketahui bersifat zoonosis karena dapat ditularkan dari hewan (mamalia, primata) ke manusia atau dari manusia ke manusia melalui vektor nyamuk (BUCK, 1991). Diperkirakan 23 spesies nyamuk dari genus *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, dan *Mansonia* dapat

mendukung perkembangan filariasis bancroftian dan brugian (SCHMIDT dan ROBERT, 2000). Pada filariasis bancroftian vektor potensial adalah *Culex sp*, *Anopheles sp* dan *Aedes sp* sedang pada filariasis brugian, adalah *Anopheles* dan *Mansonia* (DITJEN PPM dan PL, 2005).

Perkembangan Filaria dalam tubuh nyamuk memerlukan waktu kurang lebih selama 2 minggu. Siklus hidup dimulai jika nyamuk sebagai vektor menggigit dan menghisap darah orang yang terinfeksi aktif filariasis. Pada filariasis bancroftian waktu sejak

terjadinya infeksi sampai tampak mikrofilaria dalam darah adalah sekitar 6-12 bulan sedang pada filariasis Brugian sekitar 3,5 bulan (MAC DONALD, 2002). Cacing dewasa dapat hidup 5-10 tahun dan menyebabkan berbagai masalah karena kerusakan pembuluh limfe dan respon sistem imun yang dihasilkan (MAVEN SMITH, 1996).

Berdasarkan hasil survei tahun 2000, jumlah penderita kronis filariasis yang dilaporkan sebanyak 6.223 orang tersebar di 1.553 desa, di 231 kabupaten, 26 propinsi. Data ini adalah belum menggambarkan data sebenarnya karena hanya dilaporkan oleh 42% dari 7.221 puskesmas. Tingkat endemisitas filariasis di Indonesia berdasarkan hasil survey darah jari tahun 1999 adalah masih tinggi dengan rata-rata mikrofilaria (mf rate) 3,1 % (0,5-19,64%). Berdasarkan survei pada tahun 2002-2005 diketahui bahwa jumlah penderita terbanyak terjadi pada rentang waktu tersebut terutama di Sumatera dan Kalimantan. Dengan mf rate 1% atau lebih pada 84 kabupaten teridentifikasi (DITJEN PPM dan PL, 2005).

Pemutusan transmisi vektor merupakan unsur utama program eliminasi filariasis limfatik sehingga metode deteksi untuk mengetahui ada tidaknya infeksi pada nyamuk adalah sangat diperlukan (RAMZY, 2002). Pada daerah endemik deteksi yang sangat bermanfaat adalah *finger prick test* dan *The DEC provocative test* (MCMAHON dan SIMONSEN, 1996) yang menjadi standar emas pengujian. Oleh karena parasit mempunyai periode nokturnal (penampakan pada darah hanya pada malam hari) yang membatasinya sehingga test ini hanya efektif dilakukan pada malam hari. Uji berdasarkan antigen dan antibody hanya memberikan hasil yang positif beberapa bulan setelah infeksi dan hasil dari uji tersebut memberikan gambaran keberadaan transmisi filaria pada suatu saat yang sangat awal (WILLIAMS *et al.*, 2002). Berbeda dengan xenomonitoring (uji deteksi adanya mikrofilaria/larva pada nyamuk) yang menggambarkan transmisi pada saat itu. Teknik lain adalah dengan menggunakan *Polimerase Chain Reaction (PCR)* yang dapat mendeteksi 1 pikogram DNA filaria pada darah penderita (ZHONG *et al.*, 1996). Teknik ini dikembangkan untuk mendeteksi L3 atau mikrofilaria pada nyamuk sebagai vektor filariasis.

RAMZY *et al.* (1997) menyatakan bahwa metode deteksi untuk mengetahui terjadinya infeksi pada populasi vektor adalah diseksi dan PCR. Diseksi merupakan standar emas untuk menghitung level infeksi pada nyamuk, namun metode ini sangat mahal dan tidak efisien jika dilakukan pada area dengan prevalensi infeksi kecil dibawah 1%. Pada filariasis bancroftian uji berdasar PCR dikembangkan untuk mengamplifikasi elemen DNA berulang ("SspI repeat") yang spesifik untuk untuk genus *Wuchereria* dan menunjukkan hasil yang cukup sensitif untuk

mendeteksi 0,1 pg DNA genom *W. Bancrofti* dimana <1% dari DNA parasit pada nyamuk *CX. pipiens* mengandung 1 larva (CHANTEU *et al.*, 1994). LIZOTTE *et al.*, 1994; FISCHER *et al.*, 2000 dan KLUBER *et al.*, 2001 menyatakan bahwa PCR berdasar *Hha I repeat* dapat digunakan untuk mendeteksi *Brugia malayi* pada darah manusia dan telah diuji pada sampel darah yang berasal dari Indonesia. FISCHER *et al.*, (2000) menyatakan bahwa *HhaI repeat* dapat digunakan untuk mendeteksi *Brugia malayi* dalam darah siang dan malam pada penderita positif mikrofilaria. *Hha I repeat Brugia malayi* sekuens adalah nukleotida sepanjang 322 yang mempunyai banyak ulangan, tersusun tandem dan unik pada genom dari genus *brugia* (XIE *et al.*, 1994). Menurut FISCHER *et al.* (2000) and ZHONG *et al.* (1996) *HhaI repeat* tersusun secara tandem dan mempunyai >30.000 copy per haploid genome sehingga amplifikasi PCR salah satu pendekatan molekuler yang menjanjikan untuk mendeteksi infeksi pada vektor. Jumlah copy perhaploid genom *Hha I repeat B malayi* ini adalah jauh lebih banyak dari dari *Ssp I repeat W. bancrofti*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Hha I repeat* dalam mendeteksi *Brugia malayi* dapat digunakan untuk mendeteksi DNA mikrofilaria/larva filaria pada pool nyamuk dan mengetahui populasi nyamuk dominan pada malam hari yang ada di area endemis filariasis di 2 lokasi di Kalimantan Selatan.

## MATERI DAN METODE

### Penangkapan nyamuk

Lokasi penangkapan nyamuk dilaksanakan di daerah endemis filariasis di Desa Binawara, Kecamatan Hulu dan Desa Kolam Kiri, Kecamatan Barito Kuala, Propinsi Kalimantan Selatan. Nyamuk yang ditangkap adalah nyamuk betina pada malam hari antara jam 19.00-03.00 menggunakan aspirator dengan umpan manusia. Penangkapan nyamuk dilakukan di rumah penduduk yang positif mikrofilaria pada pemeriksaan darah jarinya (menurut informasi dari Dinas Kesehatan setempat) serta rawa-rawa di sekitarnya.

Jumlah sampel nyamuk yang dikoleksi adalah sebanyak  $\pm$  260 ekor. Nyamuk yang akan diproses adalah spesies nyamuk yang diketahui umum berlaku sebagai vektor filariasis baik nyamuk yang baru menghisap darah maupun tidak. Nyamuk yang diperoleh ditempatkan pada gelas kertas yang ditutup kasa bagian atasnya. Nyamuk dibunuh dengan cara dimasukkan freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, selanjutnya nyamuk mati masing-masing sebanyak 10 ekor ditempatkan pada eppendorf yang dilubangi bagian atasnya dan didalamnya berisi silika gel sampai dilakukan identifikasi. Identifikasi dilakukan secara individu dengan mikroskop stereo dan dicocokkan dengan kunci identifikasi O'CONNOR dan SOEPANTO

(1999). Setelah identifikasi, nyamuk dimasukkan dalam tabung yang berisi alkohol 70% sampai dilakukan PCR.

### Identifikasi nyamuk

Identifikasi nyamuk hanya dilakukan pada spesies nyamuk yang umum sebagai vektor filariasis brugian. Nyamuk betina dari spesies lain yang diduga sebagai vektor filariasis bancroftian juga akan dipool untuk dilakukan PCR terhadap kemungkinannya juga mengandung mikrofilaria/larva filariasis brugian. Nyamuk lain yang tidak berlaku sebagai vektor filariasis tidak akan diproses lebih lanjut.

### Isolasi DNA

Ekstraksi DNA mikrofilaria dilakukan pada darah gerbill yang positif mikrofilaria dan nyamuk positif mikrofilaria/larva filaria (sebagai kontrol positif) serta nyamuk sample yang berasal dari lapang. Ekstraksi darah dilakukan dengan metode SUPALI (komunikasi pribadi). Secara garis besar: 100 µl darah dalam antikoagulan *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA) ditambah 300 µl 0,0002% SDS dimasukkan pada tabung mikrosentrifus (Eppendorf), selanjutnya ditambah Tris EDTA (TE) 500 µl dan diinkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit sambil divortex. Campuran selanjutnya disentrifugasi 13.000 rpm selama 2 menit kemudian supernatan dibuang. Pellet dicuci dengan 500 µl TE selanjutnya dicuci kembali dengan 500 µl *Red Blood Cell Lysis Buffer* (RCLB) yang terdiri dari Sucrose, 1M Tris, pH8,0; 1M KCl, 1M MgCl<sub>2</sub>. Pencucian dilakukan sampai pellet berwarna putih. Pellet selanjutnya ditambah 200 DSP Buffer yang berisi proteinase K dan Tween 20, selanjutnya divortex dan diinkubasi selama 2 jam pada 60°C. Vortex diulang setelah satu jam. Sampel dididihkan selama 15 menit pada 95°C selanjutnya sebanyak 2 µl sampel diambil untuk digunakan sebagai template PCR.

Nyamuk betina dikumpulkan (dipool) berdasarkan spesies (10-20 ekor nyamuk/pool). Masing-masing pool kemudian dihomogenisasi dengan pestle dalam tabung mikrosentrifus yang berisi 180ml phosphate buffer saline (pH 7,2; PBS). DNA selanjutnya diekstraksi dari masing-masing tabung menggunakan komersial kit (Dneasy®, Qiagen, Hilden, Germany, cat. #69502) sesuai protocol perusahaan.

### Amplifikasi PCR

*Polimerase chain reaction* dilakukan dengan thermocycler GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) menggunakan primer *forward* HhaI (5'GCGCATAAATTCATCAGC-3') dan *reverse* HhaII (5'GCGCAAACTTAATTACAAAAGC-3'). Campuran reaksi PCR menggunakan kit Ready To Go

PCR (Amersham Bioscience) dengan total volume 25 ml.

Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 95°C : 5 menit sebanyak 1 siklus; denaturasi 95°C : 1 menit, *annealing* 55°C : 1 menit, *extension* 72°C : 1 menit masing-masing sebanyak 35 siklus. Terakhir adalah *extension* pada 72°C selama 5 menit dan hold pada 4°C. Hasil PCR sebanyak 5 µl dielektroforesis pada gel agarose 1,5% dan divisualisasi dengan pengecatan ethidium bromida untuk mengkonfirmasi terjadinya amplifikasi.

### Nyamuk positif Mikrofilaria

Karena mikrofilaria/larva filaria tidak ditemukan di daerah penelitian, maka digunakan 10 ekor nyamuk yang mempunyai kemungkinan besar positif mikrofilaria yaitu nyamuk anopheles yang digunakan sebagai vektor penular pada hewan percobaan (gerbill) di bagian parasitologi, FKUI, Salemba. Hewan gerbill ini digunakan untuk memperbanyak cacing filaria guna keperluan penelitian di laboratorium. Hewan positif mikrofilaria dijadikan dalam satu kandang dengan hewan negatif dan nyamuk anopheles sebagai vektor penular. Nyamuk ini yang selanjutnya akan diambil untuk diisolasi DNA dan PCR seperti prosedur diatas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penangkapan dan identifikasi nyamuk

Penelitian ini dilakukan di kabupaten Tanah Bumbu dan Barito Kuala, Kalimantan Selatan. Kedua lokasi tersebut adalah daerah endemis filariasis brugian di Kalimantan Selatan dengan mf rate berkisar sekitar ±2%.

Di Kecamatan Hulu, Kabupaten Tanah Bumbu, Kalsel terdapat 10 orang positif mikrofilaria (info dari Loka Litbang Tanah Bumbu) dengan nilai mf rate ± 2% dan penderita belum pernah diobati. Di desa Kolam kiri kabupaten Barito Kuala terdapat 1 orang penderita positif dengan mf rate ≤ 2% (Info dari Dinas Kesehatan Propinsi Kalimantan Selatan). Di daerah ini juga belum pernah terintervensi obat sebelumnya.

Menurut SOEYOKO (2002) secara epidemiologi terdapat 6 tipe filariasis yang masing-masing ditularkan oleh nyamuk yang berbeda-beda bionomiknya. Setiap daerah endemis umumnya mempunyai spesies nyamuk yang berbeda sebagai vektor penularnya (DEPKES, 2002). Tabel 1 adalah spesies vektor filariasis di pulau Kalimantan.

Hasil penangkapan diperoleh sampel nyamuk betina sejumlah 253 ekor dari Kec. Hulu Kab. Tanah Bumbu dan Desa Kolam Kiri, Kab. Barito Kuala, Propinsi Kalimantan Selatan seperti tertera pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Spesies cacing filaria dan nyamuk penularnya di Kalimantan yang sudah diidentifikasi tahun 2002

Propinsi	Spesies cacing penyebab kaki gajah	Spesies vektor
Kalimantan Barat	<i>B. malayi</i>	<i>Mansonia. Uniformis, Anopheles Uniformis</i>
Kalimantan Tengah	<i>B. malayi</i>	<i>Mansonia. Uniformis, Anopheles Uniformis</i>
Kalimantan Selatan	<i>B. malayi</i>	<i>Ma. Uniformis, Ma. Anulifera, Ma. Anulata, Ma. Indiana, Ma. Bonneae, Ma. Dives, An. Nigerimus</i>
Kalimantan Timur	<i>B. malayi</i>	<i>Ma. Bonneae, Ma. Uniformis, Ma. dives</i>

Sumber: Pedoman Pemberantasan Filariasis, Dep.Kes.RI tahun 2002

**Tabel 2.** Hasil penangkapan nyamuk dari Kecamatan Hulu dan Barito Kuala, Kalimantan Selatan

Lokasi Pengambilan Sampel	mf rate	Lokasi penangkapan nyamuk	Lama penangkapan	Waktu penangkapan	Jumlah nyamuk yg diperoleh (ekor)	Spesies hasil identifikasi (ekor)
Desa Binawara, Kec Hulu, Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalsel	± 2%	Rumah penduduk di dalam hutan	1 malam	19.00-03.00	107	<i>Culex quinquefasciatus</i> (94) <i>Mansonia bone/dives</i> (5) <i>Mansonia uniformis</i> (4) <i>Anopheles barbirostris</i> (2) <i>Anopheles hyrcanus</i> (1) <i>Anopheles nygerimus</i> (1)
Desa Kolam kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai Propinsi Kalsel	± 2%	Rumah penduduk dan rawa-rawa di sekitarnya	2 malam	19.00-03.00	146	<i>Mansonia uniformis</i> (140) <i>Anopheles nigerimus</i> (6)

Hasil penangkapan dan identifikasi nyamuk yang berasal dari Desa Binawara, Kab. Tanah Bumbu terdapat beberapa spesies nyamuk yaitu yang mempunyai kesesuaian dengan vektor penular *Brugia malayi* di Kalimantan Selatan (Tabel 1), walaupun demikian nyamuk penular yang tertangkap (*Mansonia sp*) jumlahnya sangat sedikit dibandingkan nyamuk dominan tertangkap yang bukan vektor penular (*Culex sp*). Berbeda halnya dengan nyamuk tertangkap di Desa Kolam Kiri dimana nyamuk dominan tertangkap adalah nyamuk vektor penular filaria *Brugian*. Kepadatan nyamuk tertangkap adalah dipengaruhi oleh topografi daerah termasuk kesuburan daerah (ada orang atau ternak sebagai sumber makanan nyamuk, ada sumber air atau genangan-genangan air sebagai tempat perkembangbiakan nyamuk, rumah dengan halaman dan kebun untuk tempat istirahat nyamuk). (DITJEN PPM dan PL, 2004)

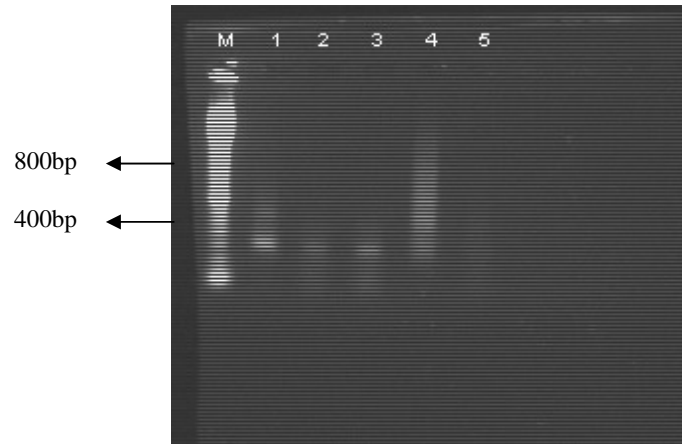
#### **Polimerase Chain Reaction pada kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol inhibitor PCR**

Sampel darah gerbill positif mikrofilaria dan nyamuk positif mikrofilaria yang berasal dari bag.

Parasitologi FKUI, Salemba digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif adalah nyamuk *culex* yang berasal dari bekasi. Pada penelitian ini juga dilakukan kontrol inhibitor untuk memastikan tidak munculnya inhibitor nyamuk yang mengganggu proses PCR.

Berikut ini adalah hasil amplifikasi PCR pada gen *HhaI repeat* dari kontrol positif yang berasal dari darah gerbill positif mikrofilaria dan nyamuk positif dari FKUI.

Uji PCR menunjukkan hasil yang positif pada kontrol positif PCR, ekstrak nyamuk positif, dan kontrol inhibitor PCR (Gambar 1). Hasil yang positif diketahui dengan adanya pita hasil amplifikasi pada sekuens *HhaI repeat* sebesar 322 bp. Pada Gambar 1 terlihat bahwa pada kontrol positif yang berasal dari darah gerbill positif mikrofilaria terjadi adanya dimer pada fragmen hasil amplifikasi (dengan ukuran fragmen 322 bp dan 640 bp), sedangkan pada ekstrak nyamuk positif filaria dan kontrol inhibitor PCR hanya dihasilkan pita tunggal (322 bp). Sesuai pernyataan FISCHER *et al.* (2002) bahwa *Wild Type HhaI repeat* disusun sebagai tandem repeat sehingga pada beberapa sampel hasil amplifikasi akan terbentuk adanya



**Gambar 1.** Hasil amplifikasi fragmen *HhaI repeat* dari sampel darah gerbill positif mikrofilaria, kontrol negatif serta kontrol inhibitornya

Keterangan gambar:

1. M: DNA Marker Ladder 100 bp
2. Kontrol positif PCR : DNA darah gerbill positif mikrofilaria (dari bag. Parasitologi, FKUI)
3. Ekstrak nyamuk positif mikrofilaria (dari bag. Parasitologi, FKUI)
4. PCR sebanyak 2  $\mu$ l (Fischer, komunikasi pribadi)  
Kontrol Inhibitor PCR : 10  $\mu$ l kontrol ekstrak nyamuk negatif (20 ekor nyamuk (-) ditambah 5 pg DNA darah gerbil positif mikrofilaria selanjutnya digunakan untuk template)
5. Kontrol ekstrak negatif : Ekstrak nyamuk negatif filaria
6. Kontrol negatif PCR : ddH<sub>2</sub>O dicampur pada PCR master mix

monomer, dimer ataupun trimer dimana fragment *HhaI repeat* yang sebenarnya adalah fragment dengan ukuran pita 322 bp. Pada kontrol inhibitor juga diperoleh adanya hasil amplifikasi, dengan demikian isolasi telah dilakukan dengan baik dan tidak muncul adanya inhibitor PCR dari nyamuk. Pada ekstrak nyamuk positif filaria juga menunjukkan adanya hasil amplifikasi pada 322 bp. Menurut DISSANAYAKE *et al.* (1990) nyamuk sebagai vektor mempunyai inhibitor PCR yang potensial. Pada proses ekstraksi mikrofilaria/larva yang berasal dari nyamuk, DNANYA sering tidak terekstraksi atau tidak teramplifikasi PCR karena adanya inhibitor tersebut. Hal ini yang seringkali menyebabkan adanya hasil negatif palsu.

#### **Polimerase chain reaction nyamuk yang berasal dari lapang**

Amplifikasi PCR sampel nyamuk yang berasal dari Desa Binawara, Kec Hulu Kab.Tanah Bumbu, Propinsi Kalimantan Selatan dilakukan pada tujuh pool sampel nyamuk yaitu 1 pool sampel nyamuk berisi 9 ekor *Mansonia sp* (Tabel 3), 1 pool sample nyamuk berisi 4 ekor *Anopheles sp* dan lima pool sampel nyamuk *Culex quinquefasciatus* masing masing berisi 20 ekor/pool (4 pool) dan 14 ekor/pool (1 pool) *semua* menunjukkan hasil negatif PCR (Tabel 3). Walaupun *Culex sp* bukan

merupakan vektor potensial *Brugia malayi* tetapi tetap dikonfirmasi PCR terhadap kemungkinannya mengandung mikrofilaria/larva *Brugia malayi* karena di lokasi ini terdapat 10 orang positif mikrofilaria pada survey darah jari. Menurut DITJEN PPM dan PL (2005) menyatakan bahwa nyamuk yang biasa berperan sebagai vektor *B. malayi* adalah *Anopheles sp* dan *Mansonia sp*. Menurut FISCHER *et al.* (2002) beberapa pool *Culex sp* pada penelitiannya dilaboratorium ada yang positif *Hha I repeat* tetapi karena nyamuk ini diberi makan darah positif mikrofilaria tetapi kemungkinan tidak dapat mendukung perkembangan parasit lebih lanjut.

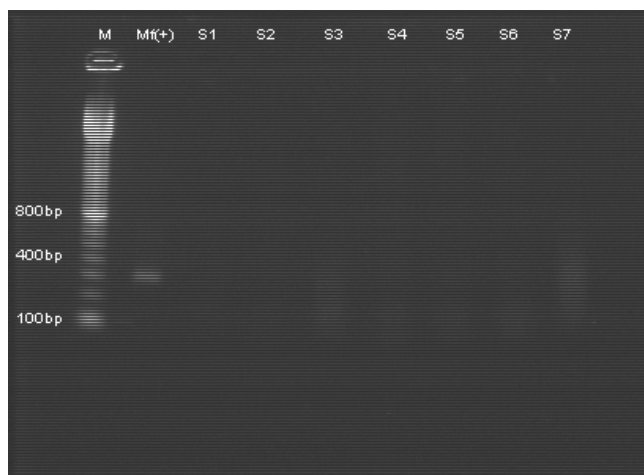
Hasil amplifikasi PCR pada sampel nyamuk yang berasal dari Desa Kolam kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai, Propinsi Kalimantan Selatan dari 14 pool sampel nyamuk yang diamplifikasi (10 ekor/pool) juga menunjukkan hasil yang negatif (Gambar 2 dan 3). Kedua lokasi penelitian ini yaitu Desa Binawara, Kab. Tanah Bumbu dan Desa Kolam Kiri, Kab. Barito Kuala adalah termasuk daerah endemis filariasis dengan mf rate yang rendah  $\pm 2$ . Pada daerah endemis dengan mf rate  $\leq 2\%$  diperlukan jumlah sampel nyamuk yang memadai untuk menemukan nyamuk yang positif. Menurut penelitian pada vektor *B. timori* yang dilakukan oleh FISCHER *et al.* (2002) di Pulau Alor, Propinsi Nusa Tenggara Timur dari 624 ekor nyamuk

*A. barbirostris* tertangkap yang diuji PCR dalam 61 pool diketahui 39 pool positif. Dari jumlah tersebut diperkirakan nyamuk yang positif adalah sebanyak 6,1% dan prevalensi infeksi pada nyamuk adalah 8,8. Menurut data dari subdit FILARIASIS dan SCHISTOSOMIASIS, DITJEN PPM dan PL (2005) di Propinsi Nusa Tenggara Timur mf rate 2,6 - 16,02%. Sedangkan angka penyakit filariasis di Propinsi Kalimantan Selatan mempunyai mf rate berkisar antara 1,2 - 6,1%.

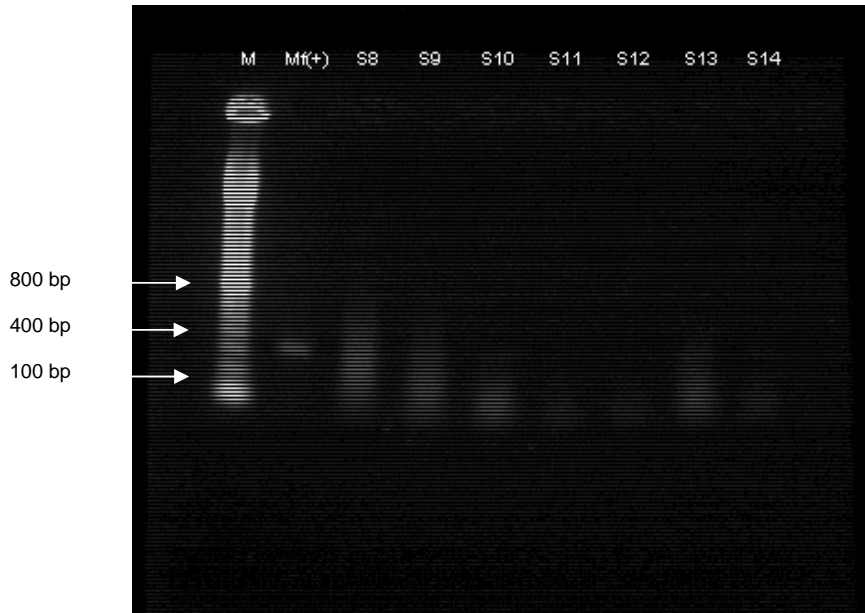
Hasil negatif pada penelitian ini diduga karena jumlah sampel yang diperoleh adalah kurang sehingga belum ditemukan nyamuk yang positif pada pool nyamuk. Menurut FARID *et al.* (2001) rata-rata infeksi yang diamati pada pool nyamuk menggambarkan proporsi rumah dengan nyamuk yang terinfeksi pada suatu malam atau pada periode tertentu. Oleh karena itu peningkatan frekuensi sampling dan jumlah nyamuk yang ditangkap meningkatkan probabilitas nyamuk positif yang tertangkap.

**Tabel 3.** Jumlah pool nyamuk yang telah diidentifikasi dan diuji dengan PCR

Lokasi pengambilan sampel	Spesies hasil identifikasi	Jumlah nyamuk (ekor)	Jumlah pool nyamuk	Jumlah nyamuk per pool	Hasil PCR
Desa Binawara, Kec. Hulu, Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalsel	<i>Culex quinquefasciatus</i>	94	5 pool nyamuk <i>Culex</i> sp.	20 ekor/pool	-
	<i>Mansonia bone/dives</i>	5			
	<i>Mansonia uniformis</i>	4	1 pool nyamuk <i>Mansonia</i> sp.	9 ekor/pool	-
	<i>Anopheles barbirostris</i>	2			
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	1			
		<i>Anopheles nygerimus</i>	1	1 pool nyamuk <i>Anopheles</i> sp.	4 ekor/pool
Desa Kolam Kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai, Propinsi Kalsel	<i>Mansonia uniformis</i>	140	14 pool nyamuk <i>Mansonia</i>	10 ekor/pool	-
	<i>Anopheles nigerimus</i>	6	1 pool nyamuk <i>Anopheles</i>	6 ekor/pool	-
		253			



**Gambar 2.** Hasil amplifikasi PCR (negatif) dari pool sampel nyamuk no S1-S7 (10 ekor nyamuk/pool) yang berasal dari Desa Kolam Kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai, Propinsi Kalimantan Selatan (M : DNA marker ladder 100 bp; S1-S7 : Pool nyamuk no 1-7)

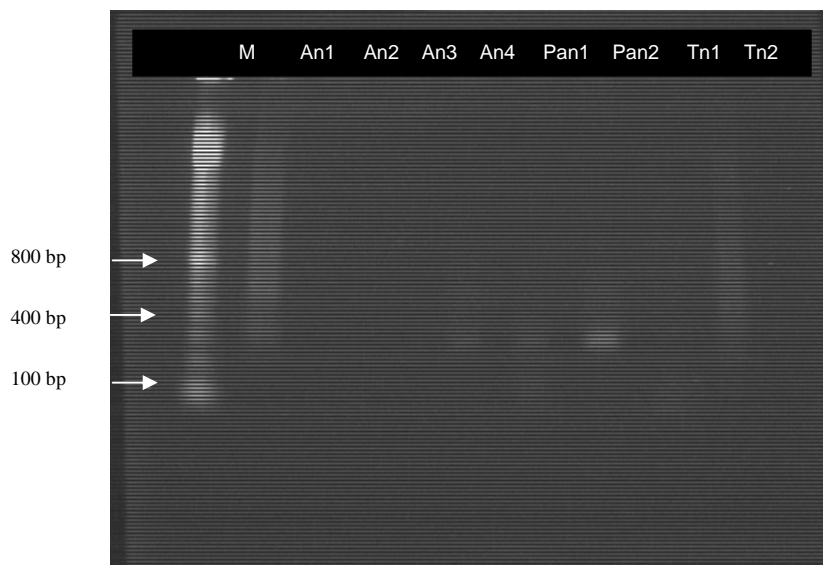


**Gambar-3.** Hasil amplifikasi PCR (negatif) dari pool sampel nyamuk no S8-S14 (10 ekor nyamuk/pool) yang berasal dari Desa Kolam Kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai, Kalimantan Selatan. ( M: DNA marker ladder 100 bp; S8-S14 : Pool nyamuk no 8-14)

#### **Deteksi mikrofilaria/larva *B.malayi* pada pool nyamuk positif mikrofilaria**

Pada penelitian ini, karena nyamuk yang berasal dari lapang tidak ditemukan adanya nyamuk positif maka digunakan nyamuk yang kemungkinan besar positif mikrofilaria yaitu nyamuk anopheles yang digunakan sebagai vektor *Brugia malayi* pada hewan percobaan gerbill di laboratorium Parasitologi FKUI. Nyamuk ini selanjutnya juga akan digunakan sebagai template PCR untuk menunjukkan sensitifitas PCR bahwa dalam pool nyamuk negatif dengan satu ekor nyamuk positif. Hasil amplifikasi pool nyamuk yang terdiri dari 1 ekor nyamuk positif dan 9 ekor nyamuk negatif serta 1 ekor nyamuk positif dan 19 ekor nyamuk negatif menunjukkan hasil positif PCR. Dengan demikian 1 ekor nyamuk positif dalam pool nyamuk negatif (10-20 ekor/pool) telah dapat terdeteksi PCR dengan baik (Gambar-4). Hal ini menunjukkan bahwa PCR adalah cukup sensitif untuk mendeteksi 1 ekor nyamuk dalam pool nyamuk negatif. Menurut RAMZY *et al.*, 1997 keuntungan dari metode berbasis PCR ini yaitu dapat digunakan untuk mendeteksi satu parasit pada pool nyamuk yang berasal dari lapang sehingga menyebabkan aplikasi di lapangan lebih efektif daripada pembedahan nyamuk untuk menemukan larva.

Menurut SUPALI (komunikasi pribadi) bahwa dengan jumlah mikrofilaria yang minimal pada nyamuk, peluang *Hha I repeat* terdeteksi PCR lebih besar dari *W. Bancrofti* karena jumlah copy number yang besar > 30.000 copy. Dari 10 ekor nyamuk yang diduga positif mikrofilaria ternyata ada 2 ekor nyamuk yang menunjukkan hasil negatif PCR (Gambar-4: An2 dan An3). Hal ini menunjukkan tidak semua vektor potensial akan positif mikrofilaria karena banyak faktor yang mempengaruhi termasuk diantaranya jumlah mikrofilaria yang dihisap cukup atau tidak untuk berkembang di tubuh nyamuk disamping itu kemungkinan nyamuk negatif disini adalah menghisap darah hospes negatif yang akan ditulari mikrofilaria bukan hospes positif mikrofilaria. Menurut DITJEN PPM dan PL (2004) syarat nyamuk menjadi vektor antara lain adalah umur nyamuk, kontak antara manusia/hospes dengan nyamuk, frekuensi menggigit, dan kerentanan nyamuk terhadap parasit. Menurut BLACK *et al.* (1996) dan WOODRING *et al.* (1996) Estimasi kapasitas menjadi vektor adalah dipengaruhi faktor lingkungan, tingkah laku, biokimia dan seluler yang mempengaruhi hubungan antara vektor, patogen yang akan ditransmisikan oleh vektor, dan hospes tempat patogen tersebut akan ditransmisikan. Baik tersebut.



**Gambar 4.** Hasil amplifikasi PCR pada nyamuk *Anopheles* yang diduga filaria yang berasal dari bag. Parasitologi KUI dan pool nyamuk yang berasal dari Desa Binawara, Kec Hulu Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalimantan Selatan

Keterangan:

- M : DNA marker ladder 100 bp
- An1- An4 : Hasil amplifikasi nyamuk *Anopheles* dari FKUI (masing-masing 1 ekor nyamuk, Hasil :An1 : (+) ; An2 : (-); An3: (-); An4: (+)
- Pan1 : Hasil amplifikasi 1 ekor nyamuk positif + 19 ekor nyamuk negatif) : Hasil (+)
- Pan2 : Hasil amplifikasi 1 ekor nyamuk positif + 9 ekor nyamuk negatif) : Hasil (+)
- Tn1 : Hasil amplifikasi nyamuk *Mansonia sp* dari Desa Binawara, Kec Hulu Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalimantan Selatan (9 ekor nyamuk) : Hasil : (-)
- Tn2 : Hasil amplifikasi nyamuk *Anopheles sp* dari Desa Binawara, Kec Hulu Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalimantan Selatan (4 ekor nyamuk) : Hasil : (-)

tingkah laku dan faktor lingkungan mempunyai peran untuk membedakan kapasitas sebagai vektor. Sebagai contoh spesies nyamuk tertentu mungkin secara genetik dan biokimia cocok untuk perkembangan secara komplit dari patogen tertentu, tetapi jika spesies nyamuk ini jarang kontak dengan hospes yang megandung patogen atau sumber darah yang diinginkan tidak termasuk hospes tersebut maka nyamuk ini bukan merupakan vektor yang cocok untuk patogen

### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Hha 1 *repeat* adalah sensitif dapat mendeteksi mikrofilaria/larva filaria pada pool nyamuk (10-20 ekor/pool) dengan satu ekor nyamuk positif. Nyamuk yang berasal dari Desa Binawara, Kecamatan Hulu, Kab. Tanah Bumbu, Propinsi Kalimantan Selatan; dan Desa Kolan Kiri, Kec. Barito Kuala, Kab. Baranbai, Propinsi Kalimantan Selatan, semua menunjukkan hasil negatif PCR. Nymamuk yang diduga sebagai vektor filaria berdasarkan nyamuk dominan pada malam hari dari

hasil penangkapan adalah *Mansonia sp* dan *Anopheles sp* dan *Culex sp* di Kab. Tanah Bumbu serta *Mansonia sp* dan *Anopheles sp* di Kab. Baranbai, Kalimantan Selatan.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Loka Litbangkes Kabupaten Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan dan stafnya serta Bapak Karman dkk dari Dinas Kesehatan Propinsi Kalimantan Selatan atas bantuan dan kerjasamanya. Penelitian ini didanai oleh APBN 2006.

### DAFTAR PUSTAKA

- BLACK, W.C. and C.G. MOORE. 1996. Population Biology as a tool for studying vector borne diseases. Pp: 393-416. In B.J. BEATY and W.C. MARQUARDT (ed), The biology of disease vectors. University Press of Colorado. Niwot. Colo.



- BUCK, A.A. 1991. Filariasis. In: G.T. STRIKLAND (Ed.). Hunter's tropical medicine. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 713-727.
- DAS, P.K., S.P. PANI and K. KRISHNAMOORTHY. 2002. Prospects of elimination of Lymphatic filariasis in India. *Indian Council Med. Res.* 32: 5-6.
- DEPKES, R.I. 2002. Pedoman Pemberantasan Filariasis. Direktorat Jendral PPM PL – Direktorat P2B2 Subdit Filariasis dan Schistosomiasis. Jakarta.
- DISSANAYAKE, S., X. MIN and W.F. PIESENS. 1991. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a non radioactive probe. *Mol. Biochem. Part.* 45: 49-56.
- DITJEN PPM dan PL. 2002. Angka Penyakit Filaria dan Jumlah Kabupaten/Kota serta Kecamatan terjangkau menurut propinsi 1998 - 2003. <http://www.bankdata.depkes.go.id/profil/web%20profil202002/lamp46.htm> (10 Maret 2006).
- DITJEN PPM dan PL. 2004. Pedoman Ekologi dan Aspek Perilaku Vektor. Ditjen PPM dan PL, Depkes RI, Jakarta.
- DITJEN PPM dan PL. 2005. Epidemiologi Filariasis. Ditjen PPM dan PL, Depkes RI, Jakarta.
- FARID H.A., R.E. HAMMAD, M.M. HASSAN, Z.S. MORSY, I.H. KAMAL, G.J. WEILL and R.M.R. RAMZY. 2001. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polimerase chain reaction : a potentially useful tool for large scale control programmes. *Transactions Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 29-32.
- SUBDIT FILARIASIS dan SCHISTOSOMIASIS. 2005. Laporan Survei. Ditjen PPM dan PL, Depkes RI, Jakarta.
- FISCHER, P., T. SUPALI, H. WIBOWO, I. BONOW and S.A. WILLIAM. 2000. Detection of DNA of nocturnally periodic *Brugia Malayi* in night and day blood samples by a polymerase chain reaction-Elisa based method using an internal control DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 291-296.
- FISCHER, P., H. WIBOWO, S. PISCHKE, P. RUCKERT, E. LIEBAU, I.S. ISMID and T. SUPALI. 2002. PCR Based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. *Annals Trop. Med. Par.* 96: 809-821.
- KLUBER, S., SUPALI, T., WILLIAM, S.A., LIEBAU, E. and FISCHER, P. 2001. Rapid PCR-based detection of *Brugia malayi* DNA from blood spots by DNA detection test strips. *Transactions Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 169-170.
- LIZOTTE, M.R., T. SUPALI, F. PARTONO and S.A. WILLIAMS. 1994. A polymease chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *American. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 314-321.
- SMITH, M. 1996. *Wuchereria bancrofti*: The causative agent of Bancroftian Filariasis. <http://maven.smith.edu/~sawlab/fgn/pnb/wuchban.html#bioandepid> (10 Maret 2006).
- MCDONALDS, S. 2002. Filariasis. <http://www.filariasis.org/> (10 Maret 2006).
- MC MAHON, J.E. and P.E. SIMONSEN. 1996. Filariases. dalam G. COOK (Eds). Manson's Tropical Diseases 20<sup>th</sup>. ELBS – W.B. Saunders, London.
- O'CONNOR, C.T. and A. SUPANTO. 2007. Kunci bergambar nyamuk anopheles dewasa. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman.
- RAMZY, R.M., H.A. FARID, I.H. KAMAL, G.H. IBRAHIM, Z.S. MORSY, R. FARIS, G.J. WEILL, S.A. WILLIAMS and A.M. GAD. 1997. A polymease chain reaction-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood and *Culex pipiens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 156-160.
- RAMZY, R.M. 2002. Field Application of PCR Based Assays for Monitoring *Wuchereria Bancrofti* Infection in Africa. *Annals Trop. Med. Par.* 96: 55-59.
- SCHIMDT, G.D. and L.S. ROBERTS. 2000. *Foundation of Parasitology*. 6<sup>th</sup> ed. The McGraw Hill Companies, Inc. pp.
- SOEYOKO. 2002. Penyakit Kaki Gajah (*Filariasis limfatik*): Permasalahan dan alternatif penanggulangannya. Pidato pengukuhan jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta,
- URGUHART, G.M., J. ARMOUR, J.L. DUNCANN, M. DUNN and F.W. JENNINGS. 1996. *Veterinary Parasitology*. The Faculty of Veterinary Medicine, The University of Glasgow, Scotland.
- WILLIAMS, S.A., S.J. LANEY, L.A. BIERWERT, L.J. SAUNDERS, D.A. BOAKYE, P. FISCHER, D. GOODMAN, H. HELMY, S.L. HOTT, V. VASUKI, P.J. LAMMIE, C. PLICHART, R.M.R. RAMZY and E.A. OTTESEN. 2002. Development and standardization of rapid, PCR-based method for the detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes, for xenomonitoring the human prevalence of bancroftian filariasis. *Trop. Med. Par.* 96: S41-S46.
- WOODRING, J.L., S. HIGGS, and B.J. READY. 1996. Natural cycles of vector borne pathogen, pp: 51-72. In: B.J. BEATY and W.C. MARQUARDT (Ed). *The Biology of Diseases Vectors*. University Press of Colorado, Niwot. Colo.
- XIE, H., O. BAIN and S.A. WILLIAM. 1994. Molecular phylogenetic studies on *Brugia filariae* using Hha I repeat sequences. *Parasite* 1: 255-260.
- ZHONG, M., J.M.C. CARTHU, L. BIERWERT, M. LIZOTTE-WANIEWSKI, S. CHANTEU, T.B. NUTMAN, E.A. OTTESEN and S.A. WILLIAMS. 1996. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am. J. Trop Med. Hyg.* 54: 357-363.