

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I

(KLASTER GIZI & KESEHATAN)

TAHUN ANGGARAN 2009



KKA
KK
LP. 104 / 10
Kus
P

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PENGENALAN *PLASMODIUM FACIPARUM* MEROZOIT COMMON ANTIGEN OLEH
PENDERITA MALARIA FALCIPARUM DARI BEBERAPA DAERAH ENDEMIS DI
INDONESIA DALAM UPAYA MEMPEROLEH KANDIDAT VAKSIN LOKAL
UNTUK INDONESIA

dr. Kusmartisnawati. MS., SpParK

Dra. Heny Arvati. MSc. Ph.D.

dr. Sri Wijayanti Sulistyawati

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan
Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Nomor : 171/SP2H/PP/DP2M V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Januari. 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengenalan *Plasmodium faciparum merozoit common antigen* oleh penderita malaria falciparum dari beberapa daerah endemis di Indonesia dalam upaya memperoleh kandidat vaksin lokal untuk Indonesia

Ketua Peneliti
Nama : dr. Kusmartisnawati, MS., SpParK
Jenis Kelamin : Perempuan
NIP : 130695880
Jabatan : Lektor Kepala
Bidang Keahlian : Parasitologi Klinik
Fakultas/ Jurusan / Puslit : Kedokteran
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

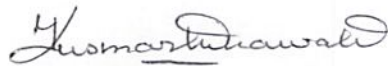
Tim Penelitian

NO	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dra. Heny Arvati, MSc. Ph.D.	Parasitologi, Molekul Iminologi	Fak. Kedokteran	Universitas Airlangga
2	dr.SriWijayanti Sulistyawati	Parasitologi	Fak. Kedokteran	Universitas Airlangga

Pendanaan dan jangka waktu penelitian
Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000
Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 80.000.000

Surabaya, Januari 2009
Ketua Peneliti

Mengetahui,
Plh. Dekan
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga




Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK.
NIP. 130 783 547

dr. Kusmartisnawati. MS., SpParK
NIP. 130 695 880



Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat



Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh
NIP. 131 1837 004

RINGKASAN

Sampai saat ini, malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting di Indonesia. Perubahan perilaku sosial masyarakat, mobilitas penduduk yang sangat cepat dari dan ke luar pulau Jawa, perubahan lingkungan akibat ulah manusia, peningkatan suhu bumi global, ditambah pula nyamuk *Anopheles* sebagai vektor malaria telah menjadi semakin resisten terhadap insektisida. Hal ini mengakibatkan pola penularan penyakit malaria semakin kompleks, dan insiden malaria di Indonesia semakin meningkat. Masalah resistensi parasit terhadap obat anti malaria, termasuk pengobatan dengan kombinasi obat antimalaria, mengakibatkan penanggulangan malaria semakin sulit. Untuk mengatasi hal ini adalah dengan vaksin (Engers and Godal, 1998; Moorthy, 2004). Akan tetapi vaksin yang efektif dan bisa diterapkan secara global sulit untuk diciptakan. Alternatif lain yang perlu didukung adalah penciptaan vaksin malaria yang bisa diterapkan secara lokal, yaitu di Indonesia. Untuk itu telah dilakukan beberapa kali penelitian untuk mendapatkan kandidat vaksin malaria untuk lokal Indonesia. Salah satu dari penelitian tersebut adalah pencarian kandidat vaksin malaria secara imunologi dengan mereaksikan antigen stadium aseksual *Plasmodium falciparum* dengan serum penderita malaria falciparum dari berbagai daerah endemis malaria di Indonesia.

Dalam penelitian ini digunakan sampel serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Ogan Komering Ulu (Oku), Propinsi Sumatera Selatan dan Kabupaten Pacitan, Propinsi Jawa Timur. Penelitian ini menghasilkan *common antigen* untuk kedua daerah tersebut atau yang dapat direspons oleh serum penderita malaria falciparum dari kedua daerah endemis malaria tersebut, yaitu protein antigen dengan berat molekul 26, 19, 12 dan 10 kDa. Antigen ini berpotensi sebagai kandidat vaksin malaria terutama untuk kedua daerah tersebut. Namun untuk itu diperlukan penelitian lebih lanjut.

SUMMARY

Malaria remains a major health problem in the world as well as the increased incidence of this disease in the tropical regions including Indonesia. Rapid people movement from/to Java Island is one of reasons in increasing malaria incidence in Indonesia. Social changes, human migration, natural and man-made changes to the environment contribute to create a complex pattern of malaria transmission. The use of imprecise dose of antimalarial drugs for medication in community is causing mutation in the parasite genes. This is resulting in parasite resistance to antimalarial drugs. Genetic variation of *P. falciparum*, in fact, affects the diversity of clinical symptom, pathology, transmission characteristic, and human response to antimalarial drugs. Furthermore, mosquito vectors have become increasingly resistant to insecticides. An alternative to overcome this problem is using vaccine. In fact, heterogeneity of individual response to malaria parasite is affected by intensity of parasite exposure, genetic factor of host/parasite, factor ethnic, geographic and parasite strain. Due to those reasons and the complexity of parasite life cycle causing the effective and global vaccine is difficult to produce. Through this research we are trying to develop a malaria vaccine for being applied to Indonesia locally. This research is an early step of the main research in malaria vaccine development. *Plasmodium falciparum* merozoit protein is important for erythrocyte invasion, therefore, it is potential for malaria vaccine development. Therefore, we are trying to find out the recognition of *falciparum* malaria-infected patients from different endemic areas in Indonesia to the asexual stage antigen of *P. falciparum* by means of Western blotting reaction. The purpose of this research is to find out the common antigen for the Pacitan District of East Java Province and Ogan Komering Ulu District (OKU) of South Sumatera in Indonesia. Hopefully, the common antigen can be used as vaccine candidate for Indonesia locally. The results show that common antigen for both endemic areas are 26, 19, 12 dan 10 kDa. These antigens are potential as malaria vaccine candidate especially for both Pacitan and Oku Districts, however, further investigation is needed.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini. Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P (K), dan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Dr. dr. Retty Ratnawati, MSc, Ketua Departemen Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang yang telah mengizinkan kami dalam mengadakan penelitian ini, dan kepada Kepala Puskesmas Tegaiombo Kabupaten Pacitan, dalam pengambilan sampel untuk penelitian ini. Kepada mahasiswa Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga kami sampaikan terimakasih atas pemberian sampel serum dari Kabupaten Ogan Komering Ulu, Propinsi Sumatera Selatan.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat baik sebagai tambahan pengetahuan bagi penelitian di masa mendatang, maupun penggunaannya pada masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Desember 2009

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Parasit Malaria	4
2.2 Daur hidup <i>P. falciparum</i>	4
2.3 Penyakit malaria.....	5
2.3 Situasi malaria di dunia	5
2.4 Situasi malaria di Indonesia	6
2.5 Diversitas dan variasi antigenik	7
2.6 Protein Merozoit Sebagai Kandidat Vaksin Malaria	9
2.5 Perkembangan Vaksin Malaria	
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
2.1 Tujuan Penelitian	12
2.2 Manfaat Penelitian	12
IV. METODE PENELITIAN.....	13
4.1 Sampel, lokasi dan waktu pengambilan sampel	13

4.2	Pengambilan sampel darah	13
4.3	Diagnosis mikroskopis dan pcnghitungan parasitemia	13
4.4	Kultivasi <i>P. falciparum</i>	13
4.5	Sinkronisasi biakan <i>P. falciparum</i>	14
4.6	Isolaasi antigen	14
4.7	SDS-PAGE dan Western Blott.....	15
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
5.1	Antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i>	16
5.2	Western blotting menggunakan serum dari Kabupaten Oku.....	17
5.3	Western blotting menggunakan serum dari Kabupaten Pacitan.....	18
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	21
6.1	Kesimpulan	21
6.2	Saran.....	21
	DAFTAR PUSTAKA	22

DAFTAR TABEL

	Halaman
TABEL 1 Berat molekul antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i> yang direspons oleh serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku, Sumatera Selatan.	17
TABEL 2 Berat molekul antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i> yang direspons oleh serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan, Jawa Timur	18
TABEL 3 Protein antigen yang direspons oleh serum dari Kabupaten Oku dan Kabupaten Pacitan (<i>common antigen</i>).....	19

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 1	Antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i> setelah pemisahan protein dengan SD-PAGE	16
Gambar 2	Variasi reaksi antibody penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku, Sumatera Selatan terhadap antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i>	17
Gambar 3	Variasi reaksi antibodi penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan, Jawa Timur terhadap antigen stadium aseksual <i>P. falciparum</i>	18

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Sampai saat ini, malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting di Indonesia, di samping penyakit infeksi yang lain, seperti AIDS dan tuberkulosis. Perubahan perilaku sosial masyarakat, mobilitas penduduk yang sangat cepat dari dan ke luar pulau Jawa, perubahan lingkungan akibat ulah manusia peningkatan suhu bumi global, ditambah pula nyamuk *Anopheles* sebagai vektor malaria telah menjadi semakin resisten terhadap insektisida. Hal ini mengakibatkan pola penularan penyakit malaria semakin kompleks, dan insiden malaria di Indonesia semakin meningkat. Masalah resistensi parasit terhadap obat anti malaria, termasuk pengobatan dengan kombinasi obat antimalaria, mengakibatkan penanggulangan malaria semakin sulit. Untuk mengatasi hal ini adalah dengan vaksin (Engers and Godal, 1998; Moorthy, 2004). Akan tetapi vaksin yang efektif dan bisa diterapkan secara global sulit untuk diciptakan. Alternatif lain yang perlu didukung adalah penciptaan vaksin malaria yang bisa diterapkan secara lokal, yaitu di Indonesia.

Berdasarkan pada daur hidup parasit malaria yang kompleks, para peneliti di dunia telah berupaya untuk menciptakan vaksin malaria, tetapi saat ini masih belum ditemukan vaksin yang efektif. Salah satu alasan yang menyebabkan pembuatan vaksin malaria sulit adalah karena antigen yang diekspresikan oleh parasit, terutama stadium aseksual eritoristik, adalah berbeda-beda. Setiap stadium mempunyai antigen berbeda yang menimbulkan imunitas protektif. Pada beberapa kasus, antigen yang diekspresikan oleh stadium tertentu tidak diekspresikan oleh stadium lain. Kenyataan ini tidak menutup kemungkinan bahwa antigen pada semua stadium yang menimbulkan imunitas protektif akan dapat diidentifikasi (Hoffman and Miller, 1996).

Protein merupakan komponen dari suatu antigen yang bersifat imunogenik. (Cruse and Lewis, 1995). Sebagai calon vaksin diperlukan protein yang sangat imunogenik. Transport protein dari luar eritrosit pasca invasi parasit *P. falciparum* mengakibatkan perubahan varian antigen, hal ini mengakibatkan terjadi diversitas dan variasi antigen pada tiap stadium dan pada tiap strain parasit tersebut (Marsh and Howard, 1986; Forsyth et al, 1989; Marsh et al, 1989).

Vaksin anti stadium eritrositik dirancang untuk mencegah kejadian penyakit malaria, yaitu dengan menghambat pertumbuhan parasit di dalam darah, mencegah perlekatan eritrosit yang mengandung parasit pada sel endotel kapiler, dan memblokir faktor dalam parasit. misalnya toksin yang menyebabkan penyakit (Hoffman and Miller, 1996; Engers and Godal, 1998; Moorthy et al, 2004).

Vaksin tersebut dapat dibuat berdasarkan protein yang terdapat pada merozoit yang ditujukan untuk mencegah invasi parasit ke dalam eritrosit, sehingga akan menghambat pertumbuhan parasit di dalam darah. Dengan demikian akan menghambat pula terjadinya gejala klinis yang diakibatkan oleh stadium eritrositik (Hoffman and Miller, 1996; Engers and Godal, 1998; Moorthy et al, 2004).

Protein pada merozoit telah diidentifikasi sebagai target yang dapat menghambat invasi eritrosit oleh parasit. Protein ini terdapat pada tiga lokasi, yaitu pada permukaan merozoit (*merozoite surface protein*): protein terlarut yang kemungkinan berhubungan dengan permukaan merozoit; dan protein pada organel apikal dalam merozoit eritrositik (Hoffman and Miller, 1996).

Mengingat Indonesia merupakan negara yang luas dan terbentang dari barat ke timur dengan kondisi endemisitas malaria yang berbeda. maka untuk menemukan kandidat vaksin lokal di Indonesia perlu dilakukan peninjauan terhadap reaktivitas antibodi pada penderita malaria *falciparum* dari beberapa daerah endemis malaria di Indonesia terhadap antigen merozoit *P. falciparum*. Untuk tujuan tersebut telah dilakukan isolasi antigen merozoit *P. falciparum* isolat Indonesia, yaitu strain 2300. (Arwati dan Bumi, 2004; Arwati et al, 2004; Arwati dan Basuki, 2005; Arwati et al, 2005; Arwati dan Basuki, 2006; Arwati et al, 2007; Arwati dan Kusmartisnawati, 2007; Kusmartisnawati, et al, 2007). Serum penderita malaria diambil dari daerah endemis tinggi di luar pulau Jawa, yaitu di Kab Sumbawa, Kotamady Palembang, Propinsi Sumatera Selatan, dan di pulau Jawa di Kabupaten Pacitan, dan Kabupaten Malang. Propinsi Jawa Timur. Selanjutnya variasi csaksi antara antigen dengan antibodi penderita malaria *falciparum* tersebut dapat divisualisasi melalui pita protein pada reaksi western blot. Dengan demikian dapat diketahui *common* atau protein antigen yang paling banyak direspons oleh antibodi penderita malaria *falciparum* dari berbagai daerah endemis di Indonesia tersebut, sehingga protein antigen tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin malaria untuk lokal di Indonesia.

1.2 Rumusan masalah

1. Bagaimanakah variasi reaksi antara antigen stadium aseksual *P. falciparum* dengan serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan dan Kabupaten Oku?
2. Apakah ada common antigen yang direaksi oleh serum dari Kabupaten Pacitan dan Kabupaten Oku?

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Parasit Malaria

Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium*. Ada empat spesies *Plasmodium* yang menyerang manusia, yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae*. Dari keempat spesies tersebut, *P. falciparum* merupakan spesies yang paling ganas dan menyebabkan malaria malignan (Faust et al, 1970). Spesies yang banyak dijumpai di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*, sedangkan *P. malariae* dijumpai di Indonesia bagian timur. *P. ovale* banyak ditemukan di Irian Java dan Nusa Tenggara Timur (Wijayanti et al., 1999).

2.2 Daur Hidup *P.falciparum*

Daur hidup parasit malaria pada manusia terdiri atas fase seksual eksogenik (sporogoni) dalam tubuh nyamuk *Anopheles* dan fase aseksual (skisogoni) dalam tubuh manusia. Fase Aseksual mempunyai dua daur, yaitu daur dalam sel parenkim hati (skisogoni eksoeritrositik) dan daur dalam sel darah (skisogoni eritrositik). Pada waktu nyamuk *Anopheles* yang terinfeksi oleh parasit malaria menggigit manusia, nyamuk mengeluarkan beribu-ribu sporozoit dari kelenjar ludahnya. Sporozoit ini mengikuti aliran darah kira-kira satu jam, kemudian melakukan penetrasi ke dalam sel parenkim hati. Di dalam sel ini, parasit berkembang menjadi stadium cincin, trofosoit dan skison. Stadium skison yang matur pecah dan mengeluarkan merozoit. Stadium merozoit akan menginfeksi eritrosit. Di dalam eritrosit, merozoit berkembang menjadi cincin, trofosoit dan skison. Eritrosit yang terinfeksi oleh skison yang matur akan pecah dan mengeluarkan merozoit untuk menginfeksi eritrosit kembali atau berkembang menjadi gametosit. Eritrosit yang terinfeksi oleh gametosit dihisap oleh nyamuk *Anopheles* untuk kemudian melanjutkan daur hidup seksual di dalam tubuh nyamuk. Gametosit berkembang menjadi gamet jantan dan betina kemudian melakukan fertilisasi dan menghasilkan sigot. Sigot menjadi bentuk panjang dan bergerak disebut ookinet. Stadium ookinet ini bergerak menembus dinding lambung melalui sel epitel ke permukaan luar lambung dan menjadi bulat disebut ookista. Stadium ookista ini makin lama makin besar dan membelah menjadi bentuk memanjang yang disebut sporozoit. Kemudian ookista pecah, beribu-ribu

sporozoit dilepaskan dan bergerak menuju kelenjar ludah nyamuk, Nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung sporozoit ini menjadi infeksi. Apabila nyamuk ini menggigit manusia maka akan menularkan malaria dengan memasukkan sporozoit ini ke dalam tubuh manusia. (Faust et al, 1970).

Siklus hidup *P. falciparum* in vitro, sedikit berbeda dengari in vivo. Pada parasit yang sudah diadaptasikan di dalam biakan in vitro, merozoit tidak berkembang menjadi gametosit, tetapi merozoit yang keluar dari skison akan menginfeksi eritrosit lagi dan berkembang menjadi trofosoit. skison dan seterusnya (Treger and Jensen. 1976).

2.3 Penyakit Malaria

Perjalanan penyakit malaria terdiri atas serangan demam yang disertai dengan sakit kepala dan badan terasa tidak enak, diselingi oleh periode tanpa gejala. Gejala yang khas adalah periodisitas demam. Masa tunas intrinsik parasit malaria *falciparum* yang ditularkan oleh nyamuk kepada manusia adalah 12 hari. Demam yang terjadi secara periodik berhubungan dengan waktu pecahnya sejumlah skison matang dan keluarnya merozoit yang masuk ke dalam aliran darah. Serangan demam terdiri dari stadium menggigil, stadium puncak demam, dan stadium berkeringat. Gejala infeksi yang timbul kembali setelah serangan pertama disebut relaps. Pembesaran limpa (splenomegali) merupakan gejala yang khas terutama pada malaria menahun. Pada infeksi malaria juga terjadi anemia yang derajatnya tergantung pada spesies parasit penyebabnya. Patofisiologi pada infeksi malaria berhubungan dengan gangguan atau penyumbatan aliran darah setempat akibat melekatnya eritrosit yang mengandung parasit pada endothelium kapiler. Perlekatan ini banyak terjadi pada organ-organ penting, seperti liver, jantung, ginjal dan bahkan otak sehingga menyebabkan malaria serebralis (Sherman, 1996).

1.4 Situasi Malaria di Dunia.

Sampai saat ini malaria masih merupakan masalah kesehatan yang penting di dunia. Lebih dari 2400 juta penduduk atau 40% dari penduduk dunia tinggal di daerah endemis malaria. Prevalensi penyakit malaria di seluruh dunia diperkirakan antara 300-500 juta kasus klinis setiap tahunnya. Angka kematian yang dilaporkan mencapai 1-1.5 juta penduduk per tahun, terutama terjadi pada anak-anak di Afrika,

khususnya daerah yang kurang terjangkau oleh pelayanan kesehatan (WHO, 2000).

Setiap tahun, malaria menginfeksi 500 juta penduduk di dunia, dan yang paling banyak adalah di Afrika, dengan 1 juta kematian akibat malaria yang terjadi setiap tahun. Jumlah anak-anak di Afrika menderita malaria berlipat 4/kali setiap tahun. Hal ini merupakan penyebab kematian tertinggi di Afrika. Sementara itu, malaria belum bisa dicegah dan diatasi (The World Bank Group, 2007).

Beberapa negara telah menunjukkan kemajuan dalam usaha menurunkan kasus malaria. Banyak negara di Afrika menggunakan obal yang efektif dan *insecticide-treated nets* (ITNs) terhadap lebih dari 60% penduduk berisiko tinggi. Selain itu juga menggunakan *intermittent preventive treatment* (IPT) terhadap 460% lebih ibu hamil. Malaria di Asia masih merupakan masalah kesehatan yang signifikan. Malaria *vivax* muncul (*resurged*) di Asia Tengah dan Transcaucasia. Malaria *falciparum* muncul kembali di (*reemerge*) di Tajikistan sejak 1990. Pada awal 2002, daerah ini memulai kontrol vektor malaria melalui penggunaan ITNs dan IRS. Asia Tenggara mempunyai angka resistensi tertinggi terhadap obat antimalaria di dunia. *Multidrug resistance* memberikan kontribusi terhadap *re-emerging*, malaria di banyak area, khususnya di sepanjang perbatasan antar negara. Semua negara di Asia Tenggara menggunakan IRS untuk kontrol vektor di area tertentu yang ditemukan kasus malaria. Angka kematian akibat malaria di Vietnam turun dengan cepat setelah penggunaan *artemisinin-based combination therapy* (ACT) secara efektif untuk penanganan pertama terhadap penderita malaria. Insiden malaria di area dengan risiko tinggi di Malaysia turun 28 kali lipat antara tahun 1995 dan 2003 setelah dilakukan distribusi ITN serta peningkatan diagnosis dan pengobatan (WHO and UNICEF, 2005)

2.5 Situasi Malaria di Indonesia

Sekitar 70% dari distrik di Indonesia merupakan area berisiko malaria, dan 49,6% penduduk Indonesia tinggal di daerah berisiko malaria. Mengingat luas area yang berisiko tersebut, telah dilaporkan terjadi 300.000-400.000 kasus malaria positif setiap tahun. Jumlah kasus yang terbanyak adalah terjadi di Nusa Tenggara (120.744), Papua (91.932), dan Papua Barat (34.915). Jumlah kasus yang paling sedikit terjadi di Jakarta, Batam dan Bali (Depkes RI, 2008).

Sebanyak 310 kabupaten kota di Indonesia memiliki tingkat risiko tinggi sebagai area penyebar malaria. Penularan malaria tertinggi dengan prevalensi kasus

terbanyak berasal dari Provinsi Papua, Irian Jaya Barat, Maluku, Maluku Utara, dan Nusa Tenggara Timur, serta kawasan lain yang jauh dari jangkauan. terpencil, terisolasi dan tertinggal di daerah pedesaan, miskin, dan sulit akses ke pelayanan kesehatan. Jumlah kasus malaria diperkirakan sejumlah 10 juta kasus klinis, dengan 3 juta kasus positif, sedangkan yang dilaporkan pada tahun 2006 sebanyak 340.400, kasus positif malaria. Pada tahun 2006 dan 2007, malaria dinyatakan sebagai kejadian luar biasa (KLB). Peningkatan kasus malaria di delapan provinsi, delapan kabupaten yang meliputi 20.331 penduduk, 12 desa dengan kesakitan sejumlah 1.051 orang dan kematian 23 orang. Case fatality rate sebesar 2,19 persen (Laihad, 2008). Walaupun sampai tahun 1992 terjadi tendensi penurunan jumlah kasus malaria, yang dinyatakan dengan *Annual Parasite Incidence* (API), tetapi pada tahun berikutnya ada tendensi terjadinya peningkatan API. Pada tahun 2000 API di pulau Jawa-Bali mencapai yang tertinggi yaitu, 0,8% dan AMI di luar pulau Jawa-Bali adalah, 30% Oleh karena itu seiring dengan program *Roll Back Malaria* (RBM) yang dicanangkan oleh WHO pada tahun 1998, Indonesia mencanangkan program Gerakan Berantas Kembali Malaria (Gebrak Malaria) pada tahun 2000. Setelah dilaksanakan program ini terbukti terjadi penurunan API pada tahun 2003 menjadi 0,22% dan AMI menjadi 21,8% (Achmadi, 2004).

2.6 Diversitas dan Variasi Antigenik

Salah satu alasan yang menyebabkan pembuatan vaksin malaria sulit adalah antigen yang diekspresikan oleh parasit dalam perkembangannya, terutama stadium aseksual eritrositik, adalah berbeda-beda. Setiap stadium mempunyai antigen berbeda yang dapat menimbulkan imunitas protektif. Antigen yang diekspresikan oleh stadium tertentu tidak diekspresikan oleh stadium lain (Hoffman and Miller, 1996). Dua hal utama yang menyebabkan diversitas antigen adalah polimorfisme alel dan variasi Antigenik (Anders, 1910).

Variasi antigenik merupakan mekanisme penting bagi *Plasmodium* untuk menghindari dari sistem imun supaya dapat bertahan hidup (Biggs et al, 1991; Newbold, 1999) yaitu dengan cara mengekspresikan bentuk molekul yang berbeda dari antigen permukaan (Biggs, et al, 1991). Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa, variasi antigenik merupakan suatu kemampuan parasit klon tunggal untuk merubah ekspresi dari gene yang berbeda yang mengkodekan *P. falciparum*

erithrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1), yang diekspresikan pada permukaan eritrosit terinfeksi (Biggs et al, 1991)

Variasi antigenik pada antigen permukaan dari berbagai isolat *Plasmodium* diidentifikasi dengan *immunofluorescence* dan *passive transfer* serum yang imun (Hommel et al, 1983). Varian antigen ini sangat imunogenik, sehingga satu infeksi *Plasmodium* cukup untuk menimbulkan antibodi yang mampu menggumpalkan (*agglutinate*) parasit dalam hal antibodi spesifik terhadap varian tersebut (Marsh and Howard, 1986; Forsyth et al, 1989; Marsh et al, 1989). Secara umum, serum bersifat protektif melawan isolat homolog (parasit dari penderita itu sendiri), tetapi tidak protektif terhadap isolat heterolog parasit dari penderita lain) (Hommel et al, 1993). Dalam hal ini infeksi dapat menimbulkan respon imun spesifik terhadap varian antigen, terutama ditunjukkan oleh *convalescent serum* (serum dari penderita yang telah sembuh dari infeksi malaria) yang bereaksi sangat kuat dalam menggumpalkan parasit sedangkan serum dari infeksi akut gagal untuk menggumpalkan parasit homolog (Forsyth et al, 1989; Marsh et al, 1989; Bull et al, 1999). Hal tersebut mengindikasikan bahwa *P. falciparum* menunjukkan variasi antigenik. Klon tunggal parasit menunjukkan perubahan fenotipe antigen pada permukaan eritrosit terinfeksi (Hommel et al, 1983).

2.7 Protein Merozoit *P.falciparum* Sebagai Calon Vaksin Malaria

Vaksin yang dibuat berdasarkan protein yang terdapat pada merozoit ditujukan untuk mencegah invasi parasit ke dalam eritrosit. Sehingga akan menghambat pertumbuhan parasit di dalam darah. Dengan demikian akan menghambat pula terjadinya gejala klinis yang diakibatkan oleh stadium eritrositik (Hoffman and Miller, 1996; Engers and Godal, 1998; Moorthy et al, 2004).

Protein pada merozoit telah diidentifikasi sebagai target yang dapat menghambat invasi parasit ke dalam eritrosit. Protein ini terdapat pada tiga lokasi, yaitu pada permukaan merozoit (*merozoite surface protein*); protein terlarut yang berhubungan dengan permukaan merozoit; dan protein pada organela apikal dalam merozoit eritrositik (Hoffman and Miller, 1996).

Beberapa antigen pada permukaan membran merozoit *P. falciparum* yang telah diidentifikasi, yaitu antara lain *merozoite surface protein A*, "2, -3, dan -4 (MSP-1, MSP-2, MSP-3 dan MSP-4) (Holder, 1996). *Merozoite surface protein-1*

(MSP-1) merupakan konponen protein permukaan merozoit yang paling banyak. MSP-1 mengandung dua *epidermal growth factor-like domain*. Protein ini disintesis oleh stadium skison intraeritrositik sebagai prekursor protein yang sangat besar dengan berat molekul 185-210 kDa. Protein ini mengalami proses proteolisis selama pematangan merozoit (Blackman et al,1990; Blackman et al,1991; Blackman et al,1992). Proses proteolisis pertama menghasilkan empat fragmen polipeptida utama dengan berat molekul 83 (MSP-1₈₃), 28-30 (MSP-1₃₀), 38 (MSP-1₃₈) dan 42 kDa (MSP-1₄₂). Fragmen-fragmen ini merupakan suatu kompleks yang berhubungan secara nonkovalen pada permukaan merozoit. Proteolisis yang kedua memecah MSP-1₄₂ menjadi polipeptida dengan berat molekul 33 (MSP-1₃₃) dan 19 kDa (MSP-1₁₉). Polipeptida MSP-1₁₉ tetap berada pada membran merozoit dan dibawa sampai merozoit menginvasi eritrosit. Polipeptida MSP-1₃₃ bersama dengan polipeptida lain yang berasal dari proteolisis membentuk suatu kompleks ke arah ekstraseluler (Blackman, 1991; Ans et al. 2003).

MSP-2 merupakan protein pada permukaan merozoit, dengan berat molekul 43-56 kDa. Protein ini tertanam pada permukaan merozoit dengan *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) tetapi tidak dibawa oleh merozoit pada saat invasi. Protein ini sangat bervariasi di antara strain-strain parasit (Smythe et al.1988; Smythe et al. 1991). Protein ini dikenali oleh antibodi yang menghambat pertumbuhan parasit *in vitro* (Dark et al, 1988; Epping et al, 1988). Berdasarkan lokasi dan penghambatan pertumbuhan parasit ini, MSP-2 dijadikan sebagai kandidat vaksin malaria (Holder, 1996).

MSP-3 dan SPAM (*secreted polymorphic antigen associated with merozoite*) mempunyai *partial sequence* yang sama. Protein ini merupakan *soluble protein* yang berhubungan dengan permukaan merozoit. Protein ini mempunyai berat molekul 43 kDa dan merupakan protein yang sangat hidrofobik (McCull et al, 1994). Parasit yang dihilangkan MSP-3 dan *acidic-basic repeat amino acid* (ABRA) menunjukkan penurunan invasi eritrosit, sehingga dikatakan bahwa, MSP-3 tidak esensial untuk pertumbuhan parasit intraeritrositik (Mills, et al. 2002).

MSP-4 dan MSP-5 merupakan protein permukaan merozoit yang mengandung *single epidermal growth factor-like domain*. Di dalam protein ini terdapat *sequence signal N-terminal* dan *sequence hidrofobik C-terminal*. Protein ini juga tertanam di dalam merozoit dengan GPI. MSP-4 mempunyai berat molekul 40

kDa, sedangkan MSP-5 mempunyai berat molekul 101 kDa (Marshall et al. 1997; Wu et al., 1999).

MSP-1 juga terdiri dari polipeptida dengan berat molekul 36,22 dan 19 kDa, yang merupakan ekspresi dari dua gen yang berbeda. Protein 36 kDa yang merupakan derivat dari prekursor protein permukaan merozoit ini kemudian disebut MSP-6 (True 'o et al., 2001). Protein 22 dan 19 kDa protein kemudian disebut MSP-7 (Pachebat, et al., 2001).

MSP-8 merupakan protein pada membran stadium cincin yang berlokasi di vakuola parasitoforus dari eritrosit terinfeksi. Protein ini mengandung dua *epidermal growth factor-like domain* pada C-terminal, dan ini dianggap sebagai target potensial imunitas protektif (Jack et al. 2001; Drew et al., 2005).

MSP 9 dari *P. vivax* adalah ortholog dengan *P. falciparum* ABRA yang dikenal dengan pi 01 (Vargas-Serrato, 2002). Lokasi *P. falciparum* ABRA diidentifikasi terdapat pada permukaan merozoit dan vakuola parasitoforus. AdRA juga dikenal sebagai kandidat vaksin malaria (Weber et al., 1988).

MSP-10 merupakan protein permukaan merozoit yang berikatan dengan reseptor pada membran permukaan eritrosit manusia. Hal ini menjadikan MSP-10 sangat penting dalam proses invasi parasit ke dalam eritrosit. MSP-10 protein diidentifikasi sebagai *high activity binding peptides* (HSBPs) yang menyebabkan sensitif terhadap neuraminidase (Puentes et al., 2005).

Protein terlarut yang berhubungan dengan permukaan merozoit, merupakan polipeptida yang disekresikan oleh merozoit dan diekspor ke vakuola parasitoforus selama stadium lanjut pada perkembangan parasit intraseluler. Setidaknya ada 5 protein telah diidentifikasi. Protein tersebut dipertimbangkan sebagai kandidat vaksin karena lokasinya dan hubungannya dengan permukaan merozoit. Di samping itu, karena dalam penelitian *in vitro* serum yang imun dapat menggumpalkan merozoit pada waktu skison pecah, oleh karena itu antibodi terhadap protein ini diduga terlibat dalam aglutinasi merozoit tersebut (Lyon, 1986).

P. falciparum *serine repeat antigen* (PfSERA) atau *serins rich protein* (SERF) merupakan suatu protein yang larut dalam air (Delplace et al., 1987), dapat dideteksi baik dalam supernatant dari kultur *P. falciparum* maupun di peredaran darah penderita malaria falciparum (Banic et al., 1994). Protein ini disintesis oleh stadium akhir *P. falciparum* dalam sel darah merah dan disekresikan ke dalam

vakuola parasitoforus (Delplace et al, 1987; Fox *md* Bzik, 1994). Protein ini ditranslokasikan dengan cepat dari tempat sintesisnya ke vakuola parasitoforus melalui endoplasmik retikulum (Ragge et al, 1990) sehingga PfSERA dapat terdeteksi di vakuola parasitoforus (Delplace, 1987). Sekitar 11% asam amino dalam PfSERA adalah serine, dan 57% dari residu serin tersebut men pakan 21-37 residu serin yang berurutan dan dimulai pada asam amino sekitar 200 (Horii et al, 1988; Bzik et al. 1988; Knapp et al. 1989). Antibodi monoklonal terhadap PfSERA dapat menghambat invasi merosoit ke dalam eritrosit. sedangkan imunitas orotektif pada kera *Aotus* atau *Squirrel* didapat setelah diimunisasi dengan fragmen rekombinan dari PfSERA (Inselburg et al, 1991; Morimaisu et al, 1997).

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui variasi reaksi antibodi penderita malaria falciparum di daerah endemis di P. Jawa, yaitu Kabupaten Pacitan, Propinsi Jawa Timur dan di luar P. Jawa, yaitu Kabupaten Oku, propinsi Sumatera Selatan, terhadap antigen stadium aseksual *P.falciparum*.
2. Menemukan *common antigen* yang direspon oleh serum dari kedua daerah endemis tersebut, yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin malaria untuk Indonesia.

3.2 Manfaat penelitian

1. Manfaat akademis adalah menambah informasi mengenai variasi antigen stadium aseksual *P. falciparum* yang dapat direspon oleh serum penderita malaria dari kedua daerah endemis yang berbeda, sehingga dapat diketahui pula bagian tertentu dari antigen tersebut yang paling banyak direspon oleh serum dari ketiga daerah endemis tersebut.
2. Manfaat praktis: penelitian ini merupakan penelitian awal dalam rangka menemukan kandidat vaksin malaria untuk Indonesia, oleh karena itu data yang diperoleh dapat digunakan untuk melangkah ke penelitian berikutnya untuk mencapai tujuan tersebut.

IV. METODE PENELITIAN

3.1 Sampel, lokasi dan waktu pengambilan sampel

Sampel adalah darah penderita malaria *falciparum* yang positif ditemukan parasit *P. falciparum* pada hapusan darah. Sampel darah penderita malaria *falciparum* dari Kabupaten Pacitan diperoleh dari Dra. Heny Arwati, MSc.PhD. Sampel dari Kotamadya Palembang diperoleh dari mahasiswa Pasca sarjanj. Universitas Airlangga yang sedang melakukan penelitian malaria *falciparum* di Kotamadya Palembang. Sampel dari kab sumbawa akan kami peroleh dari penderita malaria *falciparum* yang mengalami rawat inap di rumah sakit daerah kabupaten setempat.

3.2 Pengambilan sampel darah

Pengambilan sampel darah dari penderita dilakukan setelah memperoleh sertifikat *ethical clearance* dari Komisi Etik Kedokteran di Universitas Airlangga Surabaya. Pengambilan sampel dilakukan oleh tenaga medis yang beretugas di Puskesmas Kecamatan Tegalombo, Kabupaten pacitan. Pengambilan sampel darah diambil setelah dilakukan diagnosis mikroskopis pada hapusan darah penderita. Hanya sampel darah yang terinfeksi oleh *P. falciparum* yang digunakan dalam penelitian ini. Apabila ditemukan penderita yang terinfeksi oleh spesies *Plasmodium* yang lain atau campuran dengan *P. falciparum* maka tidak digunakan dalam penelitian ini. Darah diambil dengan *vena puncture* kurang lebih 2-3 ml untuk keperluan isolasi serum

3.3 Diagnosis mikroskopis dan penghitungan parasitemia

Diagnosis mikroskopis dilakukan pada tetes tebal darah penderita yang dicat dengan 5% Giemsa untuk memastikan bahwa penderita terinfeksi *P. falciparum*, bukan spesies lain dari *Plasmodium*. Parasitemia dihitung berdasarkan jumlah eritrosit terinfeksi per 200 leukosit.

3.4 Kultivasi *P. falciparum*

Kultivasi parasit *in vitro* merupakan sumber untuk pembuatan antigen dan

ikerjakan secara berkelanjutan. Parasit *P. falciparum* strain 2300 diperoleh dari US NAMRU (United State Navy Medical Research Unit) #2 Jakarta. Parasit dikultivasi berdasarkan metode Trager & Jensen (1976), yaitu dengan sistem *candle jar*. Parasit ditumbuhkan dengan medium RPMI 1640 dan eritrosit dari golongan darah 0. Kultivasi dilakukan dalam 25cm^2 *plastic tissue culture petridish*. Medium disuplemen dengan 10% (v/v) serum manusia, 16 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES. Hypoxantidan 25ug/ml gentamicine. Kemudian kultur diinkubasi di dalam *candle jar* dengan diberi lilin yang menyala, lalu ditutup rapat. Setelah lilin mati, kemudian *candle jar* dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C. Pertumbuhan parasit diamati dengan membuat hapusan tipis dari biakan tersebut dan di cat dengan 5% larutan Giemsa.

3.5 Sinkronisasi

Sinkronisasi dilakukan untuk memperoleh parasit dengan stadium yang sama, yaitu dengan menggunakan 5% sorbitol (Lambros and Vandenberg, 1978). Dalam hal ini diperlukan stadium skison berikut merozoit di dalamnya. Parasit dari hasil Sinkronisasi digunakan untuk memproduksi antigen baik untuk imunisasi maupun untuk titrasi antibodi mencit. Pada biakan *P. falciparum* yang mayoritas mengandung stadium cincin (*ring form*), disinkronisasi dengan menggunakan 5% sorbitol. dan dibiakkan lagi selama 12-14 jam sehingga didapatkan biakan dengan stadium skison. Skison yang mengandung merozoit ini, kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk pembuatan antigen.

3.6 Isolasi Antigen

Untuk pembuatan antigen skison matang kemudian di lisis dengan 0,015% saponin untuk memperoleh merozoit. Isolasi antigen dari merozoit dilakukan dengan menambahkan 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 uM TLCK (Na-p-tosyl-L-lysin Chloromethyl Keton) dan 2 mM EDTA, kemudian disonifikasi di atas es selama 5 menit. Ekstrak disentrifus pada 100.000 g. 4°C selama 30 menit. Supernatan digunakan sebagai antigen. Kadar protein dari antigen ini diukur dengan V menggunakan spectrophotometer.

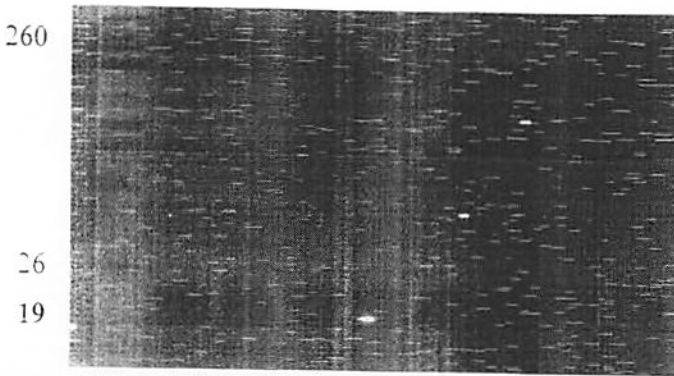
3.7 SDS-PAGE dan Western Blott

Untuk SDS-PAGE digunakan gel 15%. Sampel dicampur dengan lisis buffer. dipanaskan pada 65°C selama 15 menit kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke dalam *well*. Elektroforesis ini dikerjakan dengan kekuatan 30mA selama 5 jam. Protein dari gel pada SDS-PAGE kemudian ditransfer ke membran nitrocellulose dan diberi aliran listrik 0,8 mA/cm² gel. Setelah protein ditransfer, membran dicuci dengan aquadest dan larutan TBS, selanjutnya dilakukan blotting. membran diblok dengan BSA 10 % selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS sebanyak 2 kali. Selanjutnya direaksikan dengan serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan, Propinsi Jawa Timur, dan Kabupaten Oku, Propinsi Sumatera Selatan. Kemudian diinkubasi pada temperatur ruangan selama 1 jam. Setelah dicuci 3 kali dengan larutan TBS direaksikan dengan *Goat anti human IgG-horse radish phosphatase-conjugared antibody* dan substrat TMB. Hasil reaksi antigen-antibodi kemudian ditentukan berat molekul protein yang dikenali oleh antibodi tersebut di atas.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Antigen stadium aseksual *P. falciparum*

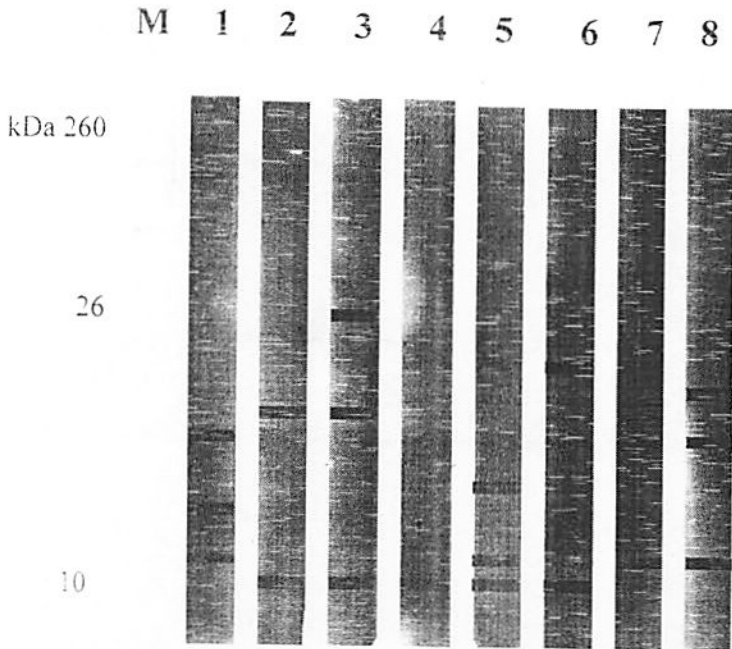
Berdasarkan SDS-PAGE yang telah dilakukan terhadap pemisahan protein pada antigen stadium aseksual *P. falciparum* menunjukkan pita (band) yang jelas dengan ukuran 19 kDa.



Gambar 1. Antigen stadium aseksual *P. falciparum* setelah pemisahan protein dengan SD-PAGE.

Antigen setelah di SDS-PAGE kemudian ditransfer ke membran nitrocelulose dan direaksikan dengan serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku Sumatera Selatan dan Kabupaten Pacitan, Jawa Timur dengan metode western blotting. Hasil reaksi western blotting menunjukkan bahwa serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku lebih banyak menunjukkan variasi reaksi terhadap antigen stadium aseksual *P. falciparum* daripada serum dari Kabupaten Pacitan. Berat molekul dari antigen yang direspons oleh serum dari Kabupaten Oku adalah 10 kDa (Gambar 2 dan Tabel 1). Sedangkan antigen yang banyak direspons oleh serum dari Kabupaten Pacitan adalah antigen dengan berat molekul 41, 26 dan 12 kDa (Gambar 3 dan Tabel 2). Protein antigen yang direspons oleh serum dari Kabupaten Oku dan Kabupaten Pacitan adalah 26, 19, 12 dan 10 kDa. Protein ini adalah merupakan *common antigen* untuk kedua daerah tersebut.

5.2 Western blotting menggunakan serum dari Kabupaten Oku

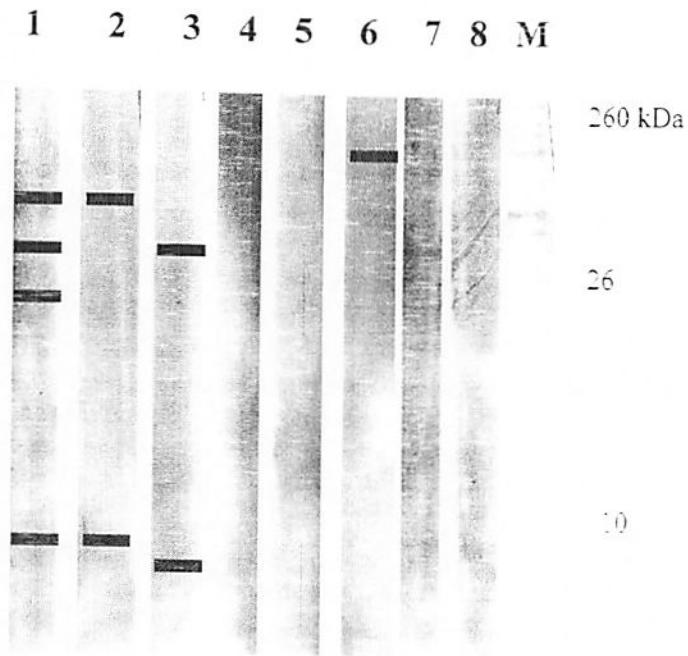


Gambar 2. Variasi reaksi antibody penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku, Sumatera Selatan terhadap antigen stadium aseksual *P. falciparum*

Tabel 1. Berat molekul antigen stadium aseksual *P. falciparum* yang direspons oleh serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Oku, Sumatera Selatan..

No. Sampel	Berat Molekul
1.	19, 15, 12
2.	21, 10
3.	26, 21, 10
4.	10
5.	18, 12, 10
6.	24, 10
7.	12
8	22,5, 19, 12

5.3 Western blotting menggunakan serum dari Kabupaten Pacitan



Gambar 3. Variasi reaksi antibodi penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan, Jawa Timur terhadap antigen stadium aseksual *P. falciparum*

Tabel 2. Berat molekul antigen stadium aseksual *P. falciparum* yang direspons oleh serum penderita malaria falciparum dari Kabupaten Pacitan. Jawa timur

No. Sampel	Berat Molekul
1.	41, 26, 19, 12
2.	41, 12
3.	26, 10
4.	-
5.	-
6.	45
7.	-
8.	-

Tabel 3. Protein antigen yang direspons oleh serum dari Kabupaten Oku dan Kabupaten Pacitan (*Comon antigen*).

KAB. PACITAN	KAB. OKU	KAB. PACITAN & KAB. OKU
24	45	26
22.5	41	19
21		12
18		10
15		

Heterogenitas respon individu terhadap *P. falciparum* dipengaruhi oleh intensitas kontak terhadap parasit, faktor genetik dan hospes maupun parasit itu sendiri, faktor ras/etnik, geografik dan strain parasit (Modiano et al, 1996; Laserson, 1999). Adanya perbedaan reaktifitas antibodi terhadap antigen stadium aseksual *P. falciparum* antara sampel dari Kabupaten Oku dan Kabupaten Pacitan, tidak lepas dari faktor geografis dan etnis, strain parasit, intensitas kontak terhadap parasit.

Dalam penelitian ini digunakan sampel dari dua daerah dengan letak geografis yang berbeda, yaitu Kabupaten Oku di luar pulau Jawa, yang merupakan daerah mesoendemis dan Kab. Pacitan di Jawa Timur yang merupakan daerah hypoendemis. Dari hasil penelitian tersebut di atas, berdasarkan jumlah antigen yang direaksi oleh serum dari Kabupaten Oku menunjukkan bahwa, sebagian besar sampel bereaksi dengan lebih dari 2 antigen. Dari total 8 sampel, 2 sampel ereaksi terhadap hanya satu antigen. Sedangkan sampel dari Kabupaten Pacitan bereaksi dengan 1-4 protein antigen, dan 4 sampel negatif.

Kaplan, et al (1993) dan Scanf et al (1999) mengemukakan bahwa individu yang tinggal di daerah endemis tinggi malaria *falciparum*, secara bertahap akan membangun proteksi terhadap penyakit malaria. Dalam penelitian ini, banyaknya variasi reaksi antibodi penderita malaria *falciparum* dari kedua kabupaten, walaupun merupakan daerah hypoendemis, menunjukkan adanya proteksi terhadap penyakit malaria karena terpapar dengan berbagai varian antigen *P. falciparum* sehingga menghasilkan respon imun yang bervariasi. Semakin banyak variasi antigen yang direspons oleh serum penderita malaria mengindikasikan semakin tingginya intensitas paparan parasit terhadap penderita dan semakin tinggi pula derajat proteksi yang dimilikinya (Kaplan et al, 1993; Aucan et al, 2000). Pada sampel yang bereaksi terhadap lebih dari dua antigen menunjukkan adanya infeksi berulang atau sudah sering terpapar dengan antigen *P. falciparum*. Sedangkan adanya variasi reaksi yang lebih sedikit pada sampel menunjukkan bahwa semakin sedikit variasi antigen yang direspons, cenderung semakin rendah derajat proteksi yang dimiliki oleh individu tersebut (Kaplan et al, 1993; Aucan et al, 2000), karena kemungkinan infeksi tersebut merupakan infeksi yang baru pertama kali terjadi pada individu tersebut.

Individu yang baru pertama kali terkena malaria falciparum akan merespon paling sedikit satu komponen antigen spesifik (Scanf et al, 1999).

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Common antigen untuk kedua daerah endemis, Kabupaten Oku dan Kabupaten Pacitan adalah 26, 19, 12, dan 10 kDa. Antigen ini berpotensi sebagai kandidat vaksin malaria untuk lokal Indonesia, terutama untuk Kabupaten Pacitan atau Kabupaten Oku, untuk itu diperlukan penelitian lebih jauh lagi.

6.2 Saran

Diperlukan jumlah sampel yang lebih banyak dari berbagai daerah endemis malaria untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap guna memperoleh kandidat vaksin malaria yang dapat diterapkann di indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, U.F. 2004. Malaria situation in Indonesia (Policy). Symposium of malaria control in Indonesia. November 29-30, 2004. Tropical Disease Center Airlangga University Surabaya. Proceeding: 1-13.
- Anders, R.F. 1991. Antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. Acta Leiden. 60: 57-67.
- Arwati, H. dan Bumi, C. 2004. Reaktifitas antibodi pada penderita malaria falciparum di beberapa daerah endemik di Indonesia terhadap *Plasmodium falciparum* merozoit antigen. Laporan Penelitian Dasar 2004. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Arwati, H., Basuki, S., Kusmartisnawati, Hidayati, S., Safriah, A., Fitri, L.E. dan Dachland, Y.P. 2004. Pengenalan antigen stadium aseksual *Plasmodium falciparum* isolat Irian oleh serum penderita malaria falciparum dari Nusa Tenggara Barat dan Timur. Majalah Kedokteran Tropis Indonesia. 15(3): 27-34.
- Arwati, H. dan Basuki, S. 2005. Karakterisasi antigen stadium aseksual (marur) *Plasmodium falciparum*: "Imunogenitasnya pada mencit BALB/c" dalam rangka peninjauan kandidat vaksin malaria untuk Indonesia. Laporan Proyek. Penelitian Medical Research Unit Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. 2005.
- Arwati, H., Basuki, S., Dachland, Y.P. 2005. Variasi reaksi antibody penderita malaria falciparum di daerah endemik di Indonesia terhadap antigen stadium aseksual *Plasmodium falciparum*. Jurnal Penelitian Medika Eksakta. 6(1): 93-101.
- Arwati, H. dan Basuki, S. 2006. Identifikasi lokasi antigen, stadium aseksual *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan *indirect immunofluorescent assay* (IFA) dalam rangka peninjauan kandidat vaksin malaria untuk Indonesia, Seminar Nasional Penyakit Tropis Parasiter. Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. 8 Juli 2006.
- Arwati, H., Basuki, S., Kusmartisnawati, Hidayati, S., Safriah, A., Fitri, L.E. dan Dachland, Y.P. 2007. Localization of *Plasmodium falciparum* asexual stage antigen by mouse immune sera. Folia Medica Indonesiana. 43(1): 39-42.
- Aucan, C., Traore, Y., Tall, F., Nacro, B., Leroux, T.T., Fumoux, P., and Rihet, Y. 2000. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. Infection and Immunity 68(3): 1252-1258.
- Black, C.G., Wu, T., Wang, L., and Coppel, R.L. 2001. Merozoite surface protein-8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. Mol. Biochem. Parasitol. 114(2): 217-226.

- Blackman, M.J., Heiarich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S. and Holder, A.A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* 172:379-382.
- Blackman, M.J., Whittle, H., and Holder, A.A. 1991. Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33 kDa secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 35-44.
- Blackman, M.J. and Holder, A.A. 1992. Secondary processing of *Plasmodium falciparum* merozoite protein-1 (MSP-1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP-1.13 as a noncovalently associated complex with other fragments of MSP-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50: 307-315.
- Bzik, D. J., Li, W., Horii, T., Iiiselburg, J. 1988. Amino acid sequence of the serine repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. *Mol and Biochem Parasitol.* 30:279-288.
- Clark, J.T., Donachie, S., Anand, R., Wilson, C.F., Heidrich, H.G., and McBride, J.S. 1988. 46-53 kDa glycoproteins from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32: 15-24.
- Creasey, A., Fenton, B., Thaitong, S., Oliveira, S., Mutambu, S., Walliker, D. 1990. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am. J. of Trop. Med and Hyg.* 42(5): 403-413.
- Cruse, J.M. and Lewis, R.E. 1995. *Illustrated Dictionary of Immunology*. CRC Press. Boca Raton.
- Delplace, Fortier, P. B., Tronchin, O., Dubermetz, J. P., and Vemes, S. 1987. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23: 193-201.
- Depkes RI. 2008. People's Republic of China Gives Anti Malaria in Amount of 3 Billion to Indonesia. 01 Feb 2008 <http://www.depkes.go.id/en/0102pe.htm>
- Drew, D.R., Sanders, P.R., and Crabb, B.S. 2005. *Plasmodium falciparum* merozoite protein-8 is a ring-stage membrane protein that localized to the parasitophorous vacuole of infected erythrocytes. *Infect and Immune.* 73(7): 3912-3922.
- Engers, H.D. and Godal, T. 1998. malaria vaccine development: current status. / *Parasitol. Today.* 14(2): 56-64.
- Epping, R.J., Golstone, S.D., Ingram L.T., Upcroft, J.A., Ramamy, R., Cooper, J.A., Bushel, G.R., and Geysen, H.M. 1988. An epitope recognized by

- inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kDa merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 28: 1-10.
- Faust, E. C., Russel, P. F. and Jung, L. C. 1970. Craig and Faun's Clinical Parasitology. Eighth Edition. Lea & Febiger, Philadelphia, pp 177-224.
- Fox, B.A., and Bzik, D.J. 1994. Analysis of stage specific transcripts of the *Plasmodium falciparum* serin repeat antigen (SERA) gene and transcription from the SERA locus. Mol. Biochem. Parasitol. 68: 133-144.
- Hoffman, S.L. and Miller, L. H. 1996. A Perspective on Malaria Vaccine Development. In Hoffman, S. L. (ed.). Malaria Vaccine Development. A multi-immune Response Approach. ASM Press. Washington DC. page: 1-13.
- Holder, A.A. 1996. Preventing merozoite invasion of erythrocytes. In Hoffman, S. L. (ed.). Malaria Vaccine Development. A multi-immune Response Approach. ASM Press. Washington DC. page: 77-104
- Hommel, M., David, P.H., and Oligino, L.D.. 1983. Surface alteration of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity and the role of the spleen. J. Exp. Med. 157:1137-1148.
- Horii, T., Bzik, D. J., dan Inselburg, J. 1988. Characterization of antigen-expressing *Plasmodium falciparum* cDNA clones that react with parasite inhibitory antibodies. Mol. Biochem. Parasitol 30: 9-18.
- Inselburg, J., Bzik, D. J., Li, W. B., Green, K.m., Kansopon, I., Hahn, B.K., Bathurst, I.C., Barr, P. J., and Rossa, R. N. 1991. Protective immunity induced in rhesus monkeys by recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum*. Infect and Immun 59(4): 1247-1250.
- Kaplan, J.M., James, M.B., Akhil, B.V., Kyle, W., and Williams, P.W. 1993. Malaria. In (Kaplan K.S, ed). Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 3th edition. USA: Blackwell Scientific Publication, pp 302-351.
- Knapp, B., Hundt, E, Nau, U., and Kupper, H. A. 1989. Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by serin stretch. Mol. And Biochem. Parasitol. 32: 73-84.
- Kusmartisnawati dan Arwati, H 2007. Karakterisasi protein antigen stadium aseksual *Plasmodium falciparum* dalam rangka peninjauan kandidat vaksin malaria untuk Indonesia. Laporan Penelitian Proyek Medical Research Unit (MRU) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Laserson, K.F., Petralanda, I., Imera, R., Barker, R.H., Spielman, A., Maguire, J.H., and With, D.F. 1995. Genetic characterization of an epidemic of *Plasmodium falciparum* malaria among Yanomami Amerindians. J. Infect. Dis. 180: 2081-2085.
- Lambros, C. and Vandenberg, J.P. 1978. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages in culture. J. of Parasitol. 65(3): 418-420.

- Lyon, A.L., Haynes, J.D., Diggs, C.L., Chulay, J. D., and Pratt-Rossiter, J.M. 1986. *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface by antibodies when schizonts mature in the presence of growth inhibitory immune serum. *J. Immunol.* 136: 2252-2258.
- Modiano. D., Sirima, B.S., Nebie, I., Diallo, D., Esposito, F. and Coluzzi. M. 1996. Different responses to *Plasmodium falciparum* malaria in West African sympatric ethnic groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13206-13211.
- Marshall. V.M., Silva, A., Foley, M., Cranmer, S., Wang, L., McColl, D.J., Kernp, D.J., and Coppel, R.L. 1997. A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infect and Immune.* 65(11): 4460-4467.
- Mills. K.E., Pearce, J.A., Bral'b, B.§. and Cowman, A.IP. 2002. Truncation of merozoite surface protein-3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to surface of *Plasmodium falciparum* merozoite. *Mol. Microbiol.* 43(6): 1401-1411.
- Moorthy. V.S., Good, M.F., and Hill.A.V.S. 2004. Malaria vaccine development. *The lancet.* 363: 150-160.
- Morimatsu, K., Morikawa, T., Zanabe.K., Bzik, D. J., and Horii. T. 1997. Sequence diversity in the amino terminal 47 kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* serin repeat antigen. *Mol. And Bioihem.Parasitol.* 86:249-254.
- Pachebat. J.A., Ling, I.T., Grainger, M. et al.'. 2001. The 22-kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein-7. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117:83-89.
- Puentes. A., Ooampo, M., Rodrigues. L.E. Vera, R., Valbuena.J., Curtidor. H., Garcia, J., Lopez, R., Tovar, D., Cortes, J., Rivera, Z., and Pattaroyo, M.E. 2005. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. *Biochim'ie.* 87(5): 461-472.
- Ragge. K., Aronuld, H.H., Tummler, V., Knapp, B., Hundt, E., Lengelbach. K. 1990. In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serin rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 93-100.
- Scant, C.L., frandeur, T., Bonnefoy, S., guilotte. M., and Puijalon, O.M., 1999. Novel target of the variant-specific immune responses to *Plasmodium falciparum* identified by differential screening of an expression library. *Infection and Immunity* 67: 64-73.
- Sherman. I.W (ed).1998. *Malaria: Parasite, Pathogenesis and Protection.* ASM Press.Washington DC.

- Trager, W. and Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193:673-675.
- Trucco, C., Femandes-Reyes, D., Howell, S., Stafford, W.H., Scott-Finnigan, L., Grainger, M. et al. 2001. The merozoite surface protein surface protein-6 gene codes for a 36-kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112:91-101.
- Vargas-Serrato, E., Bamwell, J.W., Ingravallo, P. and Galinski, M.R. 2002. Merozoite-surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol* 120(1): 41-52.
- Wang, L., Crouch, L., Richie, T.L., Nhan, D.H. and Coppel, R.L. 2003. Naturally acquired antibody responses to the components of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complex. *Parasite Immunol.* 25: 403-412.
- Weber, J.L., Lyon, J.A., Wolf, R.H., Hall, T., Lowell, O.H. and Chulay, J.D. 1988. Primary structure of a *Plasmodium falciparum* malaria antigen located at the merozoite surface and within parasitophorous vacuole. *The Journal of Bio. Chem.* 263(23): 11421-11425.
- Roll Back Malaria-WHO-UNICEF. 2005. World Malaria Report. 2005. www.rbm.who.int. Diakses tanggal 14 Februari 2008. Jam 12.00 WIB.
- The World Bank Group. 2007. The world bank booster program for malaria control in Afrika: Scaling-up nr impact (SUFI). www.reliefweb.int. Diakses tanggal 14 Februari 2008. Jam 2.15 WIB.
- Wijayanti, A. W. 1999. Kemampuan Fagositosis Makrofag Peritoneum Mencit yang Diimunisasi selam . Infeksi *Plasmodium berghei*. *Berkala Ilmu Kedokteran* 31(4): 213-218.
- Wu, T., Black, C.G., W, L., Hibbs, A.R., and Coppel, R.L. 1999. Lack of sequence diversity in the gene encoding merozoite surface protein 5 of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol* 103(2): 243-250.
- WHO. 2000. Malaria. Last updated: Wednesday 2nd August. (Medline).

LAMPIRAN

Draft artikel ilmiah untuk dipublikasikan pada journal *Folia Medica Indonesiana*, dengan judul:

Parasitological examination of imported and indigenous malaria in tegalombo community health center Pacitan district, East Jawa province, Indonesia

**PARASITOLOGICAL EXAMINATION OF
IMPORTED AND INDIGENOUS MALARIA
IN TEGALOMBO COMMUNITY HEALTH CENTER
PACITAN DISTRICT, EAST JAWA PROVINCE, INDONESIA**

**Kusmartisnawati, Sulistyawati, SW and Arwati, H.
Department of Parasitology
Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia**

ABSTRACT

The district of Pacitan is one of malaria hypoendemic areas in East Jawa Province. The people of Pacitan District are accustomed to work in outer Jawa islands temporary for three months period. They go in a good health to Papua, Sulawesi, Kalimantan, and Maluku islands, but often come back to Pacitan District are infected with malaria parasites (imported malaria). On the other hand, the people who do not go to outside Pacitan District have also been infected with malaria parasites (indigenous malaria). During the period of August 2009, the microscopy examination has been done on the thick blood films of the malaria infected travelers hospitalized at the Community Health Center (Puskesmas) of Tegalombo Subdistrict, in Pacitan District. The parasite species of the total number of 26 patients hospitalized in Tegalombo Community Health Center, 22 patients (84.6%) were imported malaria and 4 patients (15.4%) were indigenous malaria. Almost all imported malaria cases were male (95.45%) aged 18-40 years old, there was only one female worker (4.54%) aged 30 years old. Indigenous malaria were found in 2 males (50%) including one kid aged 6 years old and a man aged 17 years old, and 2 females (50%) aged 30 and 35 years old.

Keywords: imported malaria, indigenous malaria

INTRODUCTION

Malaria remains one of major health problem in Indonesia. The district of Pacitan is one of malaria hypoendemic areas in East Jawa Province. The people of Pacitan District are accustomed to work outside Jawa islands temporary for three months periode. They go in a good health to Papua, Sulawesi, Kalimantan, and Maluku islands, but often

come back to Pacitan District are infected with malaria parasites (imported malaria). On the other hand, the people who do not go to outside Pacitan District have also been infected with malaria parasites (indigenous malaria).

During the period of August 2009, the microscopy examination has been done on the thick blood films of the malaria infected patients hospitalized at the Community Health Center (Puskesmas) of Tegalombo Subdistrict, in Pacitan District, East Jawa Province, Indonesia. The examination is aimed to find out the parasite species which infect the imported and indigenous malaria in the center mentioned above.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The patients examined were malaria infected patients who hospitalized in the Community Health Center of Tegalombo Subdistrict, in Pacitan District, East Jawa Province, Indonesia during August 2009. Malaria cases were divided into imported and indigenous. Imported malaria is the patients that have been infected by malaria parasites in out side Jawa Island, while indigenous malaria is the patients who infected by malaria parasites in Pacitan District.

Microscopy examination

Microscopy examination is performed on the Giemsa stained- thick blood films based on the characteristic of malaria parasite shown on the DPDx Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, and Manual of malaria microscopy (WHO, 2008). The parasite counts were also performed to obtain the number of parasites per 200 leukocytes on Giemsa stained-thick films or per μl infected blood.

RESULTS

Malaria cases

The parasite species of the total number of 26 patients hospitalized in Tegalombo Community Health Center, 22 patients (84.6%) were imported malaria and 4 patients

(15.4%) were indigenous malaria. Almost all imported malaria cases were male (95.45%) aged 18-40 years old, there was only one female worker (4.54%) aged 30 years old. Indigenous malaria were found in 2 males (50%) including one kid aged 6 years old and a man aged 17 years old, and 2 females (50%) aged 30 and 35 years old.

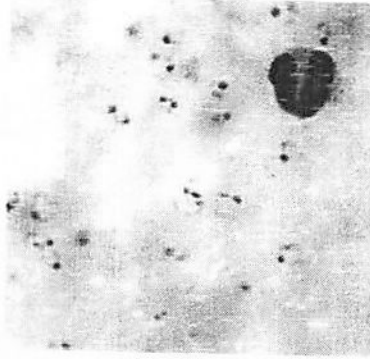


Figure 1. *P. falciparum* on thick blood film of travelers of Pacitan District hospitalized at Tegalombo Community Health Center, Pacitan District, East Jawa Province, Indonesia

Parasite species and parasite count

Identification of parasite species of imported malaria resulting in *P. falciparum* was found in 12 cases (54.5%), *P. vivax* in 4 cases (18.2%) and mix of both species in 6 cases (27.3%), and 31.8% with detectable gametocytes. The parasite counts were ranged from 480-1480 parasites per 200 leukocytes. While indigenous malaria was composed by *P. falciparum* found in 2 cases (50%), *P. vivax* in one case (25%) as well as mix of both *P. falciparum* and *P. vivax* (25%). The results are shown in Table 1.

Tabel 1. Results of parasitological examination of imported and indigenous malaria in community health center of Tegalombo sub district of Pacitan District, East Jawa Province.

	MALARIA CASES	
	IMPORTED	INDIGENOUS
Number of cases	22 (84.6%)	4 (15.4%)
Male patients	21 (95.45%)	2(50%)
Female patients	1 (4.54%)	2 (50%)
Ages	18-40 years old	6, 17, 30, 35 years old
<i>P. falciparum</i>	12 cases (54.5%),	2 cases (50%)
<i>P. vivax</i>	4 cases (18.2%)	1 case (25%)
Mix <i>Pf</i> - <i>Pv</i>	6 cases (27.3%)	1 case (25%)

DISCUSSIONS

The data shows that the number of imported malaria in Tegalombo Community Health Center is higher than that of indigenous malaria. The increase of malaria cases in Tegalombo Community Health Center of Pacitan District of East Jawa Province in August 2009 that is due to imported malaria from outer Jawa Island. Trends in imported malaria in Tegalombo Community Health Center are the result of increases in travel activity of the residence to those malaria endemic areas in Indonesia (Indonesian MOH, 2008), such as Indonesian Papua (Baird et al, 2003; Lederman, 2006), Maluku (Kompas, 2005), Kalimantan, Jambi and Riau (Priyana, 2008), while malaria infection is threatening them as they were nonimmune travelers. The aim of travel is to work as temporary worker for 3 months and come back to Pacitan District often with malaria infection. While they went back to Pacitan District, malaria is possibly transmitted to other residences that are not traveling to any malaria endemic areas. Based on the gender of workers in outer islands, almost all workers are male (95.45%) and only one female (4.54%). The ages of the workers are the productive ages to work (18-40 years old), while the choices of travel destinations are mostly the fields of work that do not need specific skill, such as building construction or plantation (Priyana, 2008) that can be done by any body with low or middle education.

Microscopy examination of blood films on imported malaria showed that infection with *P. falciparum* is higher (54.5%), followed by *P. vivax* (18.2%) and mix of both species (27.3%), and 31.8% with detectable gametocytes. The presence of gametocytes suggested, that the patients have been infected at least for 10 days as the life cycles are presented about 10 times before forming gametocytes. They also potentially transmit the parasites to others. The indigenous malaria showed the *P. falciparum* infection in 2 cases, while *P. vivax* and mix *P. falciparum* and *P. vivax* were found in only one case. Parasite counts were ranged from 480-1480 parasites per μ l infected blood and categorized as ++, +++ and ----+. Parasite count is important to establish how severe malaria in a patient. The data is necessary to find out whether the malaria parasites are responding to the antimalaria treatment being given. This can be monitored over time by

plotting the parasite count on the day of treatment and comparing it with the count in a blood film made at some specified later time (WHO, 2008).

As the increased of imported malaria were noted in Pacitan (hypoendemic area of malaria) it is important to reach the travelers for pretravel advice because they do not take effective precautions as they believe that their risk is minimal. The effective precautions are also important for the children born in the endemic areas as they have no immunity at all (Baas, et al, 2006). The geographic origin of the immigrants plays a major role in the prevalence of the predominant species. Immigrants rarely use chemoprophylaxis or seek medical advice prior to travel as they mistakenly believe that they retain lifelong immunity (Bacanner er al, 2004). The migrants of Pacitan District who come back from working in outer Jawa Island, account for an increasing proportion of malaria infection cases in Tegalombo Community Health Center. Reduced efficacy of chemoprophylaxis may also factor in the increased importation of malaria. They do not seek medical advice prior to working in outer Jawa Island. or they do but do not use chemoprophylaxis properly.

The reason of the increase in imported malaria in Pacitan District and in Jakarta is different. Jakarta is the capital and the most populous city in Indonesia, autochthonous malaria does not currently occur. Military, forestry, mining, and tourist activities draw Jakarta residents to distant parts of the archipelago with high rates of malaria. The study on imported malaria in Jakarta during January 2004 to February 2005, showed that imported malaria mostly came from Aceh Province, Papua and Bangka Islands. While malaria parasite, *P. falciparum* infection was accounted for 53% of cases, of which 15% had detectable gametocytemia. The highest number of cases occurred in May, July, and December with the nadir in October

REFERENCES

- Bacaner N , Stauffer B , Boulware DR . et al . 2004. Travel medicine considerations for North American immigrants visiting friends and relatives . JAMA 291 : 2856 – 2864 .

- Baas, MC; Wetsteyn, J; van Gool, T. 2006. Patterns of Imported Malaria at the Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. *Journal of Travel Medicine*. Volume 13. Issue 1, 2006, 2-7
- Lederman. ER., Sutanto. I., Wibudi, A., Ratulangie, L., Krisin, Rudiandyah, I., Fatmi, A., Kurniawan. L., Nelwan, RHH., and Maguire, JO. 2006. Imported Malaria in Jakarta, Indonesia: Passive Surveillance of Returned Travelers and Military Members Postdeployment. <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118566205/abstract>
- Parola P . Gazin P . Pradines B , et al . Marseilles: a surveillance site for malaria from Comoros Islands. *J Travel Med* 2004 ; 11 : 184 – 186 .
- Priyana. AH. 2008. Nyamuk Malaria Ancam Pacitan.
<http://www.kabarindonesia.com/berita.php?pil=3&jd=Nyamuk+Malaria+Ancam-Pacitan&dn=20081029100726>
- Roberts MTM , Lever AML . An analysis of imported infections over a 5-year period at a teaching hospital in the United Kingdom . *Travel Med and Infect Dis*. 2003 ; 1 : 227 – 230
- Schlagenhauf P, Steffen R, Loutan L. 2003. Migrants as a major risk group for imported malaria in European countries. *J Travel Med* 2003; 10: 106 – 107.
- WHO. 2008. Manual of malaria microscopy.