

Profil Interleukin-4 dan Interferon Gamma pada Mencit galur Balb/c Pasca Vaksinasi Ekstrak Kelenjar saliva *Anopheles sundaicus* s.l. dan Diinfeksi *Plasmodium berghei*-ANKA

Profile of Interleukin-4 and Interferon- γ of Balb/c Mice after Salivary Gland Extract of *Anopheles sundaicus* s.l. Vaccination and Infected by *Plasmodium berghei*-ANKA

Ali Machrus^{1,*}, Adrial², Yunita Armiyanti³, Hidayat Teguh Wiyono¹, & Kartika Senjarini¹

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember

²Fakultas Kedokteran Universitas Padang

³Fakultas Kedokteran Universitas Jember

*E-mail: a5krus@yahoo.co.id

ABSTRACT

Malaria infection is initiated when sporozoites are inoculated into a vertebrate host via the salivary glands of an *Anopheles* mosquito. During *Anopheles* bite, the salivary glands release components that include vasomodulator and immunomodulators. The salivary components of vectors have important role in transmission of pathogen. Therefore, if these components were injected repeatedly into a vertebrate host, it can stimulate host immune system and inhibit the transmission of the pathogen into the host. This could be observed the increasing level of IFN- γ and decreasing level of IL-4 in mice model of malaria after vaccination with salivary gland ekstrak (SGE) from *An sundaicus* s.l. It has also been proven that this mechanisms was related with pathogen of malaria. This was supported by the reduction of parasitemie rate in those mice model after infection by *P. Berghei*.

Keywords: *An sundaicus* s.l., IFN- γ , IL-4, immunomodulators, salivary gland, TBV

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh *Plasmodium* dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Penularan ini terjadi ketika nyamuk *Anopheles* betina melakukan *blood feeding*. Infeksi ini menyebabkan masalah kesehatan dunia. Lebih dari 3 milyar manusia yang tinggal di daerah endemik dan diperkirakan 350 sampai 500 juta setiap tahun beresiko menderita malaria (Lavazec, 2007). Lebih dari 3 juta orang meninggal tiap tahun akibat malaria sehingga menempatkan malaria sebagai peringkat ke delapan yang memberikan kontribusi pengurangan populasi manusia (Donovan *et al.*, 2007).

Indonesia adalah salah satu negara endemis malaria, walaupun telah dilakukan program penatalaksanaan malaria sejak tahun 1959, namun hingga akhir 2011 kasus penyakit malaria masih tinggi. Angka penderita malaria dibebberapa propinsi bagian timur Indonesia masih diatas rata-rata nasional yaitu >2,4% (DepKes, 2011). Hal ini terjadi karena permasalahan yang berkaitan dengan malaria sangat kompleks. Salah satu dari permasalahan tersebut yang paling utama adalah meningkatnya kasus resistensi parasit terhadap klorokuinon dan sulfadoksin-piremetamin

(BAPPENAS, 2010; Zein, 2005; Kemenkes RI, 2011), serta timbulnya resistensi vektor terhadap insektisida (Ramirez *et al.*, 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan langkah-langkah baru dalam pencegahan terhadap malaria yaitu dengan mengembangkan vaksin malaria. Mengingat hingga saat ini belum ditemukan vaksin yang efektif terhadap malaria, maka diperlukan terobosan baru pengembangan vaksin yang dapat menghambat transmisi patogen ke dalam tubuh host yaitu *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) berbasis saliva.

Kelenjar saliva nyamuk *Anopheles* telah terbukti mengandung zat anti koagulan, vasodilator, antihistamin dan imunomodulator (Titus *et al.*, 2006; Dhar *et al.*, 2003). Zat-zat ini berperan untuk memudahkan vektor nyamuk untuk melakukan *blood feeding* dengan demikian secara tidak langsung juga memudahkan infeksi parasit ke tubuh inang.

Anti koagulan dalam saliva terbukti mencegah pembekuan darah, sehingga dapat memudahkan nyamuk untuk *blood feeding*. Vasodilator meningkatkan diameter pembuluh darah sehingga memudahkan sirkulasi darah dan mencegah vasokonstriksi, sehingga *blood feeding* lebih efisien (Dhar *et al.*, 2003). Selain itu terdapat komponen imunomodulator yang mempengaruhi keberhasilan

transmisi parasit ke dalam tubuh host. Faktor imunomodulator tersebut bersifat immunosupresif dengan menekan respon imun nonspesifik (*innate immunity*) dan mengubah respon imun spesifik (*adaptive immunity*) kearah Th2 sehingga lebih menguntungkan bagi nyamuk untuk melakukan *blood feeding* dan memudahkan transmisi parasitnya. Oleh karena itu, faktor imunomodulator merupakan salah satu kandidat potensial untuk pengembangan TBV malaria. Eksplorasi terhadap respon imun berkaitan dengan ekstrak kelenjar saliva (SGE) yang merupakan langkah penting untuk pengembangan vaksin tersebut. *Anopheles sundaicus* s.l. merupakan salah satu vektor potensial di Indonesia dan belum diteliti aktifitas kelenjar salivanya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin model SGE nyamuk *An. sundaicus* s.l. terhadap profil IL-4 dan IFN- γ hewan coba mencit galur BALB/c berkaitan dengan infeksi malaria melalui parasit *Plasmodium berghei*-ANKA.

METODE

Rearing *Anopheles sundaicus* s.l.

An sundaicus s.l. diperoleh dari hasil Rearing dilakukan pada kedua hasil koleksi yaitu larva dan nyamuk. Koleksi larva dilakukan dengan cara mengambil larva secara langsung yang berada di habitatnya. Dengan menggunakan gayung dengan pegangan panjang agar dapat menjangkau larva di tempat yang jauh. Larva yang terperangkap pada gayung tersebut diambil dengan pipet karet untuk dipindahkan pada botol plastik. Larva kemudian dikembangkan di laboratorium untuk ditumbuhkan menjadi nyamuk dewasa (Gerberg, 1970; Mool *et al.*, 2008). Koleksi nyamuk dilakukan pada malam hari ketika nyamuk keluar untuk mencari makan. Dengan menggunakan aspirator menangkap setiap nyamuk yang menempel pada hewan atau pada daun dan selanjutnya disimpan pada kandang nyamuk.

Larva yang sudah menjadi kepompong dipindahkan ke kandang untuk bermetamorfosis menjadi nyamuk dewasa. Makanan nyamuk disesuaikan dengan fase pertumbuhan dan perkembangan nyamuk. Larva nyamuk diberi makanan pelet ikan yang banyak mengandung protein. Nyamuk jantan diberi makanan yang mengandung sukrosa 10%, sedangkan bagi nyamuk betina disediakan hewan untuk diisap darahnya. Nyamuk dewasa hasil rearing dapat langsung di isolasi kelenjara saliva atau dipelihara untuk kembangbiakkan (Gerberg, 1970; Moll *et al.*, 2008).

Isolasi kelenjar saliva

Isolasi SG dilakukan pada *Anopheles* betina yang diawali dengan cara menganestesi dengan kloroform beberapa detik, selanjutnya nyamuk betina diletakkan pada wadah berisi larutan NaCl 0,1%. Satu persatu nyamuk betina diambil diletakkan pada kaca benda yang ditetesi dengan PBS untuk disolasi kelenjar saliva dengan cara *microdissection* dibawah

mikroskop. Kelenjar saliva yang telah diisolasi disimpan dalam suhu -20°C sampai diperlukan. Jumlah kelenjar saliva *An. sundaicus* s.l. yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 1500 ekor (Bishop *et al.*, 2006).

Preparasi vaksin model

Ekstraksi kelenjar saliva nyamuk sebagai vaksin model SGE dilakukan dengan teknik *freeze and thaw*. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan mikropistol dan water sonication sampai protein saliva pecah. Protein saliva disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4°C , untuk mendapatkan pelet dan supernatan yang akan digunakan untuk vaksinasi. Supernatan dan pelet masing-masing ditambahkan PBS hingga 2500 μl selanjutnya disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

Preparasi mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini *Mus musculus* BALB/c hasil perkembang biakan yang dilakukan di laboratorium yang berumur 6-8 minggu. 45 ekor mencit sebelum digunakan diaklimatisasi selama 2 minggu hingga mencapai berat 25-30 gr. Selanjutnya mencit dibagi menjadi 3 kelompok, bagian pertama sebagai kelompok kontrol, bagian kedua sebagai kelompok pelet dan bagian ketiga sebagai kelompok supernatan.

Injeksi vaksin model SG

Injeksi vaksin model SG dilakukan melalui subkutan bagian femur dengan dosis 100 μl /ekor yang dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Sebelum vaksin model SG diinjeksikan, vaksin ditambahkan adjuvan aluminium hidroksida dengan perbandingan 1:1. Sedangkan kelompok kontrol diinjeksi dengan campuran PBS dan Adjuvan aluminium hidroksida dengan perbandingan yang sama yaitu 1:1 dan dosis yang sama. Setelah semua mencit divaksin semua, 2 minggu kemudian mencit-mencit tersebut diinjeksi dengan *P. Berghei*. Perhitungan derajat parasitemia dilakukan setelah 24 jam infeksi *P berghei* hingga 6 hari, sedangkan pengamatan respon imun dilakukan 24 jam sebelum vaksinasi, 7 hari setelah vaksinasi ke 1, ke 2, 24 jam pasca infeksi parasit dan 6 hari pasca infeksi parasit

Preparasi *Plasmodium berghei*

Infeksi parasit pada hewan coba dilakukan dengan mengambil darah mencit donor yang memiliki derajat parasit $>15\%$ melalui kardiak. Sebanyak 10 μl darah dari mencit donor yang diletakkan pada *heparin vacuotainer* dicampur 990 μl dan diinjeksikan pada hewan coba sebanyak 200 μl .

Penghitungan derajat parasitemia

Derajat parasitemia pada mencit yang telah diinfeksi *P berghei* dihitung setelah 24 jam yang diawali

dengan mengambil darah melalui ekor. Darah yang keluar dari ekor diteteskan pada objek glass untuk dibuat apusan. Apusan difiksasi dengan metanol dicat dengan gysma dan diamati pada mikroskop dengan pembesaran 400x. Derajat parasit diperoleh dengan menghitung jumlah parasit tiap 1000 eritrosit yang dinyatakan dengan persen.

Pengambilan plasma

Pengambilan plasma diawali dengan pengambilan darah melalui ekor dengan menganastesi mencit dengan menggunakan *xylasin* dan *ketamine* dengan perbandingan 1:10. Setiap 100 µl campuran *xylasin* dan *ketamine* selanjutnya diencerkan dengan PBS sebanyak 200 µl. Untuk menganastesi setiap mencit dibutuhkan 100 µl campuran yang sudah diencerkan tersebut. Jika mencit sudah dalam keadaan lemas, selanjutnya memotong bagian ujung ekor dengan menggunakan gunting steril. Jika ujung ekor sudah berdarah pipa kapiler dapat didekatkan kearah tetesan darah tersebut. Untuk mempercepat pengambilan darah dapat dilakukan dengan mendorong pangkal ekor kearah ujung ekor. Darah yang keluar ditampung dalam *ependorf*, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi darah disentrifuge pada kecepatan 13.000 rpm pada suhu 27°C selama 10 menit. Plasma yang sudah terpisah dengan sel darah diambil dengan mikropipet dan dipindahkan pada *ependorf* baru. Setelah diperoleh, plasma disimpan pada suhu -20°C sampai siap untuk uji elisa. Pengambilan plasma dan pemindahan kedalam *ependorf* dilakukan di *laminar air flow*.

Pengukuran kadar IL-4 dan IFN-γ melalui uji elisa

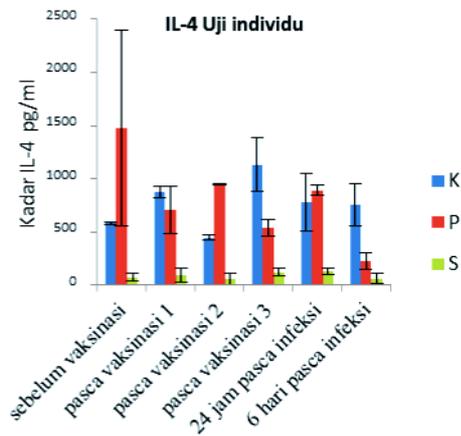
Pengukuran kadar IL-4 dan IFN-γ plasma mencit dilakukan secara individu dan populasi pada tiap-tiap kelompok perlakuan. Sampel yang berupa plasma selanjutnya diuji dengan *Uji Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mengetahui kadar IFN-γ dan IL-4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian pada individu menunjukkan adanya peningkatan kadar IL-4 pada kelompok pelet pasca vaksinasi ke-2, namun menunjukkan penurunan setelah vaksinasi ke-3 apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol. 24 jam pasca infeksi kadar IL-4 menunjukkan peningkatan sementara itu 6 hari pasca infeksi menunjukkan penurunan kembali. Keadaan ini berbeda dengan kelompok kontrol yang menunjukkan masih tingginya kadar IL-4 pada hari ke 6 pasca infeksi.

Kelompok supernatan menunjukkan kadar IL-4 yang jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok pelet dan kontrol. Kondisi ini terjadi ketika sebelum vaksinasi dan sesudah vaksinasi dilakukan bahkan setelah infeksi parasit kadar IL-4 masih tetap

kecil. Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, kadar IL-4 pada kelompok supernatan memiliki pola yang menunjukkan peningkatan kadar IL-4 setelah vaksinasi. Namun hari ke 6 pasca infeksi parasit, kadar IL-4 pada kelompok supernatan menjadi turun bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil pengukuran kadar IL-4 plasma darah pada uji individu seekor mencit sebelum dan sesudah diimmunisasi vaksin SGE *An. sudaicus* s.l. dengan metode elisa. K= Kelompok Kontrol, P= kelompok Pelet, S= kelompok supernatan

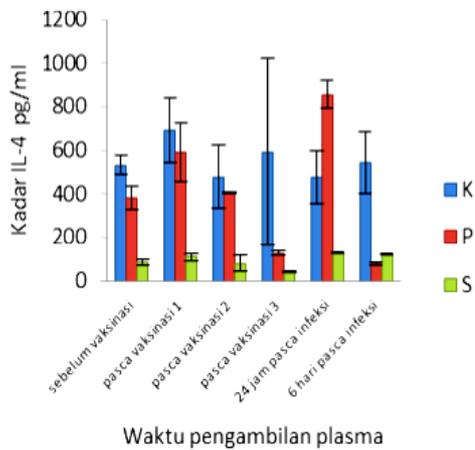
Hasil ini didukung dengan hasil pengujian pada populasi, kadar IL-4 dari populasi mencit baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol yang juga menunjukkan profil yang sama dengan hasil uji individu. Pada kelompok perlakuan terutama pada kelompok pelet menunjukkan kadar IL-4 yang tinggi pada awal vaksinasi, namun setelah vaksinasi ke 2 kadar IL-4 menunjukkan penurunan, sedangkan pada kelompok kontrol justru mengalami peningkatan (Gambar2).

Sementara itu 24 jam pasca infeksi kadar IL-4 pada kelompok pelet menunjukkan peningkatan dan memiliki kadar yang lebih tinggi dari kelompok kontrol, namun setelah 6 hari pasca infeksi kadar IL-4 kembali menurun dan memiliki kadar IL-4 yang lebih rendah dari kelompok kontrol.

Kelompok supernatan masih menunjukkan kadar yang sama dengan hasil uji individu

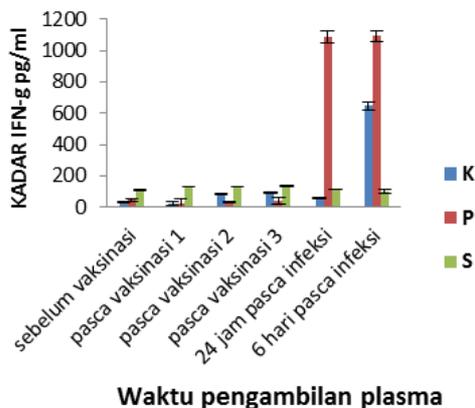
yaitu lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol tetapi menunjukkan profil yang berbeda yaitu menunjukkan penurunan kadar IL-4 setelah vaksinasi ke 3. Profil ini juga memberikan gambaran yang sama dengan kelompok pelet. Namun setelah, infeksi parasit menunjukkan peningkatan sedikit kadar IL-4 tetapi masih lebih rendah kadarnya bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dan pelet. Kondisi terus bertahan hingga hari ke 6 pasca

infeksi. Dengan demikian bila dilihat dari hasil uji populasi, kelompok supernatan memiliki profil yang sama dengan kelompok pelet tetapi memiliki kadar yang berbeda.



Gambar 2. Hasil pengukuran kadar IL4 plasma darah pada populasi mencit sebelum dan sesudah diimunisasi vaksin SGE *An. sudaicus* s.l. dengan metode elisa. K= Kelompok Kontrol, P= kelompok Pelet, S= kelompok supernatan

Kadar IFN- γ hasil uji individual secara umum menunjukkan bahwa terjadinya peningkatan pada kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan ini terjadi khususnya setelah pemberian vaksinasi model dengan kelenjar saliva. Kadar IFN- γ yang paling tinggi terdapat pada kelompok supernatan. Begitu juga pada kelompok pelet, walaupun memiliki kadar IFN- γ yang sama dengan kelompok kontrol pada awal vaksinasi, namun pasca vaksinasi ke 3 justru kadar IFN- γ mengalami peningkatan yang sangat tinggi. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 3.

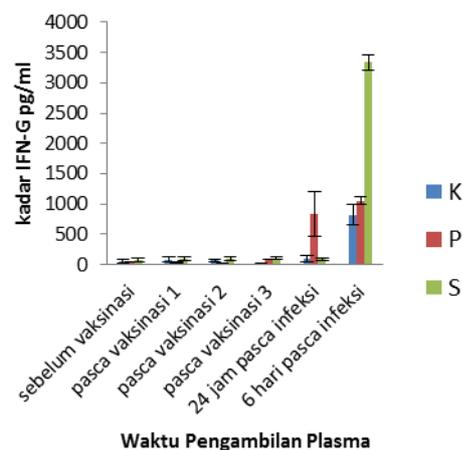


Gambar 3. Hasil pengukuran kadar IFN- γ plasma darah pada individu mencit sebelum dan sesudah diimunisasi vaksin SGE *An. sudaicus* s.l. dengan metode elisa.

K= Kelompok Kontrol, P= kelompok Pelet, S= kelompok supernatan

Hasil uji populasi terhadap kadar IFN- γ juga menunjukkan tren hasil yang sama dengan hasil uji individual. Sebelum vaksinasi kadar IFN- γ pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sangat rendah. Pada kelompok perlakuan kadar IFN- γ menunjukkan peningkatan, terutama dua minggu setelah vaksinasi dan kadar ini terus meningkat hingga enam hari setelah infeksi parasit. Sedangkan pada kelompok kontrol kadar IFN- γ hingga dua minggu pasca vaksinasi masih tetap rendah. Profil kadar IFN- γ hasil uji populasi dapat dilihat pada Gambar 4.

Tingginya kadar IL-4 setelah vaksinasi model SGE pada kelompok pelet dimungkinkan merupakan bentuk respon primer terhadap protein imunomodulator yang terdapat pada kelenjar saliva. Pada saat komponen saliva pertama kali diinjeksikan ke dalam tubuh inang, maka sebagai reaksinya tubuh akan membentuk zat anti. Bila zat tersebut adalah ekstrak kelenjar saliva yang memiliki komponen kompleks seperti vasomodulator dan komponen imunomodulator, maka tubuh akan membentuk zat anti terhadap komponen saliva tersebut. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa komponen dalam saliva tersebut mempunyai kemampuan untuk mensupresi perkembangan sel Th1 dan memodulasi respon imun ke arah Th2. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Donovan, 2007.

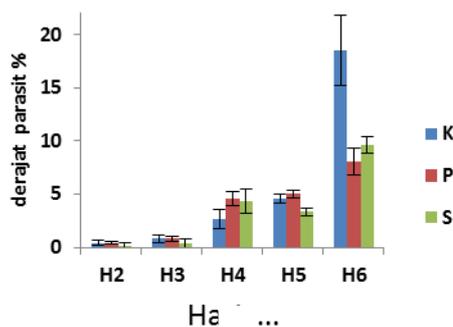


Gambar 4. Hasil pengukuran kadar IFN- γ plasma darah pada populasi mencit sebelum dan sesudah diimunisasi vaksin SGE *An. sudaicus* s.l. dengan metode elisa. K= Kelompok Kontrol, P= kelompok Pelet, S= kelompok supernatan

Namun reaksi pertama tubuh terhadap protein saliva tidaklah terlalu kuat. Tubuh belum memiliki

memori untuk mengatasinya. Tetapi pasca vaksinasi kedua, ketiga dan seterusnya, tubuh dapat membuat zat anti lebih cepat. Terbentuknya antisaliva yang lebih besar dan lebih cepat diduga menyebabkan peran sel Th-2 menjadi berkurang, sehingga kadar IL-4 menjadi berkurang.

Penurunan kadar IL-4 setelah pemberian vaksinasi ke dua dan ke tiga, akan memberikan sinyal positif bagi aktivasi makrofag. Makrofag sebagai APC akan mensekresi IL-12 dan IFN- γ . Sitokin yang dihasilkan oleh APC juga dapat mengaktifasi sel NK, sel NKT, CD8 dan juga sel gamma delta T untuk memproduksi IFN- γ yang lebih besar untuk perkembangan sel Th0 menjadi sel Th1. Selanjutnya sel Th1 akan mensekresi IFN- γ untuk mengaktifasi makrofag dan seterusnya. Makrofag yang diaktifasi akan melepaskan radikal bebas seperti NO, hidrogen peroksida (H₂O₂), O₂ singlet, OH- yang dapat menghambat pertumbuhan parasit (Gambar 5).



Gambar 5. Grafik derajat parasitemia pada kelompok kontrol, supernatan dan pelet dengan menggunakan kelenjar saliva *An sudaicus* s.l. K= Kelompok Kontrol, P= kelompok Pelet, S= kelompok supernatan

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa secara kuantitatif telah terjadi perbedaan kadar IL-4 dan IFN- γ pada hewan coba mencit Balb/c, sesudah vaksinasi dengan menggunakan vaksin model SGEAn *sudaicus* s.l. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin model SGEAn *sudaicus* s.l. mampu memodulasi respon imun inang dari subset Th2 ke arah subset Th1. Kondisi ini memberikan pengaruh negatif terhadap perkembangan parasit malaria yang dibuktikan dengan penurunan derajat parasit pada kelompok perlakuan. Kadar IL-4 pada kelompok perlakuan menurun bila dibanding dengan kelompok yang tidak divaksin (kelompok kontrol). Sementara

itu pada kelompok perlakuan kadar IFN- γ memiliki kecenderungan meningkat bahkan setelah infeksi.

DAFTAR PUSTAKA

Ahlfors H. 2009. *Interleukin-4 induced leukocyte differentiation*. Universitas Turkuensis. Medica – Odontologica.

Andrade, BB, Teixeira, CR, Barral, A & Barral-netto M. 2005. Haematophagous Arthropod Saliva and Host Defense System: a tale of tear and blood. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 77(4): 665-693.

Bannister, Lawrence H & Sherman, I W. 2009. *Plasmodium*. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd:Chichester.

BAPPENAS. 2010. *Laporan Pencapaian Tujuan Pembangunan Milenium Di Indonesia*. Kementerian Perencanaan Pembangunan Nasional/Badan Perencanaan Pembangunan Nasional (BAPPENAS).

Berlin, Renteria, L., Thomas, P., Eisele, Keating, J., Mark A., & James, Wesson, D.M. 2010. Antibody Response Against Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae) Salivary Protein as a Measure of Mosquito Bite Exposure in Haiti. *Entomological Society of America*. 0022-2585/10/1156D1163\$04.00/0

BISHOP JV., 2006. *Salivary Gland Extracts of Culicoides Sonorensis Inhibit Murine Lymphocyte Proliferation And No Production By Macrophages*. Colorado

Cattopadhyay, R., & Kumar, S. 2009. Malaria vaccine: Lates Update and Challenges Ahead. *Indian Journal of Experimental Biology*. vol. 47. Pp 527-536

Chan M. 2009. *World Malaria Report*. World Health Organization

Coutinho-Abreu I.V & Ortigao MR. 2010. Transmission Blocking Vaccines To Control Insect-Borne Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 105(1): 1-12,

Depkes RI, 2008. *Pedoman Penatalaksanaan Malaria di Indonesia*. Direktur Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.

Dhar R & Kumar N, 2003. Role Of Mosquito Salivary Glands. *Current Science*, Vol. 85 (9).

Donovan M.J., Messmore, A.S., Scrafford, D.A., Sacks, D.L., Kamhawi, S., & Dowell M.A. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection with Malaria Parasites. *American Society for Microbiology* Vol. 75(5): 2523–2530

Endaryanto A., Harsono, A., *Prospek Probiotik Pencegahan Alergi Melalui Induksi Aktif Toleransi Imunologi*. Ilmu Kesehatan Anak . FK. Unair.

Fontaine A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier, C., & Almeras, L. 2011. Implication of Haematophagous Arthropod

- Salivary Proteins in Host-Vector Interactions. *Parasites & Vectors*. 4;187
- Gerberg ,E.J. 1970. *Mosquito Rearing and Experiment techniques*
- Harijanto P.N. 2000. *Malaria epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penangannya*. Jakarta:EGC
- James A. 2003. Blocking Malaria Parasite Invasion Of Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3817-3821 3817.
- Jones, K.. 2012. *Intra Peritoneal (IP) Injection In Rat and Mice SOP*. UBC Animal care Guidelines.
- Kemenkes RI, 2011. *Epidemiologi Malaria Di Indonesia*. Triwulan 1. Buletin Kesehatan Jendela Data dan Informasi Kesehatan..
- Kemenkes, RI,, 2011. *Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Buletin Triwulan 1.
- Kementrian Kesehatan RI. 2007. *Indonesia Health Profile 2005*. Jakarta. 351.770 212.
- Langhorne, J., 2005. *Immunology and Immunopathogenesis of malaria*. Springer-Verlag. Berlin. 72-152360.
- Lavazec, C. & Bourgouin, C. 2008. *Mosquito-based Transmission Blocking Vaccines For Interrupting Plasmodium Development*. *Microbes and Infection* 10. 845e849.
- Lingtom, Y.M., Harbach, R., Seng, C.M., Anthony, T.G., & Matusop, A., 2001. Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sundaicus* s.l. (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Systematic Entomology* 26, 357-366.
- Malaguarnera. L & Musumeci, S., 2002. The immune response to Plasmodium falciparum malaria. *The Lancet Infectious Diseases*. Vol 2.
- Markus, Neurath, Finotto, S. Laurih & Glimcher. 2002. The Role of Th1/Th2 Polarization in Mucosal Immunity. *Natural Medicine*. Vol. 8.
- Matththew. 2011. *Pro-inflamatori Cytokine Respon Against Plasmodium Falciparum- Induction, Dynamic And Protective Role Os Interferon-Gamma In Malaria*. Radboud University Nijmegen. Printed by Ipskamp Drukkers B.V., Enschede.
- Moll, K, Ljungstrom, I, Perlmann, HScherf, A & Wahlgren. 2008. *Methods in Malaria Research*. Virginia.
- Moorthy,VS., Michael F.G., Adrian,V.S.H. 2004. Malaria Vaccine Developments *Lancet Review*: 363: 150–56.
- Okie, S. 2005, Betting on a Malaria Vaccine.. *New England Journal Medicine* 353;18.
- Perlmann, H., Kumar S., Vinetz M. Josep., Marika, K., Luis, & M.,Perlmann, P. 1995. Cellular Mechanisms In The Immune Response To Malaria In Plasmodium vinckei-Infected Mice. *Infection and Immunity*. Vol. 63(10): 3987–3993.
- Perlmann, P & Troye M. 2002. *Malaria and immune system in human*. *Malaria Immunology*. Chem Immunol. Vol 80: 229–242.
- Ramirez, JL., Garver, LS. & Dimopoulos, G. 2009. Challenges and Approaches for Mosquito Targeted Malaria Control. *Curr Mol Med* .Vol.9(2):116-130.
- Reid, J.A. 1966. A Note On Anopheles Subpictus Grassl And Ludlow (Diptera : Culicidae). *J. Med. Ent.* Vol. 3(3-4): 327-331.
- Sharma S. & Phatak S. 2008. Malaria Vaccine A Current Perspective. *J Vector Borne Dis* 45, pp. 1–20.
- Smith, B., and Ceusters, W. *Malaria Diagnosis and the Plasmodium Life Cycle: the BFO Perspective*. University at Buffalo, NY, USA.
- Tatontos, E.Y., Inayati, N., & Ariami, P. 2009. Identifikasi Ulang Spesies Nyamuk Vektor Malaria Di Kabupaten Lombok Barat. *Jurnal Kesehatan Prima* Vol 3 (1).
- Taylor, 2008. *Evaluation of the Vaccine Potential of Malarial TCTP*. Tesis. School of Applied Science Science, Engineering and Technology Portfolio. RMIT University.
- Titus, R.G., Bishop, J.V. & Mejia, J.S. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for these Factors to Serve as Vaccine Targets to Prevent Pathogen Transmission. *Parasite immunology*, 2000:22: 319-331.
- Valenzuela J.G., Garfield, M., Rowton, E.D., & Van M. Pham,VM. 2004. Identification of The Most Abundant Secreted Proteins from The Salivary Glands of The Sand Fly Lutzomyia Longipalpis, Vector of Leishmania Chagasi. *The Journal of Experimental Biology* 207:3717-3729.
- Waitayakul, A., Somsri, S., Sattabongkot, J., Looareesuwan, Cui, L., & Udomsangpeth, R. 2006. Natural Human Respon To Saliva Gland Protein Of *Anopheles* Mosquitoes In Thailand. *Acta Tropica* 98: 66-73.
- Yoeli, M., Most, H., and Bone, G., 1965. *The natural of plasmodium berghei in the field and under experimental condition*. NIAID. 024-23.