

176

LIT

Salatiga

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER DALAM
KONFIRMASI RESERVOIR *JAPANESE*
ENCHEPHALITIS DI JAWA DAN BALI**



Penyusun :
Farida D. Handayani, S.Si, MS

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN R.I.**

SALATIGA

2011

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER DALAM
KONFIRMASI RESERVOIR *JAPANESE*
ENCEPHALITIS DI JAWA DAN BALI**



Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
PERPUSTAKAAN

Tanggal : _____
No. Induk : _____
No. Klass : 176
LIT
Salatiga

Penyusun :
Farida D. Handayani, S.Si, MS

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN R.I.
SALATIGA
2011**



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

SURAT KEPUTUSAN
KEPALA BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT
NOMOR : HK.00.07/VII/2974/2010

TENTANG

Penelitian dengan judul "Pendekatan Biologi Molekuler dalam Konfirmasi Reservoir
Japanese encephalitis di Jawa dan Bali"

MENIMBANG:

1. Bahwa dalam rangka peningkatan kinerja riset di lingkungan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang berfokus pada bidang prioritas teknologi kesehatan khususnya program pengendalian vektor dan reservoir penyakit, maka dipandang perlu dilakukan penelitian.
2. Bahwa mereka yang namanya tercantum dalam Surat Keputusan ini dipandang cakap untuk melaksanakan penelitian tersebut.

MENINGGAT:

1. Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1353/MENKES/PER/IX/2005 tertanggal 14 September 2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit.
2. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No. LB.02.05/VII/2905/2010 tertanggal 23 Desember 2010 dengan judul penelitian Pendekatan Biologi Molekuler dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese encephalitis* di Jawa dan Bali.
3. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2011 No. 0813/024-11.2.01/13/2011 tertanggal 20 Desember 2010.

MENETAPKAN:

Petama : Membentuk tim pelaksanaan penelitian dengan susunan sebagai berikut:

- a. Peneliti Pertama : Farida Dwi Handayani, S.Si, MS
(Ketua Pelaksana)
- b. Peneliti Madya : 1). Dra. Umi Widyastuti, M.Kes
2). Drs. Ristiyanto, M.Kes
- c. Pembantu Peneliti : 1). Heru Priyanto
2). Nofika Indriyati, AMKL
3). Widiratno Valentinus
- d. Sekretariat Penelitian : Fery Jelitawati
- e. Koordinator Penelitian: Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes

Kedua :

- Tim pelaksanaan penelitian bertugas:
- a. Melaksanakan penelitian sampai selesai dan menyerahkan laporan kepada Kepala menurut Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No. LB.02.05/VII/2905/2010 tertanggal 23 Desember 2010.
 - b. Membuat pertanggungjawaban keuangan menurut ketentuan yang berlaku.



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

- Ketiga : Semua pengeluaran untuk pelaksanaan Surat Keputusan ini dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2011 No. 0813/024-11.2.01/13/2011 tertanggal 20 Desember 2010.
- Keempat : Surat Keputusan ini berlaku mulai tanggal 3 Januari 2011 sampai 31 Desember 2011 dengan catatan segala sesuatu akan ditinjau kembali apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini peraturan yang berlaku.

Ditetapkan di : Salatiga
Pada tanggal : 31 Desember 2010

Kepala



Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
NIP 195406201981101002

Tembusan :

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan di Jakarta
2. Bendaharawan Rutin Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit di Salatiga
3. Yang bersangkutan



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

SURAT PERSETUJUAN PELAKSANAAN PENELITIAN
NO. LB. 02.05/VII/2905/2010

Persetujuan pelaksanaan penelitian ini diberikan atas dasar ketentuan yang diatur dalam pasal di bawah ini:

B A B I
I K H T I S A R

1. Judul penelitian : Pendekatan Biologi Molekuler dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese encephalitis* di Jawa dan Bali
2. Tujuan : Mengetahui atau mengkonfirmasi reservoir JE yang berperan di daerah endemis JE di Jawa dan Bali
3. Ketua Pelaksana : Farida Dwi Handayani, S.Si, MS
4. Waktu pelaksanaan : 3 Januari 2011 s/d 31 Desember 2011

B A B II
B I A Y A

1. Seluruh pembiayaan yang timbul sebagai akibat dari pelaksanaan kegiatan penelitian dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2011 Nomor 0813/024-11.2.01/13/2011 tertanggal 20 Desember 2010.
2. Biaya tersebut diperinci dalam pos pengeluaran sebagai berikut:

a. Belanja Bahan	: Rp	83.830.000,-
b. Honor yang terkait dengan output kegiatan	: Rp	18.970.000,-
c. Belanja Barang Non Operasional Lainnya	: Rp	14.700.000,-
d. Belanja Perjalanan Lainnya	: Rp	<u>132.500.000,-</u>
e. Jumlah seluruhnya	: Rp	250.000.000,-
3. Penyediaan biaya untuk keperluan penelitian tersebut akan diberikan secara bertahap dan merupakan uang yang harus dipertanggungjawabkan oleh Ketua Pelaksana. Cara pertanggungjawaban harus sesuai dengan peraturan yang berlaku dan atas petunjuk pelaksanaan yang diberikan oleh Kepala.

B A B III
P E L A K S A N A N

Mengenai pelaksanaan pembiayaan diatur sebagai berikut :

1. Ketua Pelaksana mengajukan Surat Permintaan Pembayaran kepada Kepala melalui Kepala Sub Bagian Tata Usaha.
2. Kepala memberikan persetujuan pembayaran setelah persyaratan yang dikaitkan dengan pengajuan surat permintaan pembayaran dipenuhi secara lengkap oleh Ketua Pelaksana.



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vip@litbang.depkes.go.id

B A B I V
P E N G A W A S A N

1. Pengawasan terhadap pelaksanaan penelitian Tahun 2011 dilakukan oleh Kepala selaku Penanggungjawab yang bertanggung jawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Pengawasan dapat dilakukan sewaktu-waktu dan Ketua Pelaksana wajib memberikan kesempatan serta memberikan keterangan yang diminta.
3. Apabila dipandang perlu, Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dapat melakukan atau menunjuk pejabat lain untuk melakukan pengawasan.

B A B V
P E L A P O R A N

1. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan pertanggungjawaban keuangan setiap 3 (tiga) bulan dan harus diterima oleh Kepala paling lambat tanggal 5 (lima), bulan berikutnya dan melaporkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan kemajuan penelitian setiap 3 (tiga) bulan dan sesuai dengan ketentuan pelaporan yang berlaku.
3. Ketua Pelaksana wajib membuat laporan akhir penelitian yang terdiri dari:
 - a. Laporan Administrasi
 - b. Laporan Hasil Penelitian
 - c. Abstrak Hasil Penelitian
 - d. *Executive Summary* (ringkasan untuk pengambilan keputusan pimpinan) dan paling lambat diserahkan pada Januari 2012.

B A B V I
P E R S Y A R A T A N L A I N

1. Segala penemuan dan hasil penelitian ini menjadi milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Hasil penelitian ini harus diterbitkan di dalam "Bulletin Penelitian Kesehatan", apabila naskah ilmiah hendak diajukan ke majalah lain, supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan dari Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
3. Apabila naskah ilmiah tersebut hendak diajukan di dalam suatu pertemuan ilmiah supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

B A B V I I
S A N K S I

1. Apabila laporan pertanggungjawaban keuangan dan laporan kemajuan penelitian tidak masuk pada waktu yang telah ditentukan, maka tidak akan diberikan uang muka pada bulan berikutnya.
2. Selama Ketua Pelaksana belum menyelesaikan laporan akhir, maka ia tidak akan dipertimbangkan menjadi Ketua Pelaksana untuk penelitian berikutnya.



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKI

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

B A B VIII
KETENTUAN PENUTUP

Apabila penyelesaian penelitian tidak dapat dilaksanakan pada waktunya karena suatu hal yang berada di luar kekuasaan Ketua Pelaksana, Kepala dapat mengusulkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan untuk meninjau kembali dan mempertimbangkan kemungkinan perpanjangannya.

23 Desember 2010

Ketua Pelaksana,

Farida Dwi Handayani, S.Si, MS
NIP 197809032003122001

Menerima dan menyetujui
Kepala,

Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
NIP-195406201981101002

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan laporan akhir penelitian dengan judul "Pendekatan Biologi Molekuler dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese encephalitis* di Jawa dan Bali". Penelitian ini sumber dana DIPA Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan tahun anggaran 2011, Laporan ini disusun sebagai salah satu pertanggungjawaban penulis atas penelitian yang telah dilakukan.

Penulis menyadari dalam penulisan dan pelaksanaan penelitian banyak kelemahan dan jauh dari sempurna, maka saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah memberikan fasilitas dan membantu dalam penelitian ini.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat menambah informasi dalam khasanah ilmu pengetahuan.

Salatiga, Desember 2011

Penulis

Farida D. Handayani

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai konfirmasi reservoir *Japanese encephalitis* di Jawa dan Bali. *Japanese encephalitis virus* (JEV) adalah kelompok family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. JEV ditularkan secara alami diantara burung-burung liar dan domestik serta babi dengan nyamuk vektor *Culex sp.* sebagai vektor. Babi di Jepang diketahui positif JEV secara serologi setiap tahunnya. Babi dianggap memiliki viremia tinggi terhadap JEV, sehingga babi menjadi amplifiser host atau inang penguat dalam siklus penularan JE. Oleh karena itu penting dilakukan surveilans babi maupun sapi untuk melihat sirkulasi dan status JEV. Penelitian dilakukan di Kota Solo, Jawa Tengah, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, dan Kabupaten Gianyar, Bali dengan melakukan pengambilan darah sapi maupun babi serta panangkapan nyamuk di malam hari termasuk koleksi jentik. Hasil menunjukkan bahwa pada sampel darah sapi dan sampel darah babi tidak ditemukan JEV tetapi positif *flavivirus*. Demikian pula dengan *Cx. vishnui* dan *Cx. salbatus* yang mengandung *flavivirus*. Dengan demikian metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) kurang tepat bila digunakan bukan untuk skrining KLB, tetapi *risk assessment* harus kontinyu dilakukan karena resiko kejadian JE berbeda di setiap wilayah. Surveilans pada manusia dan data penularan kasus confirm JE masih belum lengkap, sehingga perlu ada penelitian lanjutan mengenai konfirmasi reservoir JE.

Kata kunci: *Japanese encephalitis*, PCR, reservoir

SUSUNAN TIM PENELITI

No.	Kedudukan dalam Tim	N a m a
1	Ketua Pelaksana	Farida Dwi Handayani, S.Si, MS
2	Anggota	Dra. Umi Widyastuti, M.Kes Drs. Ristiyanto, M.Kes Heru P. Widiratno Novika
3	Koordinator	Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
4	Administrasi	Fery Jelitawati

DAFTAR ISI

	Halaman
SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN	ii
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vi
SUSUNAN TIM PENELITI	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GRAFIK/PETA/GAMBAR	x
I PENDAHULUAN	1
II TUJUAN DAN MANFAAT	5
2.1. TUJUAN	5
2.1.1. Tujuan Umum	5
2.1.2. Tujuan Khusus	5
2.2. MANFAAT	5
III METODE	6
3.1. Kerangka Konsep	6
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	7
3.2.1. Tempat Penelitian	7
3.2.2. Waktu Penelitian	7
A. Jenis Penelitian	7
B. Desain Penelitian	8
C. Populasi dan Sampel	8
D. Variabel	8
E. Cara Pengumpulan Data	8
F. Bahan Dan Prosedur Kerja	9
G. Analisis Data	15
H. Definisi Operasional	15
IV. HASIL PENELITIAN	16
4.1. Pengambilan Sampel di Kabupaten Gianyar, Bali	16
4.2. Pengambilan Sampel di Kotamadya Surakarta	19
4.3. Pengambilan Sampel di Kabupaten Pasuruan	20
4.1. Hasil Uji Molekuler PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	21
V. PEMBAHASAN	24
VI KESIMPULAN DAN SARAN	25
UCAPAN TERIMA KASIH	25
DAFTAR KEPUSTAKAAN	26
LEMBAR PENGESAHAN	28
LEMBAR PERSETUJUAN	29

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sejarah ditemukannya virus <i>Japanese encephalitis</i> di dunia	1
Tabel 2. Sampel darah ternak, jenis nyamuk dan koleksi larva di desa Tulikup dan desa Lebih, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Propinsi Bali	18
Tabel 3. Data sampel pengujian PCR konfirmasi reservoir <i>Japanese encephalitis</i>	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka konsep terjadinya penularan dan penanggulangan JE oleh Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur	6
Gambar 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di desa Tulikup.....	17
Gambar 3. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Pantai Lebih.....	19
Gambar 4. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Kota Surakarta.....	20
Gambar 5. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Kabupaten Pasuruan	21
Gambar 6. Hasil Elektroforesis cDNA tersangka JE pada sapi dari daerah kota Solo dan nyamuk dari daerah Pasuruan dan Solo.....	23
Gambar 7. Hasil Elektroforesis cDNA tersangka JE pada sapi, babi dan nyamuk yang tertangkap dari desa Tulikup dan desa Lebih, Bali	23

I. PENDAHULUAN

Japanese encephalitis (JE) adalah penyakit menular pada hewan dan manusia. yang disebabkan oleh virus dari kelompok *flavivirus*, family *Falviviriidae* (Vaughn *at al.* 1992; Johansen, *at. al.* 1996). Virus ini dapat menyerang berbagai jenis hewan. Tetapi kasus klinis umumnya terjadi pada babi dan kuda dengan gejala demam, tremor, paralisa dan diakhiri dengan kematian. Penyakit yang bersifat zoonotik ini diyakini bertanggung jawab terhadap terjadinya lebih dari 45.000 kasus dan sepuluh ribu lebih di antaranya terjadi kematian terutama pada anak-anak setiap tahunnya di Asia Timur, Selatan dan Asia Tenggara (Tsai and Yu, 1994, Andrew, F.*at. al.* 1996). Kejadian penyakit JE berlangsung endemik di beberapa Negara di Asia. Secara geografis sebarannya meliputi Jepang, Korea, Rusia, China, Taiwan, Philipina, India, Nepal, Sri Lanka, Malaysia, Singapura dan Indonesia. Sejarah berjangkitnya JE disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sejarah ditemukannya virus *Japanese encephalitis* di dunia

1870	Epidemik "Summer Encephalitis" di Jepang
1924	Epidemik meluas di Jepang dengan jumlah kasus 6,125 orang; 3,797 dinyatakan meninggal
1924	Mengisolasi virus di kelinci dari jaringan otak manusia
1933	Virus pertama kali diisolasi dari otak manusia di Jepang
1934	Melakukan penelitian encephalitis dengan menggunakan isolasi virus pada kera
1935	Pertamakalinya mengisolasi virus dari kasus fatal di manusia
1938	Mengisolasi virus dari <i>Culex tritaeniorhynchus</i>
1940-1978	JE meluas dengan epidemic di Cina, Korea dan India
1930an	Pertama kali vaksin dikembangkan dari otak mencit
1954	Perbaikan vaksin dari otak mencit dikembangkan
1954	Vaksinasi JE dilisensikan
1954	JE ditemukan juga menginfeksi babi, kerbau, anjing dan domba

Sejak virus penyebab penyakit ini pertama kali dapat diisolasi dari vektor nyamuk pada tahun 1974 di pulau Jawa, kemudian diketahui menyebar luas di Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan Bali. Selanjutnya ditemukan di Lombok tahun 1978, di Flores tahun 1981 dan tahun 1989 dilaporkan terjadi di Irian Jaya (Kanamitsu *et al.* 1979;

(Mackenzie, 1996). Kasus klinis pernah pula dilaporkan terjadi pada seorang wisatawan yang menderita radang otak (*encephalitis*) setelah berlibur selama 2 minggu di Bali pada tahun 1989 dan secara serologis positif menderita penyakit JE. Demikian juga kejadian penyakit JE pada hewan di Bali dilaporkan telah tersebar luas.

Tahun 2005-2006 telah dilaporkan adanya tersangka kasus JE dari Kota Surabaya dan Kabupaten Jombang yang cukup tinggi. Rumah sakit Dr. Sutomo melaporkan sebanyak 129 kasus sedangkan Rumah Sakit Jombang sebanyak 45 kasus. Dari sejumlah kasus yang dilaporkan 39 orang meninggal, 30 cacat, 39 sakit dan 66 sehat². Mencermati tingginya kasus yang menimbulkan kematian penting dilakukan suatu assesment tentang vektor dan reservoir JE yang berperan di daerah endemis JE. Informasi yang di dapatkan pada tahun 2009, beberapa wilayah di Jawa yaitu di Solo dan Surabaya, dan juga Bali masih ditemukan kasus JE.

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Salatiga telah melakukan penelitian tentang konfirmasi vektor JE di Kota Surabaya Jawa Timur. Belum dilakukan lebih lanjut tentang konfirmasi reservoir dalam penularan JE di daerah endemis tersebut. Konfirmasi reservoir JE akan dilakukan menggunakan metode molekuler yaitu *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Dengan diketahuinya vektor dan reservoir JE yang berperan di Kota Surabaya dan daerah endemis lain di Jawa dan Bali dapat merupakan informasi yang bermanfaat bagi program untuk melakukan tindakan pengendalian maupun mencegah makin menjalarnya JE di daerah tersebut.

Etiologi Japanese B Encephalitis

Japanese B Encephalitis (J.E.) merupakan penyakit radang otak yang disebabkan oleh *Arthropod-borne virus* dari Grup B yang disebut virus *Japanese Encephalitis* dari famili *Flaviviridae* (dahulu *Togaviridae*). *Japanese Encephalitis* telah lama menjangkiti wilayah Asia Tenggara dan Pasifik Barat. Penyakit ini di negara Jepang, Korea dan Thailand banyak menyerang orang dewasa, terutama pada musim panas dengan angka kematian (CFR) sebesar 8,5 %. Sedangkan di Malaysia, Thailand, Philipina dan Singapura banyak menyerang golongan anak dengan angka kematian (CFR) sebesar 50,0 %. Wilayah Indonesia penyakit JE banyak menyerang golongan umur dibawah 10 tahun dan menyebabkan angka kematian berkisar 10-53 %^{1,3}. Nyamuk yang berperan sebagai vektor adalah *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus* dan *Cx. vishnui*. Mamalia yang dilaporkan sebagai reservoir adalah Babi atau dikenal sebagai amplifying host, kemungkinan burung

dan bangau⁴. Gejala klinik J.E. sulit dibedakan dengan penyakit *encephalitis* lainnya, sehingga diagnosis klinik perlu ditunjang dengan pemeriksaan serologi atau isolasi. Hal ini menyebabkan suatu hambatan untuk mengetahui besarnya jumlah kasus J.E. di Indonesia secara pasti⁵. Pada awalnya *Japanese Encephalitis* (J.E.) di Indonesia dilaporkan pada tahun 1995 di Propinsi Bali. Pada kurun waktu tahun 1997-1982 dilaporkan kasus J.E. dari berbagai Rumah Sakit di Indonesia¹. *Japanese B encephalitis* merupakan penyakit yang bersifat zoonosis dan ditularkan melalui gigitan nyamuk. Virus J.E pertama kali diisolasi dari nyamuk *Culex tritaeniorhynchus* tahun 1972, sedangkan Van Peenen, dkk pada tahun yang sama mengisolasi virus J.E. dari Babi di Kapuk Jakarta Barat¹. Tahun 2005-2006 telah dilaporkan adanya tersangka kasus JE dari Kota Surabaya dan Kabupaten Jombang yang cukup tinggi². Rumah sakit Dr. Sutomo melaporkan sebanyak 129 kasus sedangkan Rumah Sakit Jombang sebanyak 45 kasus. Dari sejumlah kasus yang dilaporkan 39 orang meninggal, 30 cacat, 39 sakit dan 66 sehat². Mencermati tingginya kasus yang menimbulkan kematian penting dilakukan suatu assesment tentang vektor dan reservoir J.E. yang berperan di daerah Kota Surabaya dan Kabupaten Jombang. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Salatiga akan melakukan kajian tentang konfirmasi vektor dan reservoir J.E. di Kota Surabaya dan Kabupaten Jombang Jawa Timur. Mempertimbangkan tingginya kasus kemungkinan tidak hanya *Cx. tritaeniorhynchus* dan Babi saja yang berperan sebagai vektor dan reservoir J.E. di kedua daerah tersebut. Konfirmasi vektor dan reservoir J.E. akan digunakan metode secara molekuler yaitu *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)^{6,7} dan *Hemaglutinasi Inhibition Tes* (HI)^{8,9}. Dengan diketahuinya vektor dan reservoir yang berperan di kota Surabaya dan Kabupaten Jombang serat Solo dan juga Bali dapat merupakan informasi yang bermanfaat bagi program untuk melakukan suatu tindakan pengendalian maupun mencegah smakin menjalarnya JE di kedua daerah tersebut.

Siklus enzootik

Virus J.E. secara alami ditularkan oleh burung liar dan juga domestik serta babi dengan perantara nyamuk *Culex*. Nyamuk terpenting dalam penularannya pada manusia adalah *Culex tritaeniorhynchus*, yang hidup di kolam perairan menggenang seperti daerah rawa¹⁴. Walaupun banyak hewan dapat terinfeksi virus ini, hanya pada hewan yang menunjukkan viraemia tinggi yang dapat menularkan dalam siklus alami. Selain menularkan dan mengembangkan virus J.E. dalam suatu daerah tertentu, burung juga berperan dalam penyebaran virus J.E. ke daerah lain atau area geografis yang baru. Babi

adalah host terpenting untuk menularkan ke manusia. Keberadaannya sangat dekat dengan manusia, memiliki jenis dan waktu viraemia yang tinggi, dan berkembang biak dengan cepat, sehingga menyediakan perindukan baru bagi virus untuk berkembang. Virus tidak menjadikan babi dan binatang reservoir lain menderita J.E., tetapi aborsi dapat terjadi pada hewan bunting.

Diagnosis laboratorium

Diagnosis laboratorium untuk J.E. sangat penting dalam mendapatkan diagnosis yang akurat dan kegiatan surveilans. Diagnosis J.E. yang biasa dilakukan adalah secara serologi menggunakan IgM-capture enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Pada umumnya pasien akan memiliki antibodi pada saat di RS ataupun beberapa hari kemudian. Cerebrospinal Fluid (CSF) merupakan sampel yang paling baik untuk diagnosis J.E. karena jika anti J.E. IgM dideteksi di CFS artinya mengkonfirmasi bahwa infeksi J.E. telah terjadi pada sistem syaraf pusat. Berbeda dengan infeksi asimtomatik oleh J.E. ataupun vaksinasi dengan virus J.E. yang telah dilemahkan, yang akan menyebabkan timbulnya antibody pada serum tetapi tidak di CSF. Akan tetapi terkadang sampel CSF diambil terlalu dini sehingga ketika diuji menggunakan IgM tidak didapati infeksi virus pada CSF. Polymerase chain reaction (PCR) telah dikembangkan juga dan dimungkinkan akan memegang peranan penting dalam diagnosis J.E. dimasa yang akan datang.

II. TUJUAN DAN MANFAAT

2.1. TUJUAN

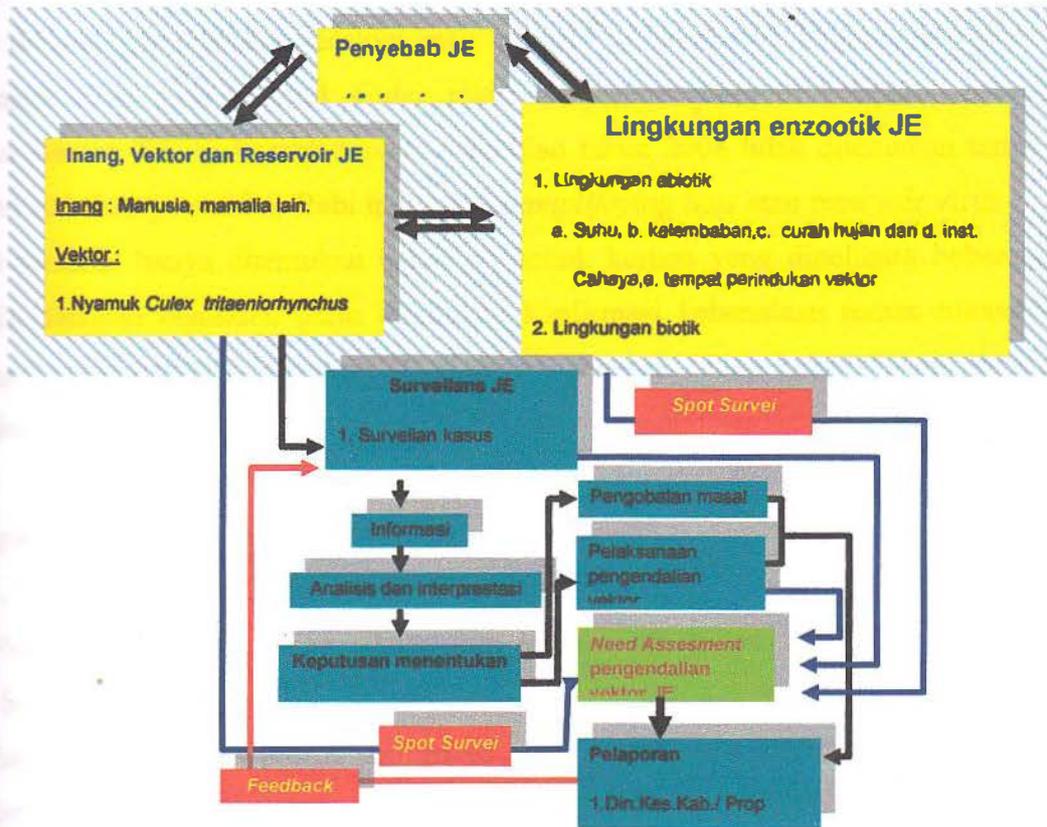
- 2.1.1. **Tujuan Umum** : Mencegah terjadinya peningkatan kasus atau adanya Kejadian Luar Biasa (KLB) JE di Kota Surabaya Jawa Timur dan Bali.
- 2.1.2. **Tujuan Khusus** : Mengetahui/konfirmasi jenis mamalia apa saja yang dapat berperan sebagai vektor J.E. di Kota Surabaya Jawa Timur dan Bali.

2.2. MANFAAT

1. Informasi ini akan bermanfaat bagi program untuk memperbaiki dan menambahkan kebijakan pengendalian J.E.
2. Mengetahui secara tepat vektor dan reservoir J.E. yang berperan sehingga dapat digunakan untuk mencegah dan menjalarnya/ meluasnya J.E.

III. METODE

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 1. Kerangka konsep terjadinya penularan dan penanggulangan JE oleh Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur

Siklus penularan J.E. tidak bisa lepas kaitannya dari segitiga epidemiologi yaitu: *agent*, *host*, dan lingkungan. Keberadaan *agent/virus* J.E. di lingkungan melibatkan *reservoir* sebagai *amplifying host*. Lingkungan abiotik yang sangat menunjang untuk berjangkitnya JE adalah temperatur/suhu, kelembaban, curah hujan, intensitas cahaya dan ~~tempat~~ tempat perindukan vektor. Sedangkan lingkungan biotik yang kemungkinan menunjang adanya kasus JE adalah keberadaan hewan temak/mamalia besar yang dapat berperan sebagai *amplifying host* atau *reservoir*. Kondisi sosial budaya masyarakat juga dapat ikut berperan dalam penyediaan habitat nyamuk vektor serta temak piaraan sebagai ~~reservoir~~ *reservoir*. Perilaku masyarakat juga dapat menunjang terjadinya penularan, terutama

asyarakat yang beraktivitas pada malam hari yang bertepatan dengan aktivitas nyamuk menggigit mencari sumber darah. Mamalia yang dilaporkan sebagai reservoir adalah Babi, kemungkinan burung dan bangau, kelelawar serta mamalia besar lain⁴. Gejala klinik JE sulit dibedakan dengan penyakit encephalitis lainnya, sehingga diagnosis klinik perlu ditunjang dengan pemeriksaan serologi atau isolasi¹⁰. Mencermati lingkungan tempat ditemukannya virus pada nyamuk *Culex tritaeniorhynchus* yaitu di wilayah Kedurus Kecamatan Karang Pilang Surabaya pada penelitian tahun 2008 tidak ditemukan ternak babi. Menurut beberapa sumber Babi merupakan *amplifying host* atau reservoir virus JE. Di daerah tersebut hanya ditemukan beberapa ternak kerbau yang dipelihara beberapa rumah saja. Dengan demikian perlu dilakukan konfirmasi keberadaan ternak mamalia besar yang berperan sebagai reservoir JE di daerah tersebut dalam kaitannya membantu program dalam surveilans .

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada kelurahan endemis JE di kota Solo, Jawa Tengah, kota Surabaya dengan memilih Kecamatan Kenjeran dan Kecamatan Karang Pilang, Surabaya berdasar hasil positif konfirmasi vektor dalam penelitian sebelumnya oleh Widarti, dkk pada 2008. Dilakukan pula konfirmasi reservoir di daerah Bali.

Kajian konfirmasi vektor JE (nyamuk spesies *Culex*) pada tahun 2008 dilakukan di lokasi sekitar rumah kasus adalah : (1). Sidotopo Wetan III No. 28 A, Kecamatan Kenjeran, Surabaya. (2). Desa Kedurus IV C No. 30, Kecamatan Karang Pilang, Surabaya. Daerah penelitian tersebut digunakan sebagai daerah penangkapan nyamuk yang diduga sebagai vektor (semua nyamuk spesies *culex*) ditangkap. Penangkapan nyamuk dilakkan pada bulan Mei-Nopember 2008.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian pendekatan biologi molekuler dalam konfirmasi J.E. ini akan dilakukan pada bulan Januari - Desember 2011.

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah peneitian non-experimental, karena tidak dilakukan intervensi dan perlakuan terhadap obyek penelitian. Penelitian memotret sekali

pengamatan pada suatu saat tertentu terhadap objek yang berubah, berkembang atau tumbuh menurut waktu.

B. Desain Penelitian

Kajian ini merupakan penelitian diskriptif eksploratif dalam rangka mengetahui adanya reservoir dalam penularan J.E. sekaligus dengan mencari kembali vektor dalam siklus penularan penyakit ini serta mempelajari hubungan antara faktor-faktor penyebab meningkatnya kasus J.E. yang terjadi.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Satuan.

Populasi pada penelitian ini adalah mamalia/tersangka reservoir JE di Jawa dan Bali.

2. Unit Analisis.

Unit analisis adalah individu reservoir JE di habitat yang ada di daerah penelitian.

D. Variabel

Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah virus JE, yaitu virus *Japanese Encephalitis* dari famili *Flaviviridae*.

Variabel terikat

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jenis reservoir JE di wilayah Solo, Surabaya dan Bali.

Variabel luar yang tidak terkontrol

Adalah beberapa variabel perancu yang pada penelitian ini tidak dapat dikendalikan meliputi temperatur, kelembaban, faktor genetik dan biologi reservoir.

E. Cara Pengumpulan Data

Penentuan endemisitas J.E., data ternak dan pemilihan lokasi serta data-data pendukung di daerah penelitian dilakukan dengan cara pencarian data sekunder dari Dinas Kesehatan dan Dinas Peternakan daerah penelitian. Sedangkan data primer untuk memperoleh konfirmasi reservoir J.E. akan dilakukan dengan cara:

a. Identifikasi reservoir JE.

Jenis mamalia di sekitar rumah kasus JE dan di daerah endemis akan diidentifikasi untuk selanjutnya diambil specimen darahnya. Identifikasi dilakukan oleh tim peneliti B2P2VRP didampingi tim dari Dinas Kesehatan dan Dinas Peternakan setempat. Akan dilakukan pula penangkapan nyamuk yang istirahat di dalam kandang dan di dalam rumah dilakukan pada kandang ternak milik penduduk yang terkena kasus JE untuk dikonfirmasi keberadaan virus JE sebagai pembanding. Sedangkan larva survei dilakukan di seluruh tempat penampungan air di rumah penduduk pada pagi hari.

b. Konfirmasi reservoir JE dilakukan dua metode, yaitu dengan metode *gold standard* HI (*Haemagglutination inhibition*) dan metode biologi molekular dengan mengisolasi RNA virus untuk selanjutnya digandakan dengan metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT PCR)*. Setelah selesai PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis dan kemudian dilihat pada Geldoc (*Gel Documentation*) untuk mengetahui apakah positif/negatif.

c. Pemetaan kasus, vektor dan reservoir J.E.

Untuk pemetaan kasus JE dan penyebaran vektor dan reservoir JE digunakan analisis spatial dengan pemanfaatan sistem informasi geografis meliputi data kasus JE dari Puskesmas dan Dinas Kesehatan daerah penelitian setempat, dari penelitian data distribusi vektor dan reservoir J.E.

F. Baban dan Prosedur Kerja

a. Identifikasi dan pengambilan sampel darah reservoir J.E.

Identifikasi reservoir J.E. dilakukan pada setiap mamalia besar atau ternak yang terdapat di daerah endemis sekitar lokasi kasus J.E baik yang di dalam kandang atau yang tidak dalam kandang. Hasil pengamatan dan identifikasi dimasukkan ke dalam tabel/formulir reservoir.

Pengambilan darah reservoir

Alat:

- *Sprit disposable* 10 ml
- Tabung plastik
- *Torniquet* (alat ikat pembendungan)

- *Microtube* (tabung mikro) 1 ml untuk penyimpanan serum
- *Sentrifuge* (alat untuk memisahkan serum)
- *Aluminium foil* (kertas aluminium)

Bahan:

- Antikoagulan EDTA
- Kapas alkohol 70%
- Air bebas ion dan larutan HNO_3

Cara:

- Pengambilan darah dilakukan antara pukul 9.00 – 12.00
- Bersihkan kulit di atas lokasi tusuk dengan alkohol 70% dan biarkan hingga mengering.
- Lokasi penusukan harus bebas dari luka dan bekas luka/sikatrik.
- Darah diambil dari vena mediana cubiti.
- Lokasi penusukan di desinfeksi dengan kapas alkohol 70% dengan cara berputar dari dalam keluar.
- *S spuit* disiapkan dengan memeriksa jarum dan penutupnya.
- Setelah itu vena mediana cubiti ditusuk dengan posisi sudut 45 derajat dengan jarum menghadap ke atas.
- Darah dibiarkan mengalir ke dalam jarum kemudian jarum diputar menghadap ke bawah, dan dihisap sebanyak 10 ml.
- Tempat bekas penusukan ditekan dengan kapas alkohol sampai tidak keluar darah lagi.
- Setelah itu bekas tusukan ditutup dengan plester.

Pemisahan sera:

- Darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse dan diputar dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit sampai serum terpisah dengan baik.
- Serum yang diperoleh rata-rata 5 ml kemudian dipisahkan ke dalam tabung reaksi yang dibungkus dengan aluminium dan dibagi ke dalam beberapa tabung mikro dengan tutup yang tidak mengandung karet.
- Masing-masing tabung diberi label sesuai formulir.
- Semua serum disimpan dalam *deep freezer* pada suhu -80°C sebelum dinalisis.

b. Konfirmasi reservoir J.E

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah untuk PCR RNA virus adalah QIAamp Viral RNA Mini Kit, 50 sampel; *grinding buffer*, potasium asetat 8 M ; etanol 70 % ; etanol absolut 100 %; *TE buffer*; 10x dapar PCR; $MgCl_2$ 50 mM; dNTP 10 mM; enzim DNA polimerase *Taq* [invitrogen]; bubuk agarosa [sigma]; tris-acetate EDTA (TAE) 0,5x; dapar loading 6x; etidium bromida (EtBr) 10 mg/ml; ladder marker 100 pb [New England Biolabs]; bahan-bahan dalam Wizard[®] SV Gel dan PCR Clean-Up System [Promega], yang terdiri dari *membrane binding solution*, *membrane wash solution* dan *nuclease-free water*, BigDye[™] terminator v3.1 *Cycle Sequencing* [Applied Biosystems] yang dilengkapi dengan DNA polimerase [AmpliTaq[®]]; EDTA 125 mM; sodium asetat 3 M (pH 5,2); enzim restriksi *Apo I*; *Tsp 5091*; gel agarosa 3,2 %; dan akuabides; pisu; es batu; parafilm [Pechiney]; sarung tangan karet [Sensi[®]]; plastik berpekat dan aluminium foil [KlinPak].

1. Isolasi RNA virus dengan metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT PCR).

Bahan untuk isolasi virus digunakan QIAGEN. Serum darah hasil pengambilan dari lapangan disimpan pada suhu $-70^{\circ}C$. Pada sampel ditambahkan 310 μg AVE dan 310 μl Buffer AVE. Campuran tersebut kemudian diambil sebanyak 560 μl dan 140 μl RNA solution. Kemudian campuran tersebut divortex selama 15 detik dan diincubasi pada suhu kamar ($15-25^{\circ}C$) selama 10 menit. Setelah diinkubasi kemudian dicentrifuge 8000 rpm selama 15 detik. Campuran ditambahkan 560 μl etanol absolut dan divortex 15 detik. Diambil Sebanyak 630 ml Qiagen dan dimasukkan ke dalam Qia mini Spin column. Selanjutnya dicentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. Kedalamnya kemudian ditambahkan 500 μl buffer AW 1 kemudian dicentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 500 μl buffer AW 2 diceentrifuge full speed (12.000-14.000) rpm selama 3 menit. Kemudian dicentrifuge lagi selama 3 menit 13.000 rpm. Tambahkan buffer AVE 60 μl dengan cara diteteskan ditengah. Didiamkan dalam temperatur kamar selama 1 menit dan dicentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. Diatas esdilakukan penambahan enzin transkriptase. Kedalam tiap-tiap sampel ditambahkan campuran bahan kimia sebanyak 20 μl (10 x RT

Buffer, 10 unit Murin inhibitor 1 μ l, Oligo dT (150 μ g/ μ l) sebanyak 1 μ l), dNTP 10 mM 2 μ l, 10 unit AMV (RT) 1 μ l, ddH₂O 2 μ l dan primer 1 μ l. Campuran tersebut diincubasi pada suhu 42 ° C selama 1 jam. Sampel serum 1-20 ditambahkan primer JE dan sampel 21-40 dengan primer Universal.

2. *Polymerase Chain Reaction* RNA Virus

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan (amplifikasi) secara eksponensial suatu sekuen nucleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Pada saat melakukan PCR virus diperlukan enzim rever-transkriptase untuk mengubah inti RNA virus menjadi DNA sehingga mudah divisualisasi dan juga primer. Primer adalah suatu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. (Tri Wibowo Yuwono, 2006). Primer yang digunakan untuk PCR virus JE adalah Primer JEV.MF dan JEV.MR. Sebelum dilakukan PCR, komponen-komponen pereaksi, yaitu 10 x PCR buffer 2,5 ; MgCl₂ 50mM 1,5 ml; dNTP 10 mM 0,5 ml; primer JEV.MF 0,25; Primer JEV.MR 0,25 ml, enzim DNA polimerase *Taq* 0,25 m ; ddH₂O; dan sampel DNA dicampur terlebih dahulu dalam tabung mikrosentrifus 0,2 ml. Setelah pembuatan campuran pereaksi PCR selesai, tabung dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler*. Setelah selesai PCR kemudian divisualisasi dengan melakukan elektroforesis dan kemudian dilihat pada Gel Documentasi.

3. Pemetaan kasus dan reservoir J.E.

Pemetaan kasus J.E. dilakukan dengan observasi dan orientasi seluruh daerah penelitian dengan berjalan kaki, mencatat titik ordinat objek (rumah dengan positif kasus dan kandang) menggunakan GPS (*Geographical Position System*). Data yang diperoleh diolah dengan pemanfaatan Sistem Informasi Geografis (SIG) Arc. View V.9.

Analisis spasial dengan pemanfaatan sistem informasi geografis meliputi data kasus J.E. dari Puskesmas dan Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota, data temak dari Dinas peternakan setempat.

1). Alat-alat pemetaan

a. GPS (*Global Positioning System*) adalah sistem radio navigasi dan penentu posisi dengan menggunakan satelit ruang dimiliki dan dikelola oleh Amerika Serikat. Sistem yang terdiri atas 24 satelit ini dapat digunakan oleh banyak orang sekaligus dalam segala cuaca, serta didesain untuk memberikan posisi dan kecepatan tiga dimensi yang teliti dan juga informasi mengenai waktu secara kontinyu di seluruh dunia.⁶

b. Program Arc View V 3.2

Arc View merupakan salah satu sistem operasi komputer untuk visualisasi dan manipulasi informasi. Arc View dirancang untuk pemetaan, sehingga sistem ini secara otomatis mengubah data bentuk kualitatif dan kuantitatif menjadi database bereferensi geografis.⁷ Database bereferensi geografis merupakan database yang berisi informasi. Database ini berisi 2 jenis informasi yaitu data spasial dan referensi geografis. Data spasial adalah data data yang dapat dipetakan dan mempunyai lokasi pada sistem proyeksi tertentu (misal Lintang, bujur; x,y) atau alamat, sedangkan data referensi geografis biasanya berupa nama dan atau kode propinsi, kabupaten atau kelurahanyang spesifik dalam suatu negara⁸.

2). Alat tulis dan formulir

Alat tulis yang dibawa dalam pemetaan perindukan vektor adalah alat pensil, penghapus dan formulir GPS yang telah ditentukan.

Cara Kerja

1). Metode penentuan titik koordinat tempat kasus J.E.

Dalam menentukan titik koordinat tempat rumah kasus J.E menggunakan metode *Stop And Go* yaitu titik-titik yang akan ditentukan posisinya tidak bergerak (rumah dan perindukan nyamuk), sedangkan *receiver* GPS bergerak dari titik ke titik dan pada setiap titiknya *receiver* GPS tersebut berdiam beberapa saat, sebelum bergerak lagi ke titik berikutnya.

2). Penentuan titik koordinat dengan GPS (merk *Garmin GPS 12XL*).

a. Saat penjelajahan wilayah, pada rumah kasus J.E. atau kandang yang telah ditentukan berhenti dan mengaktifkan alat GPS sampai layer GPS menampilkan halaman POSITION.

- b. Tombol Mark pada GPS ditekan maka akan berubah menjadi layar MARK POSITION, kemudian melihat titik koordinat pada layar GPS yang tertulis pada layar posisi, yaitu S (*South* : lintang Selatan) dan E (*East* : Bujur Timur), misalnya S : 7° 27' 14'' dan E : 109° 39' 09'' dan titik koordinat tersebut ditulis dalam formulir GPS yang telah disediakan.
 - c. Setelah mencatat titik koordinat, kemudian berjalan ke titik berikutnya (rumah atau kandang berikutnya) dan melakukan hal seperti pada butir a dan b. Aktivitas ini dilakukan sampai seluruh rumah atau kandang di daerah penelitian selesai dicatat titik koordinatnya.
- 3). Pengelolaan data GPS dan pembuatan peta.
- a. Data titik koordinat yang telah dicatat dalam formulir GPS diolah dalam database dengan menggunakan program Microsoft Excel 97 dan disimpan dalam file yang ber-*extension* .dbf atau .txt.
 - b. Database titik koordinat dikelompokkan menurut tipe yaitu, tabel tipe kelompok rumah, tempat ibadah, sekolah, rumah JMB, Balai Desa, pasar, kandang, sungai, dan tataguna lahan.
 - c. Tabel kelompok titik koordinat tersebut kemudian dimasukkan dalam Program Arc View V.3.2 dengan cara mengaktifkan *View/Add Event Theme* dan memasukkan Garis bujur (koordinat bisang X) pada kotak *Lon* dan Garis Lintang (koordinat bidang Y) pada kotak *Lat* dengan menekan perintah OK pada kotak dialog *Add Event Theme* maka Arc View akan menampilkan letak titik koordinat sebagai peta pada layar komputer. Untuk kelompok rumah (rumah kasus dan tidak) ditampilkan oleh Arc View berupa titik (*point*) dengan warna yang berbeda demikian pula untuk sekolah, rumah kasus J.E., pasar, Balai Desa, dan tempat ibadah berupa titik-titik yang warnanya berlainan antara tipe satu dengan tipe lainnya. Titik tipe sungai dan jalan dirancang dalam ArcView sebagai garis (*line*) dan tataguna lahan dirancang dalam ArcView sebagai bidang (*polygon*). Ketiga kelompok tipe tersebut dapat disajikan bersama-sama dalam keterpaduan warna yang telah ditemukan.
 - d. Peta yang telah dibuat di ArcView ditransfer ke program aplikasi lain seperti di MS Word, Power Point dan lain-lain untuk laporan atau untuk seminar.

G. Analisis Data

Data yang dikumpulkan dianalisa secara deskriptif untuk menjelaskan input, proses dan output dari program pengendalian JE di daerah penelitian. Untuk mengetahui penyebaran vektor dan reservoir JE terhadap kasus JE dianalisa kualitatif.

H. Definisi Operasional

- a. Kasus JE (*Japanese B Encephalitis*) adalah adanya orang yang menderita Japanese B Encephalitis setelah dikonfirmasi oleh dokter baik dari Puskesmas maupun Rumah Sakit serta isolasi virus dari darah penderita, skala nominal.
- b. Kejadian Luar Biasa (KLB) adalah ditemukannya kasus JE yang meningkat di suatu daerah dan telah ditetapkan oleh instansi yang berwenang, skala nominal
- c. Penyelidikan Epidemiologi adalah : kegiatan yang mengamati tentang kejadian suatu penyakit di suatu daerah yang menyangkut siapa penderitanya, dimana terjadinya dan mengapa bisa terjadi, skala ratio.
- d. Konfirmasi reservoir adalah salah satu cara menentukan populasi mamalia atau reservoir lain sebagai reservoir J.E yang mengandung virus J.E. dan tidak dapat menularkan penyakit, skala nominal.

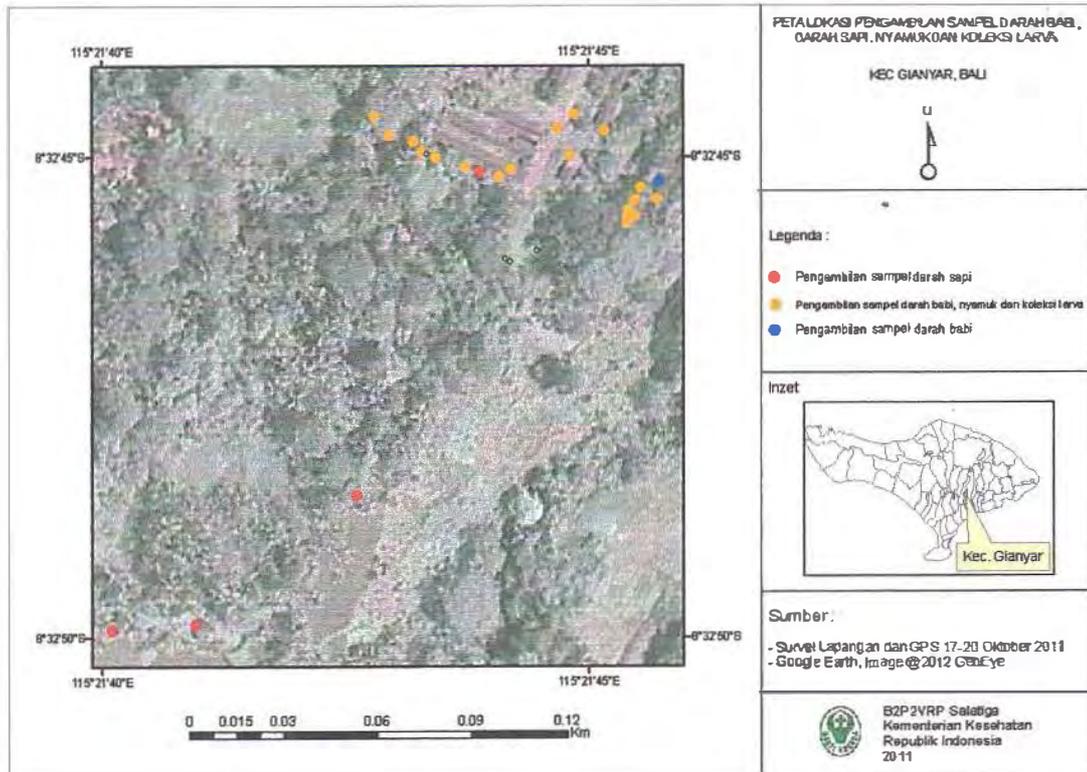
IV. HASIL PENELITIAN

Penelitian mengenai konfirmasi reservoir Japanese encephalitis (JE) dengan metode biologi molekuler dilakukan dengan beberapa kegiatan, yaitu pengambilan darah ternak atau hewan mamalia besar di sekitar kasus, penangkapan nyamuk dan koleksi jentik, serta pemetaan kasus. Lokasi penelitian yang terpilih adalah Kabupaten Gianyar, Bali; Kecamatan Jebres, Kotamadya Surakarta; dan Kecamatan Lekok, Kabupaten Pasuruan. Ketiga daerah tersebut diketahui pernah dilaporkan kasus meningitis yang mengarah ke positif JE.,

4.1. Pengambilan sampel di Kabupaten Gianyar, Bali

Pengambilan sampel di Bali dilakukan di dua tempat yang masuk dalam wilayah Kecamatan Gianyar. Kedua tempat tersebut adalah pantai lebih dan desa Tulikup. Sampel yang diambil di pantai Lebih adalah sampel darah babi, koleksi larva dan nyamuk. Lokasi pengambilan sampel di Tulikup dapat dilihat pada gambar 1. Sedangkan sampel yang diambil di desa Lebih dapat dilihat pada gambar 2.

Hasil pengambilan sampel darah di Desa Tulikup diperoleh 15 sampel darah babi dan 5 sampel darah sapi. Sedangkan hasil penangkapan nyamuk di Desa Tulikup diperoleh spesies *Anopheles vagus* 116 ekor dan *Culex tritaeniorhynchus* 143 ekor. Hasil survey larva diperoleh spesies *An. vagus* 5 ekor (jantan), *Cx. tritaeniorhynchus* 21 ekor (betina) dan 19 ekor (jantan), ditemukan pula *Cx. quinquefasciatus* 6 ekor (betina) dan 5 ekor (jantan).



Gambar 2. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di desa Tulikup

Di lokasi yang berbeda di daerah Bali, yaitu di desa Lebih diperoleh 14 sampel darah babi. Hasil penangkapan nyamuk di Desa Lebih diperoleh species *An. vagus* 17 ekor, *Cx. tritaeniorhynchus* 228 ekor dan *Cx. vishnui* 24 ekor. Sedangkan dari survey larva yang dilakukan di desa Lebih diperoleh species *An. vagus* 1 ekor jantan, *Cx. tritaeniorhynchus* 16 ekor betina dan 9 ekor jantan, *Cx. quinquefasciatus* 11 ekor betina dan 9 ekor jantan, dan *Cx. vishnui* 3 ekor betina dan 1 ekor jantan.

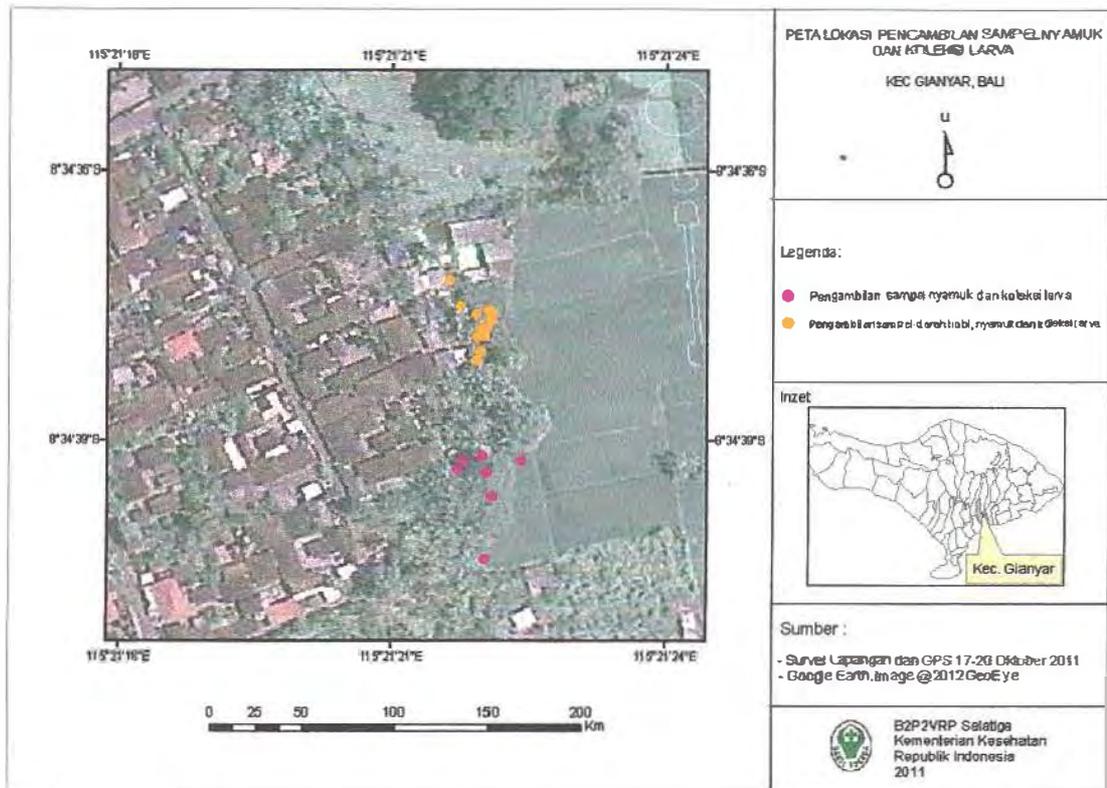
Hasil koleksi sampel darah temak, penangkapan nyamuk dan koleksi larva nyamuk di desa Tulikup dan Lebih, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Bali disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sampel darah ternak, jenis nyamuk dan koleksi larva di desa Tulikup dan desa Lebih, Kecamatan Gianyar, Kabupaten Gianyar, Propinsi Bali.

Jenis sampel	Desa Tulikup	Desa Lebih
Koleksi darah sapi	5	0
Koleksi darah babi	15	14
Penangkapan nyamuk:		
- <i>Anopheles vagus</i>	116	17
- <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	143	228
- <i>Culex vishnui</i>	0	24
Survey larva:		
- <i>Anopheles vagus</i>	5	1
- <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	50	25
- <i>Culex vishnui</i>	0	4
- <i>Culex quinquefasciatus</i>	11	20

Koleksi sampel darah disimpan di dalam *ice pack*, sedangkan nyamuk dan larva dibiarkan hidup dan dibawa ke laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit, Salatiga untuk dilakukan uji molekuler dan identifikasi.

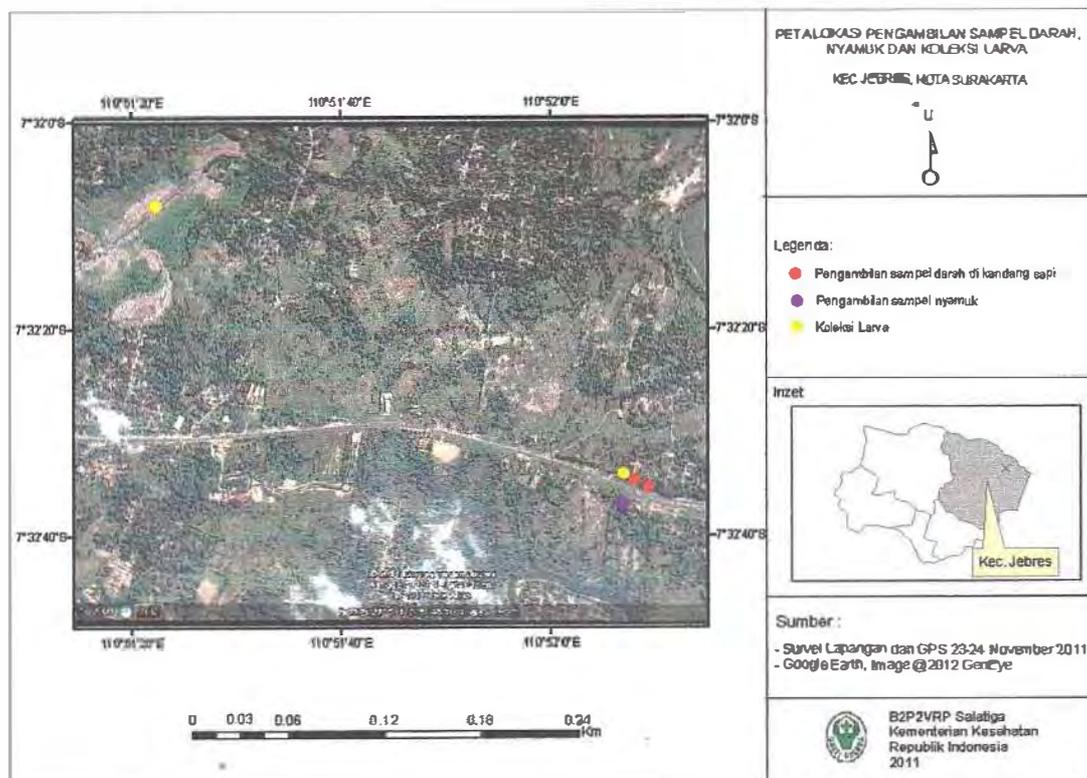
Hasil penyelidikan konfirmasi reservoir dan vektor secara molekuler disajikan terpisah pada sub bab tersendiri, karena pengujiannya dilakukan secara bersama dari ke-3 daerah penelitian.



Gambar 3. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Pantai Lebih

4.2. Pengambilan sampel di Kotamadya Surakarta

Pengambilan sampel darah ternak di Kota Surakarta dilakukan pada ternak sapi yaitu di Kecamatan Jebres. Selain pengambilan darah ternak, dilakukan pula penangkapan nyamuk di malam hari dan koleksi larva. Sampel hanya bisa diambil di beberapa titik saja, hal ini dikarenakan sebagian besar ternak yang ada dibiarkan bebas di lingkungan sehingga petugas mengalami kesulitan untuk menangkapnya kemudian mengambil darahnya. Sampel yang diambil adalah sampel darah sapi, koleksi larva dan nyamuk. Diperoleh spesies *Anopheles vagus* 106 ekor dan *Culex tritaeniorhyncus* 150 ekor. Hasil koleksi larva nyamuk di Jebres diperoleh spesies *An. Vagus* 5 ekor (jantan), *Cx. Tritaeniorhyncus* 21 ekor (betina) dan 19 ekor jantan. Ditemukan pula *Cx. quinquefasciatus* 6 ekor betina dan 5 ekor jantan. Lokasi pengambilan sampel di Kecamatan Jebres Kota Surakarta dapat dilihat pada gambar 4.



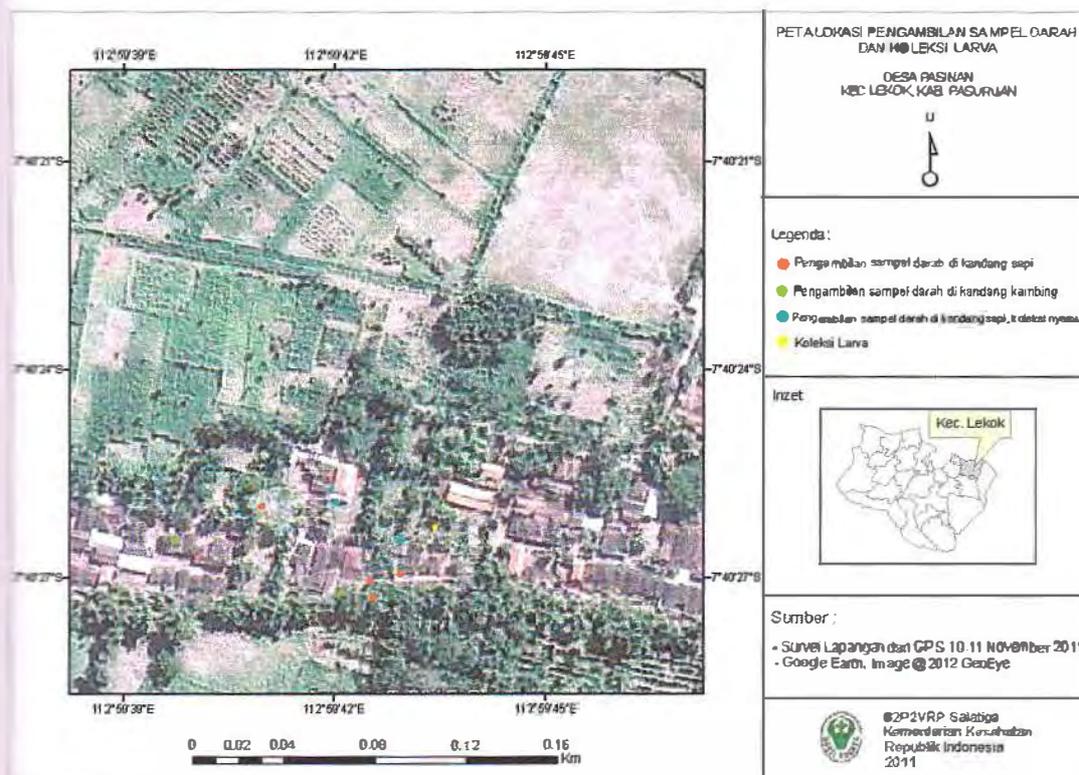
Gambar 4. Peta Pengambilan sampel di Kota Surakarta

4.3. Pengambilan sampel di Kabupaten Pasuruan

Pengambilan sampel di Kabupaten Pasuruan dilakukan di desa Pasinan, kecamatan lekok, kabupaten Pasuruan. Sampel yang diambil di daerah ini hampir sama dengan sampel yang diambil di Kota Surakarta hanya saja di daerah ini juga diambil sampel darah Kambing. Kegiatan dilaksanakan di Dusun Tampung RT 02/RW 04, desa Tampung Randu, Kecamatan Lekok yang merupakan daerah sentra peternakan sapi dan kambing. Tanaman atau vegetasi penyusun utama adalah rumput gajah yang digunakan untuk pakan ternak. Sumber air didapatkan dari sumur dengan kedalaman sekitar 8 – 15 meter. Kondisi umum lingkungan saat dilakukan penelitian adalah kering, genangan air sangat jarang. Walaupun ada genangan air di sekitar kandang hewan ternak adalah berasal dari akumulasi urin ternak dan tidak ditemukan larva di dalamnya. Larva survei dilakukan pada siang hari dan ditemukan di bak penampungan air sekitar kandang di rumah Bapak H. Sanusi.

Koleksi nyamuk dilakukan pada malam hari, dengan spesies nyamuk yang ditangkap adalah *Culex tritaeniorhynchus* dan *Culex quinquefasciatus* total sebanyak 331

ekor dan *Anopheles vagus* sejumlah 108 ekor. Hasil koleksi serologi atau pengambilan darah ternak terdiri dari sampel darah sapi 7 (tujuh) ekor yang diambil dari rumah kasus 2 (dua) ekor dan selebihnya dari lingkungan sekitar. Dari rumah kasus diketahui memiliki ternak kambing dilakukan sampling darah juga untuk diketahui potensinya sebagai reservoir JE dan ditemukan kambing betina jenis gibas sebanyak 3 (tiga) ekor. Lokasi pengambilan sampel di Kecamatan Lekok, Kabupaten Pasuruan dapat dilihat pada gambar 5.



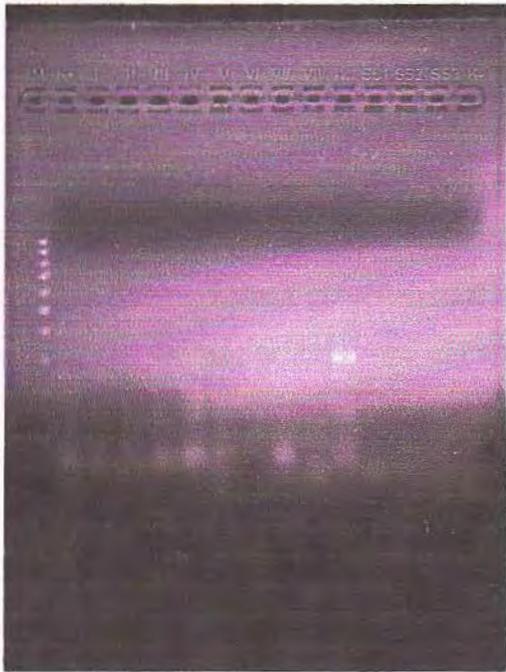
Gambar 5. Peta Pengambilan sampel Kabupaten Pasuruan

4.4. Hasil uji molekuler PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Metode biologi molekuler menggunakan PCR mesin dilakukan untuk mendeteksi RNA JEV. Proses yang dilalui adalah mengisolasi RNA, mengubahnya menjadi cDNA, penggandaan pita DNA di mesin PCR, elektroforesis dan pembacaan hasil dengan Gel-Doc. Sampel darah, nyamuk, dan larva dari lapangan di pisahkan sesuai spesies dan tempat/daerah dimana sampel itu diperoleh. Data sampel, pengkodean dan hasil pengujian PCR disajikan pada Tabel 3. Sedangkan dokumentasi tersangka positif JE/*flavivirus* disajikan pada Gambar 6 dan 7.

Tabel 3. Data sampel pengujian PCR konfirmasi reservoir *Japanese encephalitis*

Daerah	Jenis sampel	Kode PCR	Hasil
Bali-desa Tulikup	Sapi	2	
	Sapi	4	Pos.weak
Bali-desa Lebih	Babi	16	
	Babi	18	Pos.weak
Solo-jebres	Sapi	SS1	
	Sapi	SS2	
	Sapi	SS3	Pos.weak
Nyamuk			
Bali-desa Tulikup	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	T1	
	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	T2	
Bali-desa Lebih	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	L1	
	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	L2	
	<i>Cx. vishnui</i>	L3	Pos.weak
	<i>An. vagus</i>	L4	
Solo-jebres	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	V	
	<i>Cx. vishnui</i>	VI	
	<i>Cx. fascocephalus</i>	VII	
	<i>An. vagus</i>	VIII	
	<i>An. subalbatus</i>	IX	Positif
Kab. Pasuruan	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	I	
	<i>Cx. fatigan</i>	II	
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	III	
	<i>Cx. vishnui</i>	IV	Pos.weak



Gambar 6. Hasil elektroforesis cDNA tersangka JE pada sapi dari daerah kota Solo dan Nyamuk dari daerah Pasuruan dan Solo



Gambar 7. Hasil elektroforesis cDNA tersangka JE pada sapi, babi dan nyamuk yang tertangkap di desa Tulikup dan desa Lebih, Bali.

V. PEMBAHASAN

Penelitian konfirmasi reservoir JE dilakukan di empat lokasi yang diduga penularan JE terjadi atau pernah terjadi di daerah tersebut. Keempat daerah penelitian tersebut adalah; desa Tulikup dan desa Lebih di Propinsi Bali; di Jebres Kodya Solo dan di Kabupaten Pasuruan. Ketika dilakukan koordinasi dan penelusuran data sekunder angka kesakitan JE, diketahui bahwa surveilans JE sangat lemah. Dinas Kesehatan dan rumah sakit menyatakan bahwa saat ini pelaporan kasus JE tidak ada karena minimnya kemampuan laboratorium daerah dalam pendiagnosian dan penegakan konfirmasi JE. Diagnosa berhenti hanya sampai meningitis. Sehingga lokasi pengambilan darah ternak dan penangkapan nyamuk serta survey larva diambil berdasarkan kasus lama JE yang pernah terjadi (di desa Lebih, Bali) atau di daerah dimana laporan kasus meningitis tinggi dan terdapat vektor didekatnya.

Japanese encephalitis virus (JEV) adalah kelompok family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. JEV ditularkan secara alami diantara burung-burung liar dan domestik serta babi dengan nyamuk vektor *Culex sp.* sebagai vektor. Penyakit meningitis spesifik ini pertama kali ditemukan di Jepang. Vektor penting dalam penularannya di Jepang adalah *Culex tritaeniorhynchus*. Babi di Jepang diketahui positif JEV secara serologi setiap tahunnya (Matsunaga, 1999). Babi dianggap memiliki viremia tinggi terhadap JEV, sehingga babi menjadi amplifier host atau inang penguat dalam siklus penularan JE. Oleh karena itu penting dilakukan surveilans babi maupun sapi untuk melihat sirkulasi dan status JEV.

Surveilans *Japanese Encephalitis* (JE) pada babi dan sapi pernah dilakukan pada hewan sentinel di Kota Denpasar, Bali pada tahun 2003 oleh Ketut Santhia dkk. Siklus infeksi virus JE diketahui terjadi di sentinel sapi dan babi setelah mendeteksi antibodi virus JE pada kedua jenis hewan tersebut. Tertularnya sapi dan babi ini menunjukkan virus JE ada di daerah sentinel. Siklus penularan dapat terjadi karena adanya virus, hospes yang peka, vektor dalam lingkungan sesuai. Hasil survey menunjukkan prevalensi antibodi virus JE tinggi (Ketut Santhia *et al*, 2003).

Tingkat infeksi virus JE pada sapi di sentinel lebih rendah (30,0%) dibandingkan babi (90,0%). Hal ini menunjukkan bahwa babi merupakan hospes paling peka dan merupakan amplifier utama virus JE. Terinfeksi sapi dan babi di lokasi sentinel ini erat kaitannya dengan peranan nyamuk sebagai vektor. Selama surveilans telah tertangkap 3

jenis nyamuk, yakni *Culex sp*, *Anopheles sp* dan *Aedes sp*. Dari ketiga nyamuk tersebut yang bertindak sebagai vektor adalah *Culex sp*.

Manusia merupakan reservoir peka JE. Artinya manusia mampu menggandakan virus JE tetapi sangat rentan dan berakibat fatal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa viremia JE pada manusia singkat. Penelitian konfirmasi reservoir JE tidak lepas kaitannya dengan melihat jenis-jenis nyamuk yang berperan sebagai vektor. Dari hasil penangkapan nyamuk dan koleksi larva di daerah penelitian, ditemukan bahwa sapi juga memiliki kemampuan viremia yang lebih tinggi dibanding manusia. Hal ini dibuktikan dengan adanya hasil positif dari dokumentasi penggandaan cDNA dari flavivirus yang ada di dalam tubuhnya.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sapi dan babi diketahui positif mengandung *flavivirus*. Demikian pula dengan *Cx. vishnui* dan *Cx. subalbatus*. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) kurang tepat bila digunakan untuk surveilans reservoir JE dan bukan pada saat siklus penularan berlangsung. PCR akan tepat digunakan pada saat skrining KLB. *Risk assessment* harus kontinyu dilakukan karena resiko kejadian JE berbeda di setiap wilayah. Surveilans JE di Indonesia masih sangat lemah, disebabkan tidak ada pemeriksaan lengkap untuk konfirmasi JE. Penguatan dan pengembangan laboratorium daerah maupun pusat perlu dilakukan untuk melakukan pemeriksaan JE. Diperlukan adanya penelitian lanjutan mengenai metoda yang tepat dan cepat dalam surveilans JE di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan, Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI yang telah memberikan izin dan kepercayaan bagi penulis untuk melakukan penelitian konfirmasi reservoir Japanese encephalitis di Jawa dan Bali. Tidak lupa terima kasih kami sampaikan atas kerjasama yang baik dari Dinas Kesehatan terkait, yaitu Dinas Kesehatan Propinsi Bali, Jawa Timur dan Jawa Tengah, Dinas Peternakan Propinsi/Kota/Kabupaten, Dinas Kesehatan Kota Solo, RS. Moewardi, Dinas Kesehatan Kabupaten Pasuruan dan Dinas Kesehatan Kabupaten Gianyar. Penelitian ini pun tidak akan terlaksana dengan baik tanpa kerjasama yang solid dari para teknisi B2P2VRP yang telah bekerja di lapangan maupun di laboratorium. Penghargaan dan terima kasih kami ucapkan atas kerja kerasnya. Tidak lupa kami juga berterima kasih kepada para tenaga lapangan dan pihak-pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

Andrew F. van den Hurk and S.A. Ritchie, (1997) Japanese encephalitis in the Yorres Strait: Surveillance of Suspected Vectors, *Arbivirus Research in Australia- Vol 7*; 105-111

Kanamitsu M, K. Taniguchi, S. Urasawa, T. Ogata, Y. Wada and J.S. Saroso (1979) Geographic distribution of arbovirus antibodies in indigenous human populations in the Indo-Australian archipelago. *Am. J.Trop.Med. Hyg.* 289 (2) 351-363

Ketut Santhia, AP, A. A. Gde Putra, N. Dibia, N. Purnatha dan N. Sutami (2003) Surveilans Japanese encephalitis pada peternakan sapi dan babi di daerah dataran rendah, sedang dan tinggi. *BPPV Regional VI Denpasar*.

Van Peenen, P.F.D., Joseph, P.L., Atmosoejono, S., Irsiana, R. and Saroso, J.S., (1975). Isolasi of Japanese encephalitis virus from mosquitoes near Bogor, West Java, Indonesia, *J. Med.Entomol.*, 12: 573

Dit. Jen. PPM & PLP. Japanese Encephalitis (JE) Pada Manusia di Indonesia. Sub. Dit Zoonosis dan Sub. Dit. SPP. 1999. 20 hal.

Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur. Laporan Kasus JE/ AES (Acute Encephalitis Syndrome) di Propinsi Jawa Timur. Tahun 2005-2006. Sub. Din P2P-PL.9 Hal.

Imran. L. Vektor Penyakit Japanese Encephalitis (JE) di Pontianak dan Denpasar, Indonesia. 1986. *Medika*, No 9 . September. Hal 839-843.

WHO. Geographical Distribution of Arthropod-Borne Diseases and Their Principal Vectors. Vector Biology and Control Division. 1989. WHO/VBC/89.967

Imran, L dan Suharyono, W. Faktor Nyamuk *Culex* dan Babi dalam Penyebaran Virus Japanese Encephalitis (JE) di Pontianak dan Solo. *Buletin Penelitian Kesehatan*. Vol 14. No. 1.1986. Hal 8-15.

Winoto. I; R.R. Graham; Ima Nurisa; S. Hartati; C. Ma'roef. Penelitian Serologis Japanese Encephalitis pada Babi dan Kelelawar di Sintang, Kalimantan Barat. Buletin Penelitian Kesehatan. Vol. 23. No. 3. 1995. Hal 98-103.

Cheryl, A. Johansen; Roy A. Hall; Andrew F. Van Den Hurk; Scott A. Ritchie and John S. Mackenzie. Detection and Stability of Japanese Encephalitis Virus RNA and Virus Viability in Dead Infected Mosquitoes Under Different Storage Conditions. 2002. Am. J. Trop. Med Hyg, 67 (6) pp 656-661.

Short Report Detection of Japanese Encephalitis Virus in Mouse peripheral Blood Mononuclear Cell Using An *In Situ* Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.

WHO. Guidelines for Prevention and Control of Japanese Encephalitis. Zoonosis Division National Institute of Communicable Diseases. 2006. 22-Sham Nath Marg, Delhi – 110 054. 18 p.

Harun S. Pemeriksaan Imunoserologi. Bahan Kursus Singkat Biologi Molekuler Puslitbang Biomedis dan Farmasi. 2008. 10 halaman.

Jolivet.P, H.I.Ree, H.K. Hong and Yoshito Wada. Dispersal of *Culex tritaeniorhynchus* in Korea. WHO/VBC/75.599.

Noriega F.G. and M.A. Wells.A. Comparison of Three Methods for Isolating RNA from Mosquito. 1993. Insect Molecular Biology. 2 (1). 21-24.

Cheryl A. Johansen, Roy A. Hall, Andrew. F.Van Den Hurk, Scott A. and John S. Mackenzie. Detection and Stability of Japanese Encephalitis Virus RNA and Virus Viability in Dead Mosquitoes Under Different Storage Conditions. 2002. American Journal Tropical Medicine Hygiene. 67 (6). Pp. 656-661.

Innis BL. Japanese Encephalitis. In: Porterfield JS, ed. *Exotic viral infection*. London: Chapman and Hall, 1995, 147 – 174.

LEMBAR PENGESAHAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit, menyatakan bahwa Laporan Penelitian "Pendekatan Biologi Molekuler Dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese Encephalitis* Di Jawa dan Bali." telah dapat disetujui sesuai ketentuan yang berlaku.

Salatiga, Desember 2011

DISETUJUI

Kepala
Balai Besar Penelitian dan
Pengembangan Vektor dan Reservoir
Penyakit Salatiga



Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
NIP 195406201981101002

Ketua Pelaksana



Farida Dwi Handayani, S.Si, MS
NIP 197809032003122001

LEMBAR PERSETUJUAN

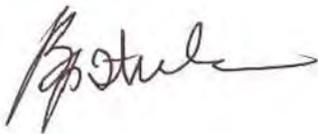
Yang bertanda tangan di bawah ini:

Ketua Panitia Pembina Ilmiah (PPI) tingkat Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit, menyatakan bahwa Laporan Penelitian "Pendekatan Biologi Molekuler Dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese Encephalitis* Di Jawa dan Bali." telah dapat disetujui sesuai ketentuan yang berlaku.

Salatiga, Desember 2011

DISETUJUI

Panitia Pembina Ilmiah



Dra. Blondine Ch. P., M.Kes.
NIP 194903251976112002

Kepala
Balai Besar Penelitian dan
Pengembangan Vektor dan Reservoir
Penyakit, Salatiga



Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
NIP 195406201981101002

CHECKLIST KELENGKAPAN LAPORAN PENELITIAN

Judul Penelitian : Pendekatan Biologi Molekuler Dalam Konfirmasi Reservoir *Japanese Encephalitis* Di Jawa Dan Bali

Ketua Pelaksana : Farida D. Handayani, S.Si, MS

Satuan Kerja : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga

Sumber Dana : DIPA B2P2VRP Salatiga

Jumlah Dana : Rp. 250.000.000,-

I	Kelengkapan	Ada	Tidak
	SK Penelitian	V	
	Kata Pengantar	V	
	Abstrak	V	
	Susunan Tim Peneliti	V	
	Daftar Isi	V	
	Daftar Tabel	V	
	Daftar Grafik/Peta/Gambar	V	
	Daftar ampiran	V	
II	Isi Laporan		
	Pendahuluan	V	
	Tujuan dan Manfaat	V	
	Metode	V	
	Hasil Penelitian	V	
	Pembahasan	V	
	Kesimpulan dan Saran	V	
	Ucapan Terima Kasih	V	
	Daftar Kepustakaan	V	
	Lembar Pengesahan	V	
	Lembar Persetujuan	V	
	Lampiran	V	

LAMPIRAN

Foto-foto kegiatan pengambilan darah ternak, survey larva dan penangkapan nyamuk malam hari di lokasi penelitian.

