

**Pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV)
Melawan Demam Berdarah Dengue (DBD) :
Identifikasi Faktor Imunomodulator Putatif dari Salivary Gland *Aedes aegypti*
Berbasis Reaksi Antigen-Antibodi Vektor dan Inang Manusia**

Peneliti : Rike Oktarianti¹
Mahasiswa Terlibat : Rofiatul Laila²
Sumber Dana : DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran
2013

¹ Staf pengajar Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

² mahasiswa Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

ABSTRAK

Saliva vektor arthropoda sukses dalam mentransmisikan patogen ke inang karena di dalam saliva tersebut mengandung sejumlah komponen vasodilator dan imunomodulator yang mempunyai aktivitas sebagai antikoagulan, vasodilatasi, anti inflamasi dan bersifat immunosupresif. Dengan alasan tersebut maka komponen saliva dapat dijadikan target dalam pengembangan TBV melawan DBD. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi faktor imunomodulator putatif dari salivary gland vektor *Aedes aegypti* berbasis reaksi antigen-antibodi vektor dan inang manusia. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis profil protein dengan *SDS-PAGE* dan dilanjutkan dengan western blot untuk mendeteksi adanya protein imunogenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa identifikasi terhadap profil protein SG *Ae. aegypti* diperoleh 15 pita dengan berat molekul ~ 255, 69, 63, 56, 53, 50, 48, 42, 40, 38, 36, 31, 27, 26, 15 kDa. Protein imunogenik SG *Ae. aegypti* adalah protein dengan berat molekul ~ 31 dan 56 kDa yang ditemukan pada serum orang yang terpapar oleh saliva nyamuk *Ae. aegypti*. Protein tersebut merupakan protein target untuk langkah awal dalam tahap pengembangan TBV melawan infeksi dengue.

Kata kunci : TBV, DBD, Salivary Gland *Aedes aegypti*, Protein imunogenik

**Pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV)
Melawan Demam Berdarah Dengue (DBD) :
Identifikasi Faktor Imunomodulator Putatif dari Salivary Gland *Aedes aegypti*
Berbasis Reaksi Antigen-Antibodi Vektor dan Inang Manusia**

Peneliti	: Rike Oktarianti ¹
Mahasiswa Terlibat	: Rofiatul Laila ²
Sumber Dana	: DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2013
Kontak Email	: rike.oktarianti@yahoo.com

¹ Staf pengajar Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

² mahasiswa Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

Executive Summary

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu contoh dari *Arthropoda borne diseases* yang merupakan penyakit pada manusia ditularkan oleh vektor berupa serangga (Arthropoda). Di Indonesia, penyakit-penyakit yang ditularkan melalui serangga merupakan penyakit endemis pada daerah tertentu. Penyakit yang diperantarai oleh vektor serangga menyebabkan kematian sekitar 1,5 juta manusia setiap tahunnya (Hill *et al.* 2005). Selain menyebabkan mortalitas juga morbiditas, akibat infeksi penyakit tersebut menyebabkan kerugian ekonomi yang besar terutama pada negara-negara berkembang (Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao, 2010). Berbagai macam teknologi vaksin telah diterapkan untuk pengembangan vaksin melawan demam berdarah, termasuk virus hidup yang dilemahkan (LAV), pemurnian virus inaktif (PIV), vaksin DNA rekombinan. Pengembangan vaksin setelah tahun 1971 antara lain adalah mengembangkan vaksin gabungan terhadap semua 4 serotipe DV yang disebut dengan Tetravalen Dengue Vaccine (TDV) (Edelman, 2007). TDV dikembangkan dengan cara membuat vaksin hidup dari keempat serotipe virus dengue (Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine), yang telah dilakukan di Thailand (Chanthavanich *et al.* 2006). Namun ada kendala dalam pengembangan TDV yaitu kesulitan dalam melemahkan secara optimal empat serotipe DENV. Dari berbagai macam vaksin tersebut di atas nampak bahwa semua pendekatan masih dalam tahap pengembangan dan sampai saat ini dilaporkan belum ada vaksin berlisensi atau obat untuk pencegahan penyakit DBD, satu-satunya metode pada saat ini yang digunakan adalah dengan mengendalikan vektor *Ae aegypti* dan *Ae albopictus* (Luplertlop, *et al.*, 2011). Oleh karena itu perlu dilakukan pendekatan baru dalam pengembangan vaksin melawan DBD yang lebih inovatif dan juga berperan dalam menghambat transmisi patogen penyebab penyakit DBD sehingga

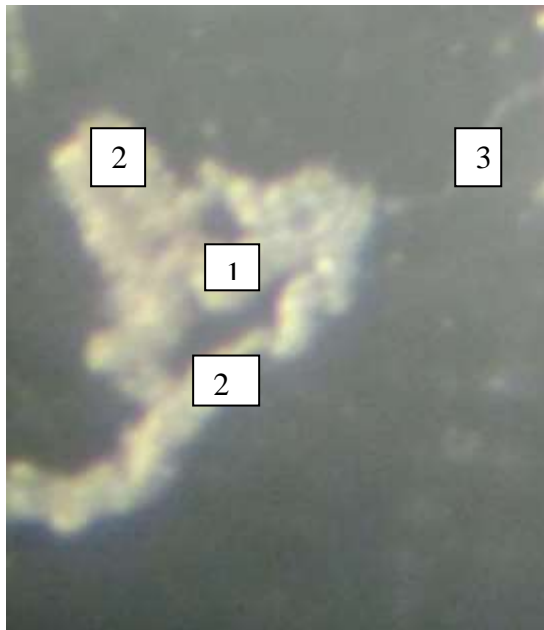
menanggulangi epideminya yaitu dengan pengembangan *Transmission-Blocking Vaccine* (TBV).

TBV adalah vaksin yang menghambat penyebaran penyakit dengan target antigen berasal dari tubuh vektor (artropoda), salah satunya dari saliva nyamuk (Carter, 2001). Tujuan dari TBV adalah mencegah transmisi patogen dari inang vertebrata yang terinfeksi ke inang yang belum terinfeksi. (Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao, 2010). TBV banyak digunakan untuk membangkitkan antibodi guna melawan molekul vektor yang terlibat dalam perkembangan patogen. Pengembangan TBV yang merupakan vaksin berbasis vektor tidak hanya pendekatan baru untuk pengendalian penyakit tetapi juga merupakan pendekatan yang lebih disukai. Vaksin berbasis vektor tidak hanya akan melindungi terhadap pathogen yang ditularkan oleh vektor tetapi juga terhadap orang lain yang belum terinfeksi. Perkembangan penelitian yang terbaru menunjukkan bahwa saliva nyamuk dan arthropoda lain mengandung bahan yang bersifat imunogenik yaitu dapat memunculkan respon imun adaptif yang menghasilkan antibodi melawan komponen saliva. Dengan alasan tersebut maka komponen saliva dapat dijadikan target dalam pengembangan TBV untuk menghambat transmisi patogen (Lavazec *et al.*, 2007; King *et al.*, 2011).

Saliva vektor arthropoda sukses dalam mentransmisikan patogen ke inang karena di dalam saliva tersebut mengandung sejumlah komponen vasodilator dan imunomodulator yang mempunyai aktivitas sebagai antikoagulan, vasodilatasi, anti inflamasi dan bersifat immunosupresif. Jika salivary gland vektor arthropoda yang mengandung faktor imunomodulator dapat meningkatkan infeksi pathogen, maka memungkinkan untuk melakukan pengontrolan transmisi tersebut dengan cara melakukan vaksinasi terhadap host dengan molekul yang bersifat melawan protein dalam salivary gland (Titus *et al.*, 2006; Wasinpiyamongkol, *et al.*, 2010; Wongkamchai *et al.*, 2010). Penelitian terhadap potensi saliva gland *Aedes aegypti* sebagai kandidat target dalam pengembangan TBV melawan DBD merupakan langkah yang sangat penting untuk mencegah sekaligus menanggulangi kasus DBD khususnya di Indonesia.

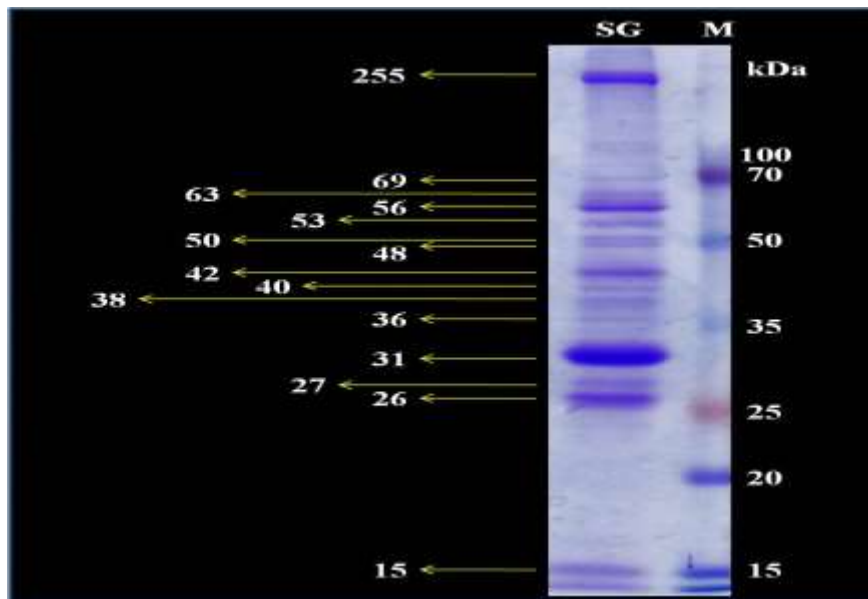
Metode penelitian yang digunakan meliputi tahapan rearing *Ae. aegypti*, isolasi salivary gland dengan *microdissection*, ekstraksi protein kelenjar saliva, analisis profil protein kelenjar saliva dengan *SDS PAGE*. Identifikasi protein imunogenik kelenjar saliva *Ae aegypti* dilakukan dengan metode *Western Blot*, yaitu melakukan reaksi silang protein kelenjar saliva *Ae aegypti* dengan serum orang sehat dan pasien DBD yang tinggal di daerah endemik. Sebagai kontrol negatif dilakukan reaksi silang dengan serum orang yang tinggal di daerah non endemic dan serum neonatus.

Hasil penelitian ini meliputi struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti*, profil protein kelenjar saliva dan protein imunogenik. Struktur kelenjar saliva berpasangan, masing-masing dihubungkan dengan ductus salivarius dan kelenjar saliva betina ukurannya lebih besar. Setiap kelenjar saliva terdiri atas 3 lobus (gambar 1), dua di lateral dan satu buah di median. Lobus median dan distal-lateral mengekspresikan gen yang produk protein berupa apyrase, antikoagulan dan vasodilator yang berperan dalam haematophagi (Arcá *et al.*, 1999).



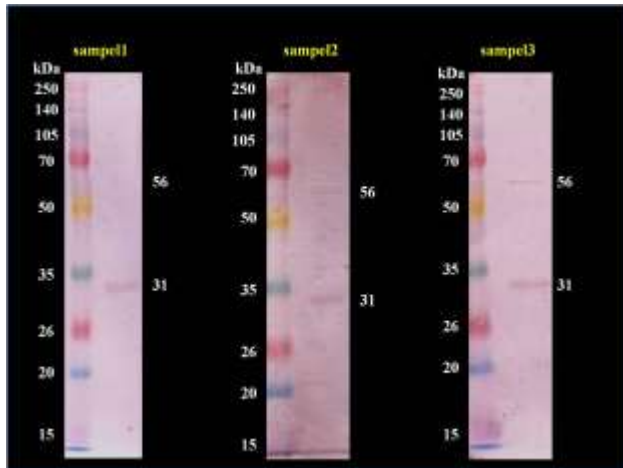
Gambar 1. salivary gland *Ae. aegypti* betina, masing-masing SG terdiri atas 3 lobus (1) satu lobus medial; (2) dua lobus lateral; (3) ductus salivarius

Hasil elektroforesis SDS-PAGE terhadap protein SG *Ae. aegypti* menunjukkan beberapa protein SG *Ae. aegypti* dengan berat molekul ~ 255, 69, 63, 56, 53, 50, 48, 42, 40, 38, 36, 31, 27, 26, 15 kDa (gambar 2). Diperoleh 4 pita tebal yaitu protein dengan berat molekul 255, 56, 31 dan 26 kDa. Protein yang terkandung dalam SG tersebut selain merupakan protein yang terdapat pada lamina basal (sel epithelium SG) juga merupakan protein sekresi saliva (Lormeau, 2009). Protein dalam kelenjar saliva memiliki sifat farmakologi yang secara langsung dapat menghambat hemostasis inang vertebrata melalui proses anti koagulasi untuk menghambat vasokonstriksi (vasodilator). Lebih jauh lagi kelenjar saliva juga mengandung molekul spesifik (imunomodulator) yang berfungsi sebagai faktor anti inflamasi dan dapat menginduksi respon imun inang yang dapat berupa respon alergi yang diwujudkan oleh rasa gatal di kulit dan kemerahan di lokasi gigitan (Andrade *et al.*, 2005; Tangamani & Wikel 2009; Fontaine *et al.*, 2011).

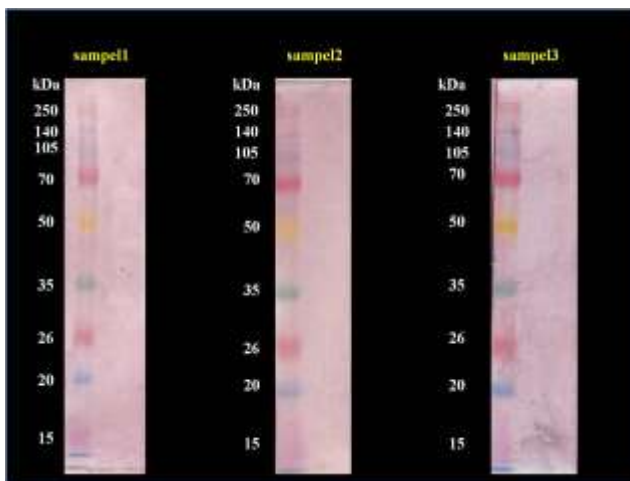


Gambar 2. Profil protein dari ekstrak SG *Ae. aegypti*, hasil isolasi 100 pasang SG *Ae. aegypti*.

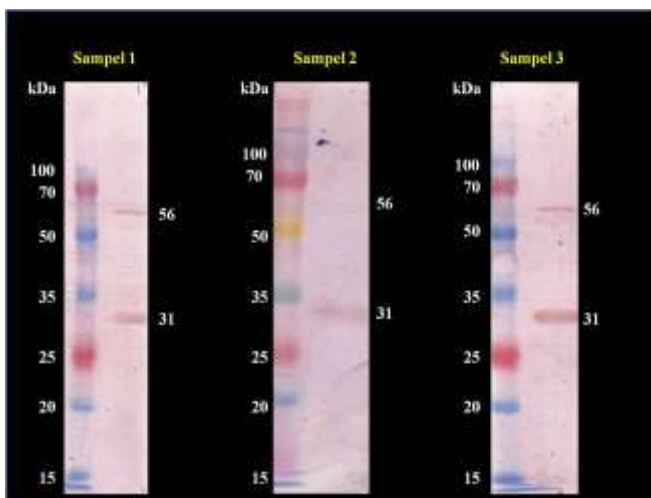
Hasil *Western Blot* untuk melihat reaksi silang antara protein SG *Ae. aegypti* dengan plasma darah sampel orang sehat dari wilayah endemik dan non endemik serta plasma penderita DBD ditunjukkan pada gambar 3 (3a, 3b, 3c). Dari hasil *Western Blot* tersebut nampak jelas bahwa reaksi silang positif ditunjukkan dengan munculnya pita. Pita (protein) spesifik yang terdeteksi dari hasil *Western Blot* adalah 2 pita dengan berat molekul ~ 56 dan 31 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa pada orang yang tinggal di wilayah endemik baik orang sehat maupun pasien DBD mempunyai antibodi yang terbentuk akibat sering terpapar oleh saliva *Ae. aegypti*. Pengembangan resistensi alami penduduk daerah endemik akibat seringnya terpapar saliva yang mengandung patogen dilaporkan pertama kali dalam kasus leishmaniasis oleh Davies & Gavvani (1999). Perkembangan penelitian terbaru menunjukkan bahwa saliva nyamuk dan arthropoda lain mengandung bahan yang bersifat imunogenik yaitu dapat memunculkan respon imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik (Gillespie *et al.*, 2000; Remoue *et al.*, 2006, 2007), atau pada wisatawan yang terpapar oleh vektor di daerah tropis (Pradines *et al.*, 2007).



Gambar 3 a. Reaksi silang SG *Ae. aegypti* dengan serum orang sehat dari wilayah endemik



Gambar 3 b. Reaksi silang SG *Ae. aegypti* dengan serum orang sehat dari wilayah non endemik



Gambar 3 c. Reaksi silang SG *Ae. aegypti* dengan serum pasien DBD

Protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa tersebut merupakan protein target yang potensial untuk dikembangkan sebagai vaksin dengue. Hal ini didasari bahwa protein tersebut bersifat imunogenik dapat memunculkan respon imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik. Dengan demikian perlu dilakukan karakterisasi proteomic dengan analisis mass spec dan uji aktivitasnya. Dengan diketahuinya karakteristik dan potensi dari protein tersebut akan memberikan harapan baru untuk menghasilkan vaksin dengue yang tidak hanya memberikan proteksi bagi individu yang divaksin tetapi juga untuk menghambat transmisi. Langkah ini sangat tepat dalam hal mencegah sekaligus menanggulangi kasus DBD mengingat tingginya kasus ini di Indonesia.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah identifikasi profil protein SG *Ae. aegypti* menunjukkan 15 pita dengan berat molekul ~ ~ 255, 69, 63, 56, 53, 50, 48, 42, 40, 38, 36, 31, 27, 26, 15 kDa. Protein imunogenik ekstrak SG *Ae. aegypti* adalah protein dengan berat molekul ~ 31 dan 56 kDa yang ditemukan pada serum orang yang terpapar oleh saliva nyamuk *Ae. aegypti*.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc.* 77(4), 665-693.
- Arcá, B., Lombardo, F., de Lara Capurro Guimarães, M., della Torre, A., Dimopoulos, G., James, A. A. and Coluzzi, M. 1999. Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1516-1521.
- Carter R. 2001. Transmission Blocking Malaria Vaccine. *Vaccine* 19: 2309-2314.
- Chanthavanich P, Luxemburger C, Sirivichayakul C, Lapphra K, Pengsaa K, Yoksan S, Sabchareon A, Lang J. 2006. Short Report: Immune Response and Occurrence of dengue Infection in Thai Children Three to Eight Years After Vaccination with Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (1): 26-28.
- Coutinho - Abreu I. & Ramalho - Ortigao M. 2010. Transmission Blocking Vaccines to Control Insect-Borne Diseases - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105, (1).
- Edelman R. 2007. Dengue Vaccine Approach the Finish Line. Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine Baltimore St. *CID* : 45: 556-560

- Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras L. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit & Vector* 4 : 187
- Gillespie, RD, Mbow, ML, Titus, RG. 2000. The Immunomodulatory Factors of Blood Feeding Arthropod Saliva. *Parasite Immunol.* 22: 319-331.
- Hill CA, Kafatos FC, Stansfield SK, Collins FH 2005. Arthropodborne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol* 3: 262-268.
- King JG, Kenneth D, Vernick, Julian FH. 2011. Members of the salivary gland surface protein family (SGS) are major immunogenic components of mosquito saliva. *JBC Papers in Press.* 1-21
- Lavazec, Boudin C, Lacroix R, Bonnet S, Diop A, Thiberge S, Boisson B, Tahar R, Bourgomin C. 2007. Carboxypeptidase B of *Anopheles gambiae* Target for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*, 75(4) : 1635-1642.
- Lormeau, VMC, 2009. Dengue viruses binding protein from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary gland. *Virology Journal* (6) : 35 ; 1-4
- Luplertlop N, Surasombattana P, Patramool S, Dumas E, wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, Piquemal d, Yssel H, Briant L, Misse D. 2011. Induction of peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland following infection with dengue virus. *PloS Pathogens*. www.plospathogens.org : January 2011 : 7 : 1-15
- Remoue F, Alix E, Cornélie S, Sokhna C. 2007. IgE and IgG4 Antibody Responses to *Aedes* Saliva in African Children. *Acta. Trop*, 104: 108–115.
- Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C. 2006. Evaluation of the Antibody Response to *Anopheles* Salivary Antigens as a Potential Marker of Risk of Malaria. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 100: 363–370.
- Rohousova I, Volf P. 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol (Praha)*. 53:161-171.
- Tangamani S, Wikel S. 2009. Differential expression *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. *Parasites & Vectors* 2 : 34
- Titus R.G, Bishop JV, Mejia JS. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 28: 131-141.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombattana P, Doucoure S, Seveno M, Martial, Remoue F, demette E, Brizard JP, Jouin P. 2010. Blood feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomic*, 10, 1906-1916

Wongkamchai S, Khongtak P, Leemingsawa S, Komalamisra N, Junsong N, Kulthanan K, wisuthsarewong W, Boitano J. 2010. Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand. *Asian Pac j Allergy Immunol* : 28 : 162169

