

**ABSTRAK DAN EXECUTIVE SUMMARY
LAPORAN HASIL PENELITIAN
HIBAH DISERTASI DOKTOR**



**Studi Immunogenik Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* untuk
Karakterisasi Protein Target Kandidat Vaksin Malaria
(*Transmission Blocking Vaccine*)**

Oleh :

dr. Yunita Armiyanti, M.Kes

NIDN. 0004067405

UNIVERSITAS JEMBER

DESEMBER, 2014

Studi Immunogenik Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* untuk Karakterisasi Protein Target Kandidat Vaksin Malaria (*Transmission Blocking Vaccine*)

Peneliti : Yunita Armiyanti¹
Mahasiswa Terlibat : -
Sumber Dana : DIPA T.A 2014 Nomor 435/UN25.3.1/LT.6/2014

¹ Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

ABSTRAK

Malaria saat ini masih menjadi masalah yang utama bagi negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Salah satu pendekatan untuk mengatasinya adalah dengan mencegah penyebaran penyakit melalui vaksin, namun sampai saat ini masih belum ada vaksin malaria yang secara efektif dapat diaplikasikan. Vaksin malaria yang ideal adalah vaksin kombinasi yang mencakup pencegahan untuk siklus pre-eritrositik, siklus eritrositik dan proses transmisi. Vaksin berbasis saliva vektor mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai vaksin malaria karena selain mencegah transmisi juga dapat menurunkan morbiditas penyakit. Saliva nyamuk mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator yang diperlukan dalam proses *blood feeding*, namun memperkuat terjadinya transmisi parasit malaria. Jika substansi dalam saliva vektor mampu meningkatkan infeksi patogen yang dibawanya, maka melakukan vaksinasi pada inang dengan substansi tersebut diharapkan terbentuk imunitas yang dapat mengendalikan transmisi patogen. Sampai saat ini masih belum ada laporan yang meneliti tentang potensi kelenjar saliva dari vektor malaria yang ada di Indonesia, khususnya yang berkaitan dengan pengembangan vaksin penghambat transmisi (*Transmission Blocking Vaccine/TBV*).. *Anopheles sundaicus* merupakan vektor malaria yang penting untuk daerah pantai di pulau Jawa, Bali, Sumatera, Kalimantan dan kepulauan Nusa Tenggara Barat. Immunogenisitas protein kelenjar saliva nyamuk ditunjukkan melalui studi imunogenik yang membuktikan protein kelenjar saliva dapat membangkitkan respon imun inang dengan terbentuknya imunoglobulin G (IgG) pada individu yang terpapar gigitan nyamuk *Anopheles*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui immunogenisitas protein kelenjar

saliva *An.sundaicus* melalui studi imunogenik (reaksi antigen-antibodi), sehingga akan diketahui protein mana yang dapat membangkitkan respon imun inang sebagai dasar identifikasi protein kandidat vaksin TBV. Profil protein kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dapat diketahui dengan melakukan SDS-PAGE kelenjar saliva dan penentuan protein imunogenik dilakukan dengan metode *Western Blotting*, yaitu antibodi anti-saliva dalam serum darah penduduk di wilayah endemis yang terpapar gigitan nyamuk *An.sundaicus* akan mengenali protein spesifik dari saliva nyamuk. Hasil SDS PAGE menunjukkan terdapat 15 pita utama dengan kisaran berat molekul antara 24 kDa sampai 138 kDa. Protein imunogenik kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan menggunakan pool serum penduduk Bangsring mempunyai berat molekul 138, 120, 97, 86, 68, 60, 58, 40, 37 dan 14 kDa. Protein imunogenik kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan menggunakan lima serum individu penduduk Bangsring (respon individual) mempunyai berat molekul 138, 120, 85, 68, 67,61,50, 43, 44, 38, 36, 34 dan 14 kDa. Protein yang paling imunogenik adalah protein dengan berat molekul 36-38 kDa.

Kata kunci: malaria, *Anopheles sunndaicus*, imunogenik, protein, kelenjar saliva

EXECUTIVE SUMMARY

Studi Imunogenik Protein Kelenjar Saliva *Anopheles sudaicus* untuk Karakterisasi Protein Target Kandidat Vaksin Malaria (*Transmission Blocking Vaccine*)

Peneliti : Yunita Armiyanti¹
Mahasiswa Terlibat : -
Sumber Dana : DIPA T.A 2014 Nomor 435/UN25.3.1/LT.6/2014
Kontak Email : yunitaarmi@yahoo.co.id
Diseminasi : Publikasi Presentasi Oral pada Seminar Internasional Indonesian Protein Society (IPS) 2014, 29-30 Oktober 2014, Universitas Jember

¹ Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

Latar Belakang dan Tujuan Penelitian

Penyakit malaria sampai saat ini masih menjadi masalah yang utama dalam skala Internasional maupun Nasional. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World malaria report* tahun 2011, pada tahun 2010 kasus malaria di dunia mencapai 216 juta dan diperkirakan 655 ribu orang meninggal (WHO, 2011). Di Indonesia penyakit malaria masih ditemukan pada semua provinsi dengan stratifikasi malaria tinggi (berdasarkan *Annual Parasite Incidence/API*) di wilayah Indonesia bagian Timur. Pulau Jawa dan Bali termasuk stratifikasi malaria rendah, namun antara tahun 2006-2009 mengalami Kejadian Luar Biasa (KLB) di enam kabupaten/kota (Kemenkes RI, 2011). Upaya-upaya yang dilakukan secara internasional maupun nasional untuk mengendalikan penyakit malaria tersebut sampai saat ini belum mencapai target seperti yang diharapkan. Oleh karena itu penemuan vaksin yang efektif sangat diharapkan untuk mencegah penyebaran malaria (Moorthy and Hill, 2002).

Vaksin malaria yang telah dikembangkan sampai saat ini ada bermacam-macam berdasarkan siklus hidup Plasmodium yang kompleks dan respon imun alami yang berbeda-beda pada setiap stadium dalam siklus hidup tersebut. Jenis vaksin yang disebut dengan *transmission blocking vaccine* (TBV) adalah vaksin yang menginduksi antibodi dalam tubuh

manusia dan antibodi tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit di dalam midgut nyamuk, sehingga terjadi penghambatan transmisi malaria dari nyamuk ke manusia (Tsuboi *et al.*, 2002). Perkembangan TBV tidak hanya terbatas pada antigen parasit saja, namun juga mulai dikembangkan vaksin berbasis antigen dari tubuh nyamuk, seperti protein dari dinding midgut dan kelenjar saliva (Hill, 2011).

Saliva nyamuk *Anopheles* merupakan suatu campuran protein dan molekul yang diperlukan dalam proses penghisapan darah dengan menghambat hemostasis inang dan respon inflamasi melalui injeksi komponen vasomodulator (Ribeiro *and* Francischetti, 2003). Injeksi saliva ke dalam tubuh inang juga dapat memodulasi respon imun dengan mensupresi respon imun non-spesifik dan respon imun adaptif, sehingga memperkuat transmisi agen pathogen (Fontaine *et al.*, 2011). Injeksi saliva juga dapat memicu produksi antibodi terhadap beberapa komponen saliva (King *et al.*, 2011). Oleh karena itu, komponen saliva dari Arthropoda penghisap darah banyak diteliti untuk diaplikasikan sebagai target pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) (Titus *et al.*, 2006).

Di Indonesia terdapat 24 spesies nyamuk *Anopheles* yang bisa menjadi vektor malaria, sepuluh spesies merupakan vektor utama. Vektor utama malaria di Indonesia meliputi *Anopheles aconitus*, *An.balabacensis*, *An.barbirostris*, *An.farauti*, *An.koliensis*, *An.letifer*, *An.maculatus*, *An.punctulatus*, *An.subpictus* dan *An.sundaicus*. Vektor malaria yang paling luas distribusinya adalah *An.sundaicus*, *An.subpictus*, *An.barbirostris*, *An.maculatus*, *An.aconitus* dan *An.balabacensis* dan sebagian besar merupakan *species complex* (Ndoen *et al.*, 2010). *Anopheles sunaicus* merupakan vektor malaria yang penting untuk daerah pantai di pulau Jawa, Bali, Sumatera, Kalimantan dan kepulauan Nusa Tenggara Barat (Sinka *et al.*, 2011).

Imunitas inang terhadap protein saliva nyamuk dibuktikan dengan adanya antibodi IgG anti-saliva pada individu yang terpapar gigitan nyamuk yang menunjukkan protein tersebut merupakan protein imunogenik karena mampu memicu produksi antibodi (Remoue *et al.*, 2006). Oleh karena itu, studi imunogenik pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan protein saliva nyamuk *Anopheles sunaicus* yang bersifat imunogenik sebagai langkah awal menemukan protein saliva yang berpotensi sebagai kandidat target baru TBV.

Metode Penelitian

Landing collection An.sundaicus dilakukan di pantai Watudodol, Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur. *An.sundaicus* betina dewasa ditangkap menggunakan alat *aspirator* pada saat *landing* (hinggap) di sekitar kandang hewan ternak, mulai pukul 19.00 sampai 23.00. Nyamuk diidentifikasi secara morfologi menggunakan kunci bergambar dalam keadaan teranestesi dan di bawah mikroskop stereo. Nyamuk dewasa dibedakan menjadi jantan dan betina. Pada nyamuk betina usia antara 3-7 hari dilakukan isolasi kelenjar saliva. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam *ependorf* steril yang telah diisi 100 μ L PBS dalam PMSF steril dan disimpan dalam -80°C sampai digunakan.

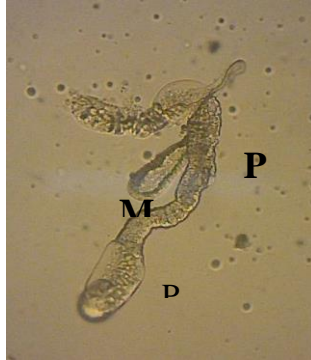
Kelenjar saliva selanjutnya diekstraksi dengan penambahan buffer lysis, dihancurkan menggunakan *micro pestle* dan *water sonicator* serta sentrifugasi. Supernatan diambil sebagai ekstrak kelenjar saliva (SGE) dan dilakukan elektroforesis SDS-PAGE untuk melihat profil protein kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus*. Hasil dari SDS-PAGE juga akan digunakan untuk pemeriksaan *western blotting* untuk menentukan protein kelenjar saliva yang merupakan protein imunogenik melalui reaksi imunologis dengan serum penduduk desa Bangsring yang mengandung antibodi spesifik terhadap protein-protein saliva. Analisis *Western Blot* dilakukan untuk melihat hasil *cross-reaction* antara antigen vektor dengan antibodi serum individu dari daerah endemik yang terpapar gigitan nyamuk *An.sundaicus*. Pita-pita yang muncul pada membran PVDF setelah direaksikan dengan serum menunjukkan protein-protein imunogenik dengan berat molekul tertentu.

Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil *landing collection* di dusun Paras Putih, Desa Bangsring, Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi didapatkan nyamuk *Anopheles sundaicus* sebagai spesies dominan. Ada dua spesies yang berhasil diidentifikasi dari 250 nyamuk yang ditangkap, yaitu *Anopheles sundaicus* dan *Anopheles barbirostris*. Dari keseluruhan jumlah nyamuk tersebut *An.barbirostris* hanya berjumlah tiga nyamuk. Oleh karena itu, *An.sundaicus* merupakan spesies dominan di wilayah tersebut dan berpotensi menjadi vektor malaria yang dominan pula.

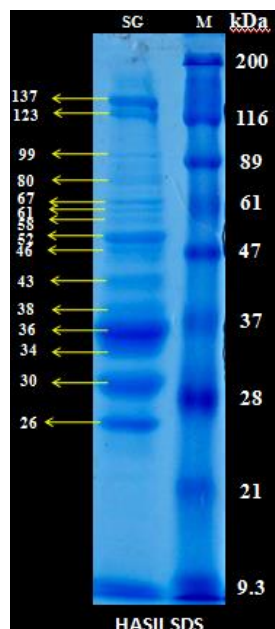
Kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* jumlahnya sepasang dan masing-masing terdiri dari tiga lobus, yaitu dua lobus lateral dan satu lobus medial. Ketiga lobus tersebut melekat

pada saluran (*duct*) saliva umum. Pada nyamuk betina, lobus lateral dibentuk oleh daerah proksimal, intermediet dan distal, sedangkan lobus median dibentuk oleh daerah leher yang pendek dan daerah distal (lihat Gambar .1).



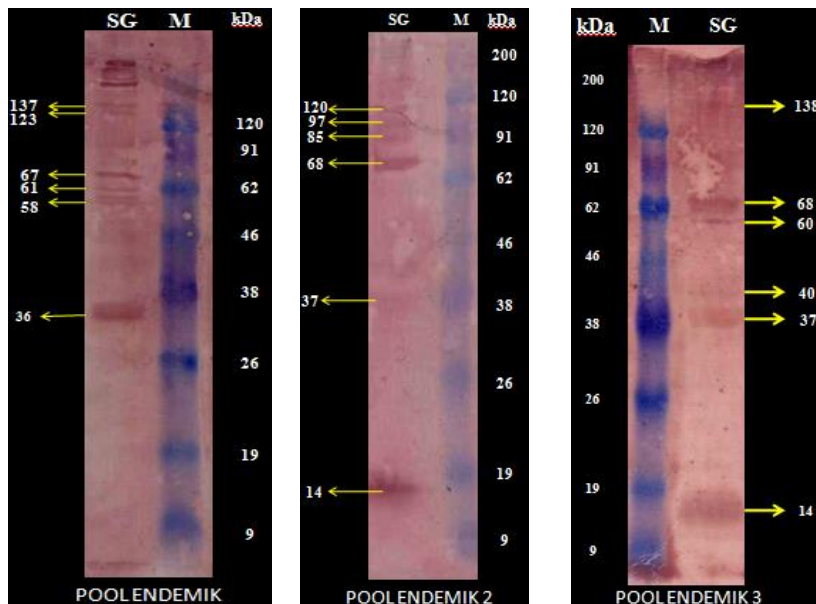
Gambar .1 Kelenjar saliva *An.sundaicus* betina (A) dan *An.sundaicus* jantan (B)
Keterangan : M: lobus medial; PL: lobus lateral proksimal; DL: lobus lateral distal

Profil protein kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* betina bisa diketahui berdasarkan hasil elektroforesis SDS PAGE. Berdasarkan hasil SDS PAGE tersebut didapatkan 15 pita utama dengan kisaran berat molekul antara 24 kDa sampai 138 kDa (lihat Gambar .2). Diantara kelima belas pita protein tersebut terdapat beberapa pita yang cukup tebal, yaitu dengan berat molekul : 137, 123, 67, 52, 43, 36, 34, 30, 26 kDa.



Gambar .2. Profil Protein kelenjar Saliva *Anopheles sundaicus* Betina

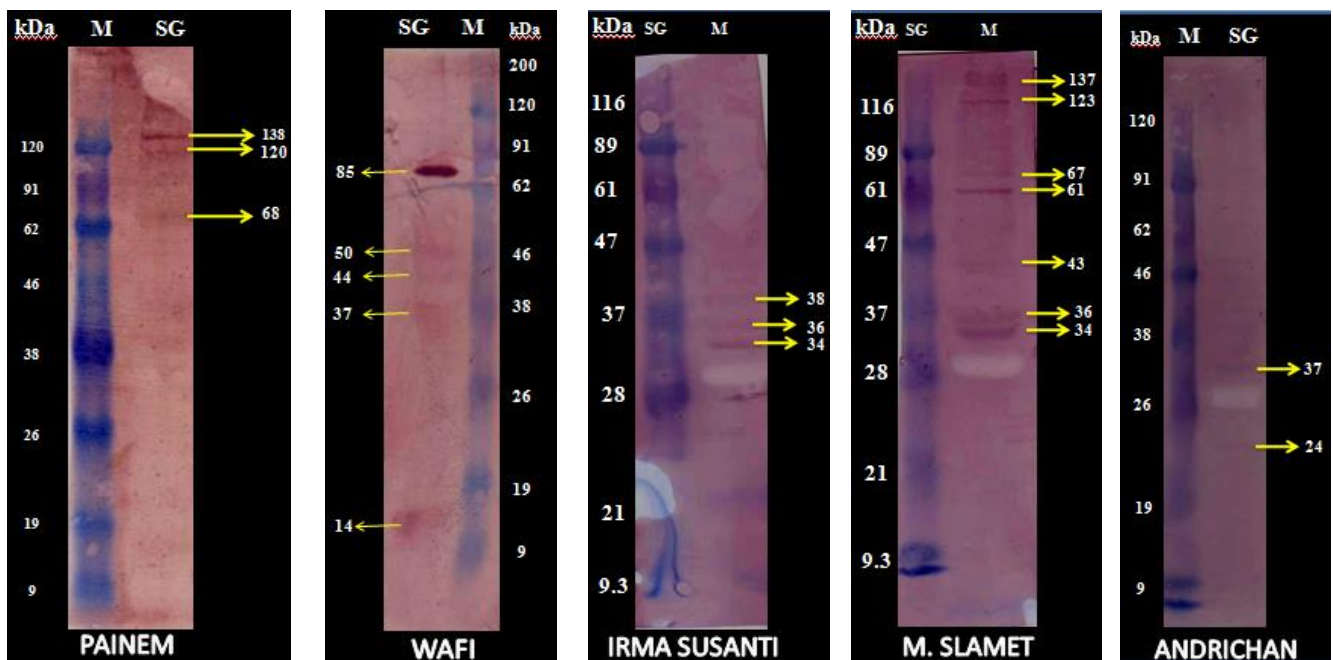
Protein imunogenik ditentukan berdasarkan adanya antigen protein kelenjar saliva yang dapat dikenali oleh antibodi dalam serum individu yang terpapar gigitan nyamuk *An.sundaicus* dengan menggunakan metode *Western Blotting*. Hasil penelitian menunjukkan adanya beberapa protein imunogenik dengan berat molekul 138, 120, 97, 86, 68, 60, 58, 40, 37 dan 14 kDa (lihat Gambar 3). Hasil ini diperoleh dengan menggunakan gabungan (pool) dari empat sampai lima sampel serum penduduk desa Bangsring dan dilakukan tiga kali pengulangan. Diantara pita-pita protein yang dikenali oleh antibodi anti-saliva tersebut, terdapat beberapa protein yang paling imunogenik karena didapatkan pada ketiga hasil pengulangan, yaitu protein dengan berat molekul 68 dan 37 kDa. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Fontaine *et al.*, (2012) yang juga mendapatkan protein imunogenik dengan berat molekul 37 kDa dari ekstrak kelenjar saliva nyamuk *An.stephensi* dan 65 kDa dari ekstrak kelenjar saliva nyamuk *An.gambiae*, *An.arabiensis* dan *An.stephensi*. Berdasarkan hasil analisis dengan mass spectrometri, kemungkinan protein 37 kDa merupakan famili protein allergen 30 kDa atau *GE-rich* (Calvo *et al.*, 2009). Protein ini merupakan protein yang berperan dalam *blood feeding* dengan menghambat (*block*) adesi platelet pada kolagen melalui ikatan secara langsung AAPP dengan kolagen dan selanjutnya menghambat agregasi platelet melalui peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler (Yoshida *et al.*, 2008).



Gambar 3. Hasil *Western Blotting* dari Pool Serum Penduduk Bangsring dengan Ekstrak Kelenjar Saliva *An.sundaicus* yang Menunjukkan Adanya Protein Imunogenik dengan Berbagai Berat Molekul.

Protein kelenjar saliva dengan berat molekul 68 kDa kemungkinan merupakan protein apyrase yang mempunyai berat molekul antara 60-65 kDa. *Apyrase* dan *5' nucleotidase* merupakan enzim yang membantu proses *blood feeding* melalui degradasi (menghidrolisa) *adenosine diphosphate* (ADP) dan *adenosine triphosphate* (ATP) menjadi AMP yang merupakan mediator agregasi platelet dan inflamasi serta mencegah aktivasi netrofil (Ribeiro and Francischetti, 2003)

Protein imunogenik hasil *Western Blotting* menggunakan pool serum lima individu penduduk Bangsring di atas, juga sesuai dengan hasil respon individual (lihat Gambar 4). Berdasarkan respon individual didapatkan pita-pita imunogenik dengan berat molekul 138, 120, 85, 68, 67,61,50, 43, 44, 38,36,34 dan 14 kDa. Diantara pita-pita imunogenik tersebut yang bersifat paling imunogenik, karena paling sering muncul, adalah dengan berat molekul 36-38 kDa. Protein dengan berat molekul 30-36 kDa merupakan famili protein allergen 30 kDa atau *GE-Rich* (Calvo *et al.*, 2009). Protein tersebut kemungkinan identik dengan AAPP yang berperan dalam *Blood Feeding* (Yoshida *et al.*, 2008).



Gambar 4 Hasil *Western Blotting* dari Serum 5 Individu Penduduk Bangsring dengan Ekstrak Kelenjar Saliva *An.sundaicus* (Respon Individual) yang Menunjukkan Adanya Protein Imunogenik dengan Berbagai Berat Molekul.

Protein dengan berat molekul 60-65 kDa pada respon individual ini tidak muncul, sehingga protein ini kurang imunogenik dibandingkan dengan protein dengan berat molekul 37 kDa. Oleh karena itu, potensi protein 37 kDa sebagai kandidat vaksin perlu ditelusuri lebih lanjut dengan analisis *mass spectrometri* untuk mengidentifikasi protein ini yang akan dikerjakan sebagai tahapan selanjutnya dari penelitian disertasi doktor ini.

Kesimpulan

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Profil protein kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* hasil SDS PAGE menunjukkan terdapat 15 pita utama dengan kisaran berat molekul antara 24 kD sampai 138 kD.
2. Protein imunogenik kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan menggunakan pool serum penduduk Bangsring mempunyai berat molekul 138, 120, 97, 86, 68, 60, 58, 40, 37 dan 14 kDa dan protein yang paling imunogenik adalah protein dengan berat molekul 37 dan 68 kDa.
3. Protein imunogenik kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan menggunakan lima serum individu penduduk Bangsring (respon individual) mempunyai berat molekul 138, 120, 85, 68, 67,61,50, 43, 44, 38,36,34 dan 14 kDa dan protein yang paling imunogenik adalah dengan berat molekul 36-38 kDa.

Saran

Protein imunogenik kelenjar saliva nyamuk *An.sundaicus* dengan berat molekul 37 dan 68 kDa perlu diidentifikasi lebih lanjut dengan analisis *mass spectrometri*.

Daftar Pustaka

- Calvo E., Pham V.M., Marinotti O., Andersen J.F., Ribeiro J.M.C. 2009. The salivary gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevant to hemophagy. *BMC Genomics*, 10:57.
- Fontaine A., Diouf I., Bakkali N., *et al.* 2011. Implication of haematophagous salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors*, 4: 1-17.

- Fontaine A., Pascual A., Orlandi-Pradines E., Diouf I., Remoue F., Pages F., Fusai T., Rogier C., Almeras L. 2011. Relationship between exposure to vector bites and antibody response to mosquito salivary gland extracts. *PLoS ONE*, 6(12): e29107.
- Hill A.V.S. 2011. Vaccines against malaria. *Phill. Trans. R. Soc. B.* 366: 2806-2814.
- King J.G., Vernick K.D., Hillyer J.F. 2011. Members of the salivary gland surface protein family (SGS) are major immunogenic components of mosquito saliva. *JBC Papers in Press*. Manuscript M111.280552.
- Moorthy V. and Hill A.V.S. 2002. Malaria Vaccines. *British Medical Buletin*; 62: 59-72.
- Ndoen E., Wild C., Dale P., Sipe N., Dale M. 2010. Relationship between Anopheline mosquitoes and topography in West Timor and Java, Indonesia. *Malaria Journal*, 9:242.
- Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J-P., Boulanger D., Simondon F. 2006. Evaluation of antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 363-370.
- Ribeiro, J.M., and Francischetti, I.M. 2003. Roelof Arthropod Saliva in Blood feeding: sialome and post-sialome perspective. *Ann. Rev. Entomol.* 48:73-78.
- Sinka M.E., Bangs M.J., Manguin S., Chareonviriyaphap T., Patil A.P., Temperley W.H., Gething P.W., Elyazar I.R.F., Kabaria C.W., Harbach R.E., Hay S.I. 2011. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites & Vectors*, 4:89.
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia, Z.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*, 28: 131-141.
- Tsuboi T., Cao Y., Rungruang T., Otsuki H., Iriko H., Kaneko O., Sattabongkot J., Torii M. 2002. Recent progress on transmission-blocking vaccine development of vivax malaria. *Prociding of 8th Japan-Korea Parasitologist's Seminar*. Maebashi, Japan. pp :66-73.
- Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H .2008. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111:2007-20.
- WHO. 2011. Malaria. Diakses tanggal 30 desember 2011 dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>

