



**ANALISIS IN VITRO AKTIVITAS APIRASE FRAKSI
PROTEIN IMUNOGENIK 67 kDa DARI
KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus***

SKRIPSI

Oleh
Nadya Rismana Fitriani
NIM 161810401057

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**ANALISIS IN VITRO AKTIVITAS APIRASE FRAKSI
PROTEIN IMUNOGENIK 67 kDa DARI
KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan
memenuhi salah satu syarat menyelesaikan program studi S1(Biologi) dan
meraih gelar Sarjana Sains

Oleh
Nadya Rismana Fitriani
NIM 161810401057

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan untuk:

1. Bapak Ferry Kusworo Coert dan Mamah Irma Wiyanti atas kesabaran, dukungan dan doa-doa yang selalu beliau panjatkan
2. Nenek Wati K. dan Kakek Widana H. atas motivasi, dukungan, dan doa-doa yang selalu beliau panjatkan
3. Oma Sri atas dukungan dan doa yang beliau panjatkan
4. Adik-adik saya Aisyah Putri F. dan Ferian Fathin serta seluruh keluarga besar yang senantiasa menjadi penyemangat
5. Guru-guru sejak taman kanak-kanak (TK), Sekolah Dasar (SD), Sekolah Menengah Pertama (SMP), dan Sekolah Menengah Atas (SMA) atas segala bimbingannya
6. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

MOTTO

“Barangsiapa yang berjalan untuk menuntut ilmu, maka Allah akan memudahkan baginya jalan ke surga.” (HR. Muslim)



*Kumpulan Hadits Sahih Bukhari Muslim oleh Muhammad Fuad Abdul Baq

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nadya Risma Fitriani

NIM : 161810401057

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Analisis In Vitro Aktivitas Apirase Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus*” adalah benar-benar karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., Dr. Rike Oktarianti, M.Si. dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juli 2020

Yang menyatakan,

(Nadya Risma Fitriani)

NIM 161810401057

SKRIPSI

**ANALISIS IN VITRO AKTIVITAS APIRASE FRAKSI
PROTEIN IMUNOGENIK 67 kDa DARI
KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus***

Oleh
Nadya Rismana Fitriani
NIM 161810401057

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Rike Oktarianti, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Syubbanul Wathon S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis In Vitro Aktivitas Apirase Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus*” karya Nadya Rismana Fitriani telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan

Alam

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

Dr.Rike Oktarianti, M.Si.
NIP. 196310261990022001

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.
NIP. 1990090620190301014

Anggota II,

Anggota III,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP. 197509132000032001

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si.
NIP. 197306012000032001

Mengesahkan Dekan,

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D
NIP. 195910091986021001

RINGKASAN

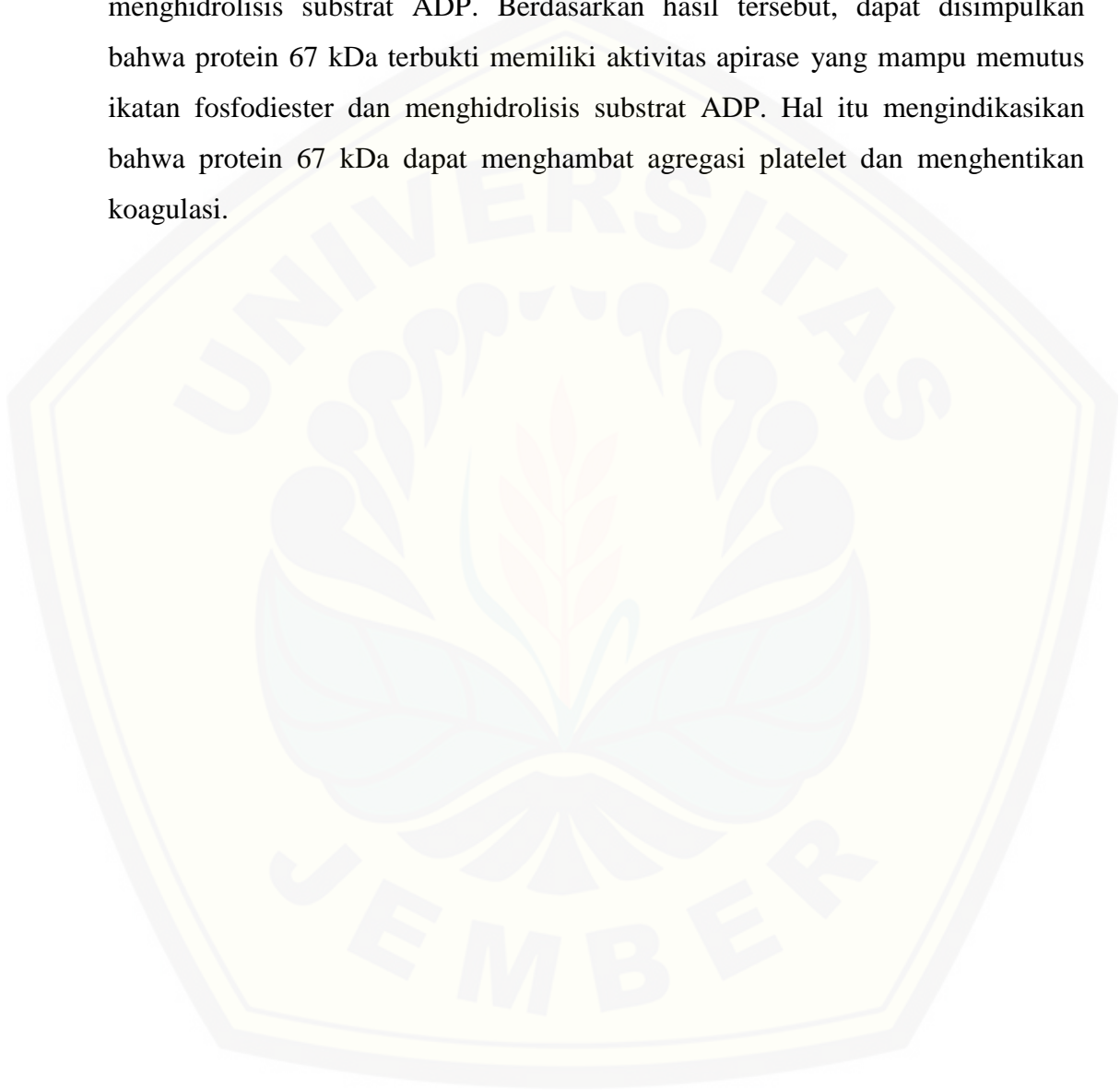
Analisis In Vitro Aktivitas Apirase Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus*, Nadya Rismana Fitriani; NIM 161810401057; 2020; 54 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Komponen saliva nyamuk *Aedes* memiliki substansi antihemostasis, antiinflamasi, dan imunomodulator yang berperan penting dalam aktivitas *blood feeding*. Di dalam kelenjar saliva *Ae. albopictus* terdapat tiga protein imunogenik yaitu 31 kDa, 47 kDa, dan 67 kDa. Protein dengan berat molekul 67 kDa diduga memiliki komponen utama berupa apirase. Apirase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ADP menjadi AMP dan fosfat inorganik. Penurunan konsentrasi ADP dapat menyebabkan penurunan agregasi platelet inang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas apirase dalam membebaskan fosfat inorganik dari substrat ADP dalam menghambat agregasi platelet pada fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus*.

Metode penelitian ini meliputi *landing* dan *rearing* nyamuk *Ae. albopictus*, Identifikasi dan isolasi kelenjar saliva *Ae. albopictus*, isolasi fraksi protein 67 kDa menggunakan metode SDS-PAGE, purifikasi protein 67 kDa dengan metode elektroelusi dan dialisis, serta uji aktivitas apirase menggunakan *malachite green detection kit* untuk mengetahui aktivitas enzim dalam membebaskan fosfat inorganik dari ADP. Hasil pembebasan fosfat inorganik kemudian dibandingkan dengan kurva standar KH_2PO_4 . Untuk mengukur konsentrasinya.

Pada penelitian ini digunakan sampel 67 kDa yang dibandingkan dengan ekstrak total kelenjar saliva dan kontrol positif ATPase. Hasil yang diperoleh yaitu protein 67 kDa mampu membebaskan fosfat inorganik sebesar 34,02 nmol. Sedangkan protein total mampu membebaskan fosfat inorganik sebesar 228,18 nmol dan kontrol positif ATPase mampu membebaskan fosfat inorganik sebesar 52,21 nmol dari substrat ADP 210 μM . Bila dibandingkan dengan kontrol positif, kemampuan protein 67 kDa setara dengan 65% kemampuan kontrol positif.

ATPase dalam menghidrolisis substrat ADP. Sedangkan protein total memiliki kemampuan yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein 67 kDa dan kontrol positif ATPase. Bila dibandingkan dengan kontrol positif ATPase, kemampuan protein total setara dengan 437% kemampuan kontrol positif ATPase dalam menghidrolisis substrat ADP. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa protein 67 kDa terbukti memiliki aktivitas apirase yang mampu memutuskan ikatan fosfodiester dan menghidrolisis substrat ADP. Hal itu mengindikasikan bahwa protein 67 kDa dapat menghambat agregasi platelet dan menghentikan koagulasi.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis In Vitro Aktivitas Apirase Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus*” dengan tepat waktu. Karya ilmiah ini dilakukan untuk memenuhi tugas akhir serta sebagai syarat dalam menyelesaikan strata satu (S1) di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Berbagai dukungan juga turut andil dalam menyelesaikan karya ilmiah ini sehingga penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Rike Oktarianti, M.Si. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktunya, memberikan ilmu serta bimbingannya hingga penelitian ini dapat selesai dengan baik.
2. Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, membimbing serta memberikan ilmunya kepada penulis sehingga penelitian ini dapat selesai dengan baik.
3. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., dan Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si. yang telah meluangkan waktu, memberikan ilmu serta bimbingan pada penelitian ini.
4. Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu, memberi motivasi dan arahan selama masa perkuliahan.
5. Teman-teman TBV 2016 (Ratis Nour Sholichah, Muhammad Khalid Abdullah, Ahmad Tosin, Yasir Mubarak, Nuril Azizah, Intan Fitri Indrasari, Riana Agatha Listiani), yang telah mendukung, berjuang bersama dan saling membantu selama penelitian.
6. Kakak-kakak senior Lailly Nur Uswatul Hasanah, Miatin Alvin Septianasari, Elisa Erni, Alfin Putri Nahdiyatin, Dwi Alfiana, Rochmatul Nuryu Khasanah, Deni Rizky Damara, yang telah memberikan motivasi, ilmu serta dukungan.

7. Sahabat-sahabat tercinta Ahmad Tosin, Yasir Mubarak, Babudin, yang selalu memberikan semangat, motivasi serta dukungan.
8. Teman-teman biologi angkatan 2016 “BANANA” yang telah mendukung serta memberikan semangat.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam terlaksananya penelitian ini. Penulis menyadari bahwa dalam karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran sangat diperlukan. Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembacanya. Amin

Jember, 27 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Batasan Masalah	2
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD)	4
2.2 Karakteristik Morfologi <i>Ae. albopictus</i>	4
2.3 Transmisi Virus Dengue dari Vektor ke Inang	6
2.4 Protein Kelenjar Saliva Aedes dan Fungsi Biologisnya	7
2.5 Aktivitas Apirase dan Peran Biologisnya	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Rancangan Penelitian	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 <i>Landing</i> dan <i>Rearing Ae. albopictus</i>	13
3.4.2 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	13

3.4.3	Isolasi Fraksi Protein 67 kDa	14
3.4.4	Purifikasi Fraksi Protein 67 kDa	14
3.4.5	Uji Aktivitas Apirase Protein Imunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	15
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1	Identifikasi dan Isolasi Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	16
4.2	Profil dan Purifikasi Protein 67 kDa	18
4.3	Uji Aktivitas Apirase Protein Imunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	19
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	25
5.1	Kesimpulan	25
5.2	Saran	25
	DAFTAR PUSTAKA	26
	LAMPIRAN	31

DAFTAR GAMBAR

2.1	Morfologi <i>Aedes albopictus</i>	5
2.2	Perbedaan <i>Aedes albopictus</i> jantan dan betina	6
2.3	Transmisi virus dengue di dalam vektor nyamuk dan ke manusia	7
2.4	Peran protein kelenjar saliva arthropoda	10
3.1	Rancangan Penelitian.....	12
4.1	Morfologi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	18
4.2	Morfologi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> jantan dan betina.....	19
4.3	Kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i>	20
4.4	Profil Protein Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	21
4.5	Reaksi <i>Malachite Green Calorimetric</i>	22
4.6	Jumlah Fosfat Inorganik (Pi) yang Dibebaskan	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi Larutan	31
Lampiran 2	Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Ekstrak Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	33
	Kurva standar marker protein	33
Lampiran 3	Daftar Standar BSA	35
	Kurva Standar BSA	35
Lampiran 4	Daftar Standar <i>Malachite Green Calorimetric Assay</i>	37
	Kurva Standar Fosfat	37
Lampiran 5	Elusi Sampel dengan Substrat ADP	38
Lampiran 6	Nilai Absorbansi Protein 67 kDa, Protein Total Kelenjar Saliva <i>Ae.</i> <i>albopictus</i> , dan ATPase dalam Membebaskan Fosfat Inorganik .	39
	Perhitungan Kemampuan Pembebasan Fosfat Inorganik Protein 67 kDa, Protein Total Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i> dengan Kontrol Positif ATPase	39

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit yang sering diderita penduduk di wilayah tropis dan subtropis adalah Demam Berdarah Dengue (DBD) (Halstead, 2008). Wilayah tropis dan subtropis yang beresiko terjangkit penyakit DBD meliputi 128 negara, termasuk Indonesia (WHO, 2016; Sandra, 2019, Zhang dan Lui, 2020). Kasus DBD di Indonesia dianggap sebagai kejadian luar biasa karena tiap tahunnya menimbulkan korban jiwa (infoDATIN, 2016; Sandra, 2019). Penyakit DBD disebabkan oleh virus dengue (DENV) yang memiliki 4 jenis serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4 (Sasmono *et al.*, 2018; Wathon *et al.*, 2020). Virus ini ditransmisikan oleh vektor berupa nyamuk *Aedes*. Hingga saat ini diketahui bahwa *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) berperan sebagai vektor utama DBD sedangkan *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) berperan sebagai vektor sekunder (WHO, 2013; Wan *et al.*, 2013). *Ae. albopictus* memiliki sifat *antrophophilic* sehingga kemampuan transmisi virus dengue ke manusia juga tinggi (Boesri, 2011).

Virus dengue ditransmisikan oleh vektor nyamuk ke inang ketika *blood feeding* (Lambrechts *et al.*, 2010). Menurut Fontaine *et al.* (2011), saliva *hematophagus arthropod* nyamuk *Aedes* memiliki substansi antihemostasis. Substansi antihemostasis berperan dalam mencegah koagulasi darah inang ketika nyamuk melakukan *blood feeding* (Ribeiro, 2000). Komponen antihemostasis yang ditemukan pada *Aedes* adalah apirase yang memiliki kemampuan memecah *Adenosine triphosphate* (ATP) atau *Adenosine diphosphate* (ADP) untuk menghasilkan *Adenosine monophosphate* (AMP) dan fosfat inorganik (Pi) (Champagne *et al.*, 1995). Peningkatan AMP dan penurunan ADP menyebabkan kemampuan agregasi platelet inang menurun (Hamasaki, 2009).

Menurut Oktarianti *et al.* (2014) protein imunogenik pada *Ae. aegypti* teridentifikasi pada berat molekul 31 dan 56 kDa. Hasil analisis *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) menunjukkan bahwa komponen utama protein 31 kDa adalah D7 yang berperan dalam antihemostasis

yang dapat mencegah terjadinya vasokonstriksi ketika nyamuk melakukan *blood feeding*. Sedangkan komponen utama protein 56 kDa adalah apirase yang berperan sebagai antihemostasis yang menghambat agregasi platelet (Oktarianti *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Khasanah (2019) menunjukkan bahwa pada *Ae. albopictus* terdapat tiga protein imunogenik yaitu 31, 47 dan 67 kDa. Komponen protein 67 kDa diduga adalah apirase. Apirase pada *Ae. albopictus* terdapat pada protein dengan kisaran berat molekul 61-68 kDa (Doucoure *et al.*, 2013; Wichit *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2012; Marinotti *et al.*, 1996). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas apirase pada fraksi protein imunogenik 67 kDa pada kelenjar saliva *Ae. albopictus*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas apirase dalam membebaskan fosfat inorganik dari substrat ADP dalam menghambat agregasi platelet pada fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui aktivitas apirase dalam membebaskan fosfat inorganik dari substrat ADP dalam menghambat agregasi platelet pada fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus*.

1.4 Batasan Masalah

Sampel yang digunakan adalah *Ae. albopictus* yang berasal dari wilayah Kabupaten Jember.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan berkontribusi dalam pengembangan protein terapeutik sebagai agen trombolitik.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD)

Penyakit DBD merupakan penyakit tropis yang menjadi salah satu penyakit paling berbahaya di dunia. Infeksi DBD ditandai dengan gejala demam, nyeri otot/sendi dan timbulnya ruam (Halstead, 2008). Infeksi DBD diikuti oleh tiga fase yaitu demam, kritis, dan pemulihan. Periode kritis terjadi ketika peningkatan permeabilitas kapiler disertai dengan peningkatan hematokrit yang dapat menyebabkan perdarahan hebat. Jika DBD tidak diobati, angka kematian dapat mencapai 20% (WHO, 2009).

DBD disebabkan oleh virus dengue yang memiliki 4 jenis serotipe yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Masing-masing serotipe memiliki sub tipe (*strain*) yang banyak, sesuai dengan daerah atau tempat asal virus tersebut (Wathon *et al.*, 2020). Jumlah penderita penyakit DBD di Indonesia pada bulan Januari 2019 mencapai 13.683 korban jiwa. Sebanyak 133 orang dari 13.683 penderita DBD mengalami kematian. Provinsi dengan jumlah kasus DBD tertinggi di Indonesia adalah Jawa Timur dengan 2.657 kasus (Kemenkes RI, 2019).

Penyakit DBD disebabkan oleh virus dengue yang ditransmisikan melalui vektor serangga yaitu nyamuk *Aedes* (Guzman dan Haris, 2015). Vektor utama DBD yaitu *Ae. aegypti* sedangkan vektor sekunder DBD yaitu *Ae. albopictus* (WHO, 2011; WHO, 2013). Keduanya memiliki peran penting dalam penyebaran virus dengue (Boesri, 2011). *Ae. albopictus* merupakan vektor yang dapat beradaptasi dengan berbagai kondisi di wilayah tropis. Hal itu didukung dengan laporan terkait transmisi virus dengue dari *Ae. albopictus* yang menyebabkan penyakit DBD (Lambrechts *et al.*, 2010).

2.2 Karakteristik Morfologi *Ae. albopictus*

Ae. albopictus merupakan vektor sekunder DBD. Habitatnya berada di luar rumah seperti hutan atau perkebunan yang teduh dan memiliki tempat

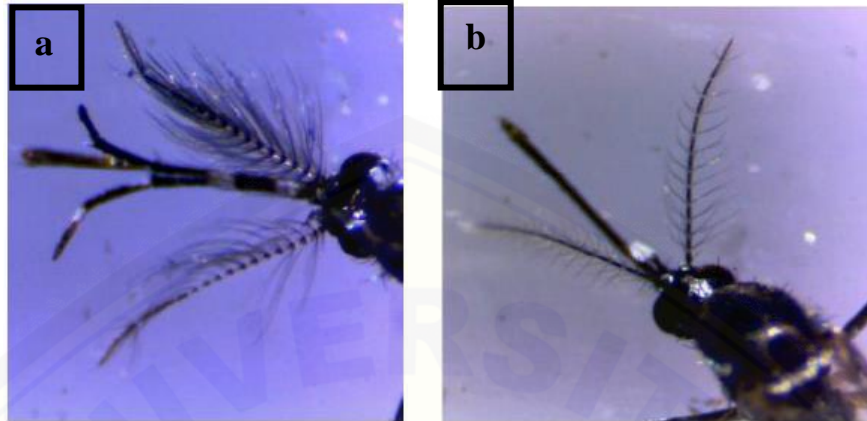
penampungan air. *Ae. albopictus* bersifat *anthropophilic* yaitu spesies tersebut cenderung melakukan *blood feeding* pada manusia. Selain itu, *Ae. albopictus* dikategorikan sebagai *multiple feeder* karena dapat melakukan *blood feeding* ke lebih dari satu individu (Boesri, 2011). Pada bagian dorsal toraks *Ae. albopictus* terdapat satu deret rambut putih di bagian mesonotum. Pada bagian lateral toraks terdapat mesepimeron dengan sisik putih yang tidak terpisah. Pada bagian anterior femur kaki tengah tidak ada deretan rambut putih. Ciri morfologi *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Rueda, 2004).



Gambar 2.1 Morfologi toraks dan kaki *Ae. albopictus*. (a) Mesonotum toraks *Ae. albopictus* (b) mesepimeron pada bagian lateral toraks (c) femur kaki tengah pada bagian lateral (Rueda, 2004)

Identifikasi jenis kelamin *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.2 dilakukan dengan melihat struktur antena dan perbandingan panjang *proboscis* dengan *palpus*. Nyamuk jantan memiliki antena dengan rambut yang panjang dan lebih lebat (*plumose*) dibandingkan betina yang memiliki rambut yang pendek dan lebih jarang (*pilose*). Nyamuk jantan memiliki *proboscis* dan *palpus* yang sama

panjang sedangkan *palpus* nyamuk betina lebih pendek dibandingkan *proboscis*-nya (Biswas dan Banerjee, 2016).

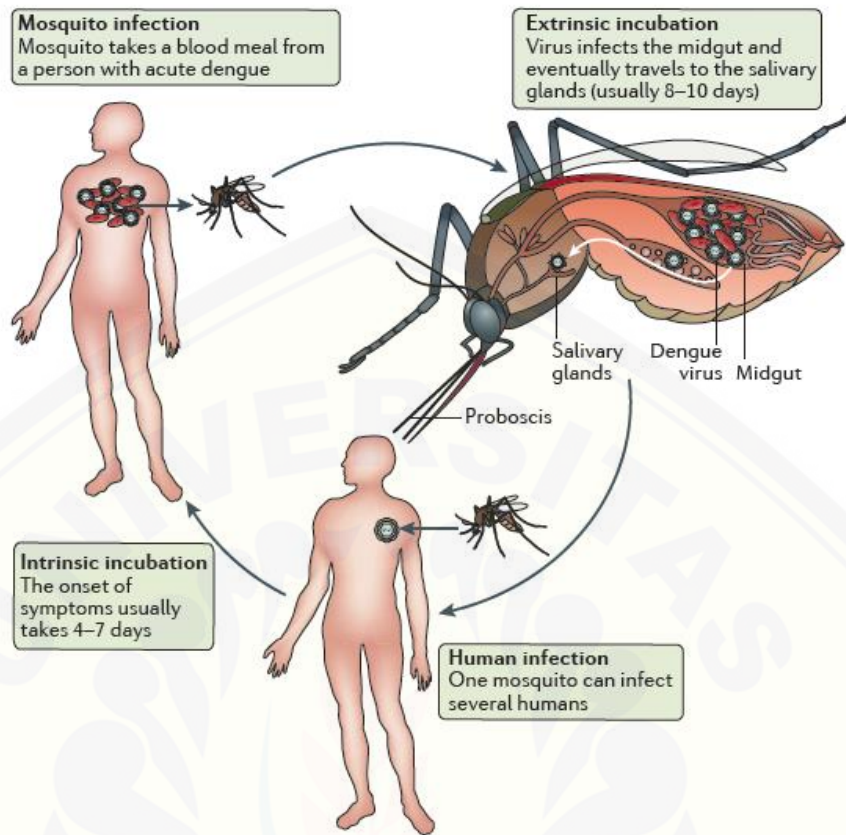


Gambar 2.2 Perbedaan *Ae. albopictus* jantan dan betina. (a) jantan (b) betina. (Biswas dan Banerjee, 2016)

2.3 Transmisi Virus Dengue dari Vektor ke Inang

Virus dengue adalah anggota famili flaviridae dan genus flavivirus. Virus ini termasuk dalam kelompok *arthropod borne virus* (arbovirus). Virus ini memiliki materi genetik berupa RNA. Virus ini dapat menyebabkan penyakit DBD dan ditransmisikan oleh vektor nyamuk *Aedes* ketika nyamuk melakukan *blood feeding* ke manusia (Haghiac dan Walle, 2005).

Virus dengue ditransmisikan oleh nyamuk betina dewasa ketika *blood feeding* ke manusia. Ketika nyamuk melakukan *blood feeding* ke manusia yang terinfeksi virus dengue maka virus akan masuk ke dalam epitelium *midgut* dan bereplikasi (Gubler, 2014). Virus yang telah bereplikasi menyebar melalui hemolimfa ke organ hingga mencapai kelenjar saliva. Proses penyebaran virus dengue di tubuh nyamuk betina berkisar 8-10 hari. Nyamuk tersebut kemudian dapat mentransmisikan virus dengue ke manusia sehat ketika melakukan *blood feeding*. Setelah terinfeksi, dibutuhkan rata-rata 4-7 hari untuk timbulnya gejala dan bagi seseorang untuk dapat menularkan virus dengue ke nyamuk baru (Guzman *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Transmisi virus dengue di dalam vektor nyamuk dan ke manusia (Guzman *et al.*, 2016).

2.4 Protein Kelenjar Saliva *Aedes* dan Fungsi Biologisnya

Kelenjar saliva nyamuk mengandung senyawa antiinflamasi, antihemostasis dan imunomodulator. Komponen antiinflamasi pada saliva nyamuk dapat menyebabkan respons inflamasi tubuh yang melawan molekul target dari saliva nyamuk menjadi terhambat. Komponen antihemostasis nyamuk dapat menghambat terjadinya pembekuan darah pada luka di lokasi *blood feeding*. Komponen imunomodulator dapat memodulasi respons imun inang sehingga dapat memfasilitasi vektor dalam mentransmisikan virus ke inang (Fontaine *et al*, 2011). Protein yang berasal dari kelenjar saliva *Aedes* mengandung substansi yang dapat memudahkan transmisi patogen dari vektor ke inang. Komponen protein kelenjar saliva *Aedes* dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komponen dan Fungsi Biologis Protein pada Saliva Nyamuk *Aedes*

No.	Nama Protein	Fungsi biologis	Berat molekul kDa	Nama spesies	
				<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>
1.	D7 family (a) (b)	vasodilator, antikoagulan, imunomodulator	31-37	+	+
2.	Serpin (a) (b)	protease inhibitor, antikoagulan	40-49	+	+
3.	Apyrase (a) (b) (c) (d) (g)	agregasi antiplatelet, antiinflamasi, antikoagulan, antihemostasis	61-68	+	+
4.	Adenosine deaminase (a) (b) (c)	antiinflamasi, antihemostasis	50-60	+	+
5.	Purine nucleosidase (a)	antiinflamasi, antihemostasis	50-60	+	-
6.	Serine proteases (a)	Antiinflamasi	50-60	+	-
7.	β -glucosidase (e)	antiinflamasi, sugar feeding	67	+	+
8.	Factor Xa (f)	Antikoagulan	54	+	-
9.	Aed a 3 (g)	reaksi alergi	30	+	-

Keterangan: (+) = ada, (-) = tidak ada (Sumber: (a) Almeras *et al.*, 2010; (b) Doucoure *et al.*, 2013; (c) Luplertlop, 2014; (d) Peng *et al.*, 2016; (e) Marinotti *et al.*, 1996; (f) Stark dan James, 1995; (g) Sun *et al.*, 2006)

Protein D7 berperan sebagai antihemostasis dengan cara menghambat aksi *amina biogenic* yang menyebabkan gagalnya proses vasokonstriksi dan agregasi platelet (Ribeiro *et al.*, 2007). Protein *serpin* pada saliva nyamuk berperan sebagai antikoagulan. Protein ini dapat menghambat aksi *Xa* dalam proses koagulasi darah. *Adenosine deaminase* dapat berfungsi sebagai antihemostasis dan antiinflamasi dengan menghilangkan *agonist* nukleotida dari agregasi platelet dan degranulasi sel *mast* (Luplertlop, 2014). Begitu pula dengan *purine nucleosidase* yang memiliki peran dalam antiinflamasi dan antihemostasis. Sedangkan *serine* hanya memiliki peran dalam antiinflamasi (Almeras *et al.*, 2010). β -glucosidase berperan dalam antiinflamasi dan *sugar feeding* (Marinotti *et al.*, 1996). *Lectin*

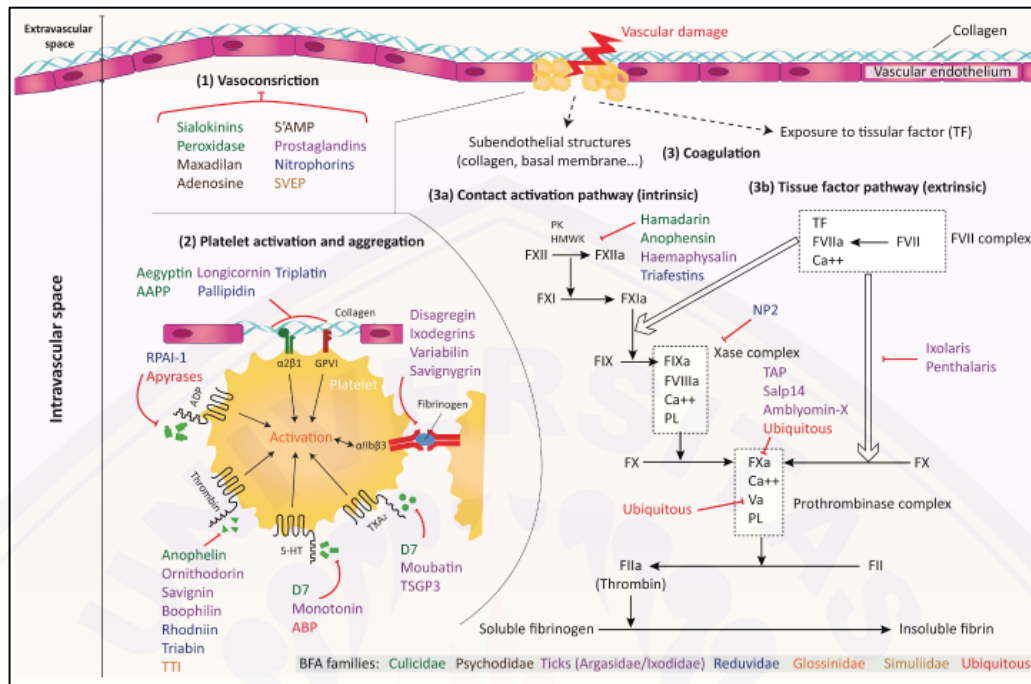
memiliki peran khusus yaitu opsonisasi, antimikroba dan dalam proses pengenalan sistem imun. *Lysozyme* berperan sebagai antimikroba yang dapat melindungi nyamuk dari patogen (Juhn *et al.*, 2011). Sedangkan apirase merupakan nukleosida trifosfat-difosfohidrolase yang membantu proses *blood feeding* dengan menghambat agregasi platelet melalui penguraian ADP atau ATP menjadi AMP dan fosfat inorganik (Sun *et al.*, 2006).

2.5 Aktivitas Apirase dan Peran Biologisnya

Protein saliva yang disekresikan oleh *Ae. albopictus* sebagian besar mengandung protein D7, *adenosine deaminase* (ADA), *serpin* dan apirase (Doucource *et al.*, 2013). Substansi tersebut memiliki peran dalam proses *blood feeding*. Peran tersebut termasuk dalam aktivitas antiinflamasi, antihemostasis, dan imunomodulator. Komponen yang memiliki peran dalam antihemostasis adalah enzim apirase (Fontaine *et al.*, 2011).

Apirase adalah enzim yang dapat diaktivasi oleh kalsium maupun magnesium pada membran plasma yang berperan dalam hidrolisis ADP untuk menghasilkan AMP dan fosfat inorganik (Smith *et al.*, 2002). Apirase yang diperoleh dari saliva *haematophagus arthropods* adalah enzim penghidrolisis nukleotida yang terlibat dalam penghambatan agregasi platelet melalui hidrolisis *adenosine diphosphate* ekstraseluler (Champagne *et al.*, 1995).

Ketika nyamuk melakukan *blood feeding* tubuh inang terluka sehingga tubuh akan melakukan mekanisme vasokonstriksi dan membentuk adesi platelet yang mengaktivasi platelet. Platelet yang aktif akan melepaskan *agonist* seperti ADP, *thrombin*, *tromboxane*, *serotonin* dan reseptor $\text{all}\beta 3$. Aktivasi platelet dilanjutkan pada tahap hemostasis kedua dengan mengekspos permukaan platelet dengan protein koagulan. Jalur koagulasi terbagi menjadi jalur intrinsik dan ekstrinsik yang akan membentuk *thrombin*. Pada akhirnya terjadi perubahan fibrinogen larut menjadi fibrin tidak larut dan menghentikan perdarahan (Fontaine *et al.*, 2011). Peran kelenjar saliva Arthropoda tersebut saat melakukan *blood feeding* dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Peran protein kelenjar saliva arthropoda (Fontaine *et al.*, 2011)

Menurut penelitian Fang (2011), protein rekombinan apirase dapat menghambat agregasi platelet. Apirase merupakan nukleosida trifosfat-difosfohidrolase yang ditemukan pada organisme *haematophagus*. Apirase termasuk famili 5'-nucleotidases dan berperan dalam menghambat agregasi platelet dengan memutus ikatan fosfodiester ADP. Apirase membantu proses *blood feeding* dengan mengubah ADP atau ATP menjadi AMP dan fosfat inorganik (Champagne *et al.*, 1995). ADP adalah penginduksi penting dari proses agregasi platelet. ADP dilepaskan oleh sel-sel yang rusak dan platelet teraktivasi. Apabila kadar AMP meningkat maka ADP tidak dapat berikatan dengan reseptor membran sehingga agregasi platelet akan terhambat (Kunapuli, 2002).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 hingga Juli 2020, bertempat di Laboratorium Bioteknologi dan Zoologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember serta Laboratorium Universitas Brawijaya.

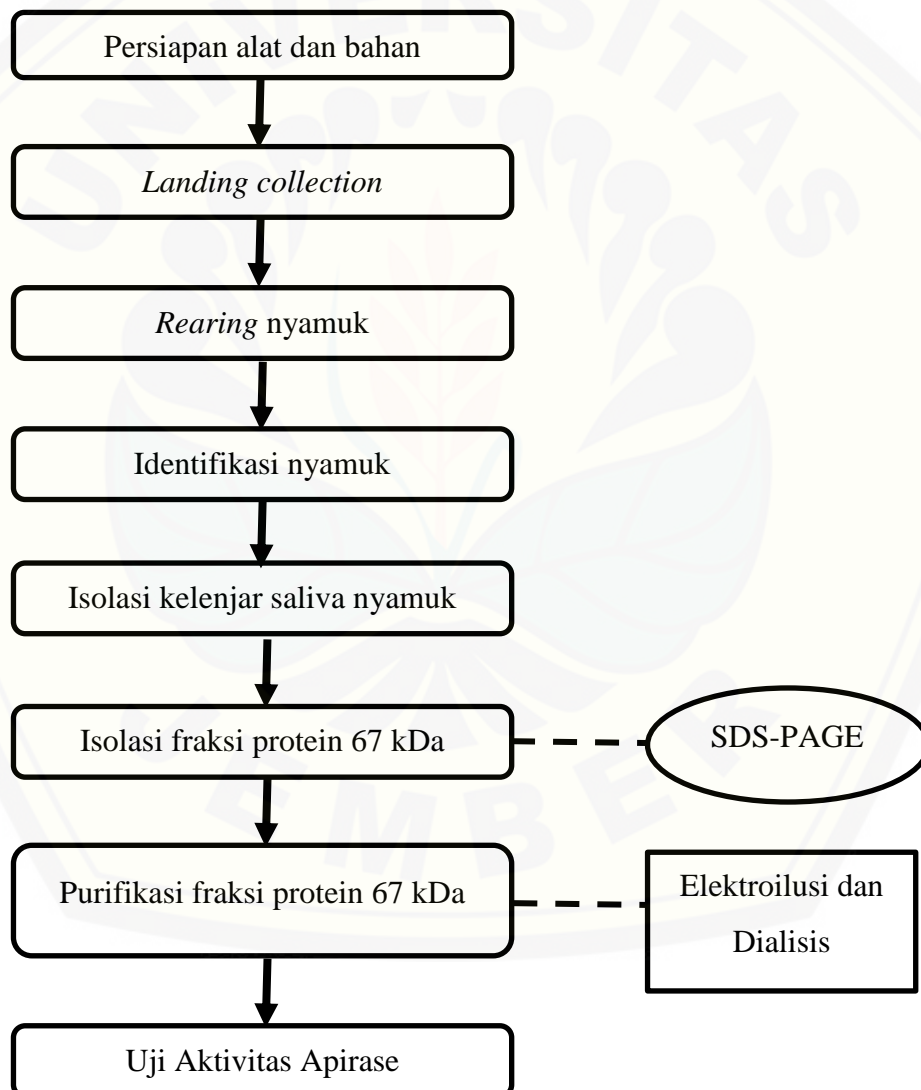
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang nyamuk, pipet plastik, cawan plastik, *tray*, sungkup tikus, erlenmeyer, aspirator, kain handuk, wadah air dari batok kelapa, mikroskop stereo, gelas benda, jarum diseksi, *beaker glass*, mikropipet, mikrotip (ukuran 0,5-10 μL , 10-100 μL , dan 100-1000 μL), *microtube* ukuran 1,5 ml, *ice box*, *ice gel*, *sentrifuge* (Hettich, Jerman), mikropistol, seperangkat alat *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Bio-Rad, USA), alat Elektroeluter (Bio-Rad, USA), pinset, *thermoshaker*, *magnetic stirrer*, Nano-Drop, *microplate* dan *microplate reader*.

Bahan yang digunakan adalah nyamuk *Ae. albopictus*, tikus wistar, larutan sukrosa 10%, tisu, kapas, *aluminium foil*, *Phenyl Metyl Sulfonyl Flouride* (PMSF) 1mM dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, NaCl 0,5%, alkohol 70%, *Acrilamide/Bis-acrilamide* 30% (Sigma-Aldrich, USA), *laemmli buffer* (Tris HCl 1 M pH 6,8, Gliserol 50%, SDS 10%, β -*mercaptoethanol*, *bromophenol blue*), *buffer* elektroda pH 8,3 (*Tris Base*, *Glycine*, SDS 0,1%), SDS 10%, Tris Cl 1,5 M pH 8,8 dan 0,5 M pH 6,8, larutan staining (*Coomassie Brillint Blue*, *Methanol*, Asam Asetat Glasial, H₂O), APS 10% (Bio-Rad, USA), TEMED (Sigma-Aldrich, USA), Marker Protein (*GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder*- Korea Selatan), *surgical blade*, membran selofan, PBS 1 mM pH 7,4, *etanol absolute*, Tris HCL 0,05 M pH 9, KH₂PO₄, amonium molibdat dalam 3 M asam sulfat, *malachite green oksalat* dalam polivinil alkohol, ADP dan ATPase.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian diawali dengan persiapan alat dan bahan kemudian melakukan landing dan rearing nyamuk *Ae. albopictus*. Kemudian dilakukan identifikasi *Ae. albopictus* dan melakukan isolasi kelenjar saliva *Ae. albopictus* betina. Setelah itu dilakukan isolasi fraksi protein 67 kDa dan purifikasi fraksi protein 67 kDa. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas apirase. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 *Landing dan Rearing Ae. albopictus*

Nyamuk *Ae. albopictus* yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil *rearing* yang dilakukan di ruang insektarium bersuhu 27 °C (Imam *et al.*, 2014). *Rearing* diawali dengan mengumpulkan (*landing collection*) nyamuk dewasa menggunakan aspirator dan larva menggunakan pipet di luar rumah atau wilayah perkebunan di wilayah Kecamatan Sumbersari Kabupaten Jember. Larva dipindahkan ke dalam nampan yang berisi air dan diberi makan berupa pelet kemudian dikembang biakan hingga menjadi pupa. Pupa dipindahkan menggunakan pipet ke cawan pupa. Cawan tersebut dimasukan ke dalam kandang nyamuk. Selain memasukan cawan pupa, perlu juga dimasukan larutan sukrosa 10% sebagai makanan nyamuk jantan. Cawan tempat peletakan telur juga disiapkan dengan pemberian kertas saring di bibir cawan untuk tempat bertelur nyamuk dewasa. Seekor tikus wistar dimasukan ke dalam kandang nyamuk dewasa 2 kali sehari pada pukul 07.00-09.00 dan 15.00-17.00 untuk proses *blood feeding* nyamuk betina. Nyamuk yang telah dewasa diambil dari kandang menggunakan aspirator kemudian dimasukan ke gelas plastik yang ditutupi kasa yang selanjutnya dilakukan isolasi kelenjar saliva nyamuk.

3.4.2 Identifikasi *Ae. albopictus*

Identifikasi dilakukan dengan melihat garis di bagian toraks dan bentuk sisik pada mesepimeron serta femur kaki tengah. Pada bagian dorsal toraks *Ae. albopictus* terdapat satu deret rambut putih (*lyre*) di bagian mesonotum. Pada bagian lateral toraks terdapat mesepimeron dengan sisik putih dengan bentuk tidak terpisah. Pada bagian lateral femur di kaki tengah tidak ada deretan rambut (Rueda, 2004). Perbedaan nyamuk jantan dan betina ditandai dengan perbandingan rambut di antena dan panjang *proboscis* dengan *palpus*. Pada nyamuk jantan rambut di antena lebih lebat (*plumose*) dibandingkan betina. Nyamuk jantan memiliki *proboscis* dan *palpus* yang sama panjang sedangkan

palpus betina lebih pendek dibandingkan *proboscis*-nya (Biswas dan Banerjee, 2016).

3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva *Ae. albopictus* betina

Nyamuk *Ae. albopictus* betina diletakkan di gelas plastik kemudian dimasukkan ke dalam pendingin bersuhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik agar nyamuk kolaps. Setelah itu nyamuk yang telah kolaps dipindahkah ke dalam *petridish*. Nyamuk diambil dengan cara menusuk toraks menggunakan jarum diseksi kemudian bagian kaki dan sayap dilepas. Tubuh nyamuk diletakkan di gelas benda yang telah ditetesi NaCl 0.5% yang diletakkan di bawah mikroskop stereo. Isolasi kelenjar saliva menggunakan teknik mikrodiseksi dengan jarum diseksi yaitu tangan kiri menekan lembut bagian toraks dan tangan kanan menarik bagian kepala perlahan-lahan, sehingga tampak kelenjar saliva bewarna bening yang berjumlah 6 lobus (Schmid *et al*, 2017).

3.4.4 Isolasi Fraksi Protein 67 kDa

Kelenjar saliva (sampel) yang telah diisolasi sebanyak 700 pasang dimasukkan ke dalam mikrotube yang di dalamnya berisi $10\text{ }\mu\text{l}$ PMSF dalam PBS. Setiap mikrotube diisi 10 pasang kelenjar saliva. Sampel yang dikumpulkan sebanyak 70 mikrotube. Sampel dipreparasi dengan cara ditambahkan *laemml buffer* kemudian dipanaskan pada *thermoshaker* dengan suhu $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 4 menit.

Sampel protein dianalisis profil proteinnnya dengan menggunakan metode SDS-PAGE menggunakan *seperating gel* 12% dan *stacking gel* 4%. Sampel protein dimasukkan ke dalam sumuran gel. Analisis SDS-PAGE dilakukan pada tegangan 150 V selama 60 menit pada suhu ruang dalam buffer elektroda pH 8,3. Gel hasil SDS-PAGE kemudian dimasukkan ke larutan perwarna *staining Coomassie Brilliant Blue* selama 120 menit kemudian dimasukkan ke dalam larutan *destaining* sebanyak tiga kali masing-masing 30 menit. Selanjutnya pita protein 67

kDa dipotong dan dimasukkan ke dalam mikrotube berisi akuades steril untuk proses purifikasi.

3.4.5 Purifikasi Fraksi Protein 67 kDa

Purifikasi fraksi protein 67 kDa dilakukan di Universitas Brawijaya. Protein dengan berat molekul 67 kDa hasil analisis SDS-PAGE dimurnikan dengan metode elektroelusi. Gel hasil analisis SDS-PAGE dipotong pada pita protein 67 kDa lalu dicuci dengan ddH₂O. Pita protein ditampung dalam membran dialisis yang berisi larutan *buffer* elektroda 1-3 ml lalu direndam dalam *buffer* elektroda pH 8.3 secara horizontal dalam ruang elektroforesis. Proses elektroelusi dilakukan selama 60 menit 120 V hingga warna ungu pada gel memudar. Cairan hasil elektroforesis dipindah ke dalam membran dialisis baru dan dilakukan dialisis pada suhu 4°C selama 24 jam dalam 500mL PBS pH 7,4. Dialisis dilakukan 4 kali masing-masing selama 8 jam dengan PBS pH 7.4 yang baru. Cairan di dalam membran dikeluarkan dan disimpan dalam mikrotube steril berisi etanol dingin dengan perbandingan 1:1 selama 24 jam. Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit dalam suhu ruang, pelet diambil dan dikeringanginkan serta ditambah 500 µl PBS pH 7.4. Protein 67 kDa yang terkumpul diletakkan di eppendorf dan konsentrasinya diukur dengan nanodrop sebesar 0,31 mg/mL.

3.4.6 Uji Aktivitas Apirase

Aktivitas enzim apirase diukur menggunakan uji tingkat pembebasan fosfat inorganik dari ATP dengan *Malachite Green Detection Kit* yang dimodifikasi (Baykov *et al.*, 1988). Pereaksi yang digunakan yaitu reagen A (campuran amonium molibdat dalam 3 M asam sulfat) dan reagen B (*Malachite Green* Oksalat dan polivinil alkohol). Uji apirase dilakukan dengan menyiapkan kurva standar fosfat menggunakan KH₂PO₄ dalam *assay buffer* (Tris HCl 0,05 M pH 9). Konsentrasi standar yang didapatkan sebesar 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM. Sampel yang digunakan yaitu protein 67 kDa 0.31 mg/mL,

protein total kelenjar saliva, dan kontrol positif ATPase. Sampel kemudian dielusi dalam 210 μ M ADP (Suhardiansyah, 2016) dan dimasukkan ke dalam *microplate* 96 *well* sebanyak 50 μ l, begitu pula dengan blanko dan standar. Pengujian dilakukan secara *triplicate* dengan penambahan 10 μ l reagen A dan diinkubasi 10 menit di suhu ruang. Kemudian ditambah reagen B dan diinkubasi 20 menit dalam suhu ruang. Setiap tahapan inkubasi dilakukan *shaking* agar mempercepat laju reaksi. Larutan uji dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm untuk menganalisa kandungan fosfat yang dibebaskan berdasarkan kurva standar yang telah dibuat. Jumlah pembebasan fosfat inorganic dibandingkan dengan kontrol positif ATPase dan dibuat pesentase dengan rumus.

$$\text{Persentase kemampuan Protein 67 kDa} = \frac{\text{konsentrasi protein 67 kDa}}{\text{konsentrasi ATPase}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase kemampuan Protein total} = \frac{\text{konsentrasi protein total}}{\text{konsentrasi ATPase}} \times 100\%$$

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Aedes albopictus* mampu membebaskan 34.02 nmol fosfat inorganik. Fraksi protein 67 kDa memiliki aktivitas enzimatis sebesar 65% bila dibandingkan dengan ATPase. Hal itu mengindikasikan protein 67 kDa mampu membebaskan fosfat inorganik dalam menghidrolisis substrat ADP.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah mengoptimalkan konsentrasi protein 67 kDa yang digunakan sebagai sampel uji aktivitas apirase.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S., Boucomont-Chapeaublanc, E., Orlandi-Pradines, E., Fusai, T. 2010. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(4), 391-402.
- Biswas, M dan Banerjee, PK. 2016. Studies on morphological variations of *Aedes albopictus* in some areas of South 24 Parganas, West Bengal. *International Journal of Mosquito Research*; 3(6): 06-10.
- Boesri, H. 2011. Biologi dan peranan *Ae. albopictus* (Skuse) 1894 sebagai penular penyakit. *Aspirator* Vol. 3 No. 2
- Bowers, D. F., Coleman, C. G. & Brown, D. T. 2003. Sindbis virus associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 40, 698–705.
- Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M., & James, A. A. 1995. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(3), 694-698
- Cheeseman, M.T. 1998. Characterization of apyrase activity from the salivary glands of the cat flea *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 1025–1030
- Dong, Fang, Y. Fu., X. Li., J. Jiang., J. Sun., dan X. Cheng. 2011. Cloning, expression, and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus*. *Parasitol Res.* 110:931-937
- Doucoure, S., S. Cornelié, S. Patramool, F. Mouchet, E. Demettré, M. Seveno, J. S. Dehecq, H. Rutee, J. P. Herve, F. Favier, D. Missé, P. Gasque and F. Remoue. 2013. First screening of *Ae. albopictus* immunogenic salivary proteins. *Royal Entomological Society*

- Fontaine, A., I. Diouf, N. Bakkali, D. Misse, F. Pages, T. Fusai, C. Rogier, dan L. Almeras. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit & Vector*. 4 : 187
- Gubler, D. J. 2014. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2nd edn (eds Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S. & Farrar, J.) 1–29
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). *Dengue*. *The Lancet*, 385(9966), 453–465.
- Guzman, M. G., D. J. Gubler, A. Izquierdo, E. Martinez and S. B. Halstead. 2016. Dengue Infection. *Primer Vol 2*.
- Haghiac, M., dan Walle, T. 2005. Quercetin Induces Necrosis and Apoptosis in SCC-9 Oral Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*. 53(2), 220–231.
- Halstead SB. 2008. Dengue. Tropical Medicine Science and Practice. *Imperial college press vol 5*
- Hamasaki R, H Kato, Y Terayama, H Iwata, JGValenzuela. 2009. Functional characterization of salivary apyrase from the sandfly, *Phlebotomus duboscqia* vector of *Leishmania major*. *J. Insect. Physiol.* 55:1044-1049
- Hogan, M. 2011. Ask a Chemist : How Colormetric Assays Work (Serial Online) <http://bitesizebio.com> [Diakses pada 14 Juli 2020]
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Guedes, B. A. M., Majid, A., Coleman, J., Pimenta, P. F. P., ... & Marinotti, O. (2011). Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 4(1), 1.
- Khasanah, RN. 2019. Identifikasi Protein Imunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember. SKRIPSI : Universitas Jember.
- Kementerian Kesehatan RI. INFODATIN Pusat Data dan Informasi Kemeterian Kesehatan RI Situasi Demam Berdarah. 2016.

- Knowlton K, Solomon G, Rotkin-Ellman M, Pitch F. 2009. Mosquito-Borne Dengue Fever Threat Spreading in the Americas. New York: *Natural Resources Defense Council Issue Paper*
- Kunapuli, S, P. 2002. P2 Receptor and Platelet activation. *Scientific World Journal* (2) : 424-433.
- Lambrechts, L., T.W. Scott., D.J Gubler. 2010. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *Neglected Tropical Diseases*. Vol 4 Issue 5
- Luplertlop, N. 2014. Imosquito salivary immune peptides: boost or block dengue viral infections. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(2): 163-168
- Mans, BJ., Gaspar, A.I.Louw., dan Neitz, A.W.H. 1998. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experiment & Applied Acarology* 22 : 336-353
- Marinotti, O., de Brito, M., & Moreira, C. K. (1996). Apyrase and α -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(4), 675-679.
- Murray, N. E. A., M.B. Quam, dan A. Wilder-Smith. 2013. Epidemiology of dengue : past, present and future prospects. *Clinical Epimiology*. 5 : 299-309
- Oktarianti, R, K. Senjarini, F. Fatchiyah, Aulanni'am. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Agains to Human Sera. *Advances in Natural an Applied Sciences*. 8(8) : 101-107
- Oktarianti, R., K. Senjarini, T. Hayono, F. Fatchiyah, dan Aulanni'am. 2015. Proteomic analysis of immunogenic protein from salivary gland of *Aedes aegypti*. *J. Of Infec. & Pub. Health*. *In press*.

- Peng, Z., Caihe, L., Beckett, A. N., Guan, Q., James, A. A., & Simons, F. E. R. (2016). rAed a 4: A new 67-kDa *Aedes aegypti* mosquito salivary allergen for the diagnosis of mosquito allergy. *International archives of allergy and immunology*, 170(3), 206-210.
- Picher, M., Sevigny, J., Dorleans, J.P., dan Beaudoin, A.R. 1996. Hydrolysis of P-2-purinoreceptor agonists by a purified ectonucleotidase from the bovine aorta, the ATP-diphosphohydrolase. *Biochem Pharmacol* 51:1453-1460
- Ribeiro, J. M., Arcà, B., Lombardo, F., Calvo, E., Phan, V. M., Chandra, P. K., & Wikel, S. K. (2007). An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *BMC genomics* 8(1):6.
- Rueda, L. M. 2004. *Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission*. Auckland : Magnolia Press.
- Sandra, T., M.A. Sofro, Suhartono, Martini, S. Hadisaputro. 2019. faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kejadian demam berdarah dengue pada anak usia 6-12 tahun di kecamatan tembalang. *Jurnal Epidemiologi Kesehatan Komunitas* 4 (1), 2019, 1-10
- Sasmono RT, Taurel AF, Prayitno A, Sitompul H, Yohan B, Hayati RF, Bouckenoghe A, Hadinegoro SR, Nealon J. 2018. Dengue virus serotype distribution based on serological evidence in pediatric urban population in Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006616.
- Schmid, M. A., E. Kauffman, A. Payne, E. Harris, L. D. Kramer. 2017. Preparation of Mosquito Salivary Gland Extract and Intradermal Inoculation of Mice. *Bio Protoc* 7(14) : doi:10.21769/BioProtoc.2407.
- Schneider, B. S., & S. Higgs. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hy.* 102: 400-408.
- Smith, T.M., Hicks-Berger, C.A., Kim, S., dan Kirley, T.L. 2002. Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406 (105–115)

- Stark, K. R., & James, A. A. 1995. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental parasitology*, 81(3), 321-331.
- Suhardiansyah, Alfian. 2016. Aktivitas Apirase Pada Protein Immunogenik 56 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*. SKRIPSI : Universitas Jember.
- Sun, D., Mcnicol, A., James, A. A., & Peng, Z. 2006. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. *Platelets*, 17(3), 178-184.
- Wathon, S., Muti'ah, F., Oktarianti, R., Senjarini, K. 2020. Purifikasi protein immunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia* 7(1).
- WHO. 2009. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition*. Geneva: World Health Organization
- WHO. 2011. *Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue Haemorrhagic Fever, Revised and Expanded Edition*. New Delhi : World Health Organization South East Asia Regional Office
- WHO, 2013. International Travel and Health DENGUE. <http://www.who.int/ith/diseases/dengue/en/index.html>. (diakses 20 Oktober 2019)
- Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS. 2013. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci* 20:37.
- Wichit, S., Ferraris, P., Choumet, V., & Missé, D. 2016. The effects of mosquito saliva on dengue virus infectivity in humans. *Current opinion in virology*, 21, 139-145.
- Zhang, H. dan R. Lui. 2020. Releasing Wolbachia-infected *Aedes aegypti* to prevent the spread of dengue virus: A mathematical study. *Infectious Disease Modelling* 5 (142-160)

LAMPIRAN 1

Komposisi Larutan :

A. Rearing Nyamuk *Aedes albopictus*

1. 100 mL Larutan Sukrosa : 10 g sukrosa dilarutkan dalam 100 mL aquades
10%

B. Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk *Aedes albopictus*

1. 10 mL PMSF dalam PBS pH : 0,08 g NaCl; 0,0144 g Na₂HPO₄;
7,4 0,0024 g KH₂PO₄; 0,002 g KCl
dilarutkan dalam 10 mL aquades
kemudian ditambahkan 0,00174 g
PMSF
2. 100 mL NaCl 0,5% : 0,5 g NaCl dilarutkan dalam 100
mL aquades

C. Isolasi Fraksi Protein 67 kDa

1. 2 mL *Laemmli sample* : Tris-HCl 1M (pH 6,8) 0,12 mL,
buffer Gliserol 50% 1 mL; SDS 10% 0,4
mL; β -mercaptoethanol 0,1 mL;
Bromophenol blue 0,2 mL; dH₂O
hingga 2 mL
2. 1000 mL *buffer* elektroda : 3 g *Tris Base*; 14,4 g *Glycine*; 1 g
pH 8,3 SDS, dH₂O hingga 1000 mL
3. 100 mL Acril- : 29,2 g Acrilamid; 0,8 g
Bisacrilamid 30% Bisacrilamid; dH₂O hingga 100
mL
4. 100 mL Tris-HCl 1,5M : 18,171 g *Tris Base*; dH₂O hingga
(pH 8,8) 100 mL

5. 100 mL Tris-HCl 0,5 M : 6,057 g Tris Base; dH₂O hingga
pH 6,8 100 mL
6. 100 mL SDS 10% : 10 g SDS, dH₂O hingga 100 mL
7. 1 mL APS 10% : 0,1 g APS; dH₂O hingga 1 mL
8. 500 mL *Staining solution* : 0,5 g *Coomasie Brilliant Blue* R250;
225 mL Metanol; 50 mL Asam
asetat glasial; dH₂O 250 mL
9. 500 mL *Destaining* : 200 mL Metanol; 50 mL Asam
solution asamasetat glasial; dH₂O 250 mL
10. TEMED : aliquot 1 mL

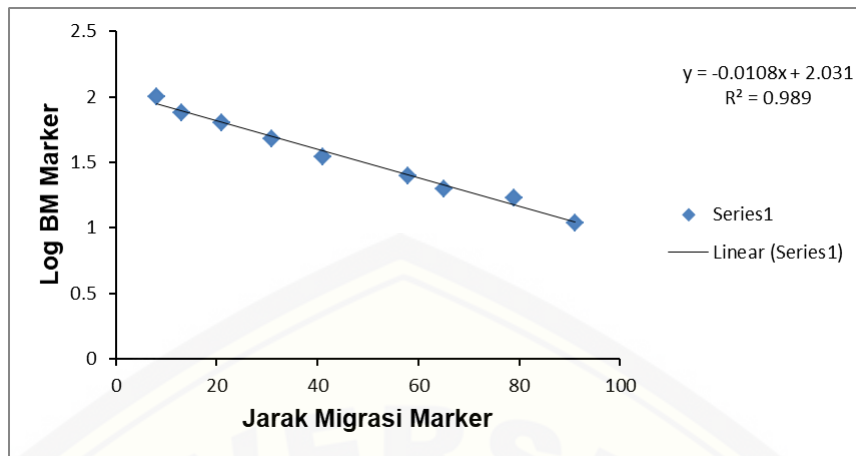
D. Purifikasi Protein 67 kDa

1. 1000 mL *Boiling buffer* : 8,4 g NaHCO₃ 0,1M; 18,612 g Na-
EDTA; dH₂O hingga 1000 mL
2. 250 mL *membrane storage* : 0,25 mL *Chloroform Solution*;
dH₂O hingga 250 mL
3. 1000 mL PBS pH 7,4 : 8 g NaCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g
KH₂PO₄; 0,2 g KCl; dH₂O hingga
1000 mL
4. 1 mL etanol 95% : 0,95 mL etanol; 0,05 mL dH₂O

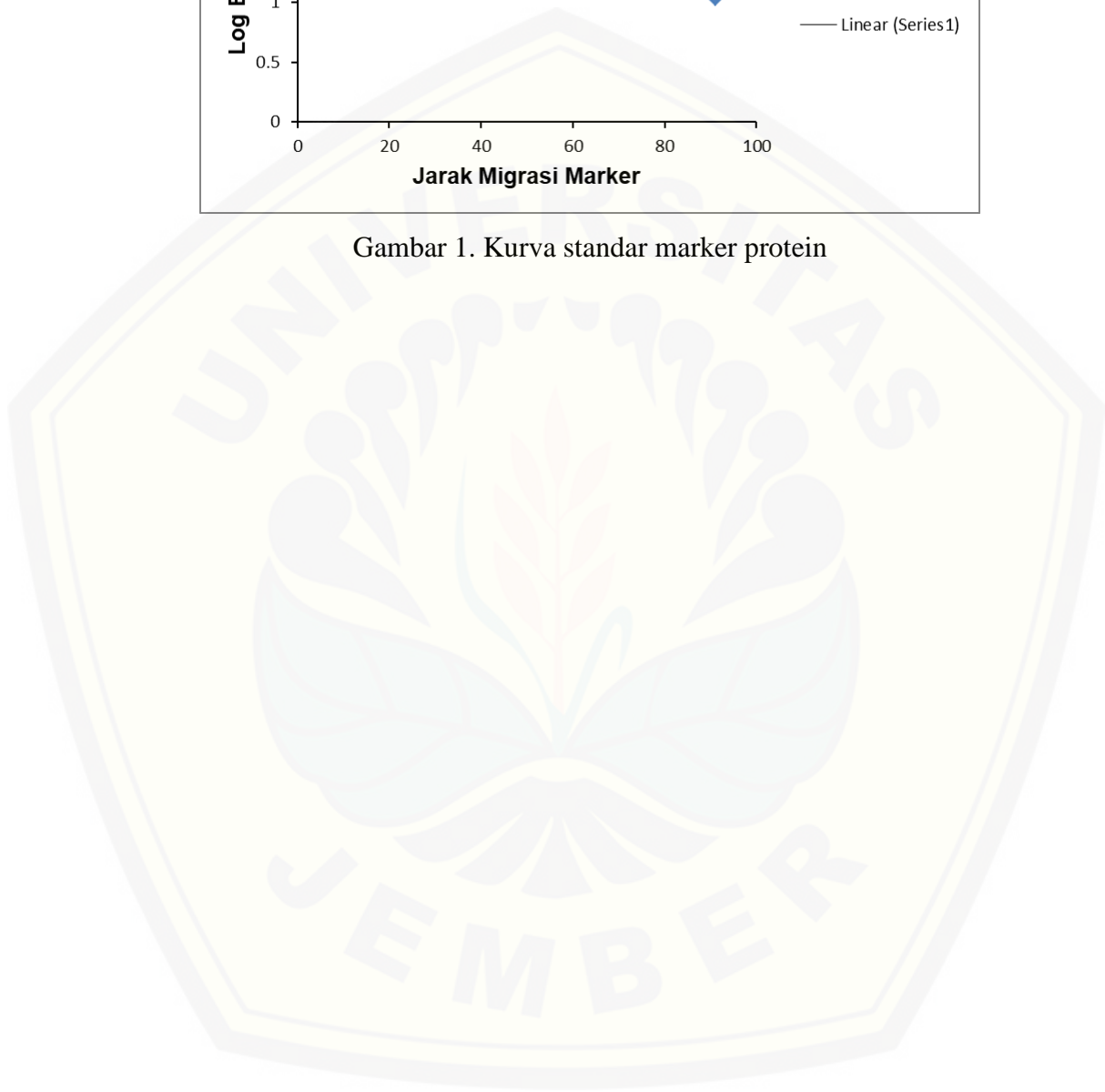
LAMPIRAN 2

Tabel 1. Hasil perhitungan berat molekul protein ekstrak kelenjar saliva *Ae. albopictus*

No	BM Marker (kDa)	Jarak Migrasi marker	Log Migrasi Marker	Jarak migrasi sampel	BM Sampel (kDa)
1	100	8	2	14	76
2	75	13	1.875061263	16	72
3	63	21	1.799340549	17	70
4	48	31	1.681241237	19	67
5	35	41	1.544068044	20	65
6	25	58	1.397940009	24	59
7	20	65	1.301029996	27	55
8	17	79	1.230448921	33	47
9	11	91	1.041392685	50	31
				52	29
				55	27
				58	25
				71	18
				74	17



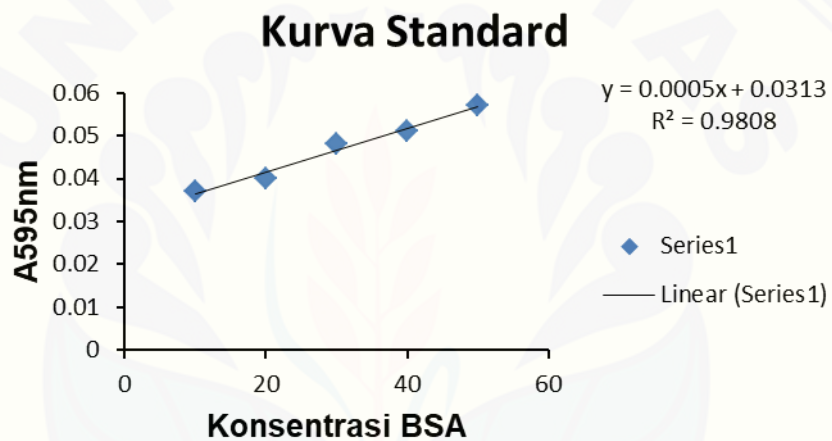
Gambar 1. Kurva standar marker protein



LAMPIRAN 3

Tabel 2. Daftar standar BSA

konsentrasi BSA (ppm)	Abs
10	0.037
20	0.04
30	0.048
40	0.051
50	0.057



Gambar 2. Kurva standar BSA

Sampel protein total yang diuji diencerkan 20x.

Nilai absorbansi sampel protein total yang diuji Bradford yaitu 0,042.

y = nilai absorbansi

x = konsentrasi protein (harus dikalikan faktor pengenceran)

$$y = 0,0005x + 0,0313$$

$$0,042 = 0,0005x + 0,0313$$

$$x = \frac{0,042 - 0,0313}{0,0005}$$

$$x = 21,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$x = 0,0214 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi protein} &= 0,0214 \times 20 \\ &= 0,428 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \end{aligned}$$

Konsentrasi protein total di sesuaikan dengan konsentrasi protein 67 kDa dengan rumus pengenceran

$$M_{\text{protein total}} \times V_{\text{protein total}} = M_{\text{protein pengenceran}} \times V_{\text{protein pengenceran}}$$

$$0,428 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times V_1 = 0,31 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 150 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 108,6 \mu\text{L}$$

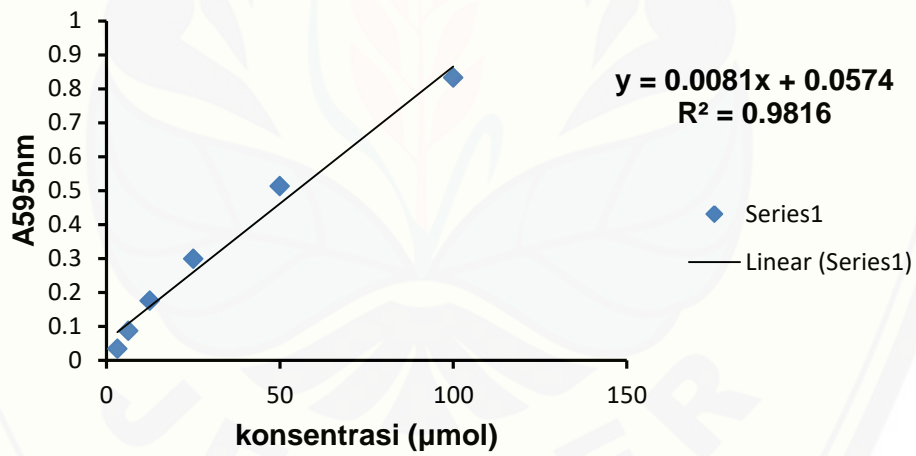
Sehingga dibutuhkan 108,6 μL protein total 0,428 mg/mL dan ditambah dH_2O hingga 150 μL

LAMPIRAN 4

Tabel 2. Daftar standar *Malachite Green Calorimetric Assay*

FOSFAT STANDAR	
Konsentrasi (μM)	nmol/well
100	5
50	2.5
25	1.25
12.5	0.625
6.25	0.312
3.125	0.156

Phosphate standar



Gambar 2. Kurva standar fosfat

LAMPIRAN 5

Rumus Elusi Sampel Protein 67 kDa dengan ADP dengan volume akhir 50 μL .

$$M_{\text{protein}} \times V_{\text{protein}} = M_{\text{ADP}} \times V_{\text{ADP}}$$
$$0,31 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times V1 = 0,089 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 50 \mu\text{L}$$
$$V1 = 14,35 \mu\text{L}$$

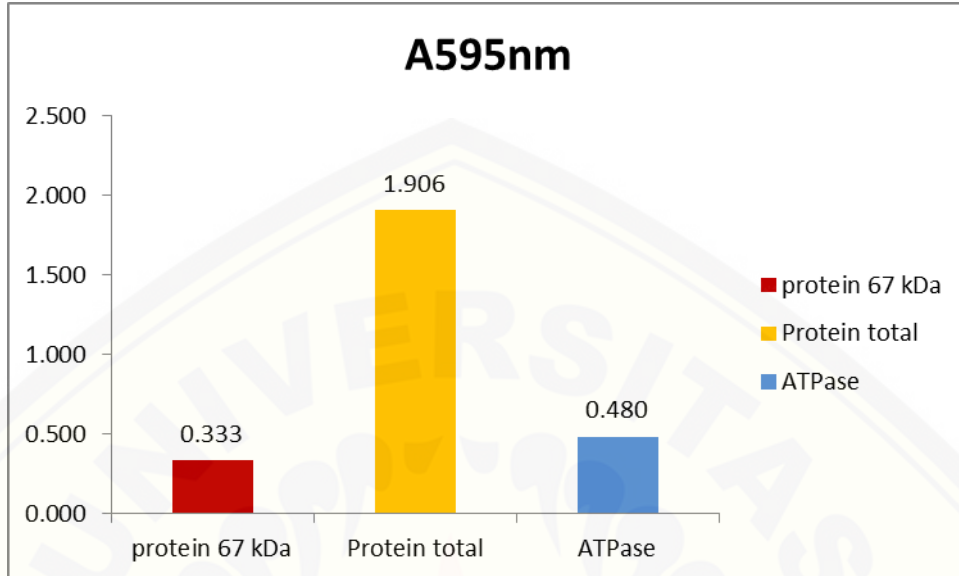
Rumus Elusi Sampel Protein total dengan ADP dengan volume akhir 50 μL .

$$M_{\text{protein}} \times V_{\text{protein}} = M_{\text{ADP}} \times V_{\text{ADP}}$$
$$0,31 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times V1 = 0,089 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 50 \mu\text{L}$$
$$V1 = 14,35 \mu\text{L}$$

Rumus Elusi Sampel ATPase dengan ADP dengan volume akhir 50 μL .

$$M_{\text{ATPase}} \times V_{\text{ATPase}} = M_{\text{ADP}} \times V_{\text{ADP}}$$
$$0,648 \times V1 = 0,089 \times 50 \mu\text{L}$$
$$V1 = 14,35 \mu\text{L}$$

LAMPIRAN 6



Gambar 3. Nilai absorbansi protein 67 kDa, protein total kelenjar saliva *Ae. albopictus*, dan ATPase dalam membebaskan fosfat inorganik

Tabel 3 Perhitungan kemampuan pembebasan fosfat inorganik protein 67 kDa, protein total kelenjar saliva *Ae. albopictus* dengan kontrol positif ATPase

Sampel	xperlakuan	xblank	xp-xb	subs regresi	% with ATPase
protein 67 kDa	0.369	0.036	0.333	34.02	65.16393443
Protein total	1.941666667	0.036	1.906	228.18	437.0113493
ATPase	0.516333333	0.036	0.480	52.21	100

Perhitungan persentase kemampuan pembebasan fosfat inorganik dibandingkan dengan kontrol positif ATPase

$$\text{Protein 67 kDa} = \frac{34,02}{52,21} \times 100\% = 65\%$$

$$\text{Protein total} = \frac{228,18}{52,21} \times 100\% = 437\%$$