



**RESPON IMUN HUMORAL MANUSIA (IgG) TERHADAP
EKSTRAK KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)
DI WILAYAH ENDEMIK DBD KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI

Oleh

**Suci Ummi Roziqotul Qudsiyah
NIM 111810401027**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**RESPON IMUN HUMORAL MANUSIA (IgG) TERHADAP
EKSTRAK KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)
DI WILAYAH ENDEMIK DBD KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Suci Ummi Roziqotul Qudsiyah
NIM 111810401027**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua tercinta yang telah memberikan kasih sayang, do'a restu, dan pengorbanan yang tiada henti;
2. semua keluarga besar dan teman-teman yang telah mendukung dan memberi motivasi dalam menempuh pendidikan;
3. semua guru dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan mengajarku, terima kasih yang tak terhingga atas segala ilmu yang diberikan;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Dan orang-orang yang berjihad untuk (mencari keridhaan) kami, kami akan tunjukkan kepada mereka jalan-jalan kami. Dan sungguh, Allah beserta orang-orang yang berbuat baik”
(terjemahan surat Al-Ankabut ayat 69¹)

“Tuntutlah ilmu dan belajarlah (untuk ilmu) ketenangan dan kehormatan diri, dan bersikaplah rendah hati kepada orang yang mengajar kamu.”
(HR. Al-Thabrani²)

¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. Al-Qur'an dan Terjemahannya. Semarang : CV Toha Putra

² Alwi bin Ali Al-Habsy. 2010. *Duhai Anak Cucu Adam-Kumpulan Hadits Qudsi*. Jakarta: Pustaka Zawiyah

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Suci Ummi Roziqotul Qudsiyah

NIM : 111810401027

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Respon Imun Humoral Manusia (IgG) Terhadap Ekstrak Kelenjar Saliva *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Di Wilayah Endemik DBD Kabupaten Jember” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. 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, 12 Juni 2015

Yang menyatakan,

Suci Ummi Roziqotul Q.

NIM 111810401027

SKRIPSI

**RESPON IMUN HUMORAL MANUSIA (IgG) TERHADAP
EKSTRAK KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)
DI WILAYAH ENDEMIK DBD KABUPATEN JEMBER**

Oleh

Suci Ummi Roziqotul Qudsiyah
NIM 111810401027

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. nat Kartika Senjarini S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Sri Mumpuni Wahyu Widajati S.Pd., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Respon Imun Humoral Manusia (IgG) terhadap Ekstrak Kelenjar Saliva *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) di Wilayah Endemik DBD Kabupaten Jember” telah diuji dan disahkan

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

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

Sri Mumpuni W.W., S.Pd., M.Si.
NIP. 197105101999032002

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd.
NIP. 195805281988021002

Purwatiningsih S.Si,M.Si,Ph.D
NIP: 197505052000032001

Mengesahkan

Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Respon Imun Humoral Manusia (IgG) Terhadap Ekstrak Kelenjar Saliva *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Di Wilayah Endemik DBD Kabupaten Jember; Suci Ummi Roziqotul Qudsiyah; 111810401027; 33 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam Berdarah Dengue (DBD) atau *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) merupakan salah satu masalah kesehatan dengan angka kematian yang tinggi di Indonesia. Beberapa provinsi di Indonesia DBD telah ditetapkan sebagai Kejadian Luar Biasa (KLB) antara lain provinsi Jawa Timur. Salah satu kabupaten di Jawa timur dengan angka kasus DBD tertinggi adalah kabupaten Jember. Penyakit DBD disebabkan oleh virus *dengue* dengan 4 serotip (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) yang diketahui merupakan genus Flavivirus dari famili Flaviviridae. Upaya penanganan terhadap penyakit DBD dapat dilakukan dengan mengendalikan vektor dan melakukan vaksinasi. Pembuatan vaksin terbaru yaitu dengan memanfaatkan komponen saliva vektor Arthropoda sebagai target pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV). Saliva nyamuk mengandung substansi yang berperan penting dalam proses transmisi patogen, seperti vasodilator, inhibitor koagulasi darah, imunomodulator, dan agregasi platelet. Komponen imunomodulator yang bersifat immunosupresif mempermudah transmisi patogen sehingga dapat menekan sistem imun inang. Pada paparan berulang (sekunder), substansi protein yang terdapat pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) akan menyebabkan modulasi pada respon imun inang. Modulasi yang terjadi karena adanya pergeseran subset Th1 ke subset Th2. Perubahan subset ke Th2 akan menginduksi sel B untuk menghasilkan antibodi spesifik (IgG). Peningkatan IgG pada paparan kedua merupakan dasar penggunaan kadar IgG sebagai analisis dalam respon antibodi terhadap paparan saliva nyamuk *Ae. aegypti*. Penelitian ini dibatasi sampai pada tahap penentuan secara kuantitatif antigen

ekstrak protein kelenjar saliva *Ae. Aegypti* yang dapat bereaksi dengan antibodi serum darah neonatus, penderita DBD dan orang sehat dari wilayah endemik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imun humoral manusia (IgG), terhadap ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* di wilayah endemik DBD kabupaten Jember. Metode yang digunakan pada penelitian ini antara lain : 1) Rearing nyamuk *Ae. aegypti*, 2) isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*, 3) Ekstraksi protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*, 4) Preparasi serum darah manusia, 5) Pengukuran kadar IgG dengan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respon imun humoral manusia (IgG) masing-masing individu pada setiap kelompok neonatus, penderita DBD, orang sehat di wilayah endemik bervariasi. Kelompok serum dengan kadar IgG tertinggi hingga terendah berturut-turut adalah penderita DBD, orang sehat di wilayah endemik dan neonatus. Respon imun humoral manusia (IgG) masing-masing individu pada kelompok penderita DBD yang digolongkan berdasarkan umur juga bervariasi. Kadar IgG pada penderita DBD kelompok umur >40 tahun lebih tinggi dibandingkan kadar IgG kelompok umur <15 tahun dan kelompok umur 15-40 tahun.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah S.W.T yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Respon Imun Humoral Manusia (IgG) Terhadap Ekstrak Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) di wilayah Endemik DBD Kabupaten Jember”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si dan Sri Mumpuni W.W. S.Pd., M.Si selaku dosen pembimbing, yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd dan Purwatiningsih S.Si,M.Si,Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberi banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
3. Dra. Rike Oktarianti M.Si., selaku dosen pembimbing proyek yang telah banyak memberikan masukan dan saran selama penelitian berlangsung hingga terselesainya skripsi ini.
4. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. bapak, ibu dan adik tercinta yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, do'a tulus dan pendidikan yang selalu mengiringi penulis hingga beranjak dewasa;

6. rekan kerja seperjuangan Hasa Bella, Izzay Afkarina, Zakiyatul Khoiriyah, Dewi Masruroh dan Amatulloh Sholihah terimakasih atas kerjasama dan dukungan serta bantuannya selama ini;
7. kakak-kakak seperjuangan Washilul Arham, Moh. Mirza Nuryadi, Renam Putra A., Elisa Nurma R. dan adik-adik seperjuangan serta teman-teman seperjuangan yang selalu memberikan dukungan dan semangatnya;
8. teknisi Laboratorium Biologi Dasar dan Kimia Farmasi Universitas Jember yang telah meluangkan waktu dan tenaganya.
9. teman-teman Biologi angkatan 2011 atas motivasi, dukungan serta bantuan dalam pengerjaan skripsi ini;
10. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Manfaat	4
BAB 2. Tinjauan Pustaka.....	5
2.1 Penyakit DBD Dan Penanggulangannya	5
2.2 Pengembangan Vaksin <i>Dengue</i>	8
2.3 Kelenjar Saliva Sebagai Target Pengembangan TBV	9
2.4 Respon Immunologi Inang Terhadap Saliva <i>Aedes aegypti</i>	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13

3.2 Alat dan Bahan	13
3.3 Prosedur Penelitian	14
3.4.1 Preparasi Alat	14
3.4.2 Rearing <i>Aedes aegypti</i>	14
3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	16
3.4.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	17
3.4.5 Preparasi Serum Darah	18
3.4.6 Pengukuran Kadar IgG dengan Metode ELISA.....	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1 Profil Kadar IgG Anti Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) <i>Aedes aegypti</i>	20
4.2 Profil Kadar IgG Anti Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) <i>Aedes aegypti</i> Berdasarkan Umur.....	24
BAB 5. PENUTUP	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Transmisi virus <i>dengue</i>	7
2.2 Struktur Kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> betina.....	10
3.1 Perbedaan toraks bagian dorsal dua spesies genus <i>Aedes</i>	15
3.2 Perbedaan antena pada <i>Ae. aegypti</i> betina dan <i>Ae. aegypti</i> jantan.....	16
3.3 Struktur Kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> betina.....	17
4.1 Kadar IgG anti EPKS <i>Ae. aegypti</i> pada kelompok serum neonatus, penderita DBD dan orang sehat di wilayah endemik.....	20
4.2 Kadar IgG anti EPKS <i>Ae. aegypti</i> pada kelompok serum neonatus, penderita DBD dan orang sehat di wilayah endemik berdasarkan rata- rata serum individual dan <i>pool</i> serum.....	22
4.3 Kadar IgG anti EPKS <i>Ae. aegypti</i> pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur pada serum individual.....	25
4.4 Kadar IgG anti EPKS <i>Ae. aegypti</i> pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur serum individual dan <i>pool</i> serum.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Larutan dan <i>Buffer</i>	34
B. <i>Ethical Clearance</i>	35
C. <i>Informed Consent</i>	37

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD) atau *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) merupakan salah satu masalah kesehatan dengan angka kematian yang tinggi di Indonesia. Beberapa provinsi di Indonesia DBD telah ditetapkan sebagai Kejadian Luar Biasa (KLB) salah satunya yaitu provinsi Jawa Timur. Pada tahun 2013 terdapat 14.895 kasus DBD di Jawa Timur dengan jumlah kasus meninggal sebanyak 156 orang (Kemenkes RI, 2014). Salah satu kabupaten di Jawa timur dengan angka kasus DBD tertinggi adalah kabupaten Jember.

Kabupaten Jember merupakan wilayah endemik DBD. Kasus DBD di wilayah Jember masih sangat tinggi dari tahun ke tahun. Berdasarkan data Dinas Kesehatan Jember tahun 2005-2012 terdapat 6.940 kasus DBD yang terjadi di 31 kecamatan se kabupaten Jember (Dinkes Jember, 2012). Saat ini kabupaten Jember ditetapkan dalam wilayah kabupaten/kota yang mengalami Kejadian Luar Biasa (KLB) DBD (Kemenkes RI, 2015).

Penyakit DBD disebabkan oleh virus *dengue* dengan 4 serotip (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) yang diketahui merupakan genus Flavivirus dari famili Flaviviridae (Wan *et al.*, 2013). Penyakit DBD merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus, maka hingga saat ini tidak ada terapi kausatifnya. Terapi yang diberikan pada penderita hanya bersifat suportif dan simptomatis (Andriani *et al.*, 2013).

Upaya penanganan terhadap penyakit DBD dapat dilakukan dengan mengendalikan vektor dan melakukan vaksinasi. Mekanisme 3M (menguras, menutup, mengubur) diprogramkan pemerintah untuk mengendalikan vektor (Sayono, 2008), namun program ini tidak dapat mengurangi jumlah kasus kematian

penderita DBD setiap tahunnya. Oleh karena itu, satu-satunya cara yang paling efektif untuk menanggulangi penyakit DBD yakni dengan vaksinasi.

Pengembangan vaksin hingga saat ini masih terus dilakukan. Vaksin merupakan cara yang paling efektif untuk mencegah penyakit DBD (Sogiejanto, 2003). Salah satu vaksin yang telah dikembangkan yakni *Live Attenuated Virus* (LAV). Pengembangan LAV masih dianggap belum efektif karena adanya empat tipe serotip yang berbeda. Pengembangan vaksin DBD dilanjutkan dengan menggabungkan empat macam serotip virus *dengue* yang disebut dengan *Tetravalen Dengue Vaccine* (TDV) (Edelman, 2007). Namun vaksin ini juga dianggap kurang efektif dan kurang efisien karena adanya kesulitan dalam menentukan pengaruh interaksi antara empat serotip. Selain itu, kekhawatiran munculnya fenotip yang lebih ganas masih menjadi kendala.

Pembuatan vaksin terbaru yaitu dengan memanfaatkan komponen saliva vektor Arthropoda sebagai target pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV). Saliva nyamuk mengandung substansi yang berperan penting dalam proses transmisi patogen, seperti vasodilator, inhibitor koagulasi darah, imunomodulator, dan agregasi platelet (Andrade *et al.*, 2005).

Komponen vasodilator dalam saliva Arthropoda berperan dalam pelebaran pembuluh darah (Titus *et al.*, 2006), sedangkan antikoagulan berperan untuk menghambat pembekuan darah sehingga memudahkan nyamuk untuk menghisap darah dalam tubuh inang (Andrade *et al.*, 2005). Komponen imunomodulator yang bersifat immunosupresif mempermudah transmisi patogen sehingga dapat menekan sistem imun inang (James *et al.*, 2003). Oleh karena itu vaksinasi melawan komponen immunosupresif sangat penting untuk mencegah transmisi patogen.

Pengembangan potensi vektor imunomodulator dalam saliva vektor sebagai target pengembangan TBV didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu pada penyakit *Leishmaniasis* (Titus *et al.*, 2006). Hasil penelitian tersebut mengindikasikan adanya mekanisme protektif pada tubuh inang setelah pemberian paparan berulang

saliva vektor Arthropoda (Chen, 2009). Pada paparan berulang (sekunder), substansi protein yang terdapat pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* akan menyebabkan modulasi pada respon imun inang. Modulasi yang terjadi karena adanya pergeseran subset Th1 ke subset Th2 (Schneider *et al.*, 2004). Perubahan subset ke Th2 inilah yang akan menginduksi sel B untuk menghasilkan antibodi spesifik (IgG). Peningkatan IgG pada paparan kedua merupakan dasar penggunaan kadar IgG sebagai analisis dalam respon antibodi terhadap paparan saliva nyamuk *Ae. aegypti* (Doucoure *et al.*, 2012).

Pembentukan IgG pada setiap individu dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah faktor usia. Usia dapat mempengaruhi fungsi sel T dan sel B dalam memproduksi antibodi (Bratawidjaja & Iris, 2014). Hal ini sesuai dengan penelitian Doucoure *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa usia dapat mempengaruhi produksi antibodi berupa IgG terhadap paparan saliva *Ae. aegypti*. Sehingga mengetahui respon antibodi terhadap saliva *Ae. aegypti* merupakan langkah penting yang harus dilakukan terkait faktor imunomodulator dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* sebagai target dalam pengembangan TBV

1.2 Rumusan Masalah

Komponen dalam saliva *Ae. aegypti* telah diketahui mampu mempengaruhi transmisi patogen *dengue* ke manusia. Namun demikian respon imun humoral manusia terhadap ekstrak kelenjar saliva, dalam hal ini IgG, belum diketahui. Sehingga pada penelitian ini, permasalahan yang ingin dijawab adalah:

1. Bagaimana respon imun humoral manusia (IgG) terhadap ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti*?
2. Bagaimana respon imun humoral manusia (IgG) berdasarkan umur terhadap terhadap ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti*?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imun humoral manusia (IgG), terhadap ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* di wilayah endemik DBD kabupaten Jember.

1.4 Batasan Masalah

Pengamatan respon imun humoral dalam penelitian ini difokuskan pada analisis IgG secara kuantitatif. Serum yang digunakan untuk analisis tersebut berasal dari serum darah neonatus, orang sehat dari wilayah endemik, dan pasien DBD. Sementara itu respon imun humoral berdasarkan umur diamati hanya dari serum penderita DBD.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai respon imun humoral manusia terhadap ekstrak protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Informasi ini sangat penting terkait kemungkinan potensi ekstrak tersebut sebagai faktor imunomodulator yang merupakan target potensial pengembangan TBV untuk DBD.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit DBD dan Penanggulangannya

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) ditemukan hampir diseluruh bagian dunia. Sebesar 2,5 milyar orang yang tersebar di lebih dari 100 negara dengan sejumlah 50-100 juta orang penderita DBD setiap tahunnya (Adhista, 2013). Penyakit DBD banyak ditemukan didaerah tropis dan subtropis seperti Indonesia, Maldives, Myanmar, Sri Lanka, Thailand, dan Timor-Leste (WHO, 2009). Indonesia merupakan negara endemik DBD dan sebagian besar wilayah telah masuk dalam wilayah berisiko tinggi (*High Risk*) DBD. Provinsi Jawa Timur merupakan wilayah yang termasuk dalam wilayah risiko rendah (*medium risk*) dengan *Incidence Rate* (IR) 50 kasus DBD per 100.000 penduduk (Kemenkes, RI, 2010).

Berdasarkan data Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, pada tahun 2012 terdapat 11.207 kasus DBD dengan *Incidence Rate* (IR) 29,25 per 100.000 penduduk (Dinkes Jatim, 2013). Kabupaten Jember merupakan salah satu wilayah di Jawa Timur dengan jumlah kasus DBD yang tinggi. Pada tahun 2009 terdapat 1.093 kasus DBD dan meningkat sebanyak 1.494 kasus pada tahun 2011 (Dinkes Jember, 2012). Kabupaten Jember ditetapkan sebagai daerah yang berstatus Kejadian Luar Biasa (KLB) DBD (Kemenkes RI, 2015).

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *dengue* dengan tipe DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Virus tersebut termasuk dalam kelompok *Arthropod Borne Viruses* (*Arboviruses*) (Garjito, 2007). *Dengue* merupakan virus dengan genome RNA dari famili Flaviviridae, genus Flavivirus (Muliawan, 2007). Virus ini ditularkan dari orang sakit ke orang sehat melalui paparan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* yang merupakan vektor utama dan vektor sekunder DBD di Indonesia (Fahmi, 2006).

Transmisi virus *dengue* ke dalam tubuh manusia seperti yang terlihat pada Gambar 2.1. Virus *dengue* masuk ke dalam tubuh nyamuk *Ae. aegypti* saat *blood feeding*. Virus akan berkembang dari *midgut* ke kelenjar saliva selama 5-7 hari. Infeksi virus *dengue* pada orang sehat terjadi saat proses *blood feeding* oleh nyamuk yang terinfeksi, sehingga virus *dengue* berpindah dari tubuh nyamuk ke dalam tubuh inang yang belum terinfeksi (Sembiring, 2009).

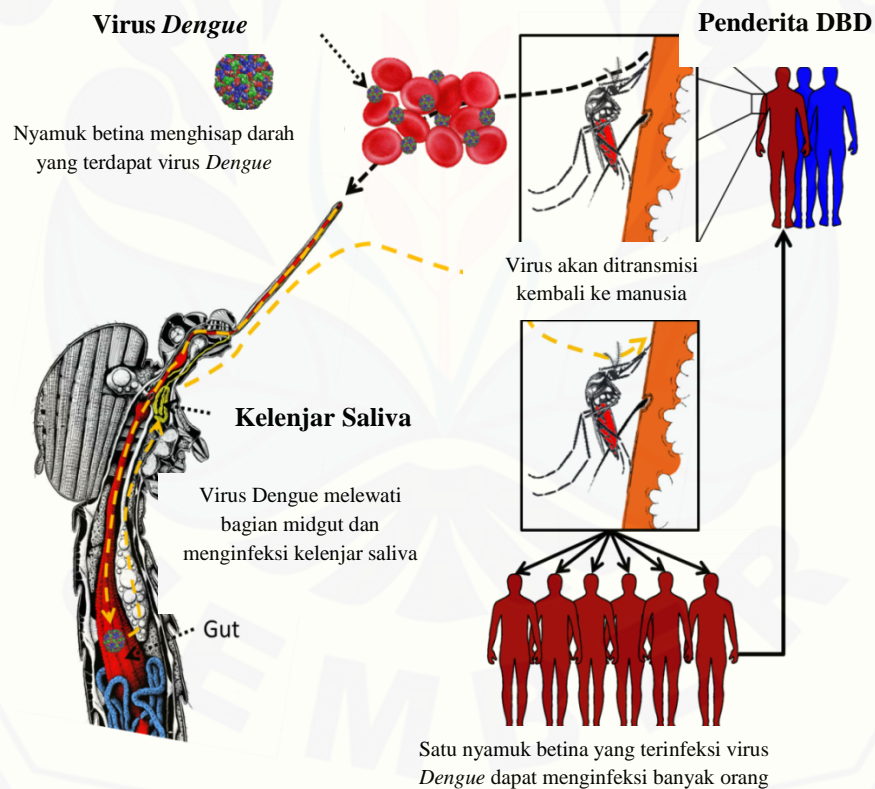
Mekanisme masuknya virus *dengue* ke dalam tubuh sebagai infeksi pertama akan memberi gejala demam *dengue*. Reaksi yang amat berbeda akan tampak bila seseorang mendapat infeksi yang berulang dengan tipe virus *dengue* yang berlainan (Sylvana & Pereira, 2000). Hal tersebut dinyatakan dalam hipotesis *immune enhancement* yang menjelaskan bahwa secara tidak langsung mereka yang terkena infeksi kedua oleh virus heterolog mempunyai risiko yang lebih besar untuk menderita DBD berat (Chen, 2009). Seseorang yang terinfeksi virus *dengue* akan terjadi respon berupa sekresi mediator vasoaktif yang berakibat peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan perembesan cairan ke ekstrasvaskuler (*plasma leakage*), sehingga mengakibatkan keadaan hipovolemia dan syok (Soegijanto, 2003).

Sejauh ini belum ada terapi yang spesifik untuk penyakit DBD. Prinsip pengobatan demam berdarah bersifat suportif dan simptomatis dengan cara penggantian volume cairan intravena akibat terjadinya dehidrasi (Andriani *et al.*, 2013). Terapi simptomatik pada penderita DBD merupakan pemberian terapi untuk mengatasi gejala yang timbul, seperti pemberian antipiretik berupa parasetamol. Terapi nonfarmakologis yang diberikan meliputi tirah baring dan pemberian makanan dengan kandungan gizi yang cukup (Chen, 2009).

Penyakit DBD hingga saat ini belum ditemukan obat maupun vaksinnnya, sehingga satu-satunya cara untuk mencegah terjadinya penyakit ini dengan memutuskan rantai penularan yaitu dengan pengendalian vektor (Fathi *et al.*, 2005). Pengendalian vektor DBD dilaksanakan dalam dua kegiatan yaitu pemberantasan nyamuk dewasa (*fogging*) dan pemberantasan jentik nyamuk melalui kegiatan 3M

(menguras, menutup, mengubur) serta kegiatan Pemantauan Jentik Berkala (PJB) (Sitepu & Supriyadi, 2013).

Upaya pengendalian vektor menimbulkan konsekuensi yang tidak diharapkan yaitu munculnya fenomena resistensi vektor Arthropoda dari penggunaan insektisida (Edelman, 2007). Fenomena tersebut menjadi kendala dalam pengendalian vektor dimasa yang akan datang. Hal ini juga berkaitan dengan rendahnya kesadaran masyarakat akan kebersihan lingkungan yang dapat meningkatkan resiko terkena penyakit DBD (Suhardiono, 2005). Oleh karena itu, pencegahan dengan pengembangan vaksin DBD merupakan alternatif yang harus dikembangkan untuk pemberantasan DBD.



Gambar 2.1 Transmisi virus *dengue* (Sumber: Oxitec, 2014)

2.2 Pengembangan Vaksin *Dengue*

Vaksin merupakan suatu substansi yang digunakan untuk memperoleh respon imun terhadap mikroorganisme patogen (Radji, 2009). Pengembangan vaksin *dengue* didasarkan atas pengetahuan mengenai patogenesis DBD. Orang yang sudah terkena infeksi primer *dengue* akan memiliki respon imunitas humoral maupun seluler yang protektif terhadap tipe DENV yang sebelumnya telah menginfeksi. Berdasarkan hal itu, dikembangkan berbagai jenis vaksin seperti LAV, chimera, DNA *dengue*, dan vaksin DENV terinaktivasi (Amin & Sungkar, 2013).

LAV (*Live Attenuated Virus*) merupakan vaksin yang dikembangkan dengan menggunakan virus hidup yang telah dilemahkan (Lima *et al.*, 2011). LAV adalah vaksin yang paling ekonomis dan dapat dijangkau khususnya di negara berkembang, selain itu LAV juga memiliki tingkat imunitas yang tinggi terhadap ke-4 tipe DENV (Konishi, 2011). Akan tetapi kemungkinan rekombinasi genetik dengan virus yang bersifat virulen masih dapat terjadi, dikhawatirkan akan terjadi peningkatan keparahan penyakit akibat ketidakseimbangan respon imun.

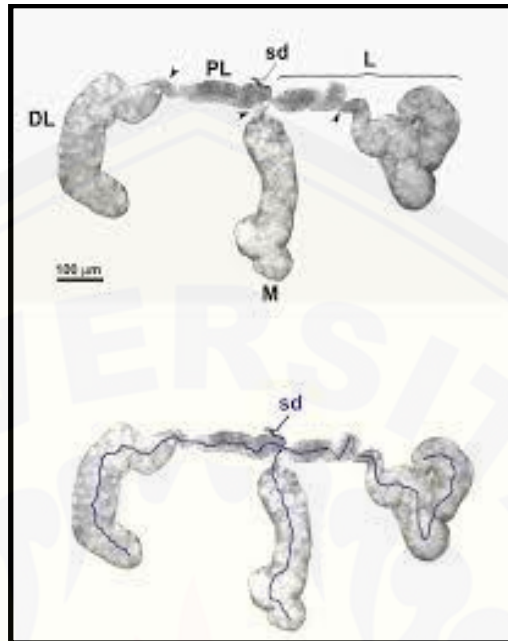
Pengembangan vaksin DBD selanjutnya yaitu Vaksin Chimera (*tetravalent ChimeriVax*). Vaksin Chimera merupakan suatu vaksin tetravalent, didasarkan pada formula vaksin yang diproduksi dari campuran seluruh vaksin *monovalent* (ada 4 vaksin *monovalent* dalam *dengue*) (Garjito, 2007). Pembuatan vaksin gabungan semua serotip virus *dengue* juga telah dilakukan di Thailand yang disebut dengan *Live Attenuated Tetravalen Dengue Vaccine* (LATDV). LATDV terbukti imunogenik dan bersifat protektif (Chanthavanich *et al.*, 2006). Namun formulasi pada vaksin LATDV dan pada vaksin *tetravalent ChimeriVax* telah menimbulkan ketidakseimbangan respon imun akibat efek percampuran virus yang dihasilkan. Oleh karena itu agar vaksin *dengue* dapat memberikan proteksi optimal, diperlukan induksi imunitas terhadap ke-4 tipe DENV sekaligus. Keamanan vaksin perlu dipertimbangkan agar tidak menimbulkan ketidakseimbangan respon imun yang dapat meningkatkan keparahan penyakit (Amin & Sungkar, 2013).

Pendekatan terbaru vaksin DBD yang dianggap efektif salah satunya yaitu berbasis vektor dengan memanfaatkan komponen saliva vektor Arthropoda melalui pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV). Vaksin berbasis vektor tidak hanya melindungi terhadap patogen yang ditularkan oleh vektor, tetapi juga terhadap patogen lain (Titus *et al.*, 2006).

2.3 Kelenjar Saliva Sebagai Target Pengembangan TBV

Kelenjar Saliva (Gambar 2.2) mengandung substansi penting yang berperan dalam proses transmisi patogen saat proses *blood feeding*. Masing-masing lobus pada kelenjar saliva nyamuk betina mensintesis protein yang berbeda-beda. Lobus medial mensintesis protein seperti sialokinin, protein vasodilator, *D7* dan *apyrase* (Juhn *et al.*, 2011). Protein *D7* berperan dalam mengikat amina biogenik yang berfungsi dalam mencegah proses vasokonstriksi (Calvo *et al.*, 2006). Enzim *apyrase* berfungsi sebagai fasilitator untuk mempermudah proses *blood feeding* karena dapat menghambat agregasi platelet dan sebagai anti-inflamasi (Wasinpiyamongkol, 2012). Lobus lateral mensintesis protein seperti *amylase*, *lysozime*, *agyptin*, *serin* dan *alpha-glucoside*.

Kelenjar saliva nyamuk betina mengandung substansi yang memiliki kemampuan untuk menghambat hemostatis, menghambat vasokonstriksi (vasomodulator) dan immunosupresan (immunomodulator) (Andrade *et al.*, 2005). Substansi kelenjar saliva nyamuk juga memiliki efek antikoagulan, agregat anti-platelet, dan aktivitas vasodilatasi yang melancarkan proses menghisap darah (Zeidner, 1999). Pada saliva *Ae. aegypti* juga terdapat protein yang dapat menghambat aktivasi sel T dan sel B Protein yang disintesis oleh kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* tersebut mampu meningkatkan transmisi patogen dalam tubuh inang (Dhar & Khumar, 2003).



Gambar 2.2 Struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina (L) lobus lateral, (M) lobus medial, (DL) distal lateral, (PL) proximal lateral, (SD) salivary ductus. (Juhn *et al.*, 2011)

Komponen vasomodulator berfungsi untuk memperlebar pembuluh darah inang (vasodilatasi) sehingga darah akan mudah dihisap oleh nyamuk (James *et al.*, 2003). Komponen imunomodulator dapat membantu meningkatkan terjadinya transmisi patogen. Komponen imunomodulator tersebut telah dilaporkan bersifat immunosupresif seperti yang terlihat pada Tabel 2.1. Komponen immunosupresif yang berada di saliva vektor Arthropoda inilah yang merupakan komponen penting bagi basis dalam pengembangan vaksin melawan patogen yang ditransmisikan (*Transmission Blocking Vaccine/ TBV*) (Titus *et al.*, 2006).. Vaksin berbasis saliva vektor ini merupakan pendekatan terbaru dan tidak hanya akan melindungi inang (manusia) terhadap patogen yang dibawa vektor, tetapi juga mampu memotong transmisinya.

Tabel 2.1 Aktivitas imunomodulator kelenjar saliva vektor Arthropoda

Antropoda	Sel Imun yang di modulasi oleh saliva vektor	Aktifitas yang dipengaruhi oleh saliva vektor
Sandflies	Makrofag Sel T	Inhibitor Inflamasi Modulator Sitokin Anti-koagulan Vasodilator (maxadilan)
Blackflies	Sel T Sel B	Inhibitor Inflamasi Modulator Sitokin Anti-koagulan
Nyamuk	Sel T	Inhibitor Inflamasi Modulator Sitokin Anti-koagulan
Hard Ticks	Sel T Sel B Makrofag Sel Natural Killer (NK) Neutrofil	Inhibitor Inflamasi Modulator Sitokin Anti-koagulan Vasodilator Histamine binding protein Complement inhibitor Anaphy latoxin inactivator Immunoglobulin binding protein

(Sumber: Gillespie *et al.*, 2000)

2.4 Respon Imunologi Inang Terhadap Saliva *Aedes aegypti*

Pada saat nyamuk betina melakukan proses *blood feeding* terjadi transmisi dengan masuknya patogen ke dalam sirkulasi, sehingga menyebabkan komponen biokimia yang ada di dalam saliva nyamuk juga masuk ke dalam tubuh inang. Komponen biokimia inilah yang akan mendapat respon imunologi dari tubuh inang, baik repon imun non spesifik (*innate*) dan respon imun spesifik (*adaptif*).

Respon imun non spesifik adalah mekanisme pertama dari sistem pertahanan tubuh inang saat terjadi paparan nyamuk. Pada paparan primer, antigen yang masuk akan direspon oleh inang melalui respon imun non spesifik dengan aktivasi makrofag. Secara umum, pada paparan awal antigen akan memproduksi sitokin seperti IL-2 dan IFN- γ yang menginduksi respon Th1, namun pada paparan berikutnya (sekunder) terjadi polarisasi sistem imun inang menjadi Th2. Pada penelitian Schneider *et al.*

(2004) diketahui bahwa paparan saliva *Ae. aegypti* menyebabkan pergeseran subset dari Th1 ke Th 2 yang ditunjukkan dengan meningkatnya produksi sitokin seperti IL-4 dan IL-10 (sitokin yang menginduksi Th2). Peningkatan IL-10 dapat menurunkan produksi MHC class II oleh monosit dan menghambat presentasi antigen oleh *Antigen-Presenting Cells* (APC) (Schneider & Higgs, 2008), sehingga menyebabkan menurunnya produksi sitokin Th1 (IL-2 dan IFN- γ). Peningkatan IL-4 dan IL-10 yang menginduksi respon Th2 dapat mengaktifasi sel B untuk membentuk sel plasma yang akan membentuk antibodi spesifik (seperti IgG). Hal ini menyebabkan mengapa IgM lebih tinggi pada paparan pertama sementara IgG pada paparan kedua. Peningkatan IgG pada paparan kedua merupakan dasar penggunaan kadar titer IgG sebagai analisis dalam respon antibodi terhadap paparan saliva nyamuk *Ae. aegypti* (Doucoure *et al.*, 2012).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Desember sampai dengan April 2015 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Dasar, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi kandang nyamuk, *tray*, pipet plastic, cawan plastik, pinset, *micro tube*, mikropipet, *water sonicator*, *beaker glass*, gelas ukur, aluminium foil, jarum diseksi, mikroskop stereo, falcon, *eppendorf*, aspirator, *shaker*, *magnetic stirrer*, mikrotip, pH meter, *microwell plates*, *refrigerator*, *refrigerated centrifuge*, *plate sealed*, *vortex*, *microplate*, dan perangkat ELISA reader.

Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas kelenjar saliva *Aedes aegypti*, Alkohol 70%, Sukrosa 10 %, tikus wistar, kertas pupasi, kapas, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), *blocking buffer*, *bicarbonate buffer*, *buffer* sampel, *Phosphat Buffer Saline Tween* (PBST), H₂SO₄, HCl, NaOH, *TMB Substrate*, *buffer* lisis, *Affinity Purified Antibody Phosphatase Labeled Goat anti-Human IgG*, serum darah manusia (sehat endemik, pasien DBD, neonatus) dan aquades (Lampiran A1, A2 dan A3).

3.3 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur dalam penelitian ini adalah dimulai dengan preparasi alat, *rearing Aedes aegypti*, isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti*, ekstraksi protein kelenjar saliva *Aedes aegypti*, preparasi serum darah dan analisis menggunakan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Secara detail prosedur penelitian akan dijelaskan sebagai berikut:

3.4.1 Preparasi Alat

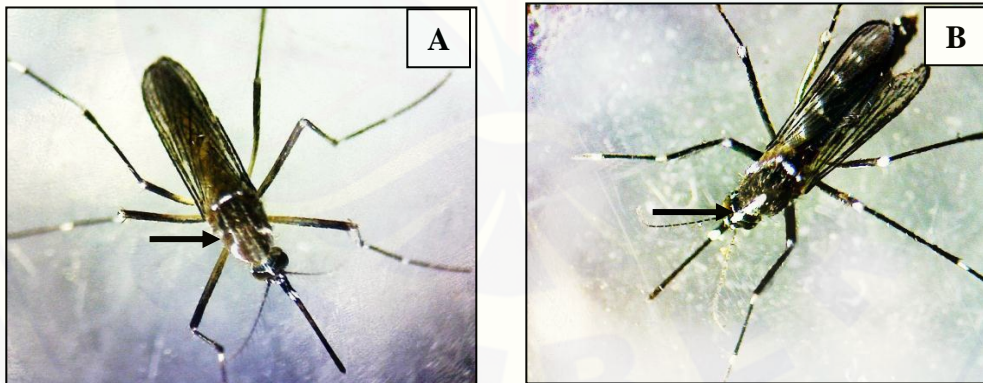
Meja tempat kerja dibersihkan menggunakan Alkohol 70%. Seluruh *glassware* dan *plasticware* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120° C selama 30 menit.

3.4.2 Rearing *Aedes aegypti*

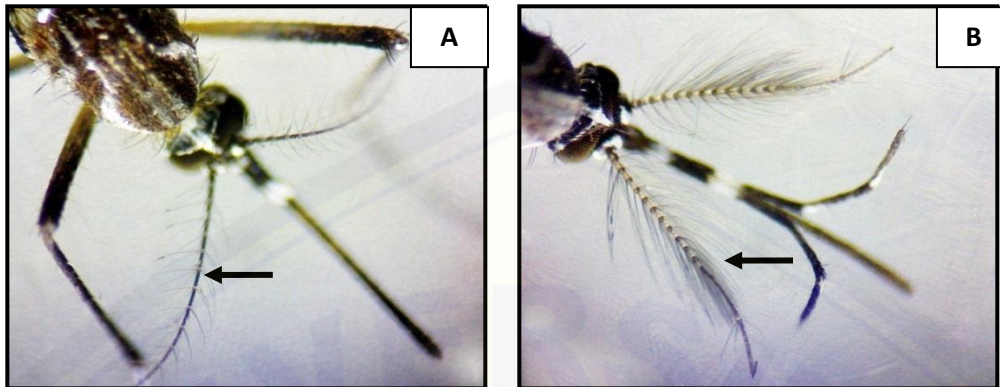
Rearing nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan dalam ruang insektarium bersuhu $\pm 28^{\circ}$ C (suhu ruang). Kegiatan *rearing* diawali dengan *landing collection* nyamuk *Aedes aegypti* yang diambil dari penampungan air bersih atau genangan air hujan misalnya bak mandi, tangki penampungan air, kaleng bekas, kantung plastik bekas, talang rumah, ban bekas ataupun semua bentuk kontainer yang dapat menampung air bersih. Larva selanjutnya dipindahkan dalam nampan plastik (*tray*) untuk dipelihara hingga berubah menjadi pupa. Larva diberi makanan berupa pelet. Larva yang telah menjadi pupa di ambil dengan pipet plastik dan dipindah ke dalam cawan pupa yang telah di lengkapi dengan kertas saring dan disusun melingkar menutupi bibir cawan yang berfungsi sebagai tempat peletakan telur nyamuk, kemudian cawan pupa dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa. Selain itu juga terdapat larutan sukrosa 10% sebagai makanan nyamuk jantan dan seekor tikus wistar yang diletakkan pada kandang kecil untuk dihisap darahnya oleh nyamuk betina. Kelembaban yang optimal untuk ketahanan hidup nyamuk berkisar antara 81,5-89,5 %. Kelembaban tersebut dijaga dengan cara menutup bagian atas kandang

nyamuk menggunakan kain yang telah dibasahi. Nyamuk diambil dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator lalu dimasukkan dalam gelas plastik dan ditutup dengan kain kasa pada bagian atasnya untuk diisolasi kelenjar salivanya.

Nyamuk *Ae. Aegypti* memiliki ciri yaitu warna dasar hitam dengan bintik-bintik putih pada bagian dorsal, kaki dan sayapnya. Selain itu, terdapat dua garis lengkung yang berwarna putih dikedua sisi lateral dan dua buah garis putih sejajar pada bagian median dorsal toraks. Garis putih pada toraks inilah yang membedakan nyamuk *Ae. Aegypti* dengan *Ae. Albopictus* (Gambar 3.1). Pada *Ae. Albopictus* hanya terdapat satu garis putih dibagian dorsal toraks (Sivanathan, 2006). Nyamuk *Ae. aegypti* memiliki sepasang antena berbentuk filiform yang terdiri atas 13 segmen (Andrew & Ananya, 2013). Antena dapat digunakan untuk membedakan kelamin pada nyamuk dewasa. Antena seperti yang terlihat pada Gambar 3.2, pada nyamuk jantan memiliki rambut yang lebih lebat daripada nyamuk betina. Rambut lebat pada antena nyamuk jantan merupakan antena tipe plumose sedangkan pada nyamuk betina yang jumlahnya lebih sedikit merupakan antena tipe pilose (Borror *et al.*, 1992).



Gambar 3.1 Perbedaan toraks bagian dorsal dua spesies genus *Aedes*, (A) toraks *Ae. aegypti*; (B) toraks *Ae. albopictus*; (menggunakan Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 12x, kamera : OptiLab)

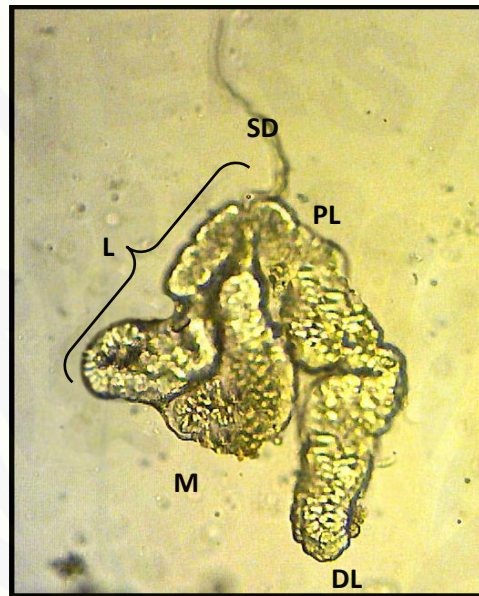


Gambar 3.2 Perbedaan antena pada *Ae. Aegypti* (A) *Ae. Aegypti* betina (B) *Ae. Aegypti* jantan (menggunakan Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 40x, kamera : Opti Lab)

3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Nyamuk dimasukkan dalam gelas plastik dan dibius dengan memasukkan kedalam lemari es. Sebelum dibedah, terlebih dahulu nyamuk diidentifikasi jenis kelamin dan spesiesnya. Identifikasi jenis kelamin dapat dibedakan dari banyak atau tidaknya rambut pada antena nyamuk. Identifikasi spesies dilakukan dengan cara melihat bagian pola sisik garis pada tubuh bagian dorsal toraks nyamuk (nampak 2 garis sejajar yang diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya) untuk memastikan bahwa nyamuk yang dibedah adalah *Aedes aegypti*. Isolasi kelenjar saliva dari nyamuk dilakukan dengan cara *microdissection*. Langkah pertama yakni nyamuk diletakkan dibawah mikroskop dan sebelumnya telah diberi larutan garam fisiologis. Jarum diseksi ditangan kiri menekan dengan lembut pada bagian toraks dan jarum diseksi ditangan kanan menarik bagian kepala dengan perlahan-lahan. Kemudian di ambil kelenjar saliva yang melekat dibagian kepala (berjumlah sepasang masing-masing terdapat 3 lobus dan berwarna bening) dipotong dan dipindah ke dalam *ependorf* steril yang telah diisi 100 μ L PMSF dan disimpan pada suhu -20°C hingga dibutuhkan.

Kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* terdapat satu pasang dan masing-masing memiliki 3 lobus. Terdapat satu lobus medial dan dua lobus lateral yang memiliki duktus menuju ke *Salivary Pump* (Gambar 3.3). Pada bagian lobus lateral kelenjar saliva nyamuk dibagi menjadi 3 bagian yaitu bagian proksimal, intermediate dan distal (Jariyapan *et al.*, 2007).



Gambar 3.3 Struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina (L) lobus lateral, (M) lobus medial, (DL) distal lateral, (PL) proximal lateral, (SD) salivary ductus. Hasil isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina (Mikroskopi LW Scientific, perbesaran 400x, kamera : OptiLab)

3.4.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang telah diisolasi secara *microdissection* pada tubuh nyamuk bagian toraks ditambahkan dengan *buffer* lisis (perbandingan 1:1). Kemudian sampel dihomogenisasi dengan *vortex*. Sampel di ekstraksi dengan menggunakan *water sonikator* selama 45 menit. Sampel disimpan pada suhu - 20°C hingga digunakan.

3.4.5 Preparasi Serum Darah

Ethical clearance dan *inform consent* (Lampiran B dan C) yang digunakan dalam penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sampel darah manusia diambil dari orang sehat, pasien DBD dan neonatus di wilayah endemik DBD Kabupaten Jember. Penentuan kawasan endemik berdasarkan data kejadian DBD dari Dinas Kesehatan Kabupaten Jember. Sampel darah penderita DBD diperoleh dari Rumah Sakit dr. Soebandi. Pengambilan sampel darah orang sehat dan penderita DBD dilakukan dari pembuluh darah *vena brachial* di lengan. Sedangkan untuk neonatus, darah diambil dari bagian tali pusar yang menuju bayi saat kelahiran oleh Bidan. Sembilan orang pada masing-masing kelompok sampel diambil sampel darahnya sebanyak @ 3 mL. Darah ditampung dalam vakutainer tanpa anti-koagulan. Kemudian sampel darah didiamkan selama 30 menit, setelah itu lapisan bening paling atas diambil dan disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 27°C dan supernatannya merupakan serum darah. Sampel serum darah di simpan pada suhu -20°C hingga di gunakan.

3.4.6 Pengukuran Kadar IgG dengan Metode ELISA

Respon imun yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar IgG yang direaksikan dengan 3 jenis serum yang diambil dari sampel serum darah penderita DBD, orang sehat dan neonatus. Kadar IgG diukur menggunakan metode ELISA yang semuanya dilakukan dalam *Microwell Plates* yang berjumlah 96 sumuran. Teknik ELISA yang digunakan adalah ELISA *sandwich* karena memiliki tingkat spesifitasnya yang relatif tinggi. Selain itu, antigen yang dapat berinteraksi dengan 2 jenis antibodi, yaitu antibodi primer berfungsi sebagai penangkap antigen yang diinginkan dan antibodi sekunder berfungsi sebagai antibodi yang berikatan dengan enzim signal untuk mendeteksi keberadaan adanya ikatan antara antigen dan antibodi primer.

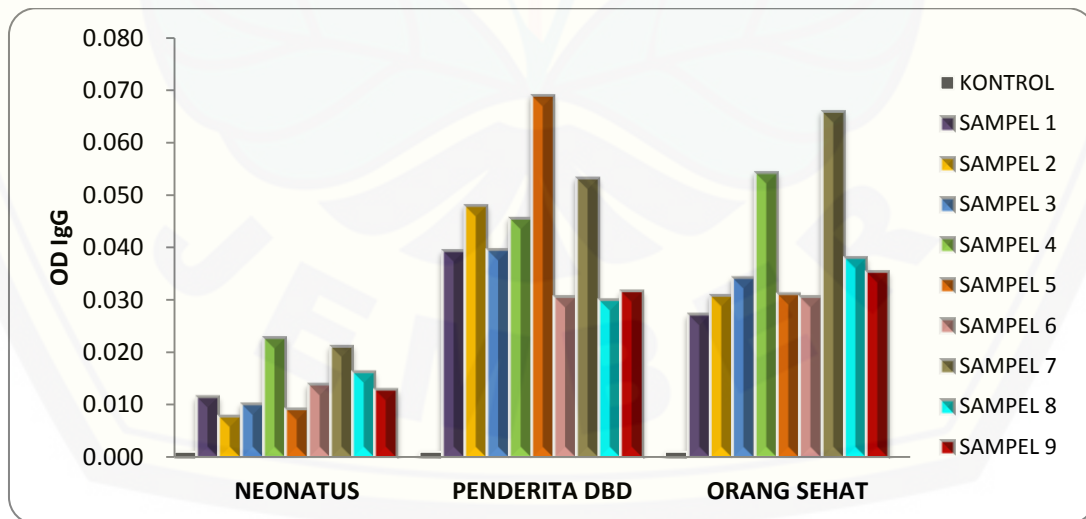
Analisis menggunakan metode ELISA diawali dengan penambahan 50 μl *Coating antigen* dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 12 jam, larutan dibuang dan dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali @ 250 μl . Selanjutnya yaitu penambahan 50 μl antibodi primer pada masing-masing *Microwell Plates* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah diinkubasi larutan dibuang dan dicuci kembali dengan PBST. Kemudian dilakukan penambahan 50 μl antibodi sekunder (Anti-human IgG dan *blocking buffer* 1:5000) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, larutan dibuang dan dicuci kembali dengan PBST. Langkah berikutnya adalah penambahan 50 μl Substrat TMB dalam ruang gelap dan diinkubasi suhu ruang hingga larutan berwarna biru. Setelah terlihat perubahan warna maka dilakukan *stop solution* dengan menambahkan 50 μl larutan H_2SO_4 . Warna yang dihasilkan tersebut akan dianalisis menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm. Dari analisis tersebut dihasilkan *absorbansi standart assay* dan *assay* sampel yang digunakan untuk mengukur kadar IgG. Perbandingan jumlah kadar IgG pada masing-masing sampel akan memberikan gambaran respon imun humoral manusia terhadap protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Profil Kadar IgG Anti Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. Aegypti* yang digunakan dalam penelitian merupakan hasil *landing collection* larva nyamuk di wilayah Kabupaten Jember. Larva yang didapat kemudian dibiakkan hingga menjadi nyamuk dewasa di Laboratorium Zoologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Sebanyak 500 pasang kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* telah berhasil diisolasi dengan metode *microdissection* (Bruce-Chwatt, 1980), dan ekstraksi sehingga diperoleh Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) dengan konsentrasi sebanyak 2,041 µg/µl.

Pengukuran kadar IgG pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Uji aktifitas protein tersebut dilakukan untuk mengetahui IgG yang bereaksi terhadap EPKS *Ae. aegypti*. Hasil pengukuran kadar IgG dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kadar IgG anti EPKS *Ae. aegypti* pada kelompok serum neonatus, penderita DBD dan orang sehat di wilayah endemik.

Berdasarkan Gambar 4.1 kadar IgG yang didapat pada kelompok neonatus dari sampel satu hingga sampel sembilan berturut-turut adalah 0.012, 0.008, 0.010, 0.023, 0.009, 0.014, 0.021, 0.016, dan 0.013. Pada kelompok penderita DBD adalah 0.039, 0.048, 0.040, 0.046, 0.069, 0.031, 0.053, 0.030, dan 0.032. Sedangkan pada kelompok orang sehat adalah 0.027, 0.031, 0.034, 0.054, 0.031, 0.031, 0.066, 0.038, dan 0.035.

Rata-rata kadar IgG anti protein kelenjar saliva untuk kontrol pada kelompok neonatus, penderita DBD, dan orang sehat adalah nol. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat antibodi spesifik yang berikatan dengan antigen. Selain itu kontrol tanpa antigen juga membuktikan bahwa antigen yang berikatan dengan antibodi dalam serum merupakan protein yang terdapat pada saliva *Ae. aegypti*.

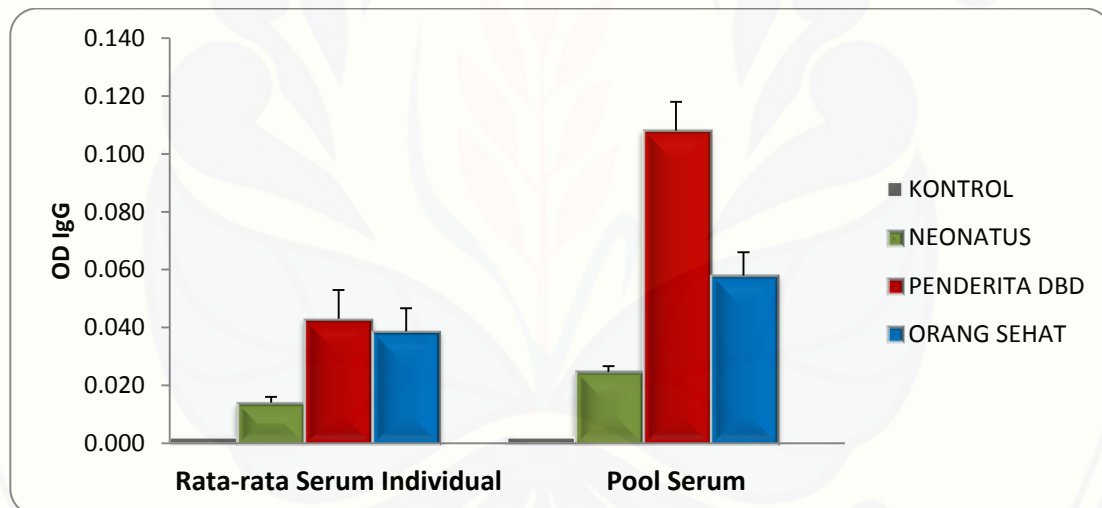
Pada setiap sampel serum kelompok neonatus, penderita DBD, dan orang sehat memiliki kadar IgG. Kadar IgG tersebut menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara antigen EPKS *Ae. aegypti* dan antibodi dalam serum darah. Adanya ikatan antigen antibodi menunjukkan bahwa setiap sampel serum telah terpapar saliva *Ae. aegypti* baik secara langsung melalui paparan nyamuk pada penderita DBD dan orang sehat maupun melalui plasenta pada kelompok neonatus.

Serum neonatus merupakan serum yang diambil dari tali pusar bayi saat kelahiran. Sedikitnya kadar IgG yang terdapat pada kelompok neonatus diduga berasal dari ibu yang disalurkan melalui plasenta saat masa kehamilan. IgG merupakan satu-satunya antibodi yang dapat menembus plasenta (Bratawidjaja & Iris, 2014).

Kadar IgG antara setiap individu pada kelompok sampel serum bervariasi. Kadar IgG yang bervariasi tersebut menunjukkan bahwa jumlah paparan nyamuk *Ae. aegypti* pada setiap individu dalam masing-masing kelompok tidak sama. Seseorang yang sering terpapar oleh saliva *Ae. aegypti* akan membentuk antibodi spesifik terutama IgG dalam tubuhnya (Remoue *et al*, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Orlandi *et al*. (2007) menunjukkan bahwa paparan primer saliva nyamuk *Ae. aegypti*

akan memproduksi IgG dalam jumlah sedikit, sedangkan pada paparan sekunder produksi IgG lebih banyak karena adanya peningkatan proliferasi sel B oleh antigen yang sama. Sehingga semakin tinggi paparan saliva nyamuk maka jumlah antibodi IgG yang diproduksi dalam tubuh juga semakin tinggi.

Pada hasil tersebut juga menunjukkan bahwa kelompok sampel penderita DBD dan orang sehat di wilayah endemik memiliki kadar IgG yang cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok sampel neonatus. Tingginya kadar IgG tersebut dikarenakan pada penderita DBD dan orang sehat di wilayah endemik lebih sering terpapar nyamuk *Ae. aegypti* secara langsung. Wilayah kabupaten Jember sebagai tempat pengambilan serum, merupakan wilayah endemik DBD (Dinkes Jember, 2012), sehingga kemungkinan terpapar nyamuk *Ae. aegypti* lebih tinggi.



Gambar 4.2 Kadar IgG anti EPKS *Ae. aegypti* pada neonatus, penderita DBD, dan orang sehat berdasarkan rata-rata serum individual dan *pool* serum.

Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian dengan menggunakan populasi (*pool*) serum dengan cara mereaksikan sembilan sampel serum secara bersamaan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kadar IgG antar kelompok serum dan dibandingkan dengan rata-rata serum individual (Gambar 4.2). Rata-rata kadar IgG pada kelompok serum individual neonatus, penderita DBD, dan orang sehat berturut-turut adalah

0.014, 0.043, dan 0.039. Sedangkan pada kelompok *pool* serum adalah 0.025, 0.108, dan 0.058. Hal ini menunjukkan bahwa kadar IgG pada setiap kelompok neonatus, penderita DBD, dan orang sehat tidak sama.

Rata-rata kadar IgG serum individual dan *pool* serum memiliki pola yang sama namun memiliki kadar IgG yang berbeda. Hal tersebut diduga karena terdapat akumulasi IgG pada setiap sampel serum yang berikatan dengan antigen. Sehingga pada *pool* serum kadar IgG setiap kelompok lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata kadar IgG individual serum. Kelompok yang memiliki kadar IgG terendah hingga tertinggi berturut-turut adalah kelompok neonatus, orang sehat dan penderita DBD.

Pada orang sehat juga terdeteksi kadar IgG. Adanya IgG dalam serum orang sehat menunjukkan bahwa orang sehat juga terpapar oleh saliva *Ae. aegypti*. Hal ini menunjukkan bahwa orang sehat di wilayah endemik yang sering terpapar oleh saliva *Ae. aegypti* akan membentuk antibodi spesifik dalam tubuhnya. Penelitian yang mendukung pernyataan tersebut adalah penelitian yang dilakukan oleh Doucoure *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa orang yang berasal dari wilayah endemik DBD akan mengembangkan antibodi spesifik terhadap protein saliva *Ae. aegypti*.

Orang sehat dan penderita DBD yang tinggal di wilayah endemik pernah terpapar nyamuk *Ae. aegypti* yang ditunjukkan dengan adanya IgG dalam serum. Namun pada orang sehat tidak mengalami sakit DBD, karena tidak semua nyamuk *Ae. aegypti* yang melakukan *blood feed* membawa virus *dengue*. Menurut Satari & Mila (2004) tidak semua paparan nyamuk *Ae. aegypti* dapat menimbulkan penyakit, hanya nyamuk yang membawa virus *dengue* yang dapat menimbulkan sakit DBD. Penelitian di Jepara dan Ujung pandang menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes* berhubungan dengan tinggi rendahnya infeksi virus *dengue* di masyarakat, tetapi infeksi tersebut tidak selalu menyebabkan DBD pada manusia karena masih tergantung pada faktor lain seperti kepadatan vektor, virulensi virus *dengue* dan sistem imun *host* (Candra, 2010).

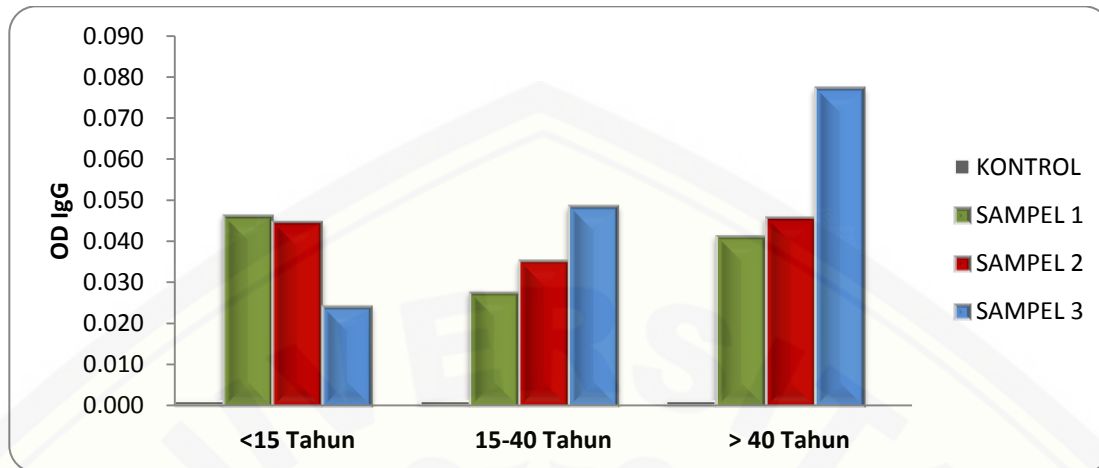
4.2 Profil Kadar IgG Anti Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *Ae. Aegypti*

Berdasarkan Umur

Pengukuran kadar IgG dengan menggunakan metode ELISA juga dilakukan pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur. Penggolongan umur pada penderita DBD dibagi menjadi tiga kelompok yaitu, kelompok umur <15 tahun, kelompok umur 15-40 tahun dan kelompok umur >40 tahun.

Pada Gambar 4.3 kelompok kontrol tidak terdapat IgG atau kadar IgG sama dengan nol. Hal ini dikarenakan pada kelompok kontrol tidak terdapat antigen yang dapat berikatan dengan antibodi spesifik yang terdapat dalam serum darah penderita DBD. Rata-rata kadar IgG anti protein saliva pada kelompok umur <15 tahun dari sampel satu, sampel dua dan sampel tiga berturut-turut adalah 0.040, 0.046 dan 0.024. Pada kelompok umur 15-40 tahun adalah 0.028, 0.035, dan 0.049. Sedangkan pada kelompok umur >40 tahun adalah 0.041, 0.046, dan 0.077

Pada kelompok umur <15 tahun, 15-40 tahun, dan umur >40 tahun menunjukkan kadar IgG anti EPKS *Ae. aegypti* antara masing-masing individu bervariasi. Hal tersebut diduga karena jumlah paparan pada setiap individu tidak sama, selain itu adanya perbedaan sistem imun pada setiap individu. Perbedaan sistem imun disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah usia. Usia dapat mempengaruhi fungsi sel T dan sel B dalam memproduksi antibodi (Bratawidjaja & Iris, 2014). Selain faktor usia, status gizi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh pada sistem imun tubuh. Status gizi dipengaruhi oleh asupan dan penyerapan gizi khususnya zat mikro yang berpengaruh pada sistem kekebalan tubuh (Husaini *et al.*, 2003), sehingga walaupun dalam kelompok umur yang sama, kadar IgG pada individu satu dengan yang lain tidak sama.

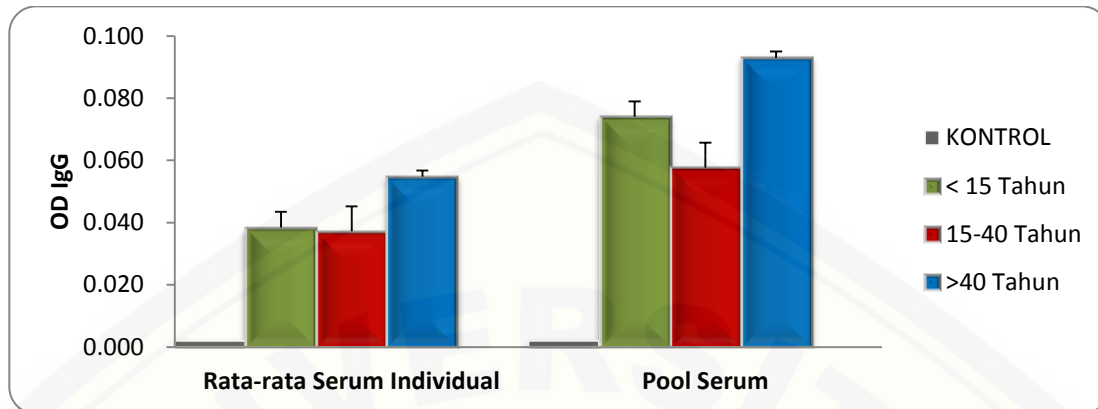


Gambar 4.3 Kadar IgG anti EPKS *Ae. aegypti* pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur pada serum individual.

Dalam penelitian ini, untuk mengetahui kadar IgG pada setiap kelompok serum juga dilakukan pengujian pada *pool* serum dengan mereaksikan tiga sampel serum secara bersamaan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kadar IgG antar kelompok serum pada *pool* serum dan dibandingkan dengan rata-rata kadar IgG serum individual.

Rata-rata kadar IgG serum individual pada kelompok umur <15 tahun, 15-40 tahun, dan >40 tahun berturut-turut adalah 0.038, 0.037, dan 0.055. Sedangkan pada *pool* serum adalah 0.074, 0.058 dan 0.093 (Gambar 4.3). Hal ini menunjukkan bahwa IgG pada setiap kelompok serum baik pada rata-rata individual serum maupun *pool* serum tidak sama.

Pada kelompok umur <15 tahun dan kelompok umur 15-40 tahun kadar IgG hampir sama. Hal ini diduga pada kedua kelompok tersebut memiliki kemungkinan jumlah paparan nyamuk *Ae. aegypti* yang sama. Jumlah paparan nyamuk dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah faktor lingkungan. Lingkungan merupakan faktor yang penting karena merupakan tempat berkembang biaknya nyamuk *Ae. aegypti*, karena semakin tinggi kepadatan populasi nyamuk maka frekuensi seseorang terpapar nyamuk juga semakin tinggi (Candra,2010).



Gambar 4.4 Kadar IgG anti EPKS *Ae. aegypti* pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur pada serum individual dan *pool* serum.

Rata-rata serum individual pada kelompok umur >40 tahun memiliki kadar IgG cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok umur yang lain. Tingginya kadar IgG pada kelompok umur >40 tahun diduga karena sering terpapar nyamuk secara terus-menerus dalam jangka waktu yang lebih lama dibandingkan kelompok umur yang lain. Seseorang yang lebih banyak terpapar nyamuk maka kadar IgG dalam tubuhnya akan meningkat (Remoue *et al.*, 2007). Hal ini sesuai dengan penelitian Doucoure *et al.* (2012) yang menyatakan umur dapat mempengaruhi produksi antibodi berupa IgG terhadap paparan saliva *Ae. aegypti*.

Pada hasil pengukuran *pool* serum memiliki kadar IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata kadar IgG pada serum individual. Hal tersebut diduga karena terdapat akumulasi antibodi spesifik (IgG) pada setiap sampel serum yang berikatan dengan antigen anti EPKS *Ae. aegypti*. Sehingga pada *pool* serum kadar IgG setiap kelompok lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata kadar IgG serum individual. IgG yang terdeteksi dalam penelitian ini merupakan antibodi yang dihasilkan oleh sel B karena adanya induksi Th2 oleh antigen anti EPKS *Ae. aegypti*. Menurut Donovan *et al.* (2007) ekstrak protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* menyebabkan peningkatan produksi IL-4 dan IL-10 yang merupakan aktifator sel Th2 dan menginduksi sel B untuk membentuk IgG.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Respon imun humoral manusia (IgG) masing-masing individu pada setiap kelompok neonatus, penderita DBD, orang sehat di wilayah endemik bervariasi. Kelompok serum dengan kadar IgG tertinggi hingga terendah berturut-turut adalah penderita DBD, orang sehat di wilayah endemik dan neonatus.
2. Respon imun humoral manusia (IgG) masing-masing individu pada kelompok penderita DBD yang digolongkan berdasarkan umur bervariasi. Kadar IgG kelompok umur >40 tahun lebih tinggi dibandingkan kadar IgG kelompok umur <15 tahun dan kelompok umur 15-40 tahun.

5.2 Saran

Kelenjar saliva nyamuk yang sudah diekstraksi (EPKS) sebaiknya segera dilakukan analisis ELISA. Karena semakin pendek waktu penyimpanan maka komponen protein saliva akan semakin bagus, jika disimpan dalam waktu lama maka akan mengurangi kualitas proteinnya. Pada saat preparasi serum untuk ELISA, diusahakan agar serum tidak terlalu lama dalam suhu ruang karena dapat merusak serum dan harus selalu disimpan pada -20° C agar kondisi serum tetap optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhista, T. Y. 2013. Perbedaan Pengetahuan Sikap Praktek Masyarakat Sebelum Dan Setelah Mendapatkan Penyuluhan PSN Dan Membuang Sampah Di Panti Mardi Utomo Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* Vol. 2 (1).
- Amin, H., Z., & Sungkar, S. 2013. Perkembangan Mutakhir Vaksin Demam Berdarah Dengue. *Perkembangan Mutakhir Vaksin DBD*. Vol. 1 (3).
- Andrade, B. B., Clarissa R.T., Aldina B., & Monel B.R. 2005. Haematophagous Arthropod Saliva And Host Defense System: A Tale of Tear and Blood. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 665-693.
- Andriani, N., Tjitrosantoso, H., & Yamelan, P. 2014. Kajian Penatalaksanaan Terapi Pengobatan Demam Berdarah Dengue (DBD) Pada Penderita Anak Yang Menjalani Perawatan Di Rsup Prof. Dr. R.D Kandou Tahun 2013. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. Vol. 3 (2).
- Andrew, D & Ananya Bar. 2013. Morphology and Morphometry Of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annual Review & Research in Biology*. Vol 3 (1) : 52-69.
- Borrer, D, J., C. A. Tripehom, N. F. Johnson. 1992. *Pelajaran Pengenalan Serangga*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Bratawidjaja, K.G. & Iris Rengganis. 2014. *IMUNOLOGI DASAR Edisi ke-II(Cetakan ke-2)*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bruce-Chwatt, L. J. 1980. *Essential Malariology*. London: William Heinemann Medical Books Ltd.
- Calvo E., Mans B.J., Anderson J.F., Ribeiro J.M. 2006. Function and evaluation of a mosquito salivary protein family. *J Biol chem*; Vol. 281: 1935-1942.
- Candra, Aryu. 2010. Demam Berdarah *Dengue*: Epidemiologi, Patogenesis, dan Faktor Risiko Penularan. *Aspirator*. Vol. 2 (2): 110 –119.

- Chanthavanich, P., Luxemburger, C., Sirivichayacul, C., Lapphra, K., Pengsaa, K., Yogsan, S., Sabchareon, A., & Lang, J. 2006. Short Report: Immun 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.* Vol. 75 (1): 26-28.
- Chen, K., Pohan, H. T., & Sinto, R. 2009. *Diagnosis dan Terapi Cairan pada Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Dhar, R., Kumar, N. 2003. Role of Mosquito Salivary Glands. *Cur. Sci.*, 85: 1308-1313.
- Dinkes Jatim. 2013. *Daftar Isi Jatim Dalam Angka Terkini Tahun 2012-2013 Triwulan II*. Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur.
- Dinkes Jember. 2012. *Kasus Demam Berdarah Dengue (DBD) Tahun 2005 s/d 2012 Se Kabupaten Jember*. [Data Tidak Dipublikasikan].
- Donovan, JM, Messmore AS, Scrafford DA, Sacks DL, Kamhawi S, McDowell MA. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection With Malaria Parasites. *J. of Infection and Immunity*. Vol.75:2523-2530.
- Doucoure, S., Mouchet, F., Comelie, S., Dehecq, J. S., Rutee, A. H., Roca, Y., Walter, A., Herve, J. P., Misse, D., Favier, F., Gasque, P., & Remoe, F. 2012. Evaluation of the Human IgG Antibody Response to *Aedes albopictus* Saliva as a New Specific Biomarker of Exposure to Vector Bites. *PloS Negl Trop Dis*. Vol 6 (2) e187.
- Doucoure, S., Mouchet, F., Cournil, A., Goff, G., Cornelié, S., Roca, Y., Giraldez, M., Simon, Z., Loayza, R., Misse, D., Flores, J., Walter, A., Rogier, C., Herve, J., & Remou, J. 2012. Human Antibody Response to *Aedes aegypti* Saliva in an Urban in Bolivia: A New Biomarker of Exposure to Dengue Vector Bites. *Am. J. Trop, Med. Hyg.* Vol. 87 (3): 504-510.
- Edelman, R. 2007. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. *Supplement Article*. University of Maryland School of Medicine Inc.
- Fahmi, M. 2006. Perbandingan Efektivitas Abate dengan Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle*) dalam Menghambat Pertumbuhan Larva *Aedes aegypti*. Tidak

- diterbitkan. Artikel Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Fathi, Soedjadi, K., & Chatarina, U.,W. 2005. Peran Faktor Lingkungan dan Perilaku Terhadap Penularan Demam Berdarah Dengue Di Kota Mataram. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. Vol. 2 (2) : 1-10.
- Fatmah. 2006. Respons Imunitas Yang Rendah Pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara, Kesehatan*. 2006 Juni 2006; Vol. 10 (1): 47-53.
- Garjito, T., A. 2007. Vaksin Dengue dan Perkembangannya Saat Ini dan Di Masa Mendatang. *Media Litbang Kesehatan*. Vol. 17 (4).
- Gillespie, R., D., Lamine, M. & Titus, R. 2000. The Immunomodulatory Factors Of Bloodfeeding Arthropod Saliva. *Parasite Immunology*. Vol. 22: 319-331.
- Husaini MA, Siagian UL, Suharno. 2003. Suatu Kompilasi Informasi dalam Menunjang Kebijakan Nasional dan Pengembangan Program. *J. Anemia Gizi*. Direktorat Gizi dan Puslitbang Gizi, Depkes R.I;
- James, A. 2003. Review: Blocking Malaria Parasite Invasion of Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206: 3817-3821.
- Jariyapan, Choochote, Jitpakdi, Harnnoi, Siriyasatein, Wilkinson, Junkum dan Bates. 2007. Salivary Gland Proteins of The Human Malaria Vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. Vol. 49 (1): 5-10.
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Guedes, B. A. M., Majid, A., Coleman, J., Pimenta, P.F.P., Akram, W., James, A. A & Marinotti, O. 2011. Spatial Mapping of Gene Expression in the Salivary Glands of the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. Vol. 4: 1.
- Kemenkes RI. 2010. *Buletin Jendela Epidemiologi Demam Berdarah Dengue*. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI.
- Kemenkes RI. 2010. *Indikator Kesehatan Indonesia 2005-2009*. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi Kementerian Kesehatan RI.
- Kemenkes RI. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

- Konishi, E. 2011. Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health*. Vol. 39 (4): 63-71.
- Lima, D. M., De-Paula, S. O., Franca, R. F., Palma, P. V., Morais, F. R., & Gomes-Ruiz, A. C. 2011. DNA Vaccine Candidate Encoding the Structural prM/E Proteins Elicits a Strong Immune Response and Protects Mice Against Dengue-4 Virus Infection. *Vaccine*. Vol. 29: 831-8.
- Muliawan, S., Y. 2007. Profile of Nonstructural Glycoprotein NS1 as a Diagnostic Marker in Dengue Type 2 Virus Infection. *Nonstructural glycoprotein NS*. *Universa Medicina*. Vol. 2 (2).
- Muslim, Azhari. 2004. "Faktor Lingkungan Yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Infeksi Virus Dengue". Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro
- Orlandi, P. E., Almeras, L., Senneville, D. L., Barbe, S., Remoue, F., Villard, C., Cornelie, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Page's, P., Laffite, D., Boulanger, D., Simondon, F. O., Pradines, B., Fusa, T., & Rogier., C. 2007. Antibody Response Against Saliva Antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in Travellers in Tropical Africa. *Microbes and Infection*. Vol. 9: 1454-1462.
- Radji, M. 2009. Vaksin DNA: Vaksin Generasi Ke Empat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 4 (1): 28-37.
- Remoue, F., Alix, E., Cornelie, S., Sokhna, C., Cisse, B., Doucoure, S., Mouchet, F., Boulanger, D., & Simondon, F. 2007. IgE and IgG Antibody Responses to *Aedes aegypti* in African Children. *Acta Tropica* 104: 108-115.
- Satari, Hindra I. & Mila Meiliasari. 2004. *Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Puspa Swara
- Sayono. 2008. "Pengaruh Modifikasi Ovitrap Terhadap Jumlah Nyamuk Aedes Yang Terperangkap." Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro
- Schneider, B., Soong, L., Zeidner, N., & Higgs, S. 2004. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-viral and Th1/Th2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. *Viral Immunology*. Vol. 17 (4) : 565-573.

- Schneider, B., Soong & Higgs, Stephen. 2008. The Enhancement Of Arbovirus Transmission And Disease By Mosquito Saliva Associated With Modulation Of The Host Immune Response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Vol. 102 (5) : 400-408.
- Sembiring, O. 2009. “Efektifitas Beberapa Jenis Insektisida Terhadap Jamuk *Aedes aegypti* (L.)” Tidak Diterbitkan. Tesis. Medan: Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Sitepu, F., Y. & Supriyadi, T. 2013. Evaluasi Program Pengendalian Dan Pencegahan Demam Berdarah Dengue (DBD) Di Sumatera Utara Tahun 2010-2012. Tidak diterbitkan. Artikel Ilmiah. Dinas Kesehatan Provinsi Sumatera Utara.
- Sivanathan, M. M. 2006. “The Ecology and Biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the Resistance Status of *Aedes albopictus* (Field Strain) Against Organophosphates in Penang Malaysia”. Thesis. Penang: University Sains Malaysia Penang.
- Soegijanto, S. 2003. *Patogenesis dan Perubahan Patofisiologi Infeksi Virus Dengue.* Vol. 4 : 1-15.
- Subekti, R.M. 2005. Daya Bunuh *Bacillus thuriangiensis* Isolat Sampang Madura terhadap berbagai instar Larva nyamuk *Aedes aegypti*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suhardiono. 2005. Sebuah Analisis Faktor Risiko Perilaku Masyarakat Terhadap Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) Di Kelurahan Helvetia Tengah Medan. *J. Mutiara Kesehatan Indonesia.* Vol. 1 (2).
- Sylvana, F. & Pereira, G. 2000. Demam Berdarah Dengue. Tidak diterbitkan. Artikel Ilmiah. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma.
- Titus, R. G., Bishop, J. V., & Mejia, J. S. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for these Factors to Serve as Vaccine to Prevent Pathogen. *Parasite Immunology.* Vol. 28: 131-141.
- Wan, S., Lin, C., Wang., Chen, Y., Yeh, T., Liu, H., Anderson, R., & Lin, Y. 2013. Current progress in dengue vaccines. *Journal of Biomedical Science.* Vol. 20 (1) : 1

- Wasinpiyamongkol, L., Thongrunkiat, S., Sangmukdanan, S., Patramol, S., Luplertlop, N. Maneekan, P., Misse, D. 2012. Protein Expression in The Salivary Gland of *Aedes aegypti* Mosquitoes and Blood- Feeding Succes. *Proteomics*; Vol. 43 (6): 1346-1357..
- WHO. 2009. *Dengue, Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New Edition. France: WHO Library Cataloguing.
- Zeidner, Nordin S., Stephen Higgs, Christine M. H., Barry J. Beatty & Barry R. Miller. 1999. Mosquito Feeding Modulates Th1 and Th2 Cytokines in Flavivirus Susceptible Mice: An Effect Mimicked By Injection Of Sialokinins, But Not Demonstrated In Flavivirus Resistant Mice. *J. Parasite ImmunologyI*. Vol. 21 : 35-44.

Daftar Rujukan Dari Internet

- Kemenkes RI. 2015. *Kemenkes Terima Laporan Peningkatan Kasus DBD Di Jawa Timur*. www.depkes.go.id [Diakses tanggal 25 Maret 2015].
- Oxitec. 2014. Dengue Fever and the *Aedes aegypti* Mosquito. <http://oxitec.com/oxitec-video/introducing-haedes-and-aegypta-all-about-aedes-aegypti-mosquito/>. [Diakses tanggal 20 September 2014].

A. KOMPOSISI LARUTAN DAN BUFFER

A.1 Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk *Ae. aegypti*

- a. PMSF dalam PBS : 0,08 gr NaCl; 0,0144 gr Na₂HPO₄; 0,0024 gr KH₂PO₄; 0,002 gr KCl dilarutkan dalam 10 mL aquades kemudian ditambahkan 0,00174 gr PMSF
- b. NaCl 30% : 30 gr NaCl dilarutkan dalam 100 mL Aquades

A.2 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva Nyamuk *Ae. aegypti*

- a. *Buffer* lisis : 1,5 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA-NaOH; 10 mM NaCl; 1% Nonidet P-40

A.3 Analisis Protein dengan Metode ELISA

- a. *Bicarbonate Buffer* : 0,039 gr Na₂CO₃; 0,073 gr NaHCO₃ dilarutkan dalam 25mL *DI Water* kemudian pH diatur hingga 7,4
- b. PBST : 2,56 gr NaCl; 0,460 gr Na₂HPO₄; 0,076 gr KH₂PO₄; 0,064 gr KCl dilarutkan dalam 320 mL Aquades kemudian ditambahkan 160 µl *Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate*, kemudian pH diatur hingga 7,4
- c. *Blocking Buffer* : 0,35 gr *Albumin Bovine Serum* dilarutkan dalam 35 mL PBST

B. ETHICAL CLEARANCE

KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877
Jember 68121 - Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK*ETHICAL APPROVAL*

Nomor : 126 /H25.1.11/KE/2011

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul : *The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

PENGEMBANGAN TRANSMISSION BLOCKING VACCINES (TBV) BERBASIS KELENJAR SALIVA NYAMUK VEKTOR PADA KASUS DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD) DAN MALARIA

Nama Peneliti Utama : Dra. Rike Oktarianti, M.Si
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 11 Mei 2011



dr. Cholis Abrori, M.Kes.

TANGGAPAN ANGGOTA KOMISI ETIK

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir - butir isian diatas dan telaah terhadap protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

tidak ada hal teknis khusus.
pertimbangan kerahasiaan proses

Jember, 11 Mei 2011



Nama dr. Agus Abrori, M.Eds

C. INFORMED CONSENT

Penjelasan untuk Mengikuti Penelitian Berjudul Pengembangan Vaksin Yang Menghambat Transmisi (Penyebaran) *Dengue*

1. Kami adalah Dr. rer. nat Kartika Senjarini, Dra. Rike Oktarianti M.Si., dan dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., staf peneliti dari Fakultas MIPA dan Fakultas Kedokteran dari Universitas Jember, dengan ini meminta bapak/ibu untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul Pengembangan *Transmission Blocking Vaccine (TBV)* Melawan *Dengue*.
2. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan protein dari kelenjar ludah (saliva) nyamuk yang bersifat imunogenik sebagai bahan vaksin, sehingga hasil penelitian ini dapat memberi manfaat berupa vaksin *dengue* yang dapat mencegah penyebaran penyakit dengue/demam berdarah. Penelitian ini akan berlangsung selama kurang lebih lima tahun dengan sampel berupa kelenjar ludah nyamuk *Aedes aegypti* vektor dengue dan darah penduduk di wilayah endemis demam berdarah.
3. Prosedur pengambilan sampel darah dari penduduk di wilayah endemis adalah dengan menggunakan spuit disposable steril 3 ml atau 10 ml untuk mengambil darah dari pembuluh *vena brachialis* di lengan. Cara ini mungkin akan menyebabkan rasa nyeri di tempat suntikan, tetapi bapak/ ibu tidak perlu khawatir karena tidak akan menimbulkan dampak apapun setelah pengambilan darah karena dilakukan secara aseptis.
4. Keuntungan yang bapak/ ibu peroleh dengan keikutsertaan bapak/ ibu dalam penelitian kami adalah bapak/ ibu telah berperan nyata dalam mewujudkan vaksin dengue yang dapat mencegah penyebaran DBD, sehingga dapat menanggulangi dan mengeliminasi penyakit DBD di wilayah bapak/ ibu.

5. Seandainya bapak/ ibu tidak menyetujui cara ini, maka bapak/ ibu boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk itu bapak/ ibu tidak akan dikenai sanksi atau konsekuensi apapun.
6. Nama dan jatidiri bapak/ ibu akan tetap dirahasiakan.

