



**ANALISIS KONSENTRASI IFN γ DAN IL 4 PADA MENCIT
BALB-C PASCA SENSITISASI DENGAN EKSTRAK PROTEIN
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* (L.)**

SKRIPSI

Oleh

**Febri Ramadhan Afaik
NIM 121810401069**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**ANALISIS KONSENTRASI IFN γ DAN IL 4 PADA MENCIT
BALB-C PASCA SENSITISASI DENGAN EKSTRAK PROTEIN
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* (L.)**

SKRIPSI

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

Oleh

**Febri Ramadhan Afaik
NIM 121810401069**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Faikah dan Ayahanda Agus Supriyanto tercinta, terimakasih atas segala limpahan doa, kasih sayang, pengorbanan, kesabaran mendidik serta dukungan yang tiada henti;
2. Keluarga besar tercinta yang telah memberi doa, motivasi, dan dukungan;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah mendidik dan membagikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”

(QS.Al-Insyirah 6-8)²

“Orang yang berilmu dan ahli ibadah memiliki derajat lebih tinggi daripada orang biasa dan ahli ibadah. Oleh karena itu, jangan mau menjadi orang biasa-biasa saja. Jadilah orang yang paham ilmu dunia dan akirat. Hikmahnya bukan hanya untuk diri kita sekarang, tapi juga untuk anak cucu kita nantinya”

(HR. Muslim)¹

-
- 1) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah /Penafsiran Al Qur'an. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bogor: Nur Publishing.
 - 2) Abdullah bin Abdurrahman Alu Bassam. 2011. *Syarah Hadist Pilihan Bukhari-Muslim*. Bekasi : PT. Darul Falah.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Febri Ramadhan Afaik

NIM : 121810401069

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Konsentrasi IFN γ dan IL 4 Pada Mencit Balb-C Pasca Sensitisasi Dengan Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (L.)” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh proyek dosen pembimbing Dr. rer. nat. Kartika Senjarini M.Si dan Dr. Rike Oktarianti M.Si dan tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 3 April 2017

Yang Menyatakan,

Febri Ramadhan Afaik

NIM 121810401069

SKRIPSI

**ANALISIS KONSENTRASI IFN γ DAN IL 4 PADA MENCIT
BALB-C PASCA SENSITISASI DENGAN EKSTRAK PROTEIN
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* (L.)**

Oleh

Febri Ramadhan Afaik
NIM 121810401069

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Rike Oktarianti M.Si

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Analisis Konsentrasi IFN γ dan IL 4 Pada Mencit Balb-C Pasca Sensitisasi Dengan Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (L.)**”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Rike Oktarianti, M.Si
NIP 196310261990022001

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini
NIP 197509132000032001

Anggota I,

Anggota II,

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

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

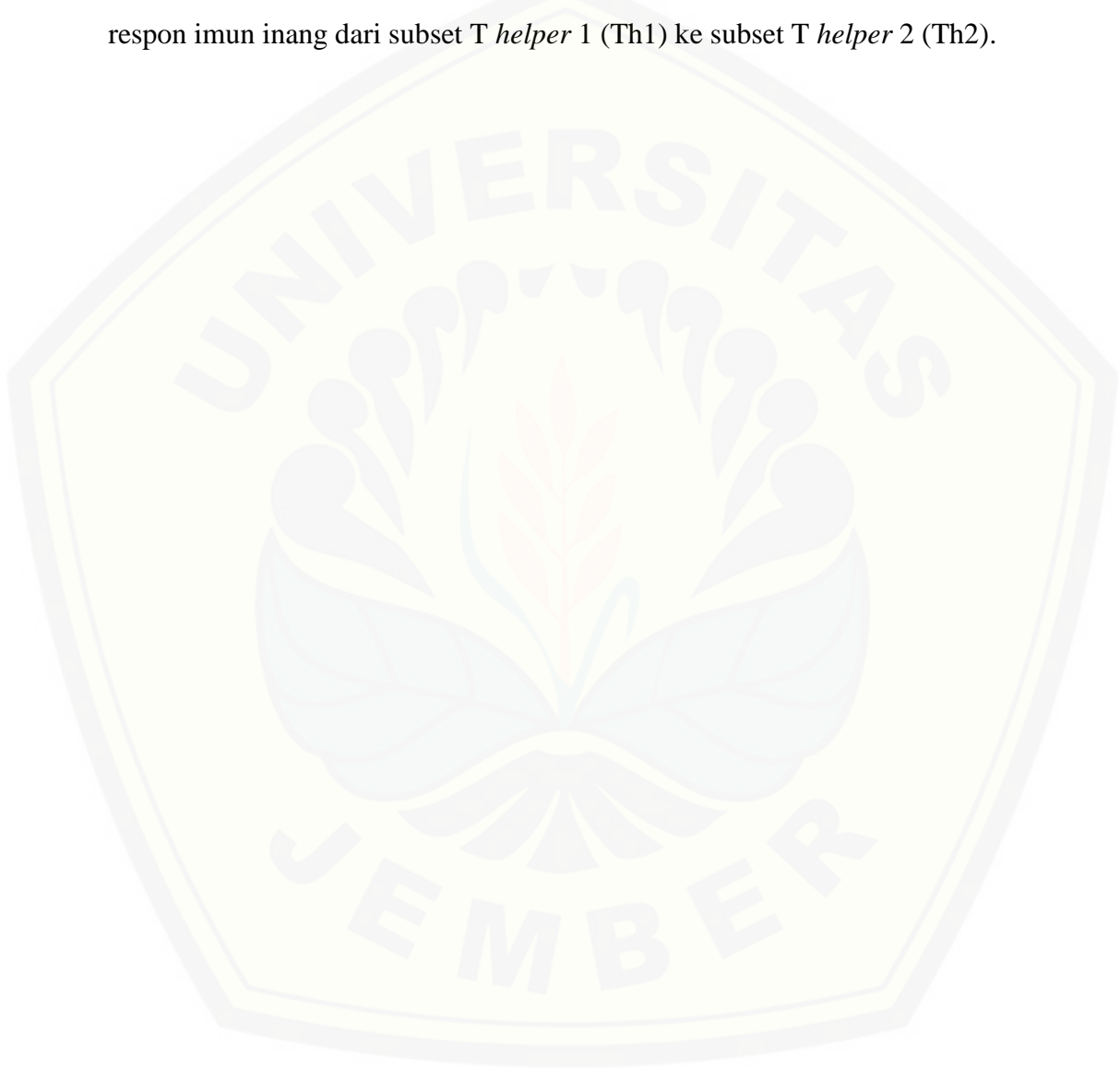
RINGKASAN

Analisis Konsentrasi IFN γ dan IL 4 Pada Mencit Balb-C Pasca Sensitisasi Dengan Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (L.) ; Febri Ramadhan Afaik, 121810401069; 2017: 27 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan penyakit demam akut yang disebabkan oleh virus *dengue* (DENV). Infeksi DENV pada manusia terjadi secara khusus melalui siklus penularan antara manusia dan nyamuk dari genus *Aedes*, dengan *Aedes aegypti* sebagai vektor utama. Saliva nyamuk merupakan substansi yang berperan dalam transmisi patogen. Saliva tersebut mengandung substansi antara lain vasodilator, inhibitor koagulasi darah, imunomodulator dan agregasi platelet. Paparan berulang saliva vektor *Aedes aegypti* akan menimbulkan mekanisme protektif pada tubuh inang. Inang akan membentuk antibodi terhadap protein saliva pada saat terjadi paparan berulang berupa IgG. Paparan nyamuk dapat mengubah respon imun inang dari T *helper* 1 (Th1) ke arah T *helper* 2 (Th2). Pergeseran respon imun tersebut ditandai dengan penurunan kadar IFN γ dan meningkatnya kadar IL 4.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi IFN γ dan IL 4 pasca paparan berulang ekstrak protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada mencit Balb-C. Objek penelitian menggunakan 40 ekor mencit betina (*Mus musculus*) strain Balb-C yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan (konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; dan konsentrasi 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *Aedes aegypti* diinjeksikan setiap dua minggu sekali pada mencit Balb-C. Pengambilan sampel darah dilakukan setiap 2 minggu sekali sampai dengan minggu ke 8. Pengukuran konsentrasi IFN γ dan IL 4 dilakukan dengan metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) menggunakan kit *R&D Systems Mouse IFN γ* dan *Mouse IL 4*. Kemudian dilakukan pengukuran absorban dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi sitokin IFN γ mengalami penurunan pasca paparan berulang Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) nyamuk *Aedes aegypti*, sedangkan konsentrasi sitokin IL 4 mengalami peningkatan pasca paparan berulang Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) nyamuk *Aedes aegypti*. Hal ini membuktikan bahwa EPKS mampu memodulasi respon imun inang dari subset T *helper* 1 (Th1) ke subset T *helper* 2 (Th2).



PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Analisis Konsentrasi IFN γ dan IL 4 Pada Mencit Balb-C Pasca Sensitisasi Dengan Ekstrak Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (L.)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Rike Oktianti, M.Si, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Dra. Mahriani, M.Si., selaku Dosen Penguji II, yang telah membantu memberikan saran serta kritik dalam penulisan skripsi ini;
3. Purnama Oktianti, S.P., M.P, yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
4. Bapak dan ibu dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati membantu penulis selama dalam masa perkuliahan;
5. Ayahanda Agus Supriyanto, Ibunda Faikah dan adik tercinta Mila Khoirun Nisa yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, do'a tulus, motivasi dan pendidikan hingga beranjak dewasa sebagai bekal hidup;
6. rekan kerja selama penelitian Whenny Purwati, Nurhayati, Imroatul Mufidah, Alfian Suhardiansyah, Maulana Jauharil Habib dan Ika Wahyuni terima kasih atas kerjasamanya selama menjalani tugas akhir ;
7. teman-teman laboratorium bioteknologi Suci Umi, Hassa Bella, Dwi Esti, Dewi Masruroh, Zakiyah, Ammatul, Izzay Afkarina, Syubanut Wathon, Fitriah

Muti'ah, Aisyah, Wibi Muchtar, Novita Amalia terimakasih atas do'a serta dukungannya.

8. sahabat-sahabatku MMG Reza Bila Afifudin, Maulana Jauharil Habib, Fita Aprilia, Nia Alfafia, Eny Rukmawati, Rekanda Isnaqoima, dan Dwi Erlinda terima kasih atas segala bantuan, doa, masukan serta semangat yang kalian berikan kepada penulis, terima kasih untuk kalian yang rela mendengarkan keluh kesah penulis selama menyusun skripsi;
9. teman-teman tercinta angkatan 2012 Jurusan Biologi Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu;
10. teman-teman *Korea Winter Camp* Annisa Zahra dan Fandi Purbantoro terimakasih atas semangatnya;
11. keluarga "Aukrug" Clauss, Neve, Marisa dan Aline atas segala perhatian dan dukungan ;
12. semua pihak yang telah memberikan sumbangan tenaga, semangat, dan pikiran yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis dalam kelancaran penulisan skripsi ini.

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

Jember, 3 April 2017

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN SAMPUL | i |
| HALAMAN JUDUL | ii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | iii |
| HALAMAN MOTO | iv |
| HALAMAN PERNYATAAN | v |
| HALAMAN PEMBIMBING | vi |
| HALAMAN PENGESAHAN | vii |
| RINGKASAN | viii |
| PRAKATA | x |
| DAFTAR ISI | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.4 Batasan Masalah | 2 |
| 1.5 Manfaat Penelitian | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Penyakit DBD dan Penanggulangannya | 4 |
| 2.2 Komponen Saliva <i>Aedes aegypti</i> Dan Fungsi Biologisnya | 6 |
| 2.3 Respon Imun Inang Terhadap Saliva <i>Aedes aegypti</i> | 8 |
| 2.4 Hipotesis | 9 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 11 |
| 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 11 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 11 |
| 3.3 Rancangan Penelitian..... | 11 |
| 3.4 Prosedur Penelitian | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1 Rearing <i>Aedes aegypti</i> | 13 |
| 3.4.2 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> | 13 |
| 3.4.3 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> | 13 |
| 3.4.4 Perlakuan Hewan Uji | 14 |
| 3.4.5 Preparasi Serum Darah | 15 |
| 3.4.6 Pengukuran Konsentrasi IFN γ Dan IL 4 | 15 |
| 3.5 Parameter Uji | 16 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 17 |
| 4.1 Identifikasi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> | 17 |
| 4.2 Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> | 18 |
| 4.3 Analisis Konsentrasi Sitokin IFN γ Dan IL 4 Mencit Balb-C Terhadap Paparan Berulang Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) <i>Aedes aegypti</i> | 19 |
| BAB 5. PENUTUP | 23 |
| 5.1 Kesimpulan | 23 |
| 5.2 Saran | 23 |
| DAFTAR PUSTAKA | 24 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| 2.2 Substansi Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> | 7 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Transmisi virus <i>dengue</i> | 5 |
| 2.2 Respon imun nonspesifik dan spesifik pada tubuh inang saat terjadi <i>blood feeding</i> | 9 |
| 3.3 Skema rancangan penelitian..... | 12 |
| 4.1 Perbedaan toraks bagian dorsal dua spesies genus <i>Aedes</i> | 17 |
| 4.2 Perbedaan Maxillary Palp dan antena pada nyamuk <i>Aedes aegypti</i> jandan dan <i>Aedes aegypti</i> Betina..... | 18 |
| 4.3 Struktur kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i> betina..... | 19 |
| 4.4 Konsentrasi IFN γ dengan perbedaan konsentrasi perlakuan..... | 20 |
| 4.5 Konsentrasi IL 4 dengan perbedaan konsentrasi perlakuan..... | 21 |
| 4.6 Grafik penurunan IFN γ dan kenaikan IL 4 pada setiap kelompok perlakuan..... | 22 |



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit demam akut yang disebabkan oleh virus berjenis flavivirus yang diklasifikasikan sebagai serotipe Dengue Virus 1 (DENV-1), Dengue Virus 2 (DENV-2), Dengue Virus 3 (DENV-3), dan Dengue Virus 4 (DENV-4). Infeksi DENV pada manusia terjadi secara khusus melalui siklus penularan antara manusia dan nyamuk dari genus *Aedes*, dengan *Aedes aegypti* sebagai vektor utama (Stephen dan Rothman, 2015). Di Indonesia terdapat 3 jenis nyamuk *Aedes* yang bisa menularkan virus dengue yaitu *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, dan *Aedes scutellaris*. Vektor primer penularan penyakit DBD adalah *Aedes aegypti*, sedangkan *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris* merupakan vektor sekundernya (Sukana, 1993).

Salah satu substansi yang berperan dalam transmisi virus yaitu saliva. Saliva nyamuk mengandung substansi yang berperan penting dalam proses transmisi patogen, antara lain vasodilator, inhibitor koagulasi darah, imunomodulator dan agregasi platelet (Lavazec *et al.*, 2007). Komponen vasodilator dapat menyebabkan pelebaran pembuluh darah sehingga mempermudah nyamuk mengisap darah. Faktor imunomodulator berfungsi untuk mempermudah vektor mentransmisikan patogen ke dalam tubuh inang dengan cara memodulasi respon imun inang. (James, 2003; Titus *et al.*, 2006). Substansi kelenjar saliva nyamuk juga memiliki efek antikoagulan, agregat anti-platelet, dan aktivitas vasodilatasi yang melancarkan proses menghisap darah (Zeidner, 1999). Komponen dalam kelenjar saliva nyamuk bervariasi pada setiap vektor, substansi ini bersifat immunosupresif dan juga dapat mempermudah transmisi patogen ke tubuh (Belkaid *et al.*, 1998). Substansi imunogenik tersebut dapat memunculkan respon imun adaptif yang menghasilkan antibodi melawan komponen saliva itu sendiri (Lavazec *et al.*, 2007). Sehingga dapat dikembangkan menjadi vaksin TBV *dengue*.

Paparan berulang saliva vektor *Aedes aegypti* akan menimbulkan mekanisme protektif pada tubuh inang (Titus *et al.*, 2006; Olivera *et al.*, 2009). Inang juga akan membentuk antibodi terhadap protein saliva pada saat terjadi paparan berulang berupa IgG (Fontaine *et al.*, 2011). Paparan nyamuk dapat mengubah respon imun inang dari T *helper* 1 (Th1) ke arah T *helper* 2 (Th2). Pergeseran respon imun tersebut ditandai dengan penurunan kadar IFN γ dan meningkatnya kadar IL 4 (Schneider *et al.*, 2004).

Paparan saliva nyamuk *Aedes aegypti* pada saat *blood feeding* sangat berkaitan erat dengan proses transmisi patogen. Oleh karena itu penelitian pengaruh paparan berulang ekstrak kelenjar saliva terhadap pembentukan sitokin pada hewan coba mencit penting dalam pengembangan vaksin berbasis vektor. Pengembangan vaksin berbasis saliva vektor yang dimungkinkan dapat meminimalkan perkembangan virus dan meningkatkan sistem imun sangat penting sebagai strategi untuk mengatasi DBD.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana konsentrasi IFN γ dan IL 4 pra dan pasca paparan berulang ekstrak protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada mencit Balb-C betina?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi IFN γ dan IL 4 pasca paparan berulang ekstrak protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada mencit Balb-C betina.

1.4 Batasan Masalah

Penelitian ini dilakukan berdasarkan analisis secara kuantitatif dengan metode ELISA terhadap konsentrasi IFN γ dan IL 4 pasca injeksi saliva *Aedes aegypti* pada hewan coba *Mus musculus* Balb-C betina.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh paparan saliva nyamuk *Aedes aegypti* terhadap konsentrasi sitokin IFN γ dan IL 4 dan dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan vaksin *dengue* berbasis vektor (TBV) untuk menanggulangi DBD



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit DBD dan Penanggulangannya

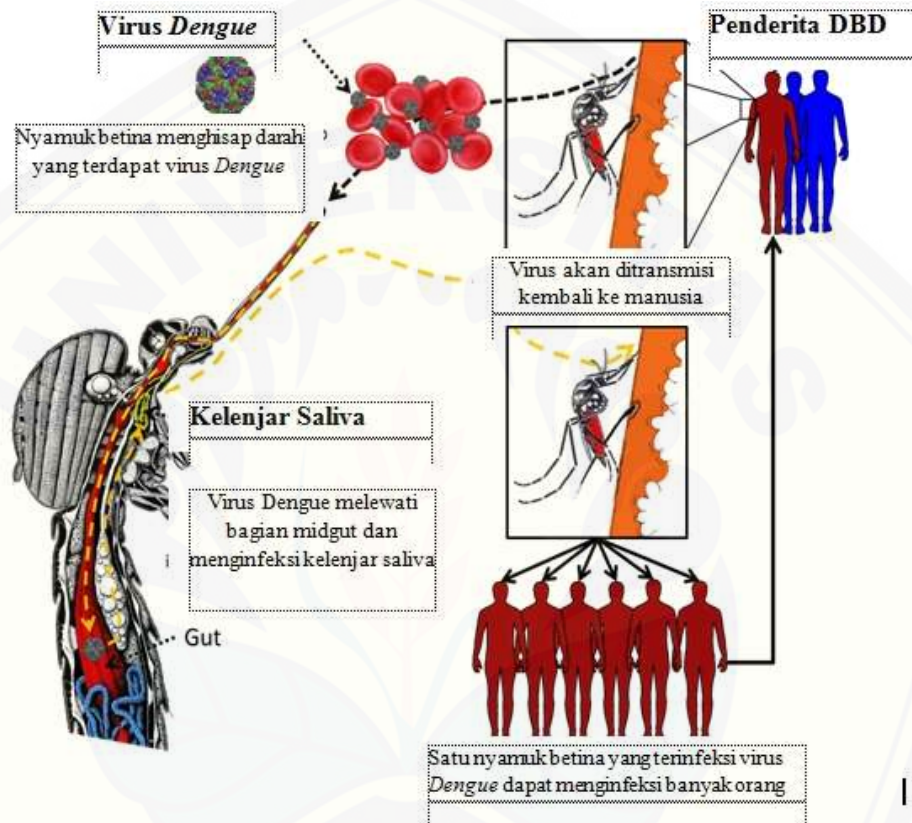
Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *dengue*. Sampai saat ini, infeksi virus *dengue* tetap menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Indonesia dimasukkan dalam kategori “A” dalam stratifikasi DBD oleh *World Health Organization* (WHO) yang mengindikasikan tingginya angka perawatan rumah sakit dan kematian akibat DBD, khususnya pada anak (Chen, 2009).

Aedes aegypti merupakan nyamuk yang dapat berperan sebagai vektor berbagai macam penyakit diantaranya DBD. Walaupun beberapa spesies dari *Aedes* sp. dapat pula berperan sebagai vektor tetapi *Aedes aegypti* tetap merupakan vektor utama dalam penyebaran penyakit DBD (Lawuyan, 1996 ; Yotopranoto *et al.*, 1998 ; Soegijanto S, 2003). Virus *dengue* diklasifikasikan menjadi empat serotipe yaitu DENV 1, DENV 2, DENV 3 dan DENV 4. Keempat serotip virus *dengue* ditemukan di wilayah Indonesia dan serotip DENV 3 yang memiliki kelimpahan tertinggi (Fahmi, 2006).

Virus *dengue* masuk ke dalam tubuh nyamuk *Aedes 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). Transmisi virus *dengue* ke dalam tubuh manusia dapat dilihat pada Gambar 2.1

Mekanisme masuknya virus *dengue* ke dalam tubuh sebagai infeksi pertama akan memberikan gejala demam *dengue*. Reaksi yang ditimbulkan akan berbeda apabila seseorang mendapat infeksi yang berulang dengan serotip virus *dengue* yang berlainan (Sylvana & Pereira, 2000). Hipotesis *immune enhancement* menyatakan secara tidak langsung bahwa manusia yang terinfeksi kedua oleh virus heterolog mempunyai risiko berat yang lebih besar untuk menderita DBD akut. Antibodi yang telah ada akan mengenali serotip virus *dengue* yang lain

kemudian membentuk kompleks antigen-antibodi yang berikatan dengan *Fragment Crystallizable* (Fc) reseptor membran leukosit terutama makrofag. Tanggapan dari proses tersebut, yaitu terjadi sekresi mediator vasoaktif yang kemudian menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, sehingga mengakibatkan keadaan hipovolemia dan syok (Chen, 2009).



Gambar 2.1 Transmisi virus *dengue* (Sumber: Doerdjan, 2010)

Pengendalian vektor DBD dilaksanakan dalam dua kegiatan yaitu pemberantasan nyamuk dewasa (*fogging focus* dan *fogging* sebelum musim penularan) dan pemberantasan jentik nyamuk melalui kegiatan 3M (menguras, menutup, mengubur) serta kegiatan Pemantauan Jentik Berkala (PJB) (Sitepu & Supriyadi, 2013). Pengendalian terhadap vektor nyamuk harus terus diupayakan, selain pemberian terapi yang optimal pada penderita DBD, dengan tujuan menurunkan jumlah kasus dan kematian akibat penyakit ini.

Penggunaan insektisida masih menjadi andalan dalam kontrol populasi vektor Arthropoda sehingga muncul fenomena resistensi, yaitu konsekuensi yang

tidak diharapkan dari penggunaan insektisida dan menjadi hambatan untuk aplikasi dimasa yang akan datang (Edelman, 2007). Hal ini disebabkan rendahnya kesadaran masyarakat akan kebersihan lingkungan yang dapat meningkatkan resiko terkena penyakit DBD (Suhardiono, 2005). Usaha pencegahan lain yang masih terus dikembangkan adalah pembuatan vaksin DBD. Namun sampai saat ini hanya terdapat 1 jenis vaksin yang telah berlisensi (WHO, 2016).

2.2 Komponen Saliva *Aedes aegypti* dan Fungsi Biologisnya

Transmission Blocking Vaccine (TBV) dianggap sebagai strategi potensial untuk mengurangi serangan patogen oleh vektor Arthropoda (Abreau & Ortigao, 2010). TBV dapat mencegah transmisi patogen dari inang yang terinfeksi ke inang yang belum terinfeksi. Salah satu target pengembangan vaksin ini adalah molekul (protein) dalam saliva vektor. Hal ini didasarkan karena kelenjar saliva pada vektor Arthropoda mengandung substansi yang memegang peranan penting dalam efektifitas proses transmisi patogen ke dalam tubuh inang (James *et al.*, 2003).

Masing-masing lobus pada kelenjar saliva nyamuk betina mensintesis protein antara lain D7, *apyrase*, sialokinin dan protein vasodilator seperti pada tabel 2.2 (Juhn *et al.*, 2011). Protein D7 berfungsi 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 *et al.*, 2012).

Saliva vektor Arthropoda mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator (Titus *et al.*, 2006). 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 (Gillespie *et al.*, 2000). Substansi kelenjar saliva nyamuk juga memiliki efek antikoagulan,

agregat anti-platelet, dan aktivitas vasodilatasi yang melancarkan proses menghisap darah (Zeidner, 1999).

Menurut penelitian Oktarianti *et al.* (2014) terdapat dua protein yang bersifat imunogenik yaitu 31 kDa dan 56 kDa yang telah diidentifikasi dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Protein tersebut menunjukkan adanya reaksi positif dengan antibodi pada serum masyarakat endemik dan menunjukkan reaksi negatif dengan antibodi pada serum masyarakat dari wilayah non endemik.

Paparan secara berulang saliva vektor Arthropoda dapat mempengaruhi respon imun inang kearah yang lebih protektif (Belkaid *et al.*, 1998), pendekatan yang mungkin dilakukan untuk mengendalikan transmisi virus *dengue* yaitu melalui vaksinasi tubuh inang dengan komponen protein dalam saliva *Aedes aegypti* yang bertindak sebagai vektornya. Dengan adanya vaksinasi protein imunomodulator saliva *Aedes aegypti* tersebut maka dapat memblokir transmisi virus *dengue* sekaligus menghalangi peningkatan efek dari saliva, sehingga dapat mengendalikan penyakit DBD.

Tabel 2.2 Substansi kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan fungsinya

| Nama Protein | Aktivitas & fungsi biologis |
|--|---|
| <i>D7 salivary protein</i> | Menghambat aksi amina biogenik seperti serotonin, histamin, dan norepinefrin membantu dalam menghisap darah, dan bertindak sebagai allergen |
| Serpins | Protease inhibitor |
| <i>Apyrase nukleotida, adenosine deaminase, purine nucleosidase, serine proteases sugar hydrolases amylase, β-glucosidase</i> | Agregasi antiplatelet, fungsi anti inflamasi, terkait dengan imunitas, aktivitas anti inflamasi |
| <i>Lectins lysozyme bacteolytic proteins</i> | Opsonisasi, melanisasi - antimikrobia |
| <i>Gambicin lysozyme defensins</i> | polypeptida – pengenalan sistem imun Aktivitas antimikrobia |
| <i>Factor Xa</i> | Antikoagulan |
| Sialokins | Vasodillator |
| <i>Aed a 3</i> | Faktor Anti-tumour necrosis Reaksi alergi |

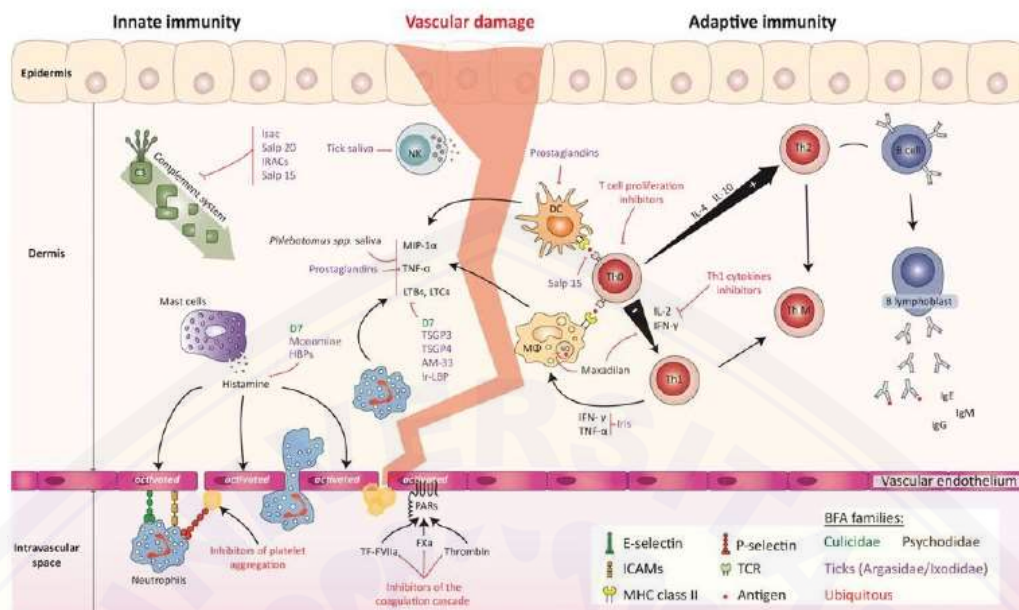
(Sumber : Luplertop, 2014)

2.3 Respon Imun Inang Terhadap Saliva *Aedes aegypti*

Aedes aegypti betina membutuhkan darah untuk pematangan telur, darah yang diambil dari inang diperoleh dengan cara menusukkan *proboscis* nyamuk pada bagian kulit inang hingga bagian *vascular* endotelium (Fontaine *et al.* 2011). Pada saat nyamuk betina melakukan proses *blood feeding* terjadi transmisi patogen ke dalam sistem sirkulasi, sehingga komponen yang ada di dalam saliva nyamuk juga masuk ke dalam tubuh inang. Komponen inilah yang akan mendapat respon imun dari tubuh inang, baik respon imun non spesifik (*innate*) dan respon imun spesifik (*adaptive*) seperti pada gambar 2.2.

Komponen saliva masuk dan mentransmisikan patogen ke dalam sistem peredaran darah pada saat nyamuk melakukan *blood feeding* ke dalam tubuh inang dan tubuh akan merespon untuk melakukan penolakan terhadap antigen yang masuk. Respon imun yang pertama kali terjadi adalah respon imun non-spesifik kemudian dilanjutkan dengan respon imun spesifik. Respon imun non-spesifik melibatkan sel imun seperti makrofag, monosit, neutrofil, sel NK (*Natural Killer*) dan sitokin. (Nugroho *et al.*, 2000).

Respon imun nonspesifik merupakan mekanisme pertama dari tubuh inang saat terjadi gigitan nyamuk. Sel yang berperan dalam respon imun nonspesifik diantaranya sel *Natural killer* (NK), *mass cell*, dan neutrofil (Radji, 2010). Selain respon imun nonspesifik pada tubuh inang terjadi respon imun spesifik dengan bantuan dari *Antigen Presenting Cell* (APC), sel T, dan sel B (Peng *et al.*, 2002). Jenis sistem imun ini terletak pada kulit, membran *mucus*, sel polimorfonuklear, sistem komplemen, dan sel sel yang mempunyai kemampuan sitotoksi.



Gambar 2.2. Respon imun nonspesifik dan spesifik pada tubuh inang saat terjadi *blood feeding* (Sumber: Fontaine *et al.*, 2011)

Respon imun spesifik sangat berbeda dengan respon imun non spesifik. Respon imun spesifik tergantung pada rangsangan antigen. Antigen adalah substansi asing yang akan menimbulkan suatu respon imun. Komponen saliva *Aedes aegypti* yang bersifat imunogenik akan mempengaruhi sistem imun spesifik dan menghasilkan antibodi seperti IgM, IgG, IgA, IgE, dan IgD. Semakin tinggi paparan nyamuk pada inang maka kadar antibodi dalam tubuh inang juga akan semakin tinggi. Sel-sel yang berperan dalam sistem imun spesifik ini adalah sel T, sel B, dan *Antigen Presenting Cells* (APS).

Respon imun yang terjadi saat patogenesis dari infeksi virus *dengue* sebagian besar dimediasi oleh sel B (sel yang mensekresi antibodi). Antibodi yang muncul pada umumnya adalah IgG dan IgM. IgM akan merespon pada paparan pertama atau antibodi pertama yang terbentuk setelah stimulasi antigen, sedangkan IgG akan meningkat setelah paparan kedua dan diasosiasikan dengan memori imunologi (Deauevieu, 2007). Hal ini menyebabkan 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 virus *dengue* (Doucoure *et al.*, 2012).

Secara umum proteksi terhadap infeksi melibatkan respon imun seluler yang dimulai dengan pelepasan Interleukin 12 (IL 12) dari antigen presenting cells (APC). Peran utama IL 12 adalah diferensiasi T CD4+ menjadi sel Th1 untuk sekresi IFN γ . Karena saliva vektor bersifat non patogenik dan lebih bersifat imunogenik maka sel Th2 lebih berperan aktif dari pada sel Th1 sehingga pada paparan pertama kelenjar saliva nyamuk pada inang menyebabkan perubahan respon imun seluler dari Th1 ke Th2 yang lebih menguntungkan vektor. Menurut Karnen *et al* (2014), IL 4 merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2. IL 4 berperan penting dalam imunoregulasi dan pengalihan kelas IgG untuk kemudian sel B berdiferensiasi dan berproliferasi untuk memproduksi antibodi seperti IgG, IgA dan IgE. Sitokin IL 4 bekerja secara antagonis dengan sitokin IFN γ yaitu pada sel Th2. Sitokin tersebut menghambat aktifitas sel Th1 dengan mekanisme regulasi silang. Paparan berulang saliva nyamuk menyebabkan perubahan respon imun inang dari Th1 ke arah Th2 yang lebih menguntungkan inang dan memberikan respon protektif. Sel Th1 menghasilkan IFN γ yang menghasilkan senyawa antibakterial *nitrit oxide* yang dihasilkan dari makrofag yang teraktivasi (Adrial *et al.*, 2013).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Mei 2016 sampai dengan Juli 2016 bertempat di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Bioteknologi, 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, kertas pupasi, kapas, pipet plastik, cawan plastik, pinset, *micro tube*, mikropipet, *water sonicator*, *beaker glass*, gelas ukur, jarum diseksi, mikroskop stereo, *micotube* ukuran 1,5 ml, botol schott, gelas ukur, gelas beker, aspirator, shaker, *magnetic stirrer*, pH meter, *elisa plates*, *refrigerator*, *refrigerated centrifuge*, *plate sealed*, *vortex*, *microplate* autoclave, aluminium foil, wadah air, mikropipet dan mikrotip 1 set (ukuran 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, dan 100-1000 μ L), *ice bag* dan *ice pack*, *laminar air flow*, *falcon*, kapas, steroform, *mikropistil*, *microscope stereo*, *vortex*, *centrifuge* (Hettich, Germany) lemari es (-20°C, dan 4°C), toples tertutup, gunting bedah, pinset, kandang kasa, kasa, dudukan *microtube*, ELISA reader.

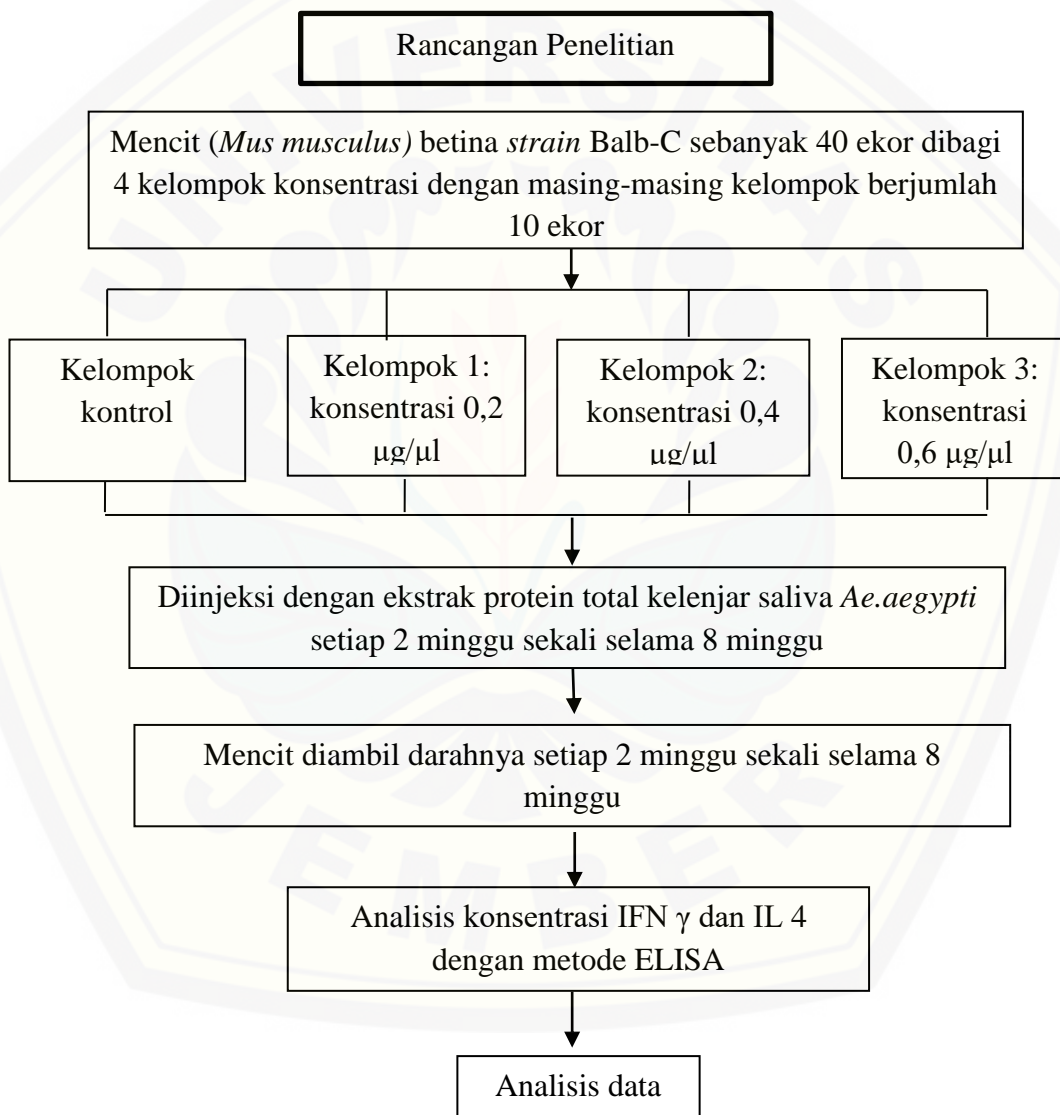
Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas ekstrak protein total kelenjar saliva *Aedes aegypti*, alkohol 70%, sukrosa 10 %, tikus wistar, mencit Balb-C, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), *Phospat Buffer Saline* (PBS), HCl, NaOH, aquades dan *R&D Systems Mouse IL-4* dan *Mouse IFN γ*

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara deksriptif. Tujuannya adalah untuk membandingkan pengaruh perlakuan pada

kelompok uji dengan perlakuan pada kelompok kontrol. Objek penelitian menggunakan 40 ekor mencit betina (*Mus musculus*) strain Balb-C umur 3-4 bulan dengan rata-rata berat badan 30 gram. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok dengan masing-masing kelompok terdapat 10 ekor.

Pada masing-masing perlakuan, dilakukan analisis IFN γ dan IL 4 dengan menggunakan metode ELISA. Secara garis besar, rancangan penelitian di atas dapat dilihat pada gambar skema berikut ini:



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur dalam penelitian ini adalah dimulai dengan *rearing Aedes aegypti*, identifikasi dan isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti*, ekstraksi protein kelenjar saliva *Aedes aegypti*, perlakuan hewan coba, dan analisis IFN γ dan IL 4 dengan ELISA Kit. Secara detail prosedur penelitian akan dijelaskan sebagai berikut:

3.4.1 Rearing *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan merupakan hasil *rearing* yang dilakukan dalam ruang insektarium bersuhu $\pm 28^{\circ}\text{C}$ (suhu ruang). Kegiatan *rearing* diawali dengan pengumpulan larva nyamuk *Aedes aegypti* yang diambil dari bak mandi rumah warga maupun kubangan air. Larva selanjutnya dipindahkan dalam nampan plastik (*tray*) untuk dipelihara hingga berubah menjadi pupa. Larva diberi makanan berupa pelet pakan ikan. Kemudian pupa di ambil dengan pipet plastik dan dipindah ke dalam cawan pupa. Kemudian cawan pupa dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa.

Di dalam kandang koloni dilengkapi dengan cawan lain sebagai tempat bertelur nyamuk yang berisi air dan dilengkapi dengan kertas saring berukuran (3x5) cm² dan disusun melingkar menutupi bibir mangkuk. Selain itu juga terdapat larutan sukrosa 10% sebagai makanan nyamuk jantan dan seekor tikus yang diletakkan pada kandang kecil untuk dihisap darahnya oleh nyamuk betina. 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.

3.4.2 Isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti*

Nyamuk dimasukkan dalam gelas plastik dan dimasukkan kedalam lemari pendingin bersuhu 4°C selama 3 menit. 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 (tampak 2 garis sejajar yang diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya) untuk memastikan bahwa nyamuk yang dibedah adalah *Aedes aegypti*. Diatas gelas benda steril diteteskan 50 μ L NaCl 0.5% dan nyamuk dibedah secara *microdissection* menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva *Aedes aegypti* berada di bagian antara toraks dan kepala nyamuk. Dua jarum diseksi diletakkan di bagian toraks dan kepala. *Aedes aegypti* lalu secara perlahan tarik kepala hingga terlepas dari toraks. Apabila tarikan benar, maka akan tampak lobus-lobus kelenjar saliva berwarna bening ikut serta saat bagian kepala ditarik. Kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain. Kelenjar saliva kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam *microtube* steril yang telah diisi 10 μ L PMSF dalam PBS steril dan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

3.4.3 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang telah diisolasi dan dikumpulkan pada *microtube*, ditambahkan buffer lisis (perbandingan 1:1). Dihomogenasi dengan mikropistil *on ice* kurang lebih 15 menit, kemudian diekstraksi dengan menggunakan *water sonikator* selama 45 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm sebanyak 5 kali masing-masing 15 menit, pada suhu 4°C . Kelenjar Saliva yang telah diekstraksi, dipisahkan dengan epimembran MWCO 10 kDa (*Cryovial*) dan disentrifugasi selama 30 detik 10.000 rpm, pada suhu 4°C sampai mencapai volume yang diinginkan. Hasil pemekatan disimpan pada suhu -20°C .

3.4.4 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak total protein kelenjar saliva dengan konsentrasi (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pada intradermal punggung mencit menggunakan jarum suntik ukuran 21. Perlakuan kontrol diberikan injeksi dengan larutan PBS. Pemberian ekstrak dengan volume 100 μl dilakukan dengan interval waktu 2 minggu sekali selama 8 minggu. Setiap 2 minggu sekali dilakukan pengambilan sampel darah pada bagian sinus orbitalis

mata hewan uji mencit. Jarak antara pengambilan darah dengan waktu injeksi yaitu 1 hari.

3.4.5 Preparasi Serum Darah

Sebanyak $\pm 75 \mu\text{l}$ darah mencit diambil dan dimasukkan kedalam *microtube*, kemudian didiamkan 10-30 menit pada suhu ruang sampai terbentuk dua lapisan, lapisan bening dan merah, lalu di sentrifuge dengan kecepatan 3200 rpm, pada suhu 27°C selama 15 menit, kemudian diambil supernatan dan disimpan pada suhu -20°C .

3.4.6 Pengukuran Konsentrasi IFN γ dan IL 4

ELISA termasuk dalam EIA (*Enzyme Immuno Assay*) yang paling banyak digunakan. Teknik ELISA yang digunakan pada penelitian ini adalah ELISA tidak langsung yang digunakan untuk mendeteksi antibodi (Radji, 2010). Teknik awal ELISA dilakukan dengan melakukan *coating* antigen pada dasar sumuran *microtiter plate* dan diinkubasi *overnight*. Selanjutnya antiserum dimasukkan pada sumuran yang telah mengandung antigen dan diinkubasi 1 jam, sehingga akan terjadi reaksi antigen antibodi apabila terdapat antibodi yang spesifik. Serum yang tidak berikatan akan terlepas saat pencucian. Aktivitas sitokin yang diamati adalah IFN γ dan IL 4 dan diukur masing-masing dengan *R&D Systems Mouse IFN γ* dan *Mouse IL 4*.

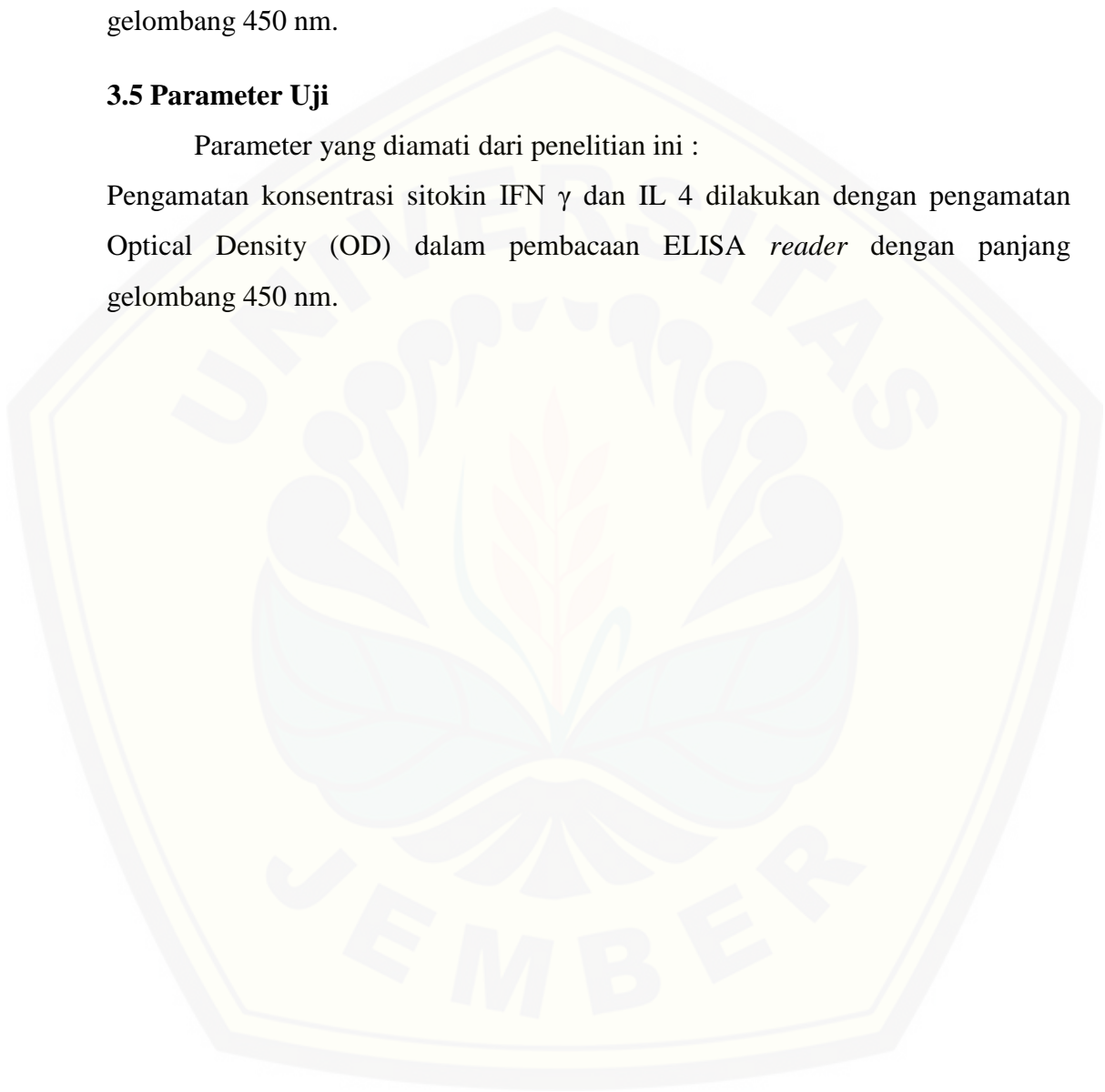
Prosedur pengujian dilakukan sesuai dengan manual *R&D Systems Mouse. Microplate* dicuci dengan *washing buffer* sebanyak 4 kali. Setelah itu menambahkan $50 \mu\text{l}$ *Assay Buffer* pada masing-masing sumuran. Langkah berikutnya adalah menambahkan $50 \mu\text{l}$ *standart*, kontrol dan sampel pada masing-masing sumuran. Inkubasi *shaking* 200 rpm pada suhu ruang selama 2 jam. Setelah inkubasi selesai maka dicuci dengan *washing buffer* sebanyak 4 kali, kemudian ditambahkan $100 \mu\text{l}$ *Mouse IFN γ detection antibody* pada masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 1 jam. Dilakukan proses *washing* lagi seperti langkah sebelumnya sebanyak 4 kali. Setelah itu ditambahkan $100 \mu\text{l}$ *Avidin-HRP solution* pada masing-masing sumuran dan diinkubasi *shaking* selama

30 menit, kemudian dicuci sebanyak 5 kali, dan ditambahkan 100 μl *substrate solution* pada masing-masing sumuran dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Penambahan reagen yang terakhir yaitu 100 μl *stop solution* pada masing-masing sumuran dan dibaca dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

3.5 Parameter Uji

Parameter yang diamati dari penelitian ini :

Pengamatan konsentrasi sitokin IFN γ dan IL 4 dilakukan dengan pengamatan Optical Density (OD) dalam pembacaan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Konsentrasi sitokin IFN γ kelompok mencit Balb-C dengan paparan berulang ekstrak protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* cenderung mengalami penurunan, sedangkan konsentrasi sitokin IL 4 cenderung mengalami peningkatan dengan paparan berulang.

5.2 Saran

Penelitian berikutnya sebaiknya melakukan analisis terhadap konsentrasi sitokin yaitu TNF α (Th1) dan IL 10 (Th2), sehingga pengaruh paparan Ekstrak Protein Kelenjar Saliva (EPKS) *Aedes aegypti* dalam memodulasi respon imun dapat diketahui secara lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrial, Edward, Z., Lestari, S. 2013. Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva Anopheles Sundaicus Sebagai Target Potensial Dalam Pembuatan Transmission Blocking Vaccine (TBV) Melawan Malaria. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*: 21-30.
- 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
- Andrew, J., & Ananya B. 2013. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annual Review & Research in Biology*. 3: (1) 52-69.
- Andriani, N., Tjitrosantoso, H., & Yamelan, P. 2013. 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).
- Belkaid, Y., Shaden K., Govind M., Jesus V., Nancy N. T., Edgar R., Jose R., & David L. S. 1998. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 188: 1941-1953.
- Bratawidjaja, Kernan Garna & Rengganis, I. 2014. *Imunologi Dasar Edisi 11*. Jakarta : Badan Penerbit Fakultas Kedokteran UI.
- Calvo, E., Fuyuki T., Osvaldo M., Jean L. V., Jose M.C.R., & Ivo M. B. 2007. Aegyptin, a Novel Mosquito Salivary Gland Protein, Specifically Binds to Collagen and Prevents Its Interaction with Platelet Glycoprotein VI, Integrin $\alpha 2\beta 1$, and von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282: 26928-26398.
- Cautinho, I. V., & Marcelo R. O. 2010. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 105(1): 1-12.
- Chanthavanich, P., Christine L., Chukiatt S., Keswadee L., Krisana P., Sutee Y., Arunee S., & Jean L. 2006. Short Report: Immune Response and Occurrence of *Dengue* Infection in Thai Children Three to Eight Years After Vaccination with Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 26-28.

- Chen, K., Pohan, H. T., & Sinto, R. 2009. *Diagnosis dan Terapi Cairan pada Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- 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.
- Fontaine, A., Diouf, Ibrahima, Bakkali, Misse D., Pages F., Fusai, Thiery; Rogier, Christophe; and Almeras, Lionel. 2011. Implication of Haematophagous Arthropod Salivary Proteins in Host-Vector Interaction. *J Parasite & Vectors*. 4: 187
- Gillespie, R.D., Lamine M., & Richard G. T. 2000. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*. Vol 22: 319-331.
- Hoff J, Rlagt LV. 2000. Methods of blood collection in the mouse. *Lab animals*. Vol. 29:47-53.
- James, A. A. 2003. Review: Blocking Malaria Parasite Invasion of Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206: 3817-3821.
- 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.
- Kusumawardani, E. 2012. Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Pedesaan Tahun 2012 (Daerah perbatasan Kabupaten Bogor dan Kabupaten Lebak). Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Lavazec, Boundin, Lacroix, Bonnet, Diop, Thiberge, Boisson, Tahar, Bourgomn. 2007. Carboxipeptidase B of *Anopheles gambiae* Target for a Plasmodium falciparum Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*. Vol. 75 (4): 1635-1642.

- Lawuyan, S. 1996. Demam Berdarah Dengue di Kotamadya Surabaya. Seminar Sehari Demam Berdarah Dengue. Tropical Disease Center, Universitas Airlangga ,Surabaya 28 Oktober 1996.
- Luplertlop, N. 2014. *Aedes* mosquito salivary immune peptides : boost or block dengue viral infections. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(2): 163-168.
- Nugroho, D. T. 2009. *Siklus Perkembangan Pradewasa Anopheles aconitus (Diptera Culicidae) Pada Dua Jenis Formulasi Pakan Yang Berbeda Di Laboratorium Bogor*: IPB.
- Oktarianti, R., Kartika S., Fatchiyah F., & Aulanni'am. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against to Human Sera. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 101-107.
- Oliveira, F., Ryan C.J., Jesus G.V., & Shaden K. 2009. Sand flies, Leishmania, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol*.58(1): 1–5.
- Peng ZN, Rasic N, Liu Y & Simons FER. Mosquito saliva specific IgE and IgG Antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110: 1-5
- Purwati, W., Senjarini K., & Oktaranti R. 2016. Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb-C Terhadap Ekstrak Protein Total Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*. L. Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Radji, M. 2009. Vaksin DNA: Vaksin Generasi Ke Empat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 4 (1):28-37.
- Radji, M. 2010. *Imunologi & Virologi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.
- Sabine T , Mark S, Adrian L, David R, Christopher D, Underhill D, Murray P, Duncan Maskell and Clare Bryant. 2006. *The Journal of Immunology*. 176:4804-4810; ; doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4804.
- Schneider, Bradley., Lynn Soong., Zeidner & Stehen H. 2004. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-Viral and TH1/TH2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. *Viral Immunology*. Volume 17 : 565–573
- Sembiring, Odantara. 2009. Efektifitas Beberapa Jenis Insektisida Terhadap Nyamuk *Aedes aegypti* L. Medan : USU Press.
- 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.

- Soegijanto, S. 2003. *Patogenesisa dan Perubahan Patofisiologi Infeksi Virus Dengue*. Vol. 4 : 1-15.
- Stephen J. Thomas., Alan L. Rothmanb. 2015. Trials and tribulations on the path to developing a dengue vaccine. *Elsevier*. 33 : D24-D31.
- Suhardiono, 2005. Sebuah Analisis Faktor Risiko Perilaku Masyarakat Terhadap Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kelurahan Helvetia Tengah, Medan, Tahun 2005. *Jurnal. Mutiara Kesehatan Indonesia*. Vol. 1, No. 2
- Sukana. 1993. Pemberantasan Vektor DBD di Indonesia. *Media Litbangkes*. Vol. III No. 1
- Sylvana, F. dan G.D.C.M. Pereira. 2000. Demam Berdarah Dengue (DBD). Tugas Klinik UPF. Fakultas Kedokteran. Universitas Wijaya Kusuma. Surabaya.
- Titus, R.G., J.V. Bishop, & J.S. Mejia. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. Vol 28: 131–141.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramol, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucourse, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demettre, E., Blizard, J.P., Jouin, P., Biron, D. G., Thomas, F., Misse, D. 2010. Blood-Feeding and Immunogenic *Aedes aegypti* Saliva Proteins. *Proteomic*. Vol. 10: 1906-1916.
- WHO. 2016. Questions and Answers on Dengue Vaccines. [online]. http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/en/. Diakses 10 Maret 2016.
- Yotopranoto ,S.,Subekti,S., Rosmanida, Salamun. 1998. Analisis Dinamika Populasi Vektor pada Lokasi dengan Kasus Demam Berdarah Dengue yang Tinggi di Kotamadya Surabaya.Majalah Kedokteran Tropis Indonesia, 9 (1-2) : 23-31.
- 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 Immunology I*. Vol. 21 : 35-44

