



**PROTEIN IMUNOGENIK KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus*
VEKTOR POTENSIAL DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD)
DI WILAYAH ENDEMIK KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI

Oleh

**Rochmatul Nuryu Khasanah
NIM 151810401033**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PROTEIN IMUNOGENIK KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus*
VEKTOR POTENSIAL DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD)
DI WILAYAH ENDEMIK 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

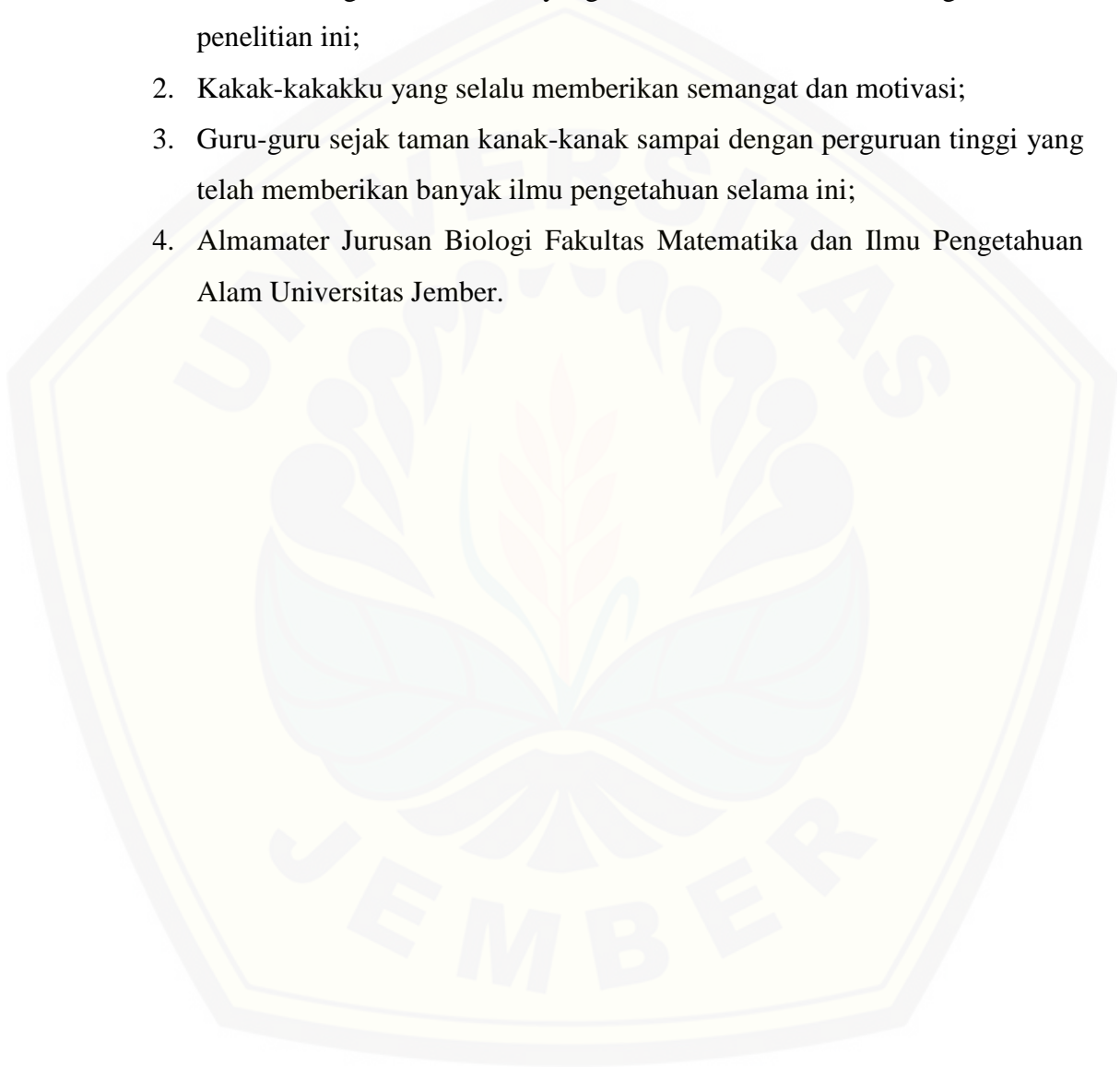
**Rochmatul Nuryu Khasanah
NIM 151810401033**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, yang selalu memberikan dukungan selama penelitian ini;
2. Kakak-kakakku yang selalu memberikan semangat dan motivasi;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan selama ini;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.



MOTO

Niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(terjemahan QS. *Al-Mujadalah* ayat 11)^{*}



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Rochmatul Nuryu Khasanah

NIM : 151810401033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Protein Imunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M. Si., Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si., dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 8 Juli 2019

Yang menyatakan,

Rochmatul Nuryu Khasanah

NIM 151810401033

SKRIPSI

**PROTEIN IMUNOGENIK KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus*
VEKTOR POTENSIAL DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD)
DI WILAYAH ENDEMIK KABUPATEN JEMBER**

Oleh

Rochmatul Nuryu Khasanah
NIM 151810401033

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Protein Immunogenik Kelenjar Saliva Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dr. Rike Oktarianti, M.Si.
NIP 196310261990022001

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.
NIP 199009062019031014

Anggota II,

Anggota III,

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

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 196008161989021001

Mengesahkan,

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Protein Immunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember; Rochmatul Nuryu Khasanah, 151810401033; 2019; 54 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi virus *dengue* yang masih menjadi masalah kesehatan di dunia. Virus *dengue* menginfeksi tubuh manusia melalui transmisi yang diperantarai oleh nyamuk *Aedes* dalam proses *blood feeding*, umumnya yaitu *Aedes aegypti* sebagai vektor primer dan *Aedes albopictus* sebagai vektor sekunder. Kelenjar saliva merupakan salah satu substansi yang menjadi kunci utama dalam keberhasilan transmisi virus *dengue* karena mengandung faktor vasomodulator dan imunomodulator. Penelitian sebelumnya mengenai protein immunogenik ekstrak kelenjar saliva *Aedes aegypti* teridentifikasi dengan berat molekul 31 dan 56 kDa. Protein immunogenik 31 dan 56 kDa dapat dikenali oleh antibodi pada serum pasien DBD dan penduduk sehat di daerah endemik, namun tidak dikenali oleh antibodi pada serum neonatus dan penduduk non endemik. Hal ini menunjukkan bahwa orang yang hidup di daerah endemik mengembangkan antibodi spesifik terhadap antigen (protein immunogenik kelenjar saliva vektor). Oleh karena *Aedes albopictus* berpotensi sebagai vektor DBD, maka diduga protein immunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus* memiliki kemiripan dengan protein immunogenik kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi protein immunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

Metode penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain: (1) *landing collection* serta *rearing* nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, (2) identifikasi morfologi nyamuk *Aedes*, (3) isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, (4) analisis SDS-PAGE, dan (5) analisis *Western Blot*. Analisis SDS-PAGE dilakukan untuk mengetahui profil protein kelenjar saliva *Aedes*

albopictus. Sedangkan analisis *Western Blot* dilakukan untuk karakterisasi fraksi protein imunogenik dari kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

Hasil penelitian ini menunjukkan profil protein *Aedes albopictus* yang memiliki 11 pita protein. Sedangkan *Aedes aegypti* memiliki 10 pita protein. Profil protein *Aedes albopictus* memiliki perbedaan dengan profil protein *Aedes aegypti* pada berat molekul ~48, 32, dan 26 kDa. Berdasarkan hasil analisis imunogenisitas pita protein imunogenik kelenjar saliva *Aedes albopictus*, berat molekul 31 kDa dapat dikenali oleh serum dari penduduk endemik baik pasien DBD maupun orang sehat. Sedangkan berat molekul 67 dan 47 kDa hanya dikenali oleh serum pasien DBD. Protein imunogenik dengan berat molekul ~67, 47, dan 31 kDa tidak dapat dikenali oleh serum neonatus.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Protein Immunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember”. 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 menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama, Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota, Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., selaku penguji I, dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku penguji II yang dengan sabar telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian hingga selesainya skripsi ini;
2. Bapak/ibu dosen serta seluruh staf Fakultas MIPA Universitas Jember atas segala partisipasinya membantu penulis selama masa perkuliahan;
3. Bapak/ibu Gaguk Supriyanto sekeluarga yang selalu memberikan dukungan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
4. Seluruh teman-teman Kenong Limo dan Biogenes15 serta anggota riset TBV atas segala kerjasama dan bantuan selama penelitian ini;
5. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dan mendukung selama penelitian ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Jember, Juli 2019

Penulis

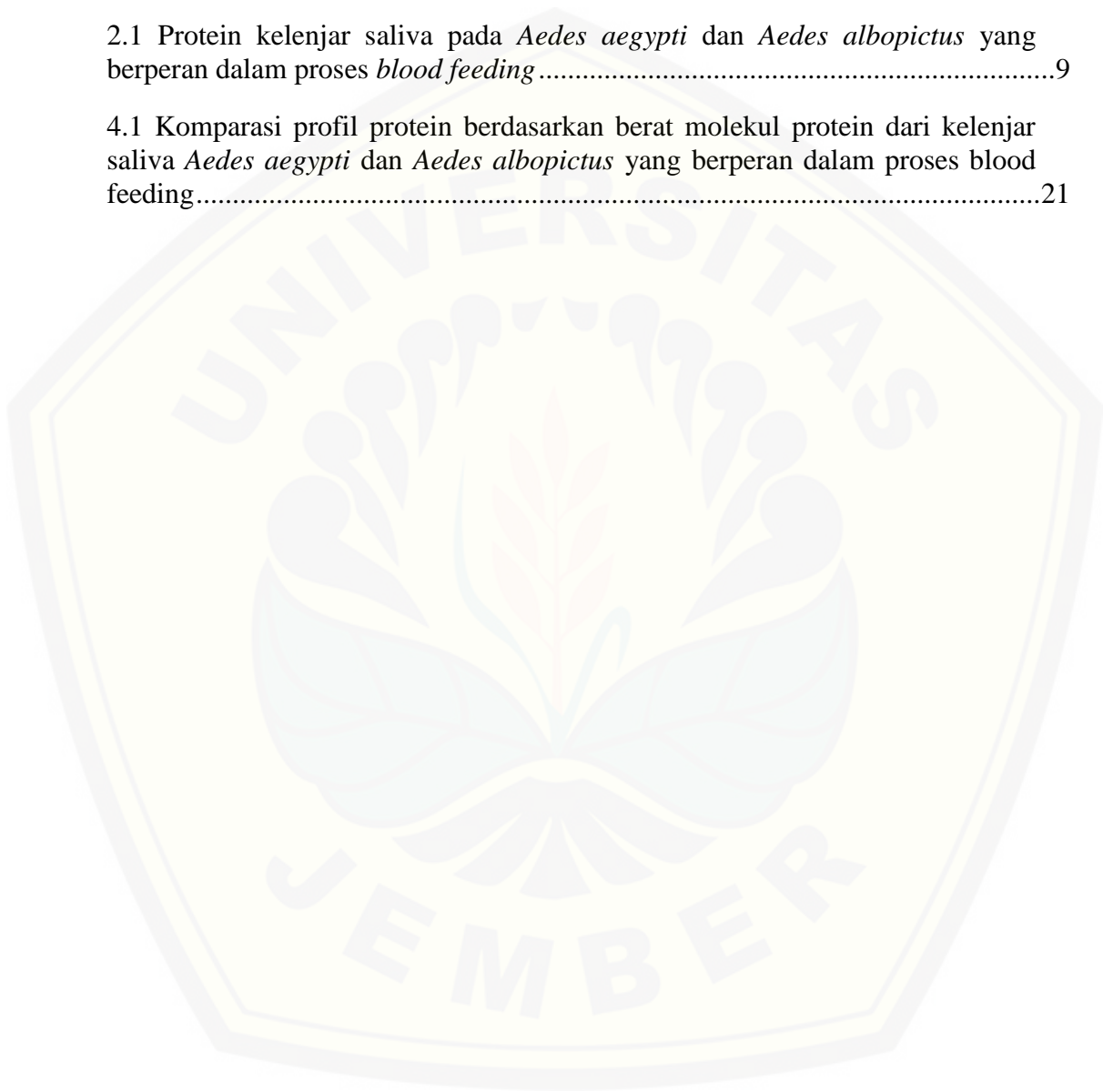
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN MOTO	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PERNYATAAN.....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR TABEL	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR GAMBAR.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR LAMPIRAN	Error! Bookmark not defined.
BAB 1. PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Batasan masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Tujuan.....	Error! Bookmark not defined.
1.5 Manfaat.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Penyakit DBD dan Penanggulangannya.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Vektor DBD dan Karakteristiknya	6
2.3 Transmisi Virus <i>Dengue</i>	Error! Bookmark not defined.
2.4 Komponen Protein dan Fungsi Biologis Kelenjar Saliva <i>Aedes</i>	9
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Alat dan Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Rancangan Penelitian	Error! Bookmark not defined.

3.4 Prosedur Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
3.4.1 Rearing Nyamuk <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>	Error! Bookmark not defined.
3.4.2 Identifikasi Morfologi Aedes...	Error! Bookmark not defined.
3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>	Error! Bookmark not defined.
3.4.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>	Error! Bookmark not defined.
3.4.5 Preparasi Serum Darah	Error! Bookmark not defined.
3.4.6 Analisis Profil Protein dari Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>	Error! Bookmark not defined.
3.4.7 Identifikasi Fraksi Protein Immunogenik Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>	Error! Bookmark not defined.
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	Error! Bookmark not defined.
4.1 Identifikasi Morfologi <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> Sebagai Vektor DBD serta Kelenjar Saliva	Error! Bookmark not defined.
4.2 Profil Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i>.....	19
4.3 Analisis Immunogenisitas Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes albopictus</i>	22
BAB 5. PENUTUP.....	26
5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN.....	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Protein kelenjar saliva pada <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> yang berperan dalam proses <i>blood feeding</i>	9
4.1 Komparasi profil protein berdasarkan berat molekul protein dari kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> yang berperan dalam proses <i>blood feeding</i>	21

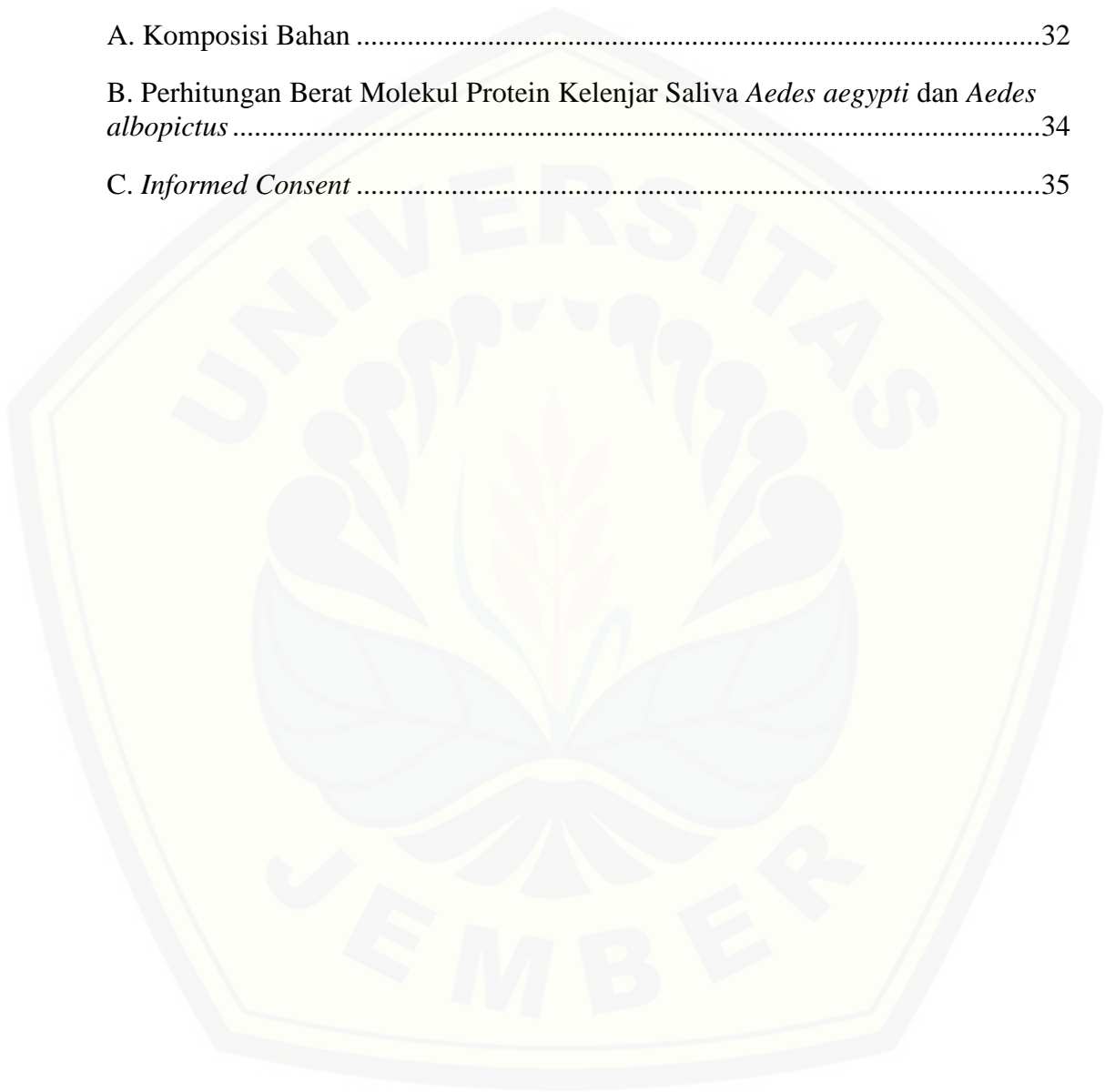


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Perbedaan mesonotum, mesepimeron, serta kaki <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	6
2.4 Transmisi virus <i>dengue</i>	8
3.1 Skema alur penelitian	12
3.2 Susunan <i>sandwich</i> pada proses <i>Western Blot</i>	16
4.2 Perbedaan mesepimeron dan kaki <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	18
4.3 Perbedaan antena serta palpus <i>Aedes albopictus</i> jantan dan betina	18
4.4 Kelenjar saliva <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i> betina.....	19
4.5 Profil protein kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> dengan analisis SDS-PAGE.....	20
4.8 Hasil analisis imunogenisitas protein kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Bahan	32
B. Perhitungan Berat Molekul Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	34
C. <i>Informed Consent</i>	35



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi virus *dengue* yang masih menjadi masalah kesehatan di dunia. Virus *dengue* termasuk ke dalam genus Flavivirus famili Flaviridae dengan RNA sebagai materi genetiknya. Virus ini memiliki empat serotip yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4. Keempat serotip ini dapat menyebabkan penyakit *Dengue Fever* dan *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) (Rigau-Pérez dkk. 1998).

Wabah penyakit *dengue* tahun 2016 terjadi pada lebih 100 negara di kawasan Afrika, Amerika, Mediterania Timur, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat. Kawasan Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat merupakan wilayah dengan dampak serius penduduk terkena infeksi *dengue* (WHO, 2016). Pada tahun 2018, terjadi peningkatan kasus DBD di beberapa daerah seperti Kuala Kapuas, Manggarai, dan daerah lainnya di Indonesia. Distribusi penyakit suspek DBD sejak minggu pertama 2018 hingga minggu pertama 2019 paling tinggi ada di wilayah Jawa Timur dengan jumlah suspek DBD sebanyak 700 orang, diikuti Jawa Tengah sebanyak 512 orang, dan Jawa Barat sebanyak 401 orang. Suspek DBD artinya kasus DBD pada daerah tersebut belum tentu positif namun sudah harus menjadi kewaspadaan oleh masyarakat dan pemerintah (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2019). Pada tahun 2019, terjadi penurunan kasus DBD di wilayah pasifik barat seperti Kamboja, Cina, Laos, Malaysia, Filipina, Vietnam, Australia, Polinesia, dan Kaledonia Baru. Kasus DBD di Singapura saat ini masih dilaporkan meningkat (WHO, 2019).

Virus *dengue* menginfeksi tubuh manusia melalui transmisi yang diperantarai oleh nyamuk *Aedes* (*Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*) (Wan dkk. 2013). *Aedes aegypti* merupakan vektor primer dari virus *dengue* karena memiliki habitat di sekitar pemukiman sehingga sering kontak dengan manusia. *Aedes albopictus* berperan sebagai vektor sekunder karena memiliki habitat di lingkungan luar seperti kebun atau hutan yang jauh dari pemukiman manusia.

Seiring berjalannya waktu, *Aedes albopictus* dapat beradaptasi di lingkungan pedesaan maupun pinggiran kota (Rahayu dan Ustiawan, 2013). *Aedes albopictus* merupakan vektor penting yang menularkan beberapa patogen virus termasuk virus demam kuning, *dengue*, dan chikungunya (Rahana dkk. 2016). Transmisi virus *dengue* terjadi pada saat proses *blood feeding*. Keberhasilan transmisi virus *dengue* terjadi karena terdapat faktor-faktor penting di dalam kelenjar saliva *Aedes* (Titus dkk. 2006).

Kelenjar saliva *Aedes* merupakan salah satu substansi yang menjadi kunci utama dalam keberhasilan transmisi virus *dengue* dari nyamuk *Aedes* ke tubuh inang karena mengandung faktor vasomodulator dan imunomodulator (Titus dkk. 2006). Saliva Arthropoda hematofagi mengandung substansi antihemostasis, antiinflamasi, dan imunomodulator yang berperan dalam keberhasilan transmisi virus *dengue* (Fontaine dkk. 2011). Faktor vasomodulator seperti substansi antihemostasis dan vasodilator sangat penting dalam proses *blood feeding*. Substansi antihemostasis mampu menghambat proses pembekuan darah. Selain itu, substansi vasodilator dapat menyebabkan pelebaran pembuluh darah melalui vasodilatasi kapiler darah. Faktor imunomodulator berfungsi meningkatkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang dengan memodulasi respon imun inang (Titus dkk. 2006). Selain itu, faktor imunomodulator juga dapat menyebabkan inang lebih sensitif terhadap faktor vasomodulator untuk memfasilitasi proses *blood feeding* (Gillespie dkk. 2000).

Hasil penelitian Oktarianti dkk. (2014) diketahui pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* terdapat dua protein imunogenik 31 dan 56 kDa. Kedua protein tersebut dikenali oleh sampel serum orang sehat dan pasien DBD yang tinggal di daerah endemik DBD, tetapi tidak dikenali oleh sampel serum orang sehat di daerah non endemik dan neonatus (*infant*). Hal ini menunjukkan bahwa orang yang hidup di daerah endemik mengembangkan antibodi spesifik terhadap antigen. Oleh karena *Aedes albopictus* telah diketahui berpotensi sebagai vektor DBD, maka diduga protein imunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus* mempunyai kemiripan dengan protein imunogenik pada kelenjar saliva *Aedes*

aegypti. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi protein imunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah dijelaskan, permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana profil protein dan hasil identifikasi protein imunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus*?

1.3 Batasan masalah

Serum darah pasien DBD diambil dari Klinik Pratama Rawat Inap Dokterku, Kaliwates, Kabupaten Jember dan Rumah Sakit Citra Husada, Patrang, Kabupaten Jember. Sedangkan sampel darah neonatus diambil dari Bidan Umi Soemarno, Sumpersari, Kabupaten Jember.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein dan mengidentifikasi protein imunogenik kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai protein imunogenik dari kelenjar saliva *Aedes albopictus* yang dapat dijadikan target pengembangan vaksin *dengue* berbasis vektor.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit DBD dan Penanggulangannya

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *dengue* (DENV). Virus *dengue* termasuk ke dalam genus Flavivirus famili Flaviridae dengan RNA sebagai materi genetiknya serta memiliki empat serotip yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (Sim dan Dimopoulos, 2010). Keempat serotip tersebut dapat menyebabkan penyakit *Dengue Fever* dan *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) (Rigau-Pérez dkk. 1998). Serotip-serotip tersebut ditemukan di Indonesia dengan kelimpahan paling tinggi adalah DENV-3 (Ishartadiati, 2010).

Kompetensi vektor nyamuk dipengaruhi oleh keberhasilan nyamuk dalam proses infeksi, replikasi, dan transmisi virus. Beberapa spesies nyamuk sangat berbeda dalam kerentanannya terhadap Flavivirus. Spesifisitas reseptor pada sel epitel *mid gut Aedes aegypti* dapat mempengaruhi kerentanannya terhadap infeksi DENV. Virus dapat memasuki tubuh vektor dan bereplikasi jika terdapat reseptor didalamnya. Protein 67 kDa (R67/R64) pada vektor dapat berperan sebagai reseptor DENV (Mercado-curiel dkk. 2008). Protein D7 dapat menghambat infeksi virus dengue baik secara *in vitro* maupun *in vivo* serta dapat berinteraksi secara langsung dengan virion DENV dan selubung virus DENV (Conway dkk. 2016)

Penyakit DBD merupakan penyakit yang penularannya terjadi melalui vektor Arthropoda. Infeksi virus *dengue* pada tahun 2016 telah terjadi pada lebih 100 negara di kawasan Afrika, Amerika, Mediterania Timur, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat dengan kawasan Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat merupakan wilayah dengan dampak serius penduduk terkena infeksi *dengue*. Kasus DBD di Asia Tenggara pada tahun 2015 mengalami kenaikan dari tahun sebelumnya mencapai 500.000 kasus, sedangkan di Indonesia hampir 200.000 kasus (WHO, 2016).

Kasus DBD pertama kali diberitakan di Indonesia khususnya di Surabaya pada tahun 1968 dengan jumlah penderita 58 orang dan meninggal 24 orang (41,3 %) (Siregar, 2004). Dinas Kesehatan Indonesia melaporkan bahwa terjadi penurunan angka kematian penderita DBD di Jawa Timur, namun masih diatas target aman <1%. Faktor-faktor penularan kasus DBD di Jawa Timur yaitu kepadatan penduduk, mobilitas penduduk, urbanisasi, pertumbuhan ekonomi, perilaku masyarakat, perubahan iklim, kondisi sanitasi lingkungan dan ketersediaan air bersih (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

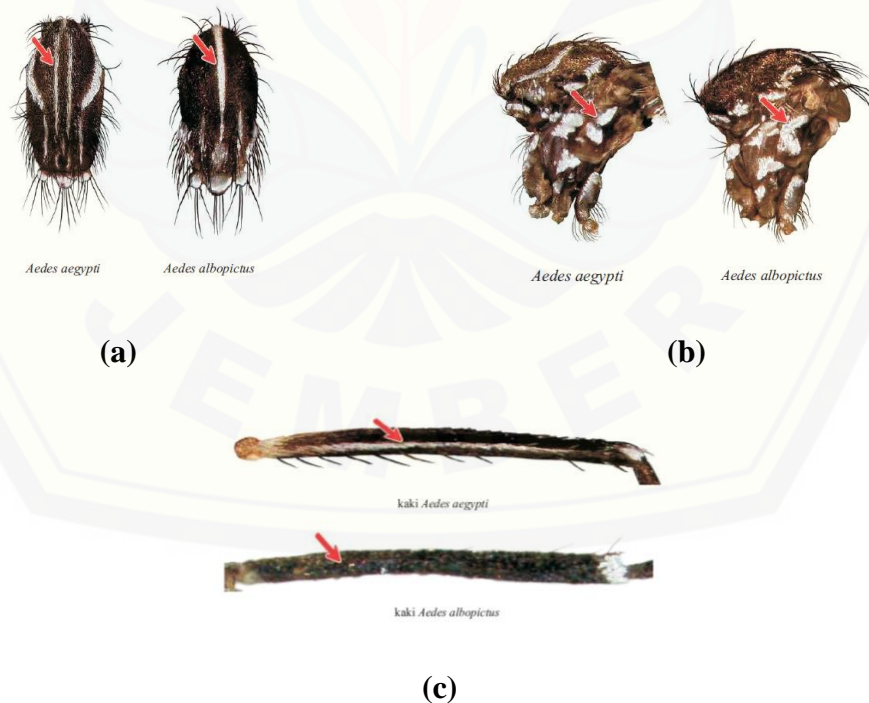
Kasus DBD mengalami peningkatan pada tahun 2018 di beberapa daerah seperti Kabupaten Kuala Kapuas, Kalimantan Tengah; Kabupaten Manggarai Barat, NTT; dan daerah lainnya di Indonesia. Sejak minggu pertama 2018 hingga minggu pertama 2019 distribusi penyakit suspek DBD tertinggi ada di wilayah Jawa Timur dengan jumlah suspek DBD sebanyak 700 orang, diikuti Jawa Tengah sebanyak 512 orang, dan Jawa Barat sebanyak 401 orang. Suspek DBD memiliki arti bahwa kasus DBD pada daerah tersebut belum tentu positif namun sudah harus menjadi kewaspadaan oleh masyarakat dan pemerintah (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2019).

Manifestasi klinis utama dari infeksi *dengue* berat adalah kebocoran pembuluh darah, trombositopenia, dan pendarahan. Selain itu, aspek imunopatologi juga terlibat dalam perkembangan gejala demam berdarah (Wan dkk. 2013). Resiko infeksi *dengue* dapat dikurangi dengan tindakan-tindakan pencegahan seperti mengurangi tempat perindukan (misalnya kontainer), menggunakan krim atau *spray* anti nyamuk, menggunakan pakaian yang menutupi tubuh sebagai proteksi saat di luar ruangan, serta memasang kasa pada jendela atau pintu (CDC, 2012). Gerakan satu rumah satu jumantik dilaksanakan di Jawa Timur untuk kemandirian masyarakat dan pencegahan penularan DBD (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Namun program tersebut kurang efektif untuk memberantas permasalahan DBD sehingga pemberantasan DBD tidak terlaksana dengan baik yang mengakibatkan DBD masih dikenal sebagai kejadian luar biasa. Pencegahan lain dalam mendukung keberhasilan penanganan DBD perlu dilakukan, salah satunya adalah pengembangan vaksin.

Saat ini terdapat lima jenis vaksin yang telah dikembangkan yaitu *live-attenuated virus vaccine*, *live chimeric virus vaccines*, *inactivated virus vaccines*, serta *live recombinant DNA* dan *subunit vaccines* yang mampu menghasilkan respon imun protektif terhadap tipe DENV tertentu (Amin dan Sungkar, 2013). Vaksin virus hidup yang dilemahkan dan vaksin virus *chimeric* hidup sedang menjalani evaluasi klinis. Keamanan dan kemanjuran vaksin *dengue* perlu dipertimbangkan khususnya pada aspek imunologi (Wan dkk. 2013).

2.2 Vektor DBD dan Karakteristiknya

Virus *dengue* ditransmisikan oleh nyamuk *Aedes* (*Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*) ke tubuh manusia di daerah perkotaan (siklus epidemi) dan mungkin juga terjadi pada primata non-manusia di hutan (siklus enzootik) (Yang dkk. 2014). *Aedes aegypti* merupakan vektor primer dari DENV, sedangkan *Aedes albopictus* sebagai vektor sekunder (Sim dan Dimopoulos, 2010). Faktor-faktor yang mempengaruhi DBD secara umum yaitu inang (manusia), agen (virus dan vektor), dan lingkungan (Amin dan Sungkar, 2013).



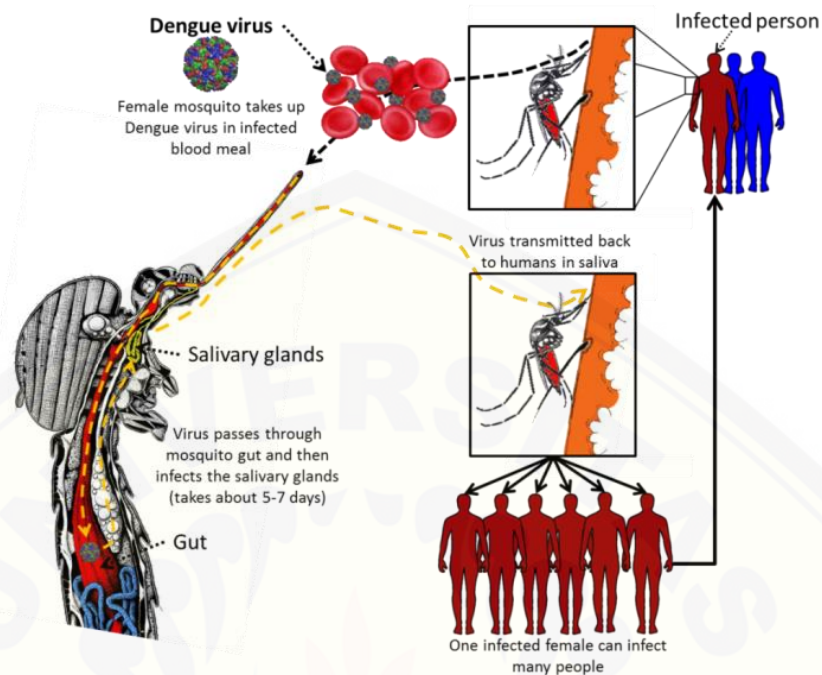
Gambar 2.1 Perbedaan *mesonotum* *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (a) Perbedaan *mesepimeron* *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (b) Perbedaan *femur anterior* *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (c) (Sumber: Rueda, 2004)

Aedes albopictus merupakan vektor penting yang menularkan beberapa patogen virus termasuk virus demam kuning, *dengue*, dan chikungunya. Nyamuk ini sangat sulit dikendalikan populasinya karena mempunyai kemampuan yang baik untuk beradaptasi dengan lingkungan (Rahana dkk. 2016). *Aedes albopictus* pertama kali dideteksi pada tahun 2004 di kota Menton, Prancis dan berasal dari Asia Tenggara (Vega-rua dkk. 2013). *Aedes aegypti* mampu berkembang di dalam ruangan (*indoor*), berbeda dengan *Aedes albopictus* yang lebih suka berkembang di alam atau *outdoor* (WHO, 2016).

Nyamuk *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti* sangat berbeda jika dilihat dari segi morfologinya. Bagian *mesonotum* pada *Aedes aegypti* memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola garis putih yaitu dua garis putih lengkung seperti *lyre* dan dua garis putih lurus yang sejajar, sedangkan pada *Aedes albopictus* hanya satu garis putih lurus saja. *Mesepimeron* dari kedua jenis nyamuk tersebut memang sangat berbeda, *Aedes aegypti* memiliki kumpulan sisik berupa dua tambalan putih terpisah, sedangkan pada *Aedes albopictus* bergabung menjadi satu. *Aedes aegypti* memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola garis putih pada bagian *femur* anteriornya, sedangkan pada *Aedes albopictus* seluruh bagian *femur* anterior memiliki rambut hitam (Rahayu dan Ustiawan, 2013). Perbedaan-perbedaan secara morfologi antara *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.1.

2.3 Transmisi Virus *Dengue*

Infeksi virus *dengue* pada manusia terjadi ketika seseorang terinfeksi virus *dengue* saat proses *blood feeding* nyamuk *Aedes* berlangsung. Darah pada penderita yang terinfeksi virus *dengue* membuat penderita menjadi sumber penularan penyakit demam berdarah. Nyamuk *Aedes* yang tidak membawa virus *dengue* dan menghisap darah penderita bisa menjadi penular sepanjang hidupnya jika virus dalam darah penderita ikut terhisap. Virus akan memperbanyak diri dan menyebar ke kelenjar saliva. Setelah itu, virus akan ditransmisikan kembali ke beberapa orang sehat lainnya (Siregar, 2004). Siklus transmisi dari virus *dengue* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Transmisi virus *dengue* (Sumber: Oxitec, 2014)

Transmisi DENV dalam kondisi alamiah terjadi saat nyamuk memperoleh infeksi *dengue* setelah melakukan *blood feeding* dari seseorang yang terinfeksi infeksi *dengue*. Virus masuk ke dalam saluran pencernaan dan bereplikasi di dalam sel epitel pada saluran pencernaan, kemudian virus baru disebarkan ke *hemocoel* lalu menyebar ke jaringan-jaringan, termasuk kelenjar saliva. Setelah replikasi virus terjadi di kelenjar saliva, virus dapat ditularkan ke inang baru melalui saliva nyamuk yang membawa virus *dengue* (Carrington dan Simon, 2014).

Transmisi virus *dengue* lainnya yaitu secara *transovarial* dengan cara virus menyebar ke ovarium nyamuk sehingga dapat terjadi transmisi virus di dalam telur. Keadaan tersebut menyebabkan nyamuk berikutnya dapat menularkan virus *dengue* kepada inangnya (Guedes dkk. 2010). Seseorang yang terinfeksi virus *dengue* untuk pertama kali biasanya hanya menderita demam *dengue* dengan gejala yang tidak spesifik atau bahkan tidak memperlihatkan gejala sakit sama sekali (asimtomatis) (Siregar, 2004).

2.4 Komponen Protein dan Fungsi Biologis Kelenjar Saliva *Aedes*

Aedes aegypti dan *Aedes albopictus* merupakan vektor virus *dengue* yang sering ditemukan. Walaupun *Aedes albopictus* merupakan vektor sekunder (Luplertlop, 2014), namun memungkinkan kelenjar salivanya mengandung protein-protein yang mirip dengan *Aedes aegypti* dan terlibat dalam proses *blood feeding* seperti pada Tabel 2.1. Menurut Almeras dkk. (2010), terdapat 11 protein pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang berperan dalam *blood feeding* yaitu, D7 family, serpin, apyrase, adenosine deaminase, purine nucleosidase, serine protease, β -glucosidase, lectin, gambicin lysozyme defensins, Xa factor, dan Aed a 3.

Tabel 2.1 Protein kelenjar saliva pada *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* yang berperan dalam proses *blood feeding*

No.	Nama Protein	Fungsi Biologis	Nama Spesies	
			<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
1.	D7 family (a,b,d)	vasodilator, antikoagulan, imunomodulator	+	+
2.	Serpin (a,b,d)	inhibitor protease, antikoagulan	+	+
3.	Apyrase (a,b,d)	anti agregasi platelet, anti inflamasi, anti koagulan, anti hemostasis	+	+
4.	Adenosine deaminase (a,b,d)	antihemostasis, antiinflamasi	+	+
5.	Purine nucleosidase (a,d)	antihemostasis, antiinflamasi	+	-
6.	Serine proteases (a,d)	mengaktifkan atau menonaktifkan jalur antiinflamasi	+	+
7.	β -glucosidase (c,d)	antiinflamasi, anti agregasi platelet	+	-
8.	Lectin (b,d)	opsonisasi, antimikroba, pengenalan sistem imun	+	+
9.	Gambicin lysozyme defensins (d,g)	aktivitas anti mikroba	+	-
10.	Xa Factor (d,f)	Antikoagulan	+	-
11.	Aed a 3 (d,e)	reaksi alergi	+	-

Keterangan: (+) = ada, (-) = tidak ada (Sumber: (a) Almeras dkk. 2010; (b) Doucoure dkk. 2013; (c) Gu dkk. 2017; (d) Luplertlop, 2014; (e) Peng dkk. 2015; (f) Stark dan James, 1995; (g) Vizioli dkk. 2001)

Protein-protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* diproduksi pada lobus-lobus yang berbeda. Lobus proksimal (*Proximal–Lateral*) memproduksi beberapa protein yaitu *alpha-glucosidase*, *lisozim*, *amilase 1*, *salivary chymotrypsin-like*, *V-ATPase*, *carbonic anhydrase*, *gambicin*, dan *serin protease*. Lobus *distal* (*Distal–Lateral*) memproduksi beberapa protein yaitu *D7*, *30 kDa allergen-like protein*, dan *aegyptin*. Lobus *medial* memproduksi beberapa protein yaitu *sialokinin*, *angiopoietin-like*, dan *putative C-type lectin*. Lobus *medial* dan lobus *distal* juga memproduksi protein yang sama yaitu *serpin*, *salivary apyrase*, *D7*, *salivary purine nucleosidase* (Juhn dkk. 2011).

Hasil penelitian Oktarianti dkk. (2014) diketahui bahwa protein imunogenik kelenjar saliva *Aedes aegypti* adalah 31 dan 56 kDa. Protein tersebut dikenali oleh serum orang sehat pasien DBD dan penduduk sehat yang tinggal di daerah endemik. Namun, kedua protein tersebut tidak dapat dikenali oleh serum dari penduduk non endemik dan neonatus (*infant*). Analisis lebih lanjut dengan metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) oleh Oktarianti dkk. (2015) menunjukkan bahwa *D7 family* paling banyak ditemukan pada pita 31 kDa. Sedangkan *apyrase* merupakan protein utama pada pita 56 kDa.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 sampai dengan bulan Mei 2019, bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

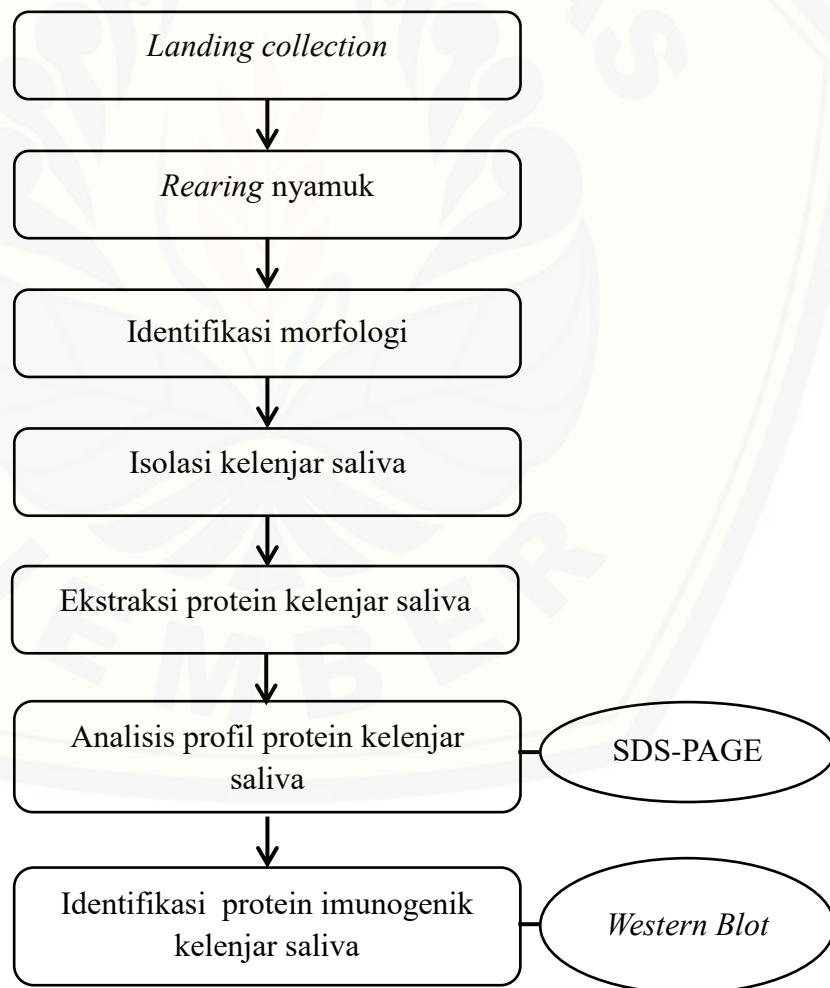
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang nyamuk, *tray*, pipet plastik, aspirator, kain kasa, kapas, karet, kertas saring, gelas kertas, wadah air, tabung erlenmeyer, botol bekas, mikroskop stereo, jarum diseksi, gelas objek, gelas piala, cawan petri, *micropipette*, *microtip* (ukuran 0.5-10 μ l, 10–100 μ l, dan 100-1000 μ l), *microtube*, tisu, *ice box*, *ice gel*, satu set alat *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), satu set alat *Western Blot*, parafilm, *magnetic stirrer*, *refrigerated centrifuge*, gelas ukur, pH-meter, gunting, pinset, penjepit, tabung sentrifugasi, membran PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*), kertas *Whatman*, dan kertas *blotting*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas kelenjar saliva (*salivary gland*) nyamuk *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*, tikus wistar, 10% larutan sukrosa, akuades, 70% alkohol, 0.5% NaCl, 1 mM *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), 10% SDS (*sodium dodecyl sulfate*), *sample buffer* (Tris, gliserol, SDS, β -mercaptoethanol, *bromophenol blue*), *running buffer* (Tris, glisin, SDS), 30% *acrylamide/bis-acrylamide*, 1.5 mM Tris-HCl pH 8.8 dan 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, larutan pewarna atau *staining* (*coomassie brilliant blue R-250*, metanol, asam asetat glasial, H₂O), larutan pencuci atau *destaining* (metanol, asam asetat glasial, H₂O), 10% APS (*Ammonium Persulfate*), TEMED (*Tetramethylethylenediamine*), metanol, *transfer buffer* (Tris, glisin, metanol, H₂O), *Tris Buffer Saline* (TBS) pH 7.4 (NaCl, KCl, Tris, H₂O), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7.4 (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, H₂O), larutan *blocking* (5% *skim milk* dalam TBS), NBT/BCIP *Alkaline Phosphatase Substrate* (*Nitro Blue*

Tetrazolium-(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase) (ROCKLAND, USA), antibodi primer (serum darah manusia) dan antibodi sekunder (*Goat–Anti Human IgG Alkaline Phosphatase Conjugate*) (ROCKLAND, USA).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif yang dimulai dengan *rearing* nyamuk *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*, identifikasi morfologi *Aedes*, isolasi kelenjar saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*, ekstraksi protein kelenjar saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*, analisis SDS-PAGE, serta analisis *Western Blot*. Alur penelitian secara rinci dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Rearing *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

Penelitian ini menggunakan nyamuk *Aedes albopictus* hasil rearing yang dilakukan di *Animal Care Unit* FMIPA Universitas Jember dengan suhu ruang (27°C). Rearing dimulai dengan metode *landing collection* yaitu menangkap nyamuk *Aedes albopictus* menggunakan aspirator di kebun-kebun sekitar Universitas Jember. Nyamuk yang tertangkap dimasukkan ke dalam jebakan berupa gelas kertas yang ditutup kain kasa dan kapas dengan dirapatkan menggunakan karet.

Nyamuk-nyamuk yang sudah terkumpul dalam gelas kertas kemudian diletakkan ke dalam kandang koloni. Larutan sukrosa 10% dibuat di dalam tabung erlenmeyer sebagai sumber nutrisi bagi nyamuk jantan, sedangkan tikus wistar dalam perangkap digunakan untuk *blood feeding* nyamuk betina. Kedua sumber nutrisi tersebut dimasukkan ke dalam kandang koloni. Kertas saring diletakkan ke dalam wadah air yang didalamnya terdapat gula dalam tabung erlenmeyer sebagai tempat telur nyamuk. Kertas saring yang terdapat telur nyamuk kemudian dipindahkan ke dalam tray yang berisi $\frac{3}{4}$ air hingga menetas menjadi larva. Selama masa perkembangan, larva diberi makan pelet ikan. Pupa yang ada dalam tray dipindahkan ke dalam botol bekas yang sudah dipotong menggunakan pipet plastik. Nyamuk betina dewasa dalam kandang koloni diambil menggunakan aspirator kemudian dimasukkan ke dalam gelas kertas yang ditutup kain kasa dan kapas untuk diisolasi kelenjar salivanya.

3.4.2 Identifikasi Morfologi *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

Identifikasi morfologi diperlukan sebelum isolasi kelenjar saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti* mudah dibedakan melalui bagian *mesonotum*, *mesepimeron*, dan *femur*. Bagian *mesonotum* pada *Aedes aegypti* memiliki deretan rambut putih membentuk pola garis putih yaitu dua garis putih lengkung seperti *lyre* dan dua garis yang sejajar, sedangkan *Aedes albopictus* hanya satu garis putih saja. *Mesepimeron* dari kedua jenis nyamuk tersebut memang sangat berbeda. *Aedes aegypti* memiliki kumpulan

sisik berwarna putih yang membentuk dua tambalan putih terpisah, sedangkan *Aedes albopictus* bergabung menjadi satu. *Aedes aegypti* memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola garis putih pada bagian *femur anterior*, sedangkan *Aedes albopictus* tidak memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola garis pada bagian *femur* (Rahayu dan Ustiawan, 2013).

3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti* betina dalam gelas kertas selanjutnya difreezing dengan cara dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C selama 1-2 menit kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri dalam *ice box*. Gelas objek ditetesi sekitar 20-30 μl NaCl 0.5%. Kaki-kaki nyamuk dihilangkan agar tidak mengganggu proses isolasi. Kelenjar saliva diisolasi dengan cara mikrodiseksi menggunakan jarum diseksi. Jarum diseksi pada tangan kanan menekan toraks, sedangkan jarum diseksi pada tangan kiri menarik kepala ke arah yang berlawanan secara hati-hati hingga kepala terlepas dari toraks. Kelenjar saliva biasanya akan menempel pada kepala atau pada toraks. Lobus-lobus kelenjar saliva tampak bewarna bening (Schmid dkk. 2014). Kelenjar saliva yang telah didapatkan kemudian dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain hingga bersih lalu dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 10 μl 1 mM PMSF dalam PBS dengan perbandingan 1:1 untuk 10 pasang sampel kelenjar saliva dan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

3.4.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

Ekstraksi protein kelenjar saliva dilakukan dengan menambah 10 μl *sample buffer* ke dalam *microtube* yang berisi 10 pasang sampel kelenjar saliva + 10 μl 1 mM PMSF dalam PBS. Proses ekstraksi dilanjutkan dengan *boiling* menggunakan *thermoshaker* dengan suhu 95°C selama 4 menit. Setelah proses *boiling*, ekstrak protein kelenjar saliva disentrifus untuk diambil supernatannya.

3.4.5 Preparasi Serum Darah

Sampel darah pasien DBD diambil dari Klinik Pratama Rawat Inap Dokterku, Kaliwates, Kabupaten Jember dan Rumah Sakit Citra Husada, Patrang,

Kabupaten Jember, sedangkan serum darah penduduk sehat endemik diambil di wilayah endemik Kabupaten Jember. Sampel darah neonatus diambil dari bidan Umi Soemarno, Sumpersari, Kabupaten Jember. Masing-masing probandus akan mengisi *inform consent*. Pengambilan sampel darah dilakukan dari pembuluh darah *vena brachial* di lengan, kecuali serum neonatus yang diambil dari tali pusar yang menuju ke bayi setelah lahir. Masing-masing sampel darah diambil sebanyak 3 ml dan ditampung dalam vakutainer tanpa anti-koagulan. Sampel darah didiamkan selama 30 menit, kemudian diambil lapisan bening paling atas dan disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifus merupakan serum darah. Sampel serum darah disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

3.4.6 Analisis Profil Protein dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

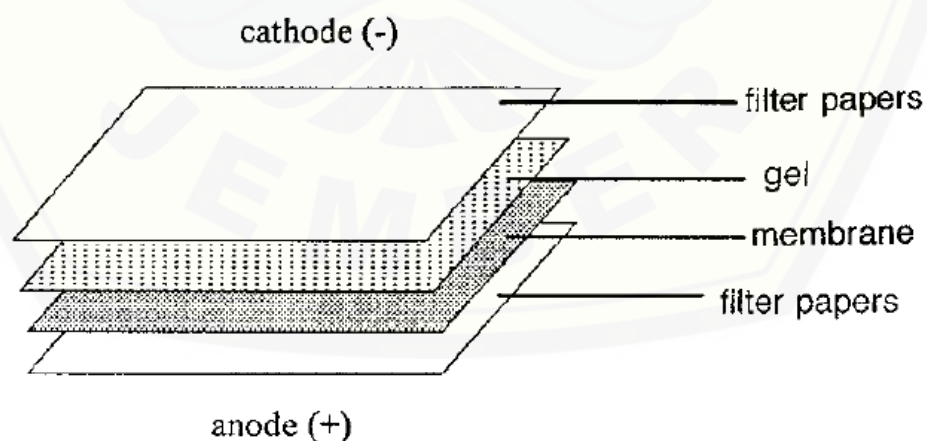
Profil protein kelenjar saliva *Aedes albopictus* kemudian dianalisis dengan metode SDS-PAGE berdasarkan prosedur dari Bollag dkk. (1991). Elektroforesis sampel protein menggunakan *Separating Gel* 12% dan *Stacking Gel* 4%. Tiap sumuran gel berisi 20 µl sampel protein (10 pasang sampel kelenjar saliva dalam 10 µl PMSF dalam PBS + 10 µl *sample buffer*). Elektroforesis dilakukan pada tegangan konstan 150 V selama 100 menit dalam *running buffer*. Kemudian dilanjutkan proses pewarnaan gel menggunakan larutan pewarna (*staining*) dengan *Coomasie Brilliant Blue* selama 60 menit. Proses pencucian (*destaining*) dilakukan sebanyak 3 kali setiap 30 menit untuk menghilangkan larutan pewarna yang tidak berikatan dengan protein.

3.4.7 Identifikasi Protein Imunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* dan *Aedes aegypti*

Proses *Western Blot* dilakukan menurut Harlow dan Lane (1999) dengan beberapa langkah yang dimodifikasi menggunakan metode *semi dry*. Protein pada gel *polyacrilamide* hasil analisis SDS-PAGE ditransfer ke membran PVDF selama 1 jam dengan arus konstan 100 mA. Membran PVDF dipotong sesuai dengan ukuran gel poliakrilamid kemudian direndam dalam metanol selama 1

menit. Gel poliakrilamid, membran PVDF, 2 lembar kertas *Whatman* dan *fiber pad* direndam ke dalam buffer transfer sebelum analisis *Western Blot*. Kertas *blotting* (*fiber pad*), *filter paper*, membran PVDF, gel akrilamid hasil SDS-PAGE, *filter paper*, dan kertas *blotting* disusun secara berurutan seperti pada (Gambar 3.2).

Proses imunoblotting dilanjutkan dengan reaksi silang antara protein kelenjar saliva *Aedes albopictus* pada membran dengan antibodi primer yang berasal dari serum penduduk sehat di wilayah endemik DBD, serta pasien DBD dan neonatus yang dilarutkan pada 5% *skim milk* dalam TBS (1:250) lalu diinkubasi *overnight* pada suhu 4°C. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Antibodi sekunder yang digunakan berupa *Goat–Anti Human IgG Alkaline Phosphatase Conjugate* (ROCKLAND, USA) yang dilarutkan pada 5% *skim milk* dalam TBS (1:2500). Membran yang telah diberi antibodi sekunder kemudian diinkubasi selama 2 jam. Visualisasi dilakukan dengan menambahkan substrat NBT-BCIP *Alkaline Phosphatase Substrate* (*Nitro Blue Tetrazolium - (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase)*) (ROCKLAND, USA) pada membran dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 1 menit hingga muncul pita protein imunogenik. Membran dicuci dengan akuades untuk menghentikan reaksi.



Gambar 3.2 Susunan *sandwich* pada proses *Western Blot* (Sumber: Walker, 1996)

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Protein dengan berat molekul yaitu: ~97, 67, 52, 49, 47, 31, 27, 17, dan 16 kDa dapat ditemukan pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* maupun *Aedes albopictus*. Profil protein dengan berat molekul 48 kDa hanya terdapat pada kelenjar saliva *Aedes aegypti*, sedangkan protein yang hanya terdapat pada saliva *Aedes albopictus* yaitu protein dengan berat molekul 32 dan 26 kDa. Protein imunogenik dengan berat molekul 31 kDa dikenali oleh serum penduduk sehat endemik baik pada *Aedes albopictus* maupun *Aedes aegypti*, serta serum pasien DBD. Protein imunogenik dengan berat molekul 67 kDa dikenali oleh serum sehat endemik pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* maupun *Aedes albopictus*. Protein imunogenik dengan berat molekul 47 kDa hanya dapat dikenali oleh serum pasien DBD pada kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut dengan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* terhadap protein imunogenik kelenjar saliva *Aedes albopictus* dengan berat molekul ~67, 47, dan 31 kDa untuk mengetahui identitas protein dan karakter molekulernya.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras, L., A. Fontaine, M. Belghazi, S. Bourdon, E. Boucomont-Chapeaublanc, E. Orldani-Pradines, M. Baragatti, N. Corre-Catelin, P. Reiter, B. Pradines, T. Fusai, dan C. Rogier. 2010. Salivary Gland Protein Repertoire from *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 10(4): 391-402
- Amin, H. Z., dan S. Sungkar. 2014. Perkembangan Mutakhir Vaksin Demam Berdarah Dengue. *eJournal Kedokteran Indonesia*
- Andrew, J., dan A. Bar. 2013. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annu Rev Res Biol*. 3(1): 52-69
- Bollag, D.M., M. D. Rozycki, dan S. J. Edelstein. 1991. *Protein Method*. USA: Wiley-Liss
- Bratawidjaja, K. G., dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar Edisi 11*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Cantillo, J. F., L. Puerta, S. Lafosse-Marin, J. L. Subiza, L. Caraballo, dan E. Fernández-Caldas. 2016. Identification and Characterization of IgE-Binding Tropomyosins in *Aedes aegypti*. *International archives of allergy and immunology*, 170(1): 46-56
- Carrington L. B., dan C. P. Simmons. 2014. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. *Frontiers in Immunology*. 5: 1-8
- CDC. 2012. How to Reduce Your Risk of Dengue Infection. <https://www.cdc.gov/dengue/prevention/index.html>. Diakses pada 12 Oktober 2018
- Conway, M. J., B. Londono-Renteria, A. Troupin, A. M. Watson, W. B. Klimstra, E. Fikrig dan T. M. Colpitts. 2016. *Aedes aegypti* D7 Saliva Protein Inhibits Dengue Virus Infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(9): e0004941
- Cornelie, S., F. Remoue, S. Doucoure, N. T. Diaye, F. X. Sauvage, D. Boulanger, dan F. Simondon. 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African Children. *Malaria journal*. 6(1): 75
- Doucoure, S., S. Cornelie, S. Patramool, F. Mouchet, E. Demetree, M. Seveno, J. S. Dehecq, H. Rutee, J. P. Herve, F. Favier, P. Gasque, F. Remoue, dan D. Misse. 2013. First Screening of *Aedes albopictus* Immunogenic Salivary Proteins. *Insect molecular biology*. 22(4): 411-423

- Fernandes D. R. M., R. Martins, E. P. Costa, E. C. Pacidônio, L. A. de Abreu, I. da Silva Vaz Jr, L. A. Moreira, R. N. da Fonseca dan C Logullo. 2014. The Modulation of The Symbiont/host Interaction Between *Wolbachia pipientis* and *Aedes fluviatilis* Embryos by Glycogen Metabolism. *PLoS One*, 9(6): e98966
- Fontaine, A., I. Diouf, N. Bakkali, D. Misse, F. Pages, T. Fusai, C. Rogier, dan L. Almeras. 2011. Implication of Haematophagous Arthropodsalivary Proteins in Host-vector Interactions. *Parasites dan Vectors*. 4: 187
- Gillespie R. D., M. L. Mbow, dan R. G. Titus. 2000. The Immunomodulatory Factors of Blood Feeding Arthropod Saliva. *Parasite Immunology*. 22: 319-331
- Gu, X., V.Gupta, Y. Yang, J. Y. Zhu, E. J. Carlson, C. Kingsley, J. S. Tash, E. Schçnbrunn, J. Hawkinson, dan G. I. Georg. 2017. Structure–Activity Studies of N-Butyl-1-deoxynojirimycin (NB-DNJ) Analogues: Discover Potent dan Selective Aminocyclopentitol Inhibitors of GBA1 dan GBA2. *ChemMedChem*. 12: 1977-1984
- Guedes D. R., M. T. Cordeiro, M. A. Melo-Santos, T. Magalhaes, E. Marques, L. Regis, A. F. Furtado, dan C. F. J. Ayres. 2010. Patient-Based Dengue Virus Surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis*. 47: 67-75
- Gulley, M. M., X. Zhang, dan K. Michel. 2013. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *Journal of Insect Physiology*. 59(2): 138-147
- Guzman, M. G., S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D.J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martínez, J. L. Pelegrino, C. Simmons, S. Yoksan, R. W. Peeling, dan M. B. Nathan. 2010. Dengue: A Continuing Global Threat. *Nature reviews microbiology*. 8(12)
- Harlow, E dan D. Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York
- Ishartadiati, K. 2010. *Aedes aegypti* sebagai Vektor Demam Berdarah Dengue. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma Surabaya
- Juhn, J., U. Naeem-Ullah, B. A. M. Guedes, A. Majid, J. Coleman, P. F. P. Pimenta, W. Akram, A. A. James, dan O. Marinotti. 2011. Spatial Mapping of Gene Expression in The Salivary Glands of The Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites dan Vectors*. 41(1): 1-13
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017*. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2019. <http://www.depkes.go.id/article/view/19011800001/kemenkes-imbau-seluruh-daerah-siaga-dbd.html>. Diakses pada tanggal 28 Mei 2019
- Luplertlop, N. 2014. Aedes Mosquito Salivary Immune Peptides: Boost Or Block Dengue Viral Infection. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(2): 163-168
- Mercado-Curiel, R. F., W. C. Black, dan M. de L Muñoz. 2008. A Dengue Receptor As Possible Genetic Marker of Vector Competence in *Aedes aegypti*. *BMC microbiology*, 8(1): 118
- Nene, V., J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. J. Tu, dan Q. Ren. 2007. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, A Major Arbovirus Vector. *Science*, 316(5832): 1718-1723
- Nivsarkar, M., G. P. Kumar, M. Laloraya, dan M. M. Laloraya. 1991. Superoxide Dismutase in The Anal Gills of The Mosquito Larvae of *Aedes aegypti*: Its Inhibition by α -terthienyl. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 16(4): 249-255
- Oktarianti, R., K. Senjarini, dan F. Fatchiyah. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against to Human Sera. *Aensi Journals*. 8(8): 101-107
- Oktarianti, R., K. Senjarini, T. Hayano dan F. Fatchiyah. 2015. Proteomic Analysis of Immunogenic Proteins from Salivary Glands of *Aedes aegypti*. *Journal of infection and public health*, 8(6): 575-582
- Paupy, C., H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, dan D. Fontenille. 2009. *Aedes albopictus*, An Arbovirus Vector: From The Darkness to The Light. *Microbes and Infection*. 11: 1177-1185
- Peng, Z., W.W. Xu, Y. Sham, H. Lam, D. Sun, L. Cheng, N. F. Rasic, Q. Guan, A.A. James, dan F. E. R. Simons. 2015. Mosquito Salivary Alergen Aed a 3: Cloning, Comprehensive Molecular Analysis, dan Clinical Evaluation. *European Journal of Allergy dan Clinical Immunology*. 71(5): 621-628
- Radji, M. 2009. Vaksin DNA: Vaksin Generasi ke Empat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 4(1): 28-37
- Rahana, V. K., A. Viswan, dan E. Pushpalatha. 2016. Response on Growth Regulatory Activity of Three Indigenous Plant Extracts Against Dengue Vector *Aedes albopictus* (Skuse). *International Journal of Mosquito Research*. 3(4): 1-5
- Rahayu, D. F., dan A. Ustiawan. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Balaba: jurnal litbang pengendalian penyakit bersumber binatang banjarnegara*. 9(1): 7-10

- Rigau-Perez, J. G., G. G. Clark, D. J. Gubler, P. Reiter, E. J. Sdaners, dan A. V. Vorndam 1998. Dengue dan Dengue Hemorrhagic Fever. *The Lancet*. 352: 971-977
- Rueda, L. M. 2004. *Pictorial Keys for The Identification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Associated with Dengue Virus Transmission*. Auckland: Magnolia Press
- Saucereau, Y., C. V. Moro, C. Dieryckx, J. W. Dupuy, F. H. Tran, V. Girard, P. Potier dan P. Mavingui. 2017. Comprehensive Proteome Profiling in *Aedes albopictus* to Decipher Wolbachia-arbovirus Interference Phenomenon. *BMC genomics*, 18(1): 635
- Schmid, M. A., E. Kauffman, A. Payne, E. Harris, dan L. D. Kramer. 2014. Preparation of Mosquito Salivary Gland Extract dan Intradermal Inoculation of Mice. *Bio-protocol*. 7(14)
- Sim, S., dan G. Dimopoulos. 2010. Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. *PloS one*. 5(5): e10678
- Siregar, F. A. 2004. Epidemiologi dan Pemberantasan Demam Berdarah Dengue (DBD) di Indonesia. *FKM Universitas Sumatera Utara Digital Library*: 1-13
- Soares, T. S., B. L. R. Gonzalez, R. J. S. Torquato, F. J. A. Lemos, A. L. Costa-da-Silva, M. D. L. C. Guimaraes, dan A. S. Tanaka. 2018. Functional Characterization of A Serine Protease Inhibitor Modulated in The Infection of The *Aedes aegypti* With *Dengue Virus*. *Biochimie*. 144: 160-168
- Stark, K. R., dan A. A. James. 1995. A Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Salivary Glands of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology*. 81: 321-331
- Titus, R. G., J. V. Bishop, dan J. S. Mejia. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva dan The Potential for These Factors to Serve as Vaccine Targets to Prevent Pathogen Transmission. *Parasite immunology*. 28(4): 131-141
- Vaughn, D. W., S. Green, S. Kalayanarooj, B. L. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T. P. Endy, R. Boonyos, A. L. Rothman, F. A. Ennis, dan A. Nisalak. 2000. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *The Journal of infectious diseases*. 181(1): 2-9
- Vega-Rua, A., K. Zouache, V. Caro, L. Diancourt, P. Delaunay, M. Grdanadam, dan A. B. Failloux. 2013. High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya dan Dengue Viruses in The Southeast of France. *PloS one*. 8(3): e59716

- Vizioli, J., P. Bulet, J. A. Hoffmann, F. C. Kafatos, H. M. Muller, dan G. Dimopoulos. 2001. Gambicin: A Novel Immune Responsive Antimicrobial Peptide from The Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *PNAS*. 98(22): 12630-12635
- Walker, J. M. 1996. *The Protein Protocols Handbook*. New Jersey: Humana Press
- Wan, S. W., C. F. Lin, S. Wang, Y. H. Chen, T. M. Yeh, H. S. Liu, A. Robert, dan Y. S. Lin. 2013. Current Progress in Dengue Vaccines. *Journal of biomedical science*. 20(1): 1
- WHO. 2016. Dengue Control: Epidemiology. <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Diakses pada tanggal 25 Oktober 2018
- WHO. 2019. Update on The *Dengue* Situation In The Western Pacific Region. http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/dengue_biweekly_20160809.pdf. Diakses pada tanggal 15 Juni 2019
- Yang, C. F., J. N. Hou, T. H. Chen, dan W. J. Chen. 2014. Discriminable Roles of *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* in Establishment of Dengue Outbreaks in Taiwan. *Acta tropica*. 130: 17-23

LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Bahan

a. Rearing Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*

1. 100 ml 10% larutan sukrosa : 10 gr sukrosa dilarutkan dalam 100 ml aquades

b. Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*

1. 10 ml PMSF dalam PBS (pH 7.4) : 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
2. 100 ml 0,5% NaCl : 0,5 gr NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades

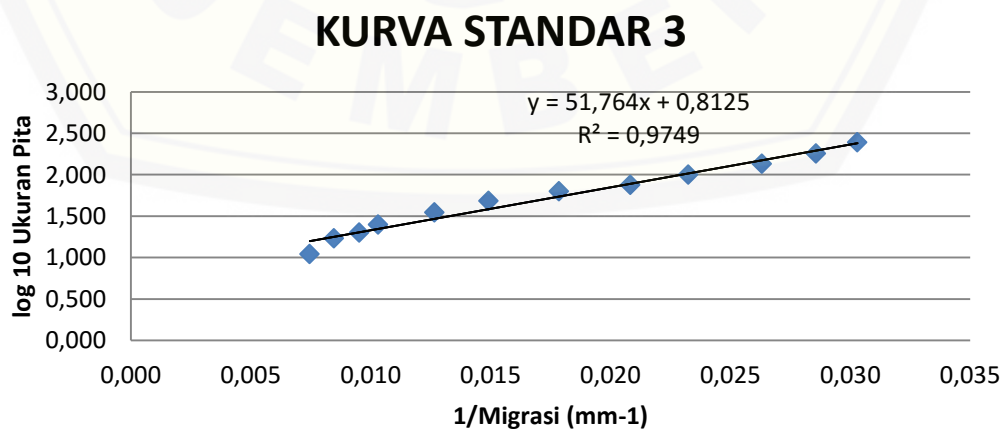
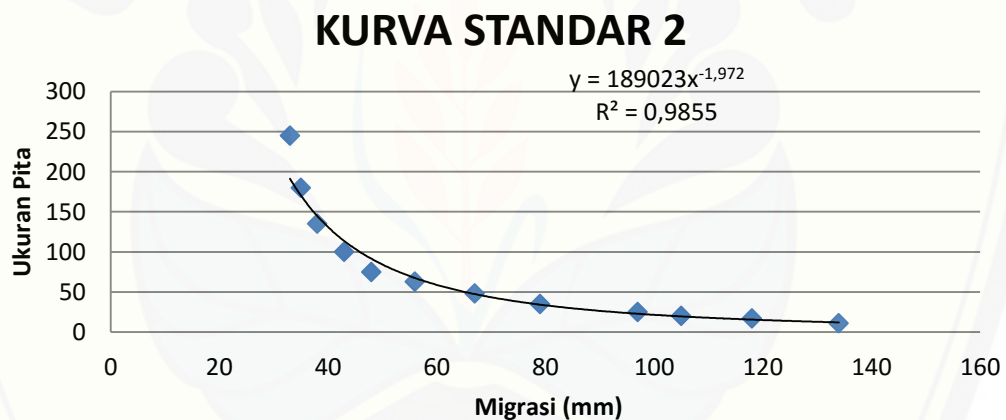
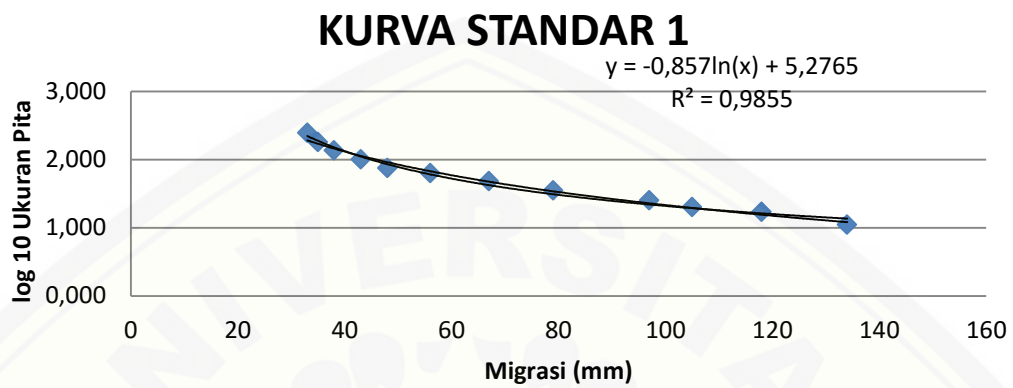
c. Analisis Profil Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dengan SDS-PAGE

1. 10 ml *Laemmli sample buffer* : 1,25 ml Tris-HCl 1M (pH 6.8); 2 ml 50% Gliserol; 4 ml 10 % SDS; 0,5 ml β -mercaptoethanol; 200 μ l *Bromphenol Blue*; dH₂O sampai 10 ml
2. 1 L Buffer Elektroda 1x : 3 gr *Tris Base*; 14,4 gr *Glycine*; 1 gr SDS; dH₂O sampai 1L
3. 100 ml 30% Acrylamide–Bisacrylamide : 29,2 gr Acrylamide; 0,8 gr Bisacrylamide; dH₂O sampai 100 ml
4. 100 ml Tris–HCl 1.5 M (pH 8.8) : 18,171 gr *Tris Base* ; dH₂O sampai 100 ml

5. 100 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) : 6,057 gr *Tris Base* ; dH₂O sampai 100 ml
6. 100 ml 10% SDS : 10 gr SDS ; dH₂O sampai 100 ml
7. 1 ml 10% SDS : 0,1 gr APS ; dH₂O sampai 1 ml
8. 1 L *Staining Solution* : 1 gr *Coomassie Brilliant Blue R-250*; 450 ml Metanol; 100 ml Asam Asetat Glasial; 450 ml dH₂O
9. 500 ml *Destaining Solution* : 200 ml Metanol; 50 ml Asam Asetat Glasial; 250 ml dH₂O

d. Analisis Western Blot

1. 1 L Buffer Transfer : 3,034 gr *Tris Base*; 1,44 gr Glysin; 200 ml Metanol pa; dH₂O sampai 1 L
2. 500 ml TBS (pH 7.4) : 4 gr NaCl; 0,1 gr KCl; 1,5 gr *Tris Base*; dH₂O sampai 500 ml
3. 10 ml 5% *Skimmed Milk* dalam TBS (pH 7.4) : 0,5 gr *Skim Milk*; 10 ml TBS pH 7.4 dalam TBS pH 7.4
4. Antibodi Primer (1 : 250) : 60 µl serum manusia; 14940 µl 5% *Skimmed Milk* dalam TBS (pH 7.4)
5. Antibodi Sekunder (1 : 2500) : 3 µl *Anti-Human IgG*; 14997 µl 5% *Skimmed Milk* dalam TBS (pH 7.4)

Lampiran B. Perhitungan Berat Molekul Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus***a. Kurva Standar Perhitungan Berat Molekul Marker Protein**

Lampiran C. *Informed Consent***PENJELASAN UNTUK MENGIKUTI PENELITIAN**

1. Kami adalah Dr. Rer.nat. Kartika Senjarini, M.Si, Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember dengan ini meminta anda untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul :
Potensi Protein Immunogenik Kelenjar Saliva Vektor Potensial Dengue *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* sebagai Target Pengembangan Vaksin Dengue Berbasis Vektor
2. Tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi molekuler protein imunogenik vektor potensial Dengue pada kelenjar saliva *Aedes albopictus* sebagai target pengembangan vaksin Dengue berbasis vektor. Pengembangan Vaksin Dengue berbasis vektor ini dapat memberi manfaat atau kontribusi yang besar dalam menciptakan vaksin baru yang efektif dan efisien untuk melawan epidemi DBD di Indonesia dan memberikan sumbangan yang sangat berarti bagi pemerintah maupun masyarakat dalam penanggulangan wabah penyakit diperantarai vektor nyamuk.
Sampel penelitian ini berupa darah yang akan diambil dari pembuluh vena cubiti di lengan, sebanyak 2-3 ml pada orang sehat maupun sampel penderita DBD. pengambilan darah secara aseptis menggunakan spuit disposable yang steril dan kulit dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Pengambilan sampel darah akan dilakukan oleh petugas medis yang sudah berpengalaman.
3. Prosedur pengambilan sampel adalah menggunakan spuit disposable yang steril dan kulit dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% diambil dari pembuluh vena cubiti di lengan kanan atau kiri. Sebanyak 5 ml untuk orang sehat dan 3 ml bagi pasien DBD. Cara ini mungkin menyebabkan sedikit rasa nyeri dan tidak nyaman tetapi anda tidak perlu khawatir karena tidak akan menimbulkan infeksi maupun efek samping yang membahayakan.
4. Keuntungan yang anda peroleh dengan keikutsertaan anda adalah subyek telah berperan nyata dalam mewujudkan vaksin dengue yang dapat mencegah penyebaran DBD, sehingga dapat menanggulangi dan mengeliminasi penyakit DBD khususnya di Indonesia sebagai negara tropik
5. Seandainya anda tidak menyetujui cara ini maka anda dapat memilih cara lain atau anda boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk itu anda tidak akan dikenai sanksi apapun
6. Nama dan jati diri anda akan tetap dirahasiakan

Peneliti

Blanko Pernyataan Persetujuan untuk Berpartisipasi dalam Penelitian

Saya yang bertandatangan dibawah ini meyakini bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar persetujuan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti

Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi salah satu subyek penelitian yang berjudul : **Identifikasi Protein Immunogenik Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember**

Jember, 2019

Peneliti

Saksi

Yang membuat pernyataan

(Kartika Senjarini)

(.....)

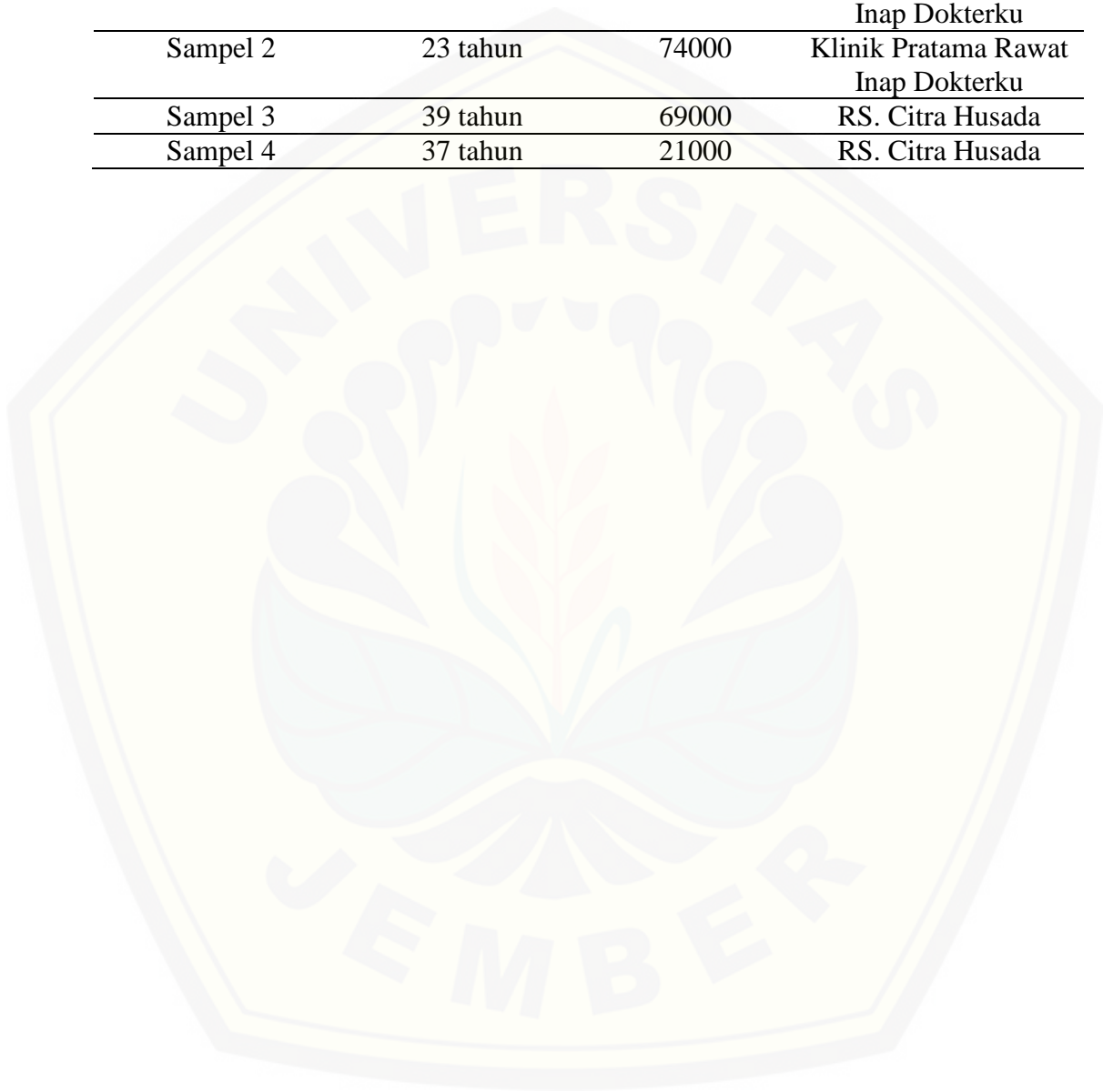
(.....)

Lampiran D. *Ethical Clearance*

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL No. 148/UN25.8/KEPK/DL/2018</p>	
Title of research protocol	: "Potensial Immunogenic Protein from Salivary Gland of Potensial Vector Dengue <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> as A Target to Develop Vector-Based Vaccines"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si.
Member of research	: -
Responsible Physician	: Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si.
Date of approval	: September 3 rd , 2018
Place of research	: Laboratory of Biotechnology - Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, September 5th, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>  <p>(Rg. R. Mahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>  <p>(Prof. Dr. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)</p>

Lampiran E. Data Pasien DBD dari Rumah Sakit Citra Husada dan Klinik Pratama Rawat Inap Dokterku

Nama	Umur	Trombosit	Lokasi Pengambilan Sampel
Sampel 1	12 tahun	55000	Klinik Pratama Rawat Inap Dokterku
Sampel 2	23 tahun	74000	Klinik Pratama Rawat Inap Dokterku
Sampel 3	39 tahun	69000	RS. Citra Husada
Sampel 4	37 tahun	21000	RS. Citra Husada



Lampiran F. Data Penduduk Sehat Endemik dan Neonatus di Kabupaten Jember**a. Data Penduduk Sehat Endemik**

Nama	Umur
Sampel 5	22 tahun
Sampel 6	21 tahun
Sampel 7	22 tahun
Sampel 8	22 tahun

b. Data Neonatus dari Bidan Umi Soemarno

Nama	Umur
Sampel 9	33 tahun