



**PROFIL DAN IMUNOGENISITAS PROTEIN KELENJAR SALIVA
VEKTOR POTENSIAL DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD) DI
WILAYAH ENDEMIK KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI

Oleh

**Ratna Safitri
NIM 141810401043**

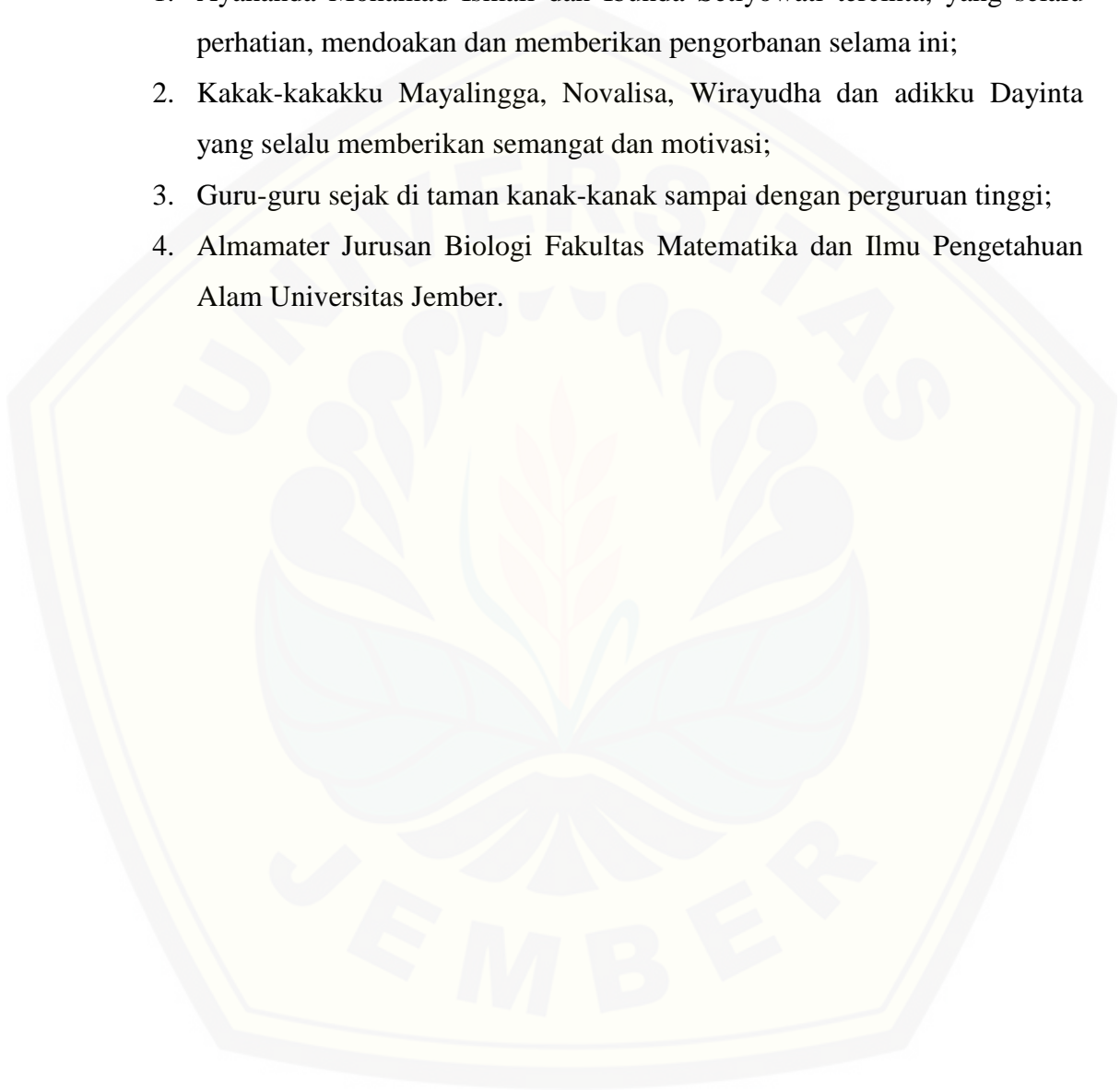
**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan kepada :

1. Ayahanda Mohamad Ismail dan Ibunda Setiyowati tercinta, yang selalu perhatian, mendoakan dan memberikan pengorbanan selama ini;
2. Kakak-kakakku Mayalingga, Novalisa, Wirayudha dan adikku Dayinta yang selalu memberikan semangat dan motivasi;
3. Guru-guru sejak di taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.



MOTO

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya
((Q.S. Al-Baqarah: 286)*)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama
kesulitan ada kemudahan ((Q.S. Al-Insyirah: 5-6)*)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ratna Safitri

NIM : 141810401043

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Profil dan Imunogenisitas Protein Kelenjar Saliva Vektor Potensial Demam Berdarah (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 kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 9 Agustus 2018

Yang Menyatakan,

Ratna Safitri

NIM 141810401043

SKRIPSI

**PROFIL DAN IMUNOGENISITAS PROTEIN KELENJAR SALIVA
VEKTOR POTENSIAL DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD) DI
WILAYAH ENDEMIK KABUPATEN JEMBER**



Oleh

Ratna Safitri

NIM 141810401043

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. Nat Kartika Senjarini, S,Si, M.si
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.

PENGESAHAN

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

Hari, tanggal :

Tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

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

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.

NIP 197509132000032001

NIP196310261990022001

Anggota I,

Anggota II,

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

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.

NIP 197306012000032001

NRP 760016783

Mengesahkan,

Dekan,

Drs. Sujito., Ph.D

NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Profil dan Immunogenisitas Protein Kelenjar Saliva Vektor Potensial Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember; Ratna Safitri, 141810401043, 2018: 46 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu masalah kesehatan yang terus terjadi setiap tahunnya di Indonesia. Virus *dengue* merupakan penyebab penyakit DBD yang ditularkan oleh nyamuk. *Ae.aegypti* merupakan vektor primer, sedangkan *Ae. albopictus* sebagai vektor sekunder. Sebagai vektor, nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* telah terbukti dapat mentransmisikan virus *dengue* ke dalam tubuh manusia melalui proses *bloodfeeding*. Pada proses *bloodfeeding*, kelenjar saliva nyamuk memiliki peranan yang sangat penting dalam mentransmisikan virus *dengue* karena di dalamnya terdapat beberapa komponen penting seperti antikoagulan, molekul antiinflamasi dan vasodilator. Komponen-komponen tersebut dapat menyebabkan terjadinya vasokonstriksi dan respon imun yang meliputi antihistamin, faktor vasodilator, antikoagulan, agregasi platelet dan faktor imunomodulator.

Pada penelitian sebelumnya menunjukkan protein dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dari ekstrak kelenjar saliva *Aedes aegypti* terbukti sebagai protein imunogenik. Hasil penelitian tersebut menunjukkan protein spesifik dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dapat bereaksi silang dengan antibodi pasien DBD dan penduduk sehat di wilayah endemik. Kemampuan antigen dalam mengenali antibodi penduduk sehat pada wilayah endemik dapat menjadi indikator adanya resistensi penduduk terhadap virus *dengue*. Sebagai vektor sekunder, kelenjar saliva *Aedes albopictus* dimungkinkan memiliki kesamaan pada profil protein dan immunogenisitas proteinnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian profil protein dan immunogenisitas protein dengan melakukan reaksi silang ekstrak kelenjar saliva nyamuk *Aedes albopictus* dengan serum pasien DBD, penduduk sehat dan neonatus penduduk endemik DBD.

Metode penelitian meliputi *landing collection* larva *Ae.aegypti* dan *Ae. albopictus* asal Kabupaten Jember. Kemudian dilanjutkan dengan *rearing* nyamuk di *animal care unit* laboratorium zoologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember. Setelah itu, dilakukan identifikasi morfologi terhadap vektor potensial *dengue*. Setelah dilakukan identifikasi morfologi, dilanjutkan dengan isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang dilakukan untuk mengetahui profil proteinnya dengan analisis SDS-PAGE. Kemudian untuk mengetahui adanya imunogenisitas protein terutama pada *Aedes albopictus*, dilakukan analisis Dot Blot menggunakan ekstrak total kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Hasil profil protein yang diperoleh pada *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* kemudian dikomparasikan dan dilihat perbedaan serta kesamaan pada berat molekul proteinnya. Sedangkan hasil analisis Dot Blot yang diperoleh, diamati adanya lingkaran gelap yang menandakan reaksi positif dan dianalisis menggunakan software imageJ untuk mengetahui densitas warna pada membran.

PRAKATA

Puji syukur panjatkan kehadiran Allah Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “*Profil Protein dan Immunogenisitas Vektor Potensial Demam Berdarah (DBD) di Wilayah Endemik Kabupaten Jember*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah dengan sabar dan senang hati meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta petunjuk sehingga selesainya skripsi ini dan sebagai ketua riset TBV yang telah mengizinkan penulis untuk bergabung dengan tim riset TBV;
2. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.S.i., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang dengan sabar dan banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta motivasi sehingga selesainya skripsi ini;
3. Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji I yang telah dengan sabar membimbing dan banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta motivasi sehingga selesainya skripsi ini;
4. Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan bimbingan dalam ujian skripsi guna kesempurnaan skripsi ini;
5. Prof. Dr. Sudarmadji, M.A., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam masa perkuliahan sampai dengan penyelesaian penyusunan skripsi ini;
6. Dina Fitriyah, S.Si., M.Si. selaku teknisi Laboratorium Bioteknologi yang telah banyak membantu dan memberikan nasihat selama penelitian;

7. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
8. Ayahanda Mohamad Ismail dan ibunda Setiyowati yang selalu memberikan dukungan, do'a, semangat serta motivasi, dan alasan utama penyelesaian penyusunan skripsi ini;
9. Kakak-kakaku yang selalu menjadi motivasi agar penyusunan skripsi ini cepat terselesaikan;
10. teman-teman seperjuangan, Nur Amalina, Lailly Nur, Aria Fransisca, dan Iffa Ali atas segala kerjasama dan bantuan semasa penelitian hingga penulisan skripsi ini;
11. kakak-kakak TBV, Dewi Masruroh, Ika Wahyuni, Fitria M. Fauzi, Aisyah Prihandana, dan Novita Amalia yang telah memberikan ilmunya semasa penelitian dan telah memberikan motivasi;
12. teman-teman Biologi angkatan 2014 yang saling memberikan motivasi dan semangat;
13. sahabat-sahabatku, Nur Azizah Rakhmaniah, Haris setiawan, Zahra Febrina, Nur Amalina Fauziah, Iffa ali, Citra Hadi dan Dwi Nur Hanifah yang selalu mendukung, menjadi pendengar yang baik dan selalu memberkan semangat selama penyusunan skripsi.
14. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu semasa penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Semoga amal kebaikan dan bantuannya mendapat balasan dari Allah Yang Maha Kuasa. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Jember, 9 Agustus 2018

Penulis

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan salah satu penyakit infeksi yang dapat ditularkan melalui vektor nyamuk yakni *Aedes aegypti* sebagai vektor primer dan *Aedes albopictus* sebagai vektor sekunder. Patogen dari penyakit ini adalah virus *dengue* yang termasuk ke dalam famili Flaviridae, genus Flavivirus dan terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Christophers, 1960). Nyamuk *Aedes* memperoleh virus saat menghisap darah seseorang yang terjangkit virus *Dengue* dan menularkannya kepada orang yang sehat. Transmisi terjadi saat proses *blood feeding* dan keberhasilan transmisi patogen tersebut menandakan kemampuannya dalam menghindari sistem imun tubuh inang (Andrade *et al*, 2005).

Pada proses transmisi patogen, kelenjar saliva merupakan bagian penting dari siklus penularan virus *Dengue*. Saliva mengandung beberapa komponen penting seperti antikoagulan, molekul antiinflamasi dan vasodilator yang memfasilitasi dalam proses *blood-feeding* (Andrade, 2005) dalam melepaskan komponen-komponen yang dapat menyebabkan terjadinya vasokontraksi dan respon imun yang meliputi antihistamin, faktor vasodilator, antikoagulan, agregasi platelet dan faktor imunomodulator (Titus *et al.*, 2006). Adanya komponen immunomodulator yang ada pada saliva dapat membantu mempermudah proses transmisi patogen karena bersifat immunosupresif yaitu dapat menekan sistem imun didalam tubuh inang (Gillespie *et al*, 2000). William *et al* (2012) menyatakan bahwa setelah terjadinya paparan saliva arthropoda secara berulang dapat meningkatkan respon imun pada tubuh inang. Titus *et al* (2006) juga menyatakan bahwa masyarakat endemik memiliki tingkat imunitas yang lebih baik dibandingkan masyarakat pendatang dari nonendemik. Dengan adanya potensi dari saliva vektor arthropoda dalam mencegah transmisi patogen kedalam tubuh inang, maka perlu dilakukan pengendalian penyakit yang

disebabkan oleh vektor serangga contohnya pada penyakit DBD.

Penelitian yang dilakukan Oktarianti *et al.* (2014) menunjukkan protein dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dari ekstrak kelenjar saliva *Aedes aegypti* terbukti sebagai protein imunogenik. Hasil penelitian tersebut menunjukkan protein spesifik dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dapat bereaksi silang dengan antibodi pasien DBD dan penduduk sehat di wilayah endemik. Sebaliknya protein tersebut tidak bereaksi silang dengan antibodi penduduk yang belum pernah terpapar gigitan nyamuk *Aedes aegypti*. Kemampuan antigen dalam mengenali antibodi penduduk sehat pada wilayah endemik dapat menjadi indikator adanya resistensi penduduk terhadap virus *dengue*. Sebagai vektor sekunder, kelenjar saliva *Aedes albopictus* dimungkinkan memiliki kesamaan pada profil protein dan imunogenisitas proteinnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian profil protein dan imunogenisitas protein dengan melakukan reaksi silang ekstrak kelenjar saliva nyamuk *Aedes albopictus* dengan serum pasien DBD, penduduk sehat dan neonatus penduduk endemik DBD.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas diketahui bahwa permasalahan dalam penelitian ini adalah : bagaimana imunogenisitas protein pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan membandingkan imunogenisitas protein pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dengan *Aedes albopictus*.

1.4 Batasan Masalah

Penelitian ini dibatasi sampai pada tahap analisis imunogenisitas protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* secara kualitatif dengan analisis Dot Blot.

1.5 Manfaat

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai profil protein dan imunogenisitas protein *Aedes albopictus* sehingga dapat bermanfaat dalam pengembangan TBV (*Transmission Blocking Vaccine*) DBD.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Demam Berdarah Dengue

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* terdapat di sebagian besar daerah tropis dan subtropis seperti Asia Tenggara, Amerika Tengah dan Karibia (Kurane, 2007). Jumlah kasus tersebut tidak pernah menurun bahkan cenderung terus meningkat (Weissenbock, 2010). Kasus penyakit ini banyak menimbulkan kematian terutama pada anak (Andriani, 2013), 90% di antaranya menyerang anak di bawah 15 tahun (Malavinge, 2004). Setiap tahunnya di Indonesia selalu terjadi KLB di beberapa provinsi, yang terbesar terjadi tahun 1998 dan 2004 dengan jumlah penderita 79.480 orang dengan kematian sebanyak 800 orang lebih (Kusriastuti, 2005). Pada beberapa tahun berikutnya jumlah kasus penyakit DBD terus naik tetapi jumlah kematian turun dibandingkan tahun 2004. Pada tahun 2008 sebanyak 137.469 orang mengalami kematian sebesar 1.187 orang atau *case fatality rate* (CFR) 0,86% dan pada kasus tahun 2009 sebanyak 154.855 orang dengan kematian 1.384 orang atau CFR 0,89% (Kusriastuti, 2010).

Terdapat 11.207 kasus DBD dengan *Incidence Rate* (IR) 29,25 per 100.000 penduduk menurut data dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, pada tahun 2012. Di Jawa Timur termasuk di Kabupaten Jember memiliki kasus yang tinggi penderita penyakit DBD. Pada tahun 2009 terdapat 1.093 kasus DBD dan meningkat sebanyak 1.494 kasus pada tahun 2011 (Dinkes Jatim, 2013). Kabupaten Jember ditetapkan sebagai daerah yang berstatus Kejadian Luar Biasa (KLB) DBD (Kemenkes RI, 2016).

Saat ini masih belum ditemukan obat dan vaksin DBD, cara yang dapat dilakukan untuk mencegah terjadinya penyakit ini dengan memutuskan rantai penularan yaitu dengan pengendalian vektor (Fathi *et al.*, 2005). Pengendalian vektor DBD dilaksanakan dalam dua kegiatan yaitu pemberantasan nyamuk dewasa (*fogging*) dan pemberantasan jentik nyamuk melalui kegiatan 3M.

2.2 Vektor *Dengue* dan Karakteristiknya

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *Dengue*. Infeksi virus *Dengue* saat ini tetap menjadi masalah kesehatan di Indonesia sehingga dimasukkan dalam kategori "A" pada stratifikasi DBD oleh World Health Organization (WHO) yang mengindikasikan tingginya angka perawatan rumah sakit dan kematian akibat DBD, khususnya pada anak (Chen, 2009).

Host DBD adalah manusia sedangkan patogennya adalah virus *Dengue* yang termasuk ke dalam famili Flaviridae dan genus Flavivirus, terdiri atas 4 serotipe yaitu Den-1, Den-2, Den3 dan Den-4 (Edelman 2007; Whitehead *et al.* 2007; Murell *et al.* 2011). 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). Terdapat dua jenis nyamuk *Aedes* yang dapat menularkan virus *Dengue* yaitu *Aedes aegypti* sebagai vektor primer dan *Aedes albopictus* sebagai vektor sekunder (Sim and Dimopoulos 2010).

2.2.1 *Aedes aegypti*

Adapun klasifikasi *Aedes aegypti* penyebab penyakit DBD yaitu :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Famili	: Culicidae
Genus	: <i>Aedes</i>
Spesies	: <i>Aedes aegypti</i> (Christophers, 1960).

Telur nyamuk *Aedes aegypti* berwarna hitam, tunggal, berbentuk oval, dan diletakkan secara satu persatu di permukaan atau sedikit di bawah permukaan air dengan jarak $\pm 2,5$ cm dari dinding tempat perindukannya. Nyamuk betina menghisap darah bertujuan untuk proses pematangan telur. Seekor nyamuk betina dapat menghasilkan sekitar 50 sampai 100 butir telur dalam satu kali bertelur (Clement., 1992). Stadium larva dari *Aedes aegypti*

sewaktu istirahat yakni tubuhnya membentuk sudut dengan permukaan air. Pada saat di permukaan, posisinya hampir tegak lurus dengan permukaan air. Pada bagian kepala terdapat mata majemuk, antena berbulu dan bagian mulut dengan tipe penusuk dan penghisap yang disebut sebagai proboscis (Rahmawati, 2004).

2.2.2. *Aedes albopictus*

Aedes albopictus merupakan vektor sekunder DBD, adapun klasifikasinya yakni ;

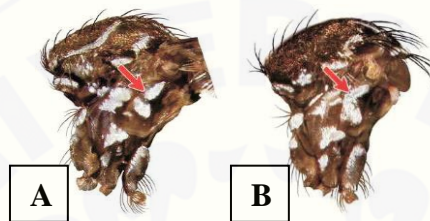
Filum : Arthropoda
Kelas : Insecta
Ordo : Diptera
Famili : Culicidae
Genus : *Aedes*
Spesies : *Aedes albopictus*

(Jupp, 1996).

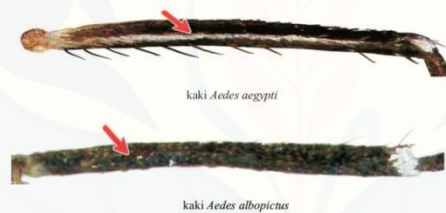
Aedes albopictus memiliki telur berwarna hitam dan akan berwarna semakin hitam ketika telur akan menetas. Telur memiliki bentuk lonjong dan berukuran kurang lebih 0,5 mm. Setelah telur menetas, akan menjadi larva dengan bentuk kepala bulat silindris, terdapat antena pendek dan halus dengan rambut-rambut berbentuk sikat di bagian depan kepala dan pada ruas abdomen VIII terdapat gigi sisir yang khas dan tanpa duri pada bagian lateral thorax (Sivanathan, 2006). Larva akan berkembang menjadi pupa dengan warna kecoklatan dan menjadi hitam menjelang tahap dewasa. *Aedes albopictus* dewasa memiliki tubuh berwarna hitam dengan bercak atau garis-garis putih pada notum dan abdomen serta memiliki antena berbulu. Pada *Aedes albopictus* jantan, palpus sama panjang dengan proboscis sedangkan panjang palpus *Aedes albopictus* betina $\frac{1}{4}$ dari proboscis (Boesri, 2011).

Secara morfologis *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* sangat mirip, namun dapat dibedakan dari strip putih yang terdapat pada bagian skutumnya (Andrew, 2013). Garis putih pada bagian skutum menjadi dasar penting untuk membedakan antara keduanya (Supartha, 2008). Skutum *Aedes aegypti* terdiri atas

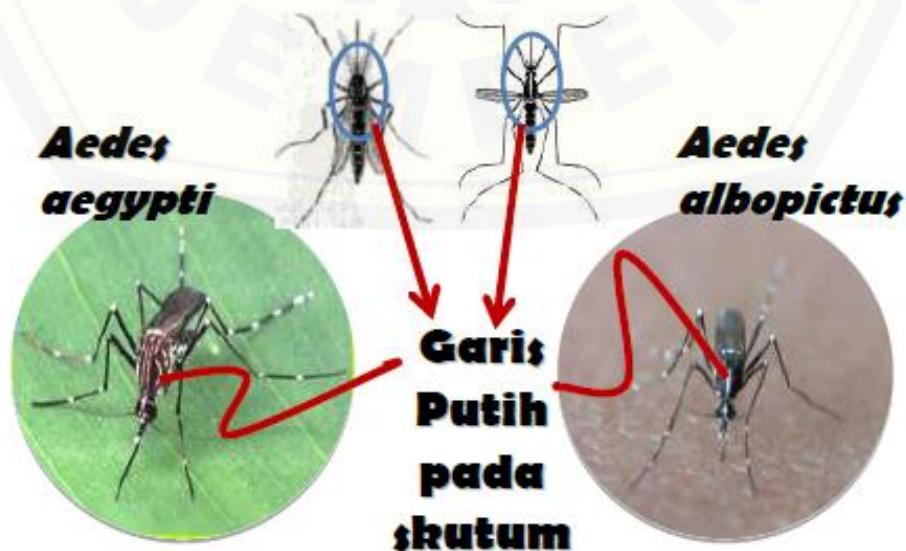
dua garis putih sejajar di bagian dorsal tengah thoraks dan diapit oleh dua garis lengkung berwarna putih. Sedangkan skutum pada *Aedes albopictus* hanya memiliki satu garis putih di bagian tengah thoraks (Sivanathan, 2006). Secara mikroskopis juga dapat dibedakan dari bagian mesopimeron pada mesonotumnya, dan perbedaannya juga dapat dilihat dari bagian anterior kaki. Anterior kaki *Aedes aegypti* bagian femur kaki tengah terdapat garis putih memanjang sedangkan pada *Aedes albopictus* tidak ada (Rahayu dan Ustiawan, 2007).



Gambar 2.1. Perbedaan mesopimeron pada bagian mesonotum *Ae. aegypti* (A) dan *Ae. albopictus* (B) (Rahayu dan Ustiawan, 2013)



Gambar 2.2. Perbedaan kaki *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Rahayu dan Ustiawan, 2013)



Gambar 2.3 Perbedaan skutum *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Supartha, 2008)

2.3 Potensi Protein Kelenjar Saliva *Aedes* dalam Transmisi Virus Dengue

Saliva vektor penyakit dari Arthropoda berperan penting dalam proses transmisi patogen ke dalam tubuh hospes. Pertama, infeksi saliva merupakan bagian penting dari siklus penularan virus *Dengue*. Kedua, saliva mengandung beberapa komponen penting seperti anti-koagulan, molekul anti-inflamasi dan vasodilator yang memfasilitasi dalam proses *blood-feeding* (Andrade, 2005). Pada saat proses *blood-feeding* kelenjar saliva nyamuk melepaskan komponen-komponen yang dapat menyebabkan terjadinya vasokonstriksi, inflamasi dan respon imun yang meliputi antihistamin, faktor vasodilator, anti-koagulan, agregasi platelet dan faktor imunomodulator (Titus *et al.*, 2006). Pada analisis *transcriptomics* dan *proteomics* menunjukkan adanya 24 protein pada kelenjar saliva vektor antropoda seperti apirase, serpin, protein D7, adenosin deaminase, serin protease, aktin, amilase, lectin (Ribeiro *et al.*, 2007).

Pada vertebrata terdapat tiga sistem yang berperan dalam menghambat transmisi patogen melalui proses *blood feeding* yakni haemostasis, inflamasi dan imunitas. Haemostasis yang dilakukan oleh inang merupakan respon host dalam mengontrol kehilangan darah, inflamasi merupakan respon *host* yang disebabkan oleh kerusakan kulit, dan imunitas berkaitan dengan respon imun pada tubuh *host*. Respon *host* tersebut dapat dihambat oleh faktor imunomodulator dan vasodilator yang terdapat pada kelenjar saliva hewan arthropoda untuk membantu dalam memudahkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang (Ribeiro, 2003).

Komponen faktor vasodilator menyebabkan melebarnya pembuluh darah pada hospes. Sedangkan komponen antikoagulan berfungsi untuk menghambat terjadinya proses penggumpalan darah, sehingga memudahkan serangga vektor untuk menghisap darah pada proses *blood-feeding* (Andrade *et al.*, 2005). Faktor

immunomodulator yang terdapat pada saliva nyamuk bersifat immunosupresif yaitu menekan sistem imun inang sehingga memudahkan dalam transmisi patogen. Aktivitas dari saliva vektor *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Bagian – bagian kelenjar saliva *Aedes aegypti* mensekresikan protein yang berbeda (Poehling, 1979). Pada lobus proksimal (*Proximal – Lateral*) memproduksi protein yaitu *alpha-glucosidase*, lisozim, amilase 1, *salivary chymotrypsin-like*, V-ATPase, *carbonic anhydrase*, *gambicin*, dan serin protease. Pada lobus distal (*Distal – Lateral*) memproduksi protein D7, 30 kDa *allergen-like protein*, dan aegyptin. Sedangkan pada lobus medial memproduksi protein 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 *et al.*, 2011). Sedangkan pada *Aedes albopictus* memiliki kemiripan dengan *Aedes aegypti* yakni pada kelenjar salivanya mengandung 30 kDa *allergen-like protein*, serpin, *salivary apyrase*, D7, *salivary purine nucleosidas* dan protein D7.

Tabel 2.1 Protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*

No	Nama Protein	Bobot Molekul Protein	Fungsi Biologis	Nama Spesies	
				<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
1.	Purin Nukleosidase	100-200 kDa	Terkait dengan imunitas	+	+
2.	Apyrase (a,c,n)	62-68 kDa	Antikoagulan	+	+
3.	Dengue Virus Binding Protein (h)	58 kDa	Mediator dalam pengikatan virus Dengue pada kelenjar saliva.	+	+
4.	Adenosin Deaminase (a,i)	55-60 kDa	Menghambat agregasi trombosit	+	+
5.	Salivary serpin putative (a,g)	47-50 kDa	Antikoagulan	+	+

6.	Serpin (a,j)	40-47 kDa	Antikoagulan, protease inhibitor	+	+
7.	D7 Family (a,f,d,m)	15-37 kDa	Vasodilator, Antikoagulan, Imunomodulat or	+	+
8.	Antigen-5 protein family, putative 30 kDa allergen-like protein (a,e,g,k,j)	23-30 kDa	Alergen	+	+

Keterangan: (a) Almeras *et al.*, 2010; (b) Calvo *et al.*, 2006; (c) Champagne *et al.*, 1995; (d) Fontaine *et al.*, 2011; (e) Hackett *et al.*, 2002; (f) James *et al.*, 1994; (g) Orlandi-Pradines *et al.*, 2007; (h) Lormeau and May, 2009; (i) Ribeiro *et al.*, 2001; (j) Robeiro *et al.* 2007; (k) Schreiber *et al.*, 1997; (l) Schneider *et al.*, 2004; (m) Valenzuela *et al.*, 2002; (n) Wasinpiamongkol *et al.*, 2010.

Pengembangan potensi saliva vektor penyakit dari Arthropoda didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu potensi faktor immunomodulator yang merupakan suatu protein terdapat pada saliva vektor *Lutzomyia longipalpis* sebagai target pengembangan vaksin pada penyakit *leishmaniasis*. Masyarakat yang tinggal di daerah endemik penyakit *leishmaniasis* mengembangkan respon imun yang lebih protektif karena adanya paparan berulang dari saliva vektor *L. longipalpis* selama dalam periode bulan sampai tahunan. Hal ini membuktikan adanya protein imunogenik yang terkandung dalam saliva vektor yang terjadi secara alami (Gillespie *et al.*, 2000).

Hasil penelitian Oktarianti *et al.* (2014) membuktikan terdapat dua protein yang bersifat imunogenik yang berhasil didapat yaitu protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa yang telah diidentifikasi dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Protein tersebut menunjukkan adanya reaksi positif terhadap serum populasi endemik dan menunjukkan reaksi negatif terhadap serum populasi dari wilayah non endemik.

Dengan analisis *transcriptomic* dan *proteomic* pada protein saliva dari *Aedes aegypti* teridentifikasi 15 protein sekretoris pada saat proses *blood feeding*. Beberapa protein diantaranya berperan dalam memodulasi respon imun (Almeras *et al.* 2010). Pada Tabel 2.1 menunjukkan protein yang terdapat pada kelenjar saliva nyamuk *Aedes* yang menyebabkan mudahnya transmisi patogen pada tubuh inang seperti pada protein D7. Paparan secara berulang saliva vektor Arthropoda dapat mempengaruhi respon imun inang ke arah 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* yang bertindak sebagai vektornya (Belkaid *et al.*, 1998). Dengan adanya vaksinasi protein imunomodulator saliva *Aedes* tersebut maka dapat memblokir transmisi virus *dengue* sekaligus menghalangi peningkatan efek dari saliva, sehingga dapat mengendalikan penyakit DBD (Oktarianti *et al.* 2014).

2.4 Hipotesis

Adanya kesamaan imunogenisitas protein pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Desember 2017 sampai dengan Mei 2018, bertempat di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* kertas pupasi, kapas, pinset, aluminium foil, cawan pupa, nampan plastik, pipet plastik, kertas saring, aspirator, jarum *microdissection*, mikroskop stereo, mikrotip, *handscone*, *beaker glass*, gelas ukur, *eppi stander*, mikropipet, *ependorf*, *micropipette*, *refrigerator*, *refrigerated centrifuge*, *vortex*, perangkat alat *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), membran PVDF, dan *micropistille*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, Akril/BIS-Akrilamid 30% (29,2 gr akrilamid; 0,8 gr bis akrilamid), buffer elektroda 5x (9 gr trisma base; 43,2 gr glisin; 3 gr SDS), buffer sampel (1 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,8 ml gliserol, 1,6 ml 10% (b/v) SDS; 0,4 ml 2-merkaptotanol; bromfenol biru 1% (b/v), 1 gr “Coomassie Blue R-250”, 450 ml methanol, 100 ml asam asetat glacial, 50% (v/v) aquades, 40% (v/v) methanol, 10% (v/v) asam asetat glacial, APS 10%, TEMED, aquades, PBS pH 7,4 (8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 1,44 gr Na₂HPO₄, 0,24 gr KH₂PO₄), *Tris Buffer Saline* (TBS) pH 7,4 (8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 3 gr Trisma Base), NBT (0,5 gr NBT dalam 10 ml 70% (v/v) dimetilformamida), BCIP (0,5 gr BCIP disodium salt dalam 10 ml 100% (v/v) dimetilformamida), buffer alkalin fosfatase (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris HCl pH 9,5), buffer transfer pH 8,3 (39 mM glisin; 48 mM Trisma base; 0,037% (b/v) SDS; 20% methanol (v/v), pewarna

(66 μ l NBT; 33 μ l BCIP dilarutkan dalam 10 ml buffer alkalin fosfatase), buffer lisis (1,5 mM MgCl₂; 10 mM Tris HCl; 2 mM EDTA-NaOH; 10 mM NaCl; 1% Nonidet p-40) ethanol 90%, es batu, marker protein (Promega), *skim milk*, serum darah manusia (sehat endemik, pasien DBD, dan neonatus), antibodi sekunder (anti human IgG (H&L) (GOAT) Antibody Alkaline Phosphatase Conjugated – 609 – 1502 ROCKLAND, ddH₂O).

3.3 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur yang akan digunakan dalam penelitian ini yakni diawali dengan preparasi alat, landing *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, rearing *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, ekstraksi protein kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, preparasi serum darah (sehat endemik, pasien DBD, dan neonatus), analisis *Dot Blot* dan analisis SDS-PAGE. Secara detail prosedur penelitian akan dijelaskan sebagai berikut:

3.3.1 Landing Collection *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*

Bahan yang akan digunakan adalah kelenjar saliva jenis nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* sehingga dilakukan pencarian larva dari kedua jenis *Aedes* tersebut. Pengumpulan larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat diambil dalam genangan air, wadah berisi air dan bak mandi. Jentik dan larva nyamuk *Aedes aegypti* serta *Aedes albopictus* dipindahkan ke dalam plastik atau botol lalu dipindahkan ke bak untuk di rearing lebih lanjut.

3.3.2 Rearing *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*

Rearing nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dilakukan dalam ruang insektarium bersuhu $\pm 28^{\circ}\text{C}$ (suhu ruang). Awal pengerjaan rearing yakni dengan memindahkan larva dalam nampan plastik (*tray*) untuk dipelihara hingga berubah menjadi pupa. Setelah itu, larva diberi makanan berupa pelet ikan. Kemudian pupa di ambil dengan pipet plastik dan dipindahkan ke dalam cawan pupa. Lalu cawan pupa dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi

nyamuk dewasa. Di dalam kandang koloni terdapat cawan lain sebagai tempat bertelur nyamuk yang berisi air dan dilengkapi dengan kertas saring berukuran $(3 \times 4) \text{ cm}^2$ yang mengelilingi pinggir mangkuk. Selain itu juga terdapat larutan sukrosa 10% yang ditaruh di dalam *erlenmeyer glass* sebanyak 50 ml sebagai makanan nyamuk jantan dan seekor tikus yang diletakkan pada kandang kecil untuk dihisap darahnya oleh nyamuk betina. Selanjutnya, nyamuk diambil dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator lalu dimasukkan dalam gelas plastik dan ditutup dengan kain kasa pada bagian atasnya yang di tengahnya terdapat lubang tempat memasukkan ujung aspirator untuk memasukkan nyamuk dan diisolasi kelenjar salivanya.

3.3.3 Identifikasi Vektor Potensial DBD

Nyamuk diidentifikasi sebelum dilakukan proses isolasi. 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 untuk memastikan jenis nyamuk yang akan dibedah. Nyamuk dalam gelas plastik dimasukkan ke dalam mesin pendingin selama 10 detik lalu diidentifikasi di bawah mikroskop. Cara membedakan *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat dilihat dari warna dan toraksnya. Pada *Aedes aegypti* terdapat 2 garis putih pada toraksnya dan badannya berwarna kecoklatan, sedangkan *Aedes albopictus* memiliki satu garis berwarna putih pada bagian toraks dan badannya berwarna hitam. Secara mikroskopis juga dapat dibedakan dari bagian mesopimeron pada mesonotumnya, dan dapat dilihat dari bagian anterior kaki. Anterior kaki *Aedes aegypti* bagian femur kaki tengah terdapat strip putih memanjang sedangkan pada *Aedes albopictus* tidak terdapat strip putih memanjang.

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

Sebelum dilakukan pembedahan, gelas benda steril terlebih dahulu ditetesi 50 μL NaCl 0.5% dan nyamuk dibedah secara *microdissection* menggunakan

jarum diseksi. Kelenjar saliva *Aedes* berada di bagian antara toraks dan kepala nyamuk. Dua jarum diseksi diletakkan di bagian toraks dan kepala *Aedes* 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. Kemudian kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain apabila belum bersih. Kelenjar saliva kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam *ependorf* steril yang telah diisi 10 μ L PMSF dalam PBS steril dan disimpan pada suhu -20°C hingga dibutuhkan.

3.3.5 Preparasi Serum Darah

Sampel darah yang digunakan pada penelitian ini berasal dari penderita DBD (rumah sakit Bina Sehat), orang sehat endemik dan neonatus yang diambil dari penduduk endemik di wilayah Jember. Sampel darah neonatus diperoleh dari tali pusar bayi saat kelahiran. Sedangkan sampel darah manusia sehat dan penderita DBD diambil melalui pembuluh darah vena *brachialis*. Dalam pengambilan sampel darah dari penderita DBD diperlukan beberapa data yang harus diketahui untuk memastikan orang tersebut positif menderita DBD. Darah dari pembuluh darah vena *brachialis* di lengan diambil sebanyak 3 ml dan ditampung pada vakutainer tanpa anti-koagulan. Kemudian didiamkan pada suhu ruang selama \pm 30 menit sampai terbentuk lapisan bening pada bagian atas. Lapisan bening diambil dan dimasukkan kedalam *ependorf* steril, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 27⁰C. Bagian supernatan yang merupakan serum darah diambil dan dipindah ke *ependorf* baru, selanjutnya disimpan pada suhu - 20⁰C sebagai stok serum darah.

3.3.6 Analisis *Dot Blot*

Analisis yang digunakan untuk uji imunogenisitas yaitu menggunakan analisis *Dot Blot*. *Dot Blot* merupakan metode sederhana untuk mendeteksi,

menganalisis, dan mengidentifikasi protein spesifik menggunakan membran PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*). Protein yang bersifat imunogenik akan terdeteksi oleh antibodi spesifik dan akan membentuk ikatan diantara keduanya. Ikatan ini akan divisualisasi oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan *constant domain* pada antibodi primer. Antibodi sekunder yang digunakan telah terkonjugasi enzim sebagai substrat pewarna untuk hasil deteksi (Olsen *et al.*, 1997).

Analisis protein pada kelenjar saliva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dilakukan dengan menggunakan ekstrak protein kelenjar saliva yang sebelumnya telah diisolasi. Caranya yakni membran *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) dipotong 2x2 cm dan direndam dalam metanol \pm 1 menit. Kemudian membran direndam 3 menit dalam TBS Ph 7,4 lalu dikeringanginkan. Sampel protein kelenjar saliva ditetaskan di atas membran masing-masing sebanyak 10 μ l dan dibiarkan hingga kering.

Membran yang telah kering diinkubasi dalam “skim milk” 5% yang terlarut dalam TBS selama 1 jam *on shaker*. Kemudian membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS masing-masing selama 5 menit. Setelah itu membran direndam dengan “skim milk” 5% terlarut dalam TBS yang telah ditambahkan antibodi primer (serum darah manusia) dengan perbandingan 1:500 (v/v). Dari 6 potongan membran masing-masing ditambahkan antibodi primer yang berbeda-beda (serum darah orang sehat endemik, pasien DBD, dan neonatus) dan satu potongan membran sebagai kontrol negatif (tanpa ditambahkan antibodi primer).

Setelah itu, semua membran diinkubasi *on shaker* selama 2 jam pada suhu ruang. Kemudian membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS masing-masing selama 5 menit. Proses selanjutnya, membran direndam dengan “skim milk” 5% terlarut dalam TBS yang telah ditambahkan antibodi sekunder (anti human IgG (H&L) (GOAT) Antibody Alkaline Phosphatase Conjugated – 609 – 1502 ROCKLAND dengan perbandingan 1:5000 (v/v) dan diinkubasi *on shaker* selama 2 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS masing-masing selama 5 menit lalu membran dikeringanginkan. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian BCIP/NBT 1-Component sebanyak 5 mL selama

5-10 menit. Hasil akan menunjukkan tanda positif apabila terjadi ikatan antara antigen dan antibodi dengan munculnya lingkaran gelap pada membran PVDF.



BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Analisis imunogenisitas protein dengan menggunakan analisis Dot Blot pada ekstrak kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* menunjukkan adanya reaksi positif yakni interaksi antara antigen dan antibodi pada masing-masing ketiga sampel dengan terbentuknya lingkaran gelap pada membran PVDF pada serum (pasien DBD, penduduk sehat endemik dan neonatus).

5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis imunogenisitas lebih lanjut menggunakan *Western Blot* untuk mengetahui pita protein imunogenik pada kelenjar saliva *Aedes albopictus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras L, Fontaine A, Belghazi M and Bourdon S. (2010): Salivary gland protein repertoire from *Ae aegypti* mosquitoes, Vector Borne and Zoonotic Diseases. 10 (4), 391-402.
- 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.
- Boesri, H. 2011. Biologi dan Peranan *Aedes albopictus* (Skuse) 1894 sebagai Penularan Penyakit. *Aspirator*. 3(2).
- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF and Ribeiro JM. (2006): Function and evolution of a mosquito salivary protein family, *J Biol Chem*, 281 (4), 1935-1942.
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM and James AA. (1995): The salivary gland- specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase. famil,. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 694-698.
- Chen, K., Pohan, H. T., & Sinto, R. 2009. *Diagnosis dan Terapi Cairan pada Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Christophers, S.R. 1960. *Aedes aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure*. London: The Syndics of the Cambridge University Press.
- Clements AN, 1992. *The Biology of Mosquitoes*, Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Deinkes Jatim, 2013. Kajian Masalah Kesehatan Demam Berdarah Dengue,

Badan Litbang dan Pengembangan Kesehatan.Surabaya.

Edelman, R., 2007. Dengue Vaccine Approach the Finish Line. Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine Baltimore St. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 556-560

Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C and Almeras L. (2011): Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host- vector interactions, *Parasit & Vector*, 4, 187.

Gillespie, RD., ML. Mbow, RG. Titus, 2000. The Immunomodulatory Factors of Blood Feeding Arthropod Saliva. *Parasite Immunol*, 22: 319-331.

Hackett SF, Ozaki H and Strauss RW. (2002): Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization, *J Cell Physiol*, 184, 275-84.

James AA, Blackmer K, Marinotti O, Ghosn CR and Racioppi JV. (1991): Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*, *Mol Biochem Parasitol*, 44, 245-254.

James, A.A. 2003. Review : Blocking Malaria Parasitic Invasion of Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206. 3817-3821.

Juhn, J., U. Naeem-Ullah, BAM. Guedes, A. Majid, J. Coleman, PFP. Pimenta, W. Akram, AA. James, O. Marinotti, 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the Dengue vector mosquito *Ae. aegypti*. *Parasites and Vectors*, 41(1): 1-13.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Situasi DBD di Indonesia. *Infodatin Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*.

Kurane, I. 2007. Dengue Hemorrhagic Fever with Special Emphasis on Immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease*. Vol 30:329-40.

Kusriastuti, R. 2005. Kebijakan Penanggulangan Demam Berdarah Dengue Di Indonesia. Jakarta: Depkes R.I.

Kusriastuti, R. 2010. Data Kasus Demam Berdarah Dengue di Indonesia tahun 2009 dan Tahun 2008. Jakarta: Ditjen PP & PL Depkes RI.

- Lestari, K. 2007. Epidemiologi Dan Pencegahan Demam Berdarah Dengue (DBD) di Indonesia. *Farmaka*. Vol. 5 No.3: 12-29.
- Lloyd, LS. 2003. Strategic Report 7. Best Practices for Dengue Prevention and Control in the Americas. Environmental Health Project Contract HRN-I-00-99-00011-00. Office of Health, Infectious Diseases and Nutrition Bureau for Global Health U.S. Agency for International Development Washington, DC 20523.
- Lormeau, VMC. (2009): Dengue viruses binding protein from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary gland, *Virology Journal*, 6 (35), 1-4.
- Malavange G, Fernando S, Senevirante S. 2004. Dengue Viral Infection. *Postgraduate Medical Journal*. Vol.80: 588-601.
- Murrell S, Chin-Wu S and Butler M. (2011): Review of dengue virus and the development of vaccine, *Biotechnology Advances*, 29, 239-247.
- Oktarianti, R., Kartika S., Fatchiyah F., dan Aulanni'am. 2014. Immunogenic Protein From Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against Human Sera. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 101-107.
- Orlandi PE, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoue F, Villard C, Cornelié S, Penhoat K, Pscual A, Bourgouin C, Fontenille D, Bonnet J, Corre-Catelin N, Pages's P, Laffite D, Boulanger D, Simondon FO, Pradines B, Fusa T and Rogier C. (2007): Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa, *Microbes Infect*, 9, 1454-62.
- Rahayu, D. F., dan A. Ustiawan. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Balaba*. 9(1).
- Ribeiro JM, Charlab R and Valenzuela JG. (2001): The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*, *J Exp Biol*, 204, 2001-10.
- Ribeiro JM and Francischetti IM. (2003): Role of Arthropod Saliva in Blood feeding: sialome and post-sialome perspective, *Ann. Rev. Entomol*. 48, 73-78.
- Ribeiro JMC, Arca B, Lombardo F, Calvo E, PhanVM, Chandra PK, and Wikel SK. (2007): An Annotated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito, *Aedes aegypti*, *BMC Genomics*. 8, 6.

- Rios, L., and J.E. Maruniak. 2004. Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Insecta: Diptera: Culicidae). *IFAS Extension University of Florida*.
- Schneider B, Soong L, Zeidner N and Higgs S. (2004): *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunology*. 17 (4), 565-57
- Schreiber MC, Karlo JC and Kovalick GE. (1997): A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen-5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins, *Gene*, 191, 135-41.
- Sim, S., G. Dimopoulos, 2010. Dengue virus inhibit immune repon in *Ae. aegypti* cell. *Plos One*, 5(5): 1-9.
- Sivanathan, M.M.A.P. 2006. The Ecology and Biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera : Culicidae) and The Resistance Status of *Aedes albopictus* (Filed Strain) Against Organophosphates In Penang, Malaysia. *Thesis*.
- Supartha, I. W. 2008. Pengendalian Terpadu Vektor Virus Demam Berdarah Dengue, *Aedes aegypti*(Linn.) dan *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Seminar DiesUnud 2008 Universitas Udayana, Denpasar*.
- Supartha, I W. 2003. *Orasi Ilmiah*. Peranan Pengendalian Hama Terpadu dalam Meningkatkan Pendapatan Petani dan Pelestarian Lingkungan di Era Pasar Global. Pidato Pengukuhan Guru Besar Tetap dalam Bidang Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan pada fakultas Pertanian Universitas Udayana.
- Sylvana, F. Dan G. D. C. M. Pereira. 2002. Demam Berdarah Dengue (DB). Tugas Klinik UPF. Fakultas Kedokteran. Universitas Wijaya Kusuma. Surabaya.
- Titus, R. G., Bishop, J. V., & Mejia, J. S. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for these Factors to Serve as Vaccine to Prevent Pathogen. *Parasite Immunology*. Vol. 28: 131-141.
- Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, Miranda- Santos IKF, Marinotti O, Francischetti IM and Ribeiro JMC. (2002): The D7 family of salivary proteins in blood sucking Diptera, *Insect Mol Biol*, 11 (2), 149-155.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S and Luplertlop N. (2010): Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins, *Proteomics*, 10, 1906-1916.
- Weissenbock H, Hubalek Z, Bakonyi T, Noowotny K. *Zoonotic*. 2010

Mosquito borne Flaviviruses: Worldwide Presence of Agent with Proven Pathogenesis and Potential candidates of Future Emerging Diseases. *Vet Microbiol.* Vol. 140:271-80.

Whitehead, SS., JE. Blaney, AP. Durbin, BR. Murphy, Prospects for a dengue virus vaccine.

WHO. 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition. Geneva: World Health Organization.

