



**AKTIVITAS IN VITRO TROMBOLITIK FRAKSI PROTEIN
IMUNOGENIK 67 kDa DARI KELENJAR SALIVA
Aedes albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae)**

SKRIPSI

Oleh

**Intan Fitri Indrasari
NIM 161810401056**

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



**AKTIVITAS IN VITRO TROMBOLITIK FRAKSI PROTEIN
IMUNOGENIK 67 kDa DARI KELENJAR SALIVA
Aedes albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae)**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Intan Fitri Indrasari
NIM 161810401056**

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

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Orang tua, atas segala dukungan serta doa-doa
2. Keluarga Besar dan Orang Terkasih di Jember Jawa Timur
3. Guru-guru sejak Taman Kanak-Kanak (TK), SD, SMP, SMA, hingga Perguruan Tinggi, atas bimbingan dan dukungannya
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

MOTO

*“Barang siapa yang bersungguh sungguh, sesungguhnya kesungguhan tersebut untuk
kebaikan dirinya sendiri”*

(terjemahan Surah Al-Ankabut ayat 6)*



* Kementerian Agama Republik Indonesia., Yayasan Penyelenggara Penerjemah Al-Quran 2009. Mushaf Al-Quran dan Terjemahan. Bogor : Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Intan Fitri Indrasari

NIM : 161810401056

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas In Vitro Trombolitik Fraksi Protein Imunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)” adalah hasil karya sendiri. Terkait beberapa kutipan yang sudah disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini adalah bagian dari proyek penelitian Dr. Rike Oktianti, M.Si, Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si., dan Syubbanul Wathon, S.Si, M.Si. Saya bertanggung jawab atas kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 20 Juli 2020

Yang menyatakan,

Intan Fitri Indrasari
NIM 161810401056

SKRIPSI

**AKTIVITAS IN VITRO TROMBOLITIK FRAKSI PROTEIN
IMUNOGENIK 67 kDa DARI KELENJAR SALIVA
Aedes albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae)**

Oleh

**Intan Fitri Indrasari
NIM 161810401056**

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas In Vitro Trombolitik Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua

Dr. Rike Oktarianti, M.Si
NIP 196310261990022001

Anggota II,

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

Anggota I

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

Anggota III,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes
NIP 196008161989021001

Mengesahkan
Dekan

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

RINGKASAN

Aktivitas In Vitro Trombolitik Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae); Intan Fitri Indrasari, 161810401056; 2020: 63 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyakit jantung koroner termasuk sindrom koroner akut akibat penyempitan arteri koroner yang disebut *arteriosclerosis*. Penyakit kardiovaskuler disebabkan oleh gangguan fungsi jantung dan pembuluh darah. Aspirin merupakan obat anti platelet untuk pencegahan primer dan sekunder penyakit jantung koroner. Efektivitas aspirin memiliki keterbatasan, karena pada 10–20% pasien yang menggunakan aspirin tetap mengalami penyumbatan vaskuler. Protein yang terdapat pada kelenjar saliva nyamuk *Ae. albopictus* yaitu *apyrase* diindikasikan mampu berperan dalam menghambat agregasi platelet (penggumpalan). Berdasarkan hasil penelitian menggunakan analisis *Western Blot* dengan sampel protein dari kelenjar saliva *Ae. albopictus*, protein dengan berat molekul 67 kDa merupakan protein imunogenik yang diduga mengandung *Apyrase*. *Apyrase* dapat ditemukan pada protein antara berat molekul 61-68 kDa. Pada penelitian ini dianalisis aktivitas fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Aedes albopictus* dalam menghambat agregasi platelet yang diindikasikan memiliki kemampuan yang sama dengan Aspirin.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *rearing* nyamuk *Aedes albopictus*, identifikasi dan isolasi kelenjar saliva *Aedes albopictus*, analisis profil protein kelenjar saliva *Aedes albopictus* menggunakan metode SDS-PAGE, purifikasi protein menggunakan metode elektroelusi dan dialisis, serta uji agregasi platelet menggunakan PRP (*Platelet Rich Plasma*) penduduk endemik Jember atau yang telah lama menetap. Pada penelitian ini menggunakan 2 kontrol negatif. Kontrol negatif 1 (perlakuan) menggunakan PBS 1 mM pH 7,4 dan kontrol negatif 2 tidak menggunakan tambahan apapun, serta untuk kontrol positif menggunakan Aspirin dengan dua konsentrasi yang berbeda yaitu 0,1 mg/mL dan 2 mg/mL. Sampel yang digunakan

adalah protein 67 kDa konsentrasi 0,1 mg/mL dan Ekstrak Total Protein Kelenjar Saliva konsentrasi 0,1 mg/mL. Uji agregasi platelet dilakukan dengan metode agregasi platelet yaitu penambahan PRP dengan *agonist*.

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah 5 sampel PRP individu dengan penambahan 0,1 mg/mL protein 67 kDa didapatkan persentase penghambatan agregasi platelet antara 3-37%. Sampel protein 67 kDa tersebut memiliki persentase penghambatan lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai penghambatan kedua kontrol positif, kedua kontrol negatif dan sampel ekstrak total protein. Kontrol positif Aspirin dengan konsentrasi 0,1 mg/mL memiliki nilai penghambatan agregasi platelet sebesar 5%, sedangkan Aspirin dengan konsentrasi 2 mg/mL memiliki penghambatan yang lebih tinggi yaitu 17%. Kemudian persentase penghambatan dari ekstrak total protein 0,1 mg/mL yaitu 1%. Berdasarkan hasil persentase tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Aedes albopictus* dengan konsentrasi 0,1 mg/mL mengandung *apyrase* yang dapat menunjukkan adanya aktivitas penghambatan agregasi platelet.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas In Vitro Trombolitik Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. Dr. Rike Oktarianti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang dengan penuh kesabaran dan perhatian telah memberi arahan dan meluangkan waktu dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
2. Syubbanul Wathon, S.Si, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah memberikan bimbingan serta meluangkan waktu dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini serta selalu memberi arahan dalam bekerja di laboratorium;
4. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Dr. Retno Wimbaningrum, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta motivasi selama masa perkuliahan;
6. Bapak/Ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama perkuliahan;
7. Staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan LSIH Universitas Brawijaya yang telah membantu kelancaran penulis dalam melakukan penelitian;

8. Ayah dan Ibu tercinta yang telah memberikan curahan kasih sayang, dukungan, motivasi, serta doa yang tulus;
9. Orang terkasih yang telah memberikan semangat dan dukungan;
10. Rekan kerja seperjuangan Nadya Rismana Fitriani, Nuril Azizah, Ahmad Tosin, Ratis Nour sholichah, Yasir Mubarak, M. Khalid, dan Riana Agatha Listiani yang selama ini telah bekerjasama dan memberi dukungan;
11. Kakak-kakak seperjuangan grup riset, Elisa Erni dan Rochmatul Nuryu yang telah memberikan arahan dan dukungan selama bekerja di laboratorium serta adik-adik seperjuangan;
12. Teman karib Ersalina Saufika, Selvi Riasbela, Nadya Rismana Fitriani, Anggun Kusuma Wardani, Nada Nisrina Maulidya, Fitri Azhari, Nana Zaimatul Husna yang selalu memberikan motivasi serta dukungan selama masa perkuliahan;
13. Teman-teman BANANA angkatan 2016 atas motivasi, dukungan serta kerja sama selama masa perkuliahan;
14. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Jember, 20 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Penyebaran dan Karakteristik <i>Ae. albopictus</i>	4
2.2 Kandungan Protein & Fungsi Biologis Kelenjar Saliva <i>Aedes</i>	7
2.3 Aktivitas Agregasi Platelet dalam Sistem Hemostasis.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.3 Rancangan Penelitian	15
3.4 Prosedur Penelitian.....	16
3.4.1 <i>Landing Collection dan Rearing Ae. albopictus.....</i>	16

3.4.2	Identifikasi Morfologi <i>Ae. albopictus</i>	17
3.4.3	Isolasi Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	17
3.4.4	Isolasi dan Purifikasi Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>	18
3.4.5	Uji Agregasi Platelet Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa Saliva <i>Ae. albopictus</i>	19
BAB. 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		21
4.1 Identifikasi Karakteristik Morfologi dan Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk <i>Ae. albopictus</i>.		21
4.2 Analisis Aktivitas Trombolitik Kelenjar Saliva <i>Ae. albopictus</i>		24
4.2.1	Profil dan Purifikasi Protein Kelenjar Saliva <i>Ae.</i> <i>albopictus</i>	24
4.2.2	Uji agregasi platelet.....	26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN		31
5.1 Kesimpulan		31
5.2 Saran		31
DAFTAR PUSTAKA		32

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peta penyebaran <i>Ae. albopictus</i>	4
2.2 Karakteristik nyamuk <i>Ae. Albopictus</i>	6
2.3 Peran protein kelenjar saliva	9
2.4 Mekanisme agregasi platelet dan pembentukan <i>thrombus</i>	10
2.5 Mekanisme agregasi pletelet pada <i>vascular</i>	12
3.1 Diagram alir penelitian.....	15
3.2 Isolasi kelenjar saliva teknik <i>microdissection</i>	18
4.1 Morfologi <i>Mesepimeron, Mesonotum, dan Femur Ae. albopictus</i>	21
4.2 Perbedaan <i>Ae. albopictus</i> Jantan dan Betina	23
4.3 Kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i>	24
4.4 Profil protein kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i>	25
4.5 Ilustrasi pembacaan nilai absorbansi.....	27
4.6 Grafik persentase penghambatan agregasi platelet.	28
4.7 Mekanisme <i>apyrase</i> dalam menghambat agregasi platelet.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
I. I. Komposisi Larutan	41
II. Perhitungan Pita Protein SDS PAGE	44
III. Grafik Regresi dan Perhitungan Bradford (EPKS).....	45
IV. Hasil Preparasi PRP	46
V. Uji Agregasi Platelet	47
VI. <i>Ethical clearance</i>	48

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Tidak Menular (PTM) sebagai penyebab kematian nomor satu di dunia adalah penyakit kardiovaskuler (Kemenkes RI, 2013). Penyakit kardiovaskuler disebabkan oleh gangguan fungsi jantung dan pembuluh darah (Berry *et al.*, 2012). Kejadian penyakit kardiovaskuler di Indonesia diperkirakan sebanyak 17,3 juta kasus dan lebih dari 3 juta kematian terjadi sebelum usia 60 tahun. Penyakit kardiovaskuler diantaranya jantung koroner, serangan jantung, aritmia, gagal jantung, dan stroke (Kemenkes RI, 2013). *World Health Organization* (WHO) mencatat pada tahun 2002 lebih dari 7 juta orang di dunia meninggal akibat penyakit jantung koroner dan diperkirakan meningkat hingga 11 juta orang pada tahun 2020 (Iskandar *et al.*, 2017). Penyakit jantung koroner termasuk sindrom koroner akut akibat penyempitan arteri koroner yang disebut *arteriosclerosis*. Penyempitan arteri tersebut akibat adanya lemak jenuh yang disebut *atherosclerosis*. Pecahnya plak *atherosclerosis* dapat diikuti dengan perlekatan, aktivasi *clotting cascade*, dan agregasi platelet. Hal tersebut menyebabkan fibrin dan platelet membentuk koagulasi darah yang mengakibatkan darah terhambat pada saluran pembuluh darah (Aziz dan Yadav, 2016).

Obat anti-platelet di Indonesia salah satunya adalah aspirin. Aspirin diindikasikan untuk pencegahan primer dan sekunder penyakit jantung koroner. Terapi anti-platelet standar menggunakan aspirin memiliki efek trombolitik. Mekanisme kerja aspirin berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivasi secara permanen aktivitas *Cyclooxygenase* (COX), dengan mengasetilasi secara *irreversible* gugus hidroksil dari residu serin tunggal pada rantai *polipeptida sintase* platelet COX-1 sehingga dapat menurunkan sintesis *Tromboxan A2* (TXA₂), *Prostaglandin H₂*, dan *Prostaglandin E₂* yang berperan penting sebagai vasokonstriktor dan agregator platelet (Miladiyah, 2012). Efektivitas aspirin memiliki keterbatasan karena pada 10–20%

pasien yang menggunakan aspirin tetap mengalami penyumbatan vaskuler (Yunita *et al.*, 2015).

Protein yang terdapat pada kelenjar saliva *arthropoda* mampu berperan dalam menghambat agregasi platelet ketika vektor melakukan *blood feeding* (Fontaine *et al.*, 2011). *Arthropoda* yang memiliki kelenjar saliva dengan karakteristik tersebut salah satunya adalah nyamuk *Ae. albopictus* sebagai vektor sekunder penyebaran DBD. Protein kelenjar saliva pada Genus *Aedes* telah banyak diteliti mengandung beberapa substansi penting berupa imunomodulator dan vasodilator yang berperan dalam proses transmisi patogen ketika *blood feeding* (Andrade *et al.*, 2005).

Berdasarkan hasil penelitian Oktarianti *et al.* (2014) terdapat dua protein imunogenik pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa. Protein imunogenik tersebut kemudian dianalisis menggunakan *Liquid Chromatography Tandem Repeat Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) dan diketahui bahwa protein 31 kDa teridentifikasi sebagai protein *family D7* pada berat molekul 37 kDa serta protein 56 kDa teridentifikasi sebagai *Apyrase* pada berat molekul 62 kDa (Oktarianti *et al.*, 2015). Menurut Doucoure *et al.* (2013) protein imunogenik pada kelenjar saliva nyamuk *Ae. albopictus* terdeteksi pada protein dengan berat molekul 60-70 kDa. Kemudian berdasarkan hasil penelitian menggunakan analisis *Western Blot* dengan sampel protein dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* disebutkan bahwa protein dengan berat molekul 67 kDa merupakan protein imunogenik yang diduga mengandung *Apyrase* (Khasanah, 2019). *Apyrase* dapat ditemukan pada protein antara berat molekul 61-68 kDa (Doucoure *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2001).

Apyrase merupakan salah satu enzim yang terdapat pada kelenjar saliva *Haematophagous Arthropoda* yang mampu menghambat agregasi platelet. *Apyrase* terdeteksi di dalam kelenjar saliva nyamuk. *Apyrase* dapat menghidrolisis *Adenosine Triphosphate* (ATP) dan *Adenosine Diphosphate* (ADP) menjadi *Adenosine Monophosphate* (AMP) dan *Inorganic Phosphate* (Pi) (Hughes, 2013). ADP dapat berperan penting sebagai inducer saat terjadi agregasi platelet (Periayah *et al.*, 2016). Berdasarkan hal tersebut diatas maka diperlukan analisis lebih lanjut terhadap fraksi

protein imunogenik 67 kDa kelenjar saliva pada vektor *Ae. albopictus* yang diduga mengandung komponen *Apyrase* dalam menghambat agregasi platelet dan berpotensi sebagai agen trombolitik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana kemampuan fraksi protein imunogenik 67 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* dalam menghambat agregasi platelet?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan fraksi protein imunogenik 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus* dalam menghambat agregasi platelet.

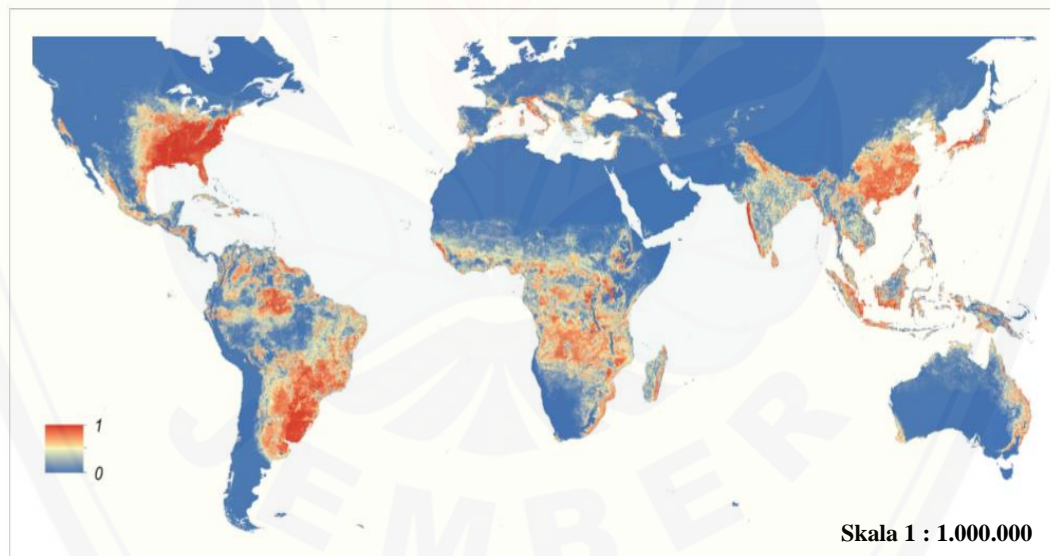
1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi protein imunogenik 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus* sebagai agen trombolitik untuk dapat dikembangkan menjadi protein terapeutik.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyebaran dan Karakteristik *Ae. albopictus* Sebagai Vektor Sekunder DBD

Penyebaran populasi *Ae. albopictus* sangat luas yaitu melebihi 2/3 dari luas dunia. *Ae. albopictus* merupakan golongan *Arthropoda* yang berasal dari wilayah timur yaitu Asia Tenggara, Kepulauan Pasifik dan India. Kemudian nyamuk *Ae. albopictus* ini menyebar selama beberapa dekade terakhir ke Afrika, Timur Tengah, Eropa dan Benua Amerika (Utara dan Selatan) selama awal abad ke-20 (Trajer *et al.*, 2017). Nyamuk *Ae. albopictus* di Asia Tenggara tersebar hampir di seluruh pulau-pulau Indonesia yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Kraemer *et al.*, 2015).



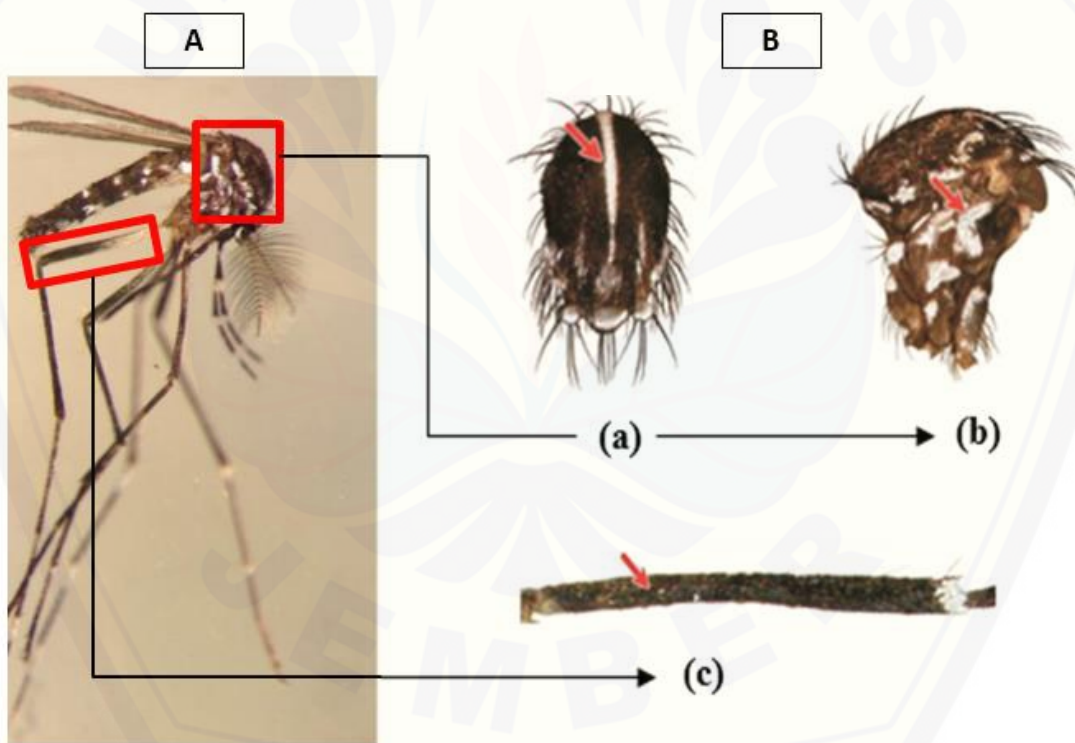
Gambar 2.1 Peta penyebaran *Ae. albopictus*. Warna skala menunjukkan rentang kepadatan populasi nyamuk *Ae. albopictus* (Skala 0 berwarna biru = rendah; Skala 1 berwarna merah = tinggi) (Kraemer *et al.*, 2015)

Ae. aegypti berperan sebagai vektor primer penyebaran DBD dan *Ae. albopictus* sebagai vektor sekundernya (Luplertlop, 2014). Habitat nyamuk *Ae. albopictus* berada di luar ruangan (*outdoor*) karena memiliki kemampuan yang baik untuk beradaptasi dengan lingkungan. Nyamuk *Ae. albopictus* menyukai lingkungan yang lembab, ternaungi, dan tidak panas. Tempat perindukan yang baik bagi larva nyamuk *Ae. albopictus* adalah didalam potongan bambu, kaleng bekas, botol pecah, ban bekas, keramik, pot bunga, dan dapat juga pada ketiak daun (Boesri, 2011). Selain itu, nyamuk *Ae. albopictus* juga memiliki sifat *anthropophilic* yaitu lebih menyukai darah manusia dari pada darah hewan (Rahana *et al.*, 2016).

Secara bioekologis, fase pra-dewasa *Ae. albopictus* yang berupa telur, larva dan pupa berada di wilayah *aquatic* (perairan), sedangkan pada fase nyamuk dewasa berada di wilayah daratan (*terrestrial*) atau udara (*aborial*). Keberadaan nyamuk dewasa banyak ditemukan di pohon, kebun atau kawasan pinggir hutan. Oleh karena itu, *Ae. albopictus* sering disebut nyamuk kebun (Supartha, 2017). Pengamatan fase pra-dewasa pada bagian telur, larva, dan pupa menggunakan mikroskop. Telur *Ae. albopictus* berukuran $\pm 0,5-0,7$ mm dan berwarna hitam serta berbentuk lonjong dengan salah satu bagian ujungnya tumpul (Boesri, 2011), sedangkan telur *Ae. aegypti* juga berwarna hitam dan berbentuk bulat panjang berukuran $\pm 0,5-0,8$ mm (Bova *et al.*, 2016). Larva *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti* memiliki *Anntena* pendek dan kepala berbentuk bulat silindris. Perbedaan larva *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti* terdapat pada *Terminal Segment* di bagian *Comb Scale* dan *Pecten Teeth*. Abdomen ke-8 pada larva *Ae. albopictus* memiliki satu baris sisik sikat (*comb scale*) yang sisi lateralnya terdapat duri-duri dengan satu berkas rambut serta gigi pekten (*pectin teeth*) yang ujungnya meruncing. Kemudian pada larva *Ae. aegypti* memiliki sisik sikat (*comb scale*) dengan sisi lateralnya terdapat duri-duri dengan banyak berkas rambut serta gigi pekten (*pecten teeth*) yang runcing yang dapat dilihat pada Gambar 4.2 (Malar, 2006). Larva *Aedes* pada bagian *Comb Scale* dan *Pecten Teeth* pada penelitian ini tidak berhasil diamati karena ukurannya yang terlalu kecil serta mudah menghilang dan rusak. Selanjutnya, pupa *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* memiliki ciri morfologi yang sama yaitu

cephalothorax tebal berbentuk seperti tanda koma dan abdomen yang dapat bergerak vertikal membentuk setengah lingkaran seperti pada Gambar 4.1 (Boesri, 2011).

Karakter morfologi dari *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.2. Menurut Rahayu dan Ustiawan (2013), ciri morfologi dari nyamuk ini berbeda dengan genus *Aedes* lainnya seperti *Ae. aegypti*. *Scutum* yang terdapat pada *mesonotum* *Ae. albopictus* hanya berisi satu deretan sisik putih tebal pada *thorax* bagian dorsal yang dapat dilihat pada poin (a). Bagian *mesepimeron* dari *Ae. albopictus* ini memiliki sekumpulan sisik putih yang menyatu seperti *boomerang*, dapat dilihat pada poin (b). Femur anterior *Ae. albopictus* berwarna hitam dapat dilihat pada poin (c).



Gambar 2.2 (A) Karakteristik *Ae. Albopictus* whole body (Trajer *et al.*, 2017) dan (B) Ciri morfologi nyamuk *Ae. albopictus* (a) *Mesonotum* (b) *Mesepimeron* (c) *Femur anterior* (Rueda, 2004)

2.2 Kandungan Protein dan Fungsi Biologis Kelenjar Saliva Genus *Aedes*

Hemostasis inang dapat terganggu aktivitasnya akibat adanya komponen anti-hemostasis pada saliva nyamuk (Fontaine *et al.*, 2011). Nyamuk dapat melakukan mekanisme untuk menghambat terjadinya koagulasi saat melakukan *blood feeding*. Ketika proses *blood feeding* berlangsung, kelenjar saliva nyamuk melepaskan berbagai komponen yang meliputi anti-histamin, faktor vasodilator seperti, antikoagulan (*apyrase*), *takikinin* dan faktor imunomodulator untuk mempermudah proses *blood feeding* (Fontaine *et al.*, 2011). Protein yang terdapat pada kelenjar saliva Genus *Aedes* dan fungsinya dapat dilihat pada Tabel 2.1.

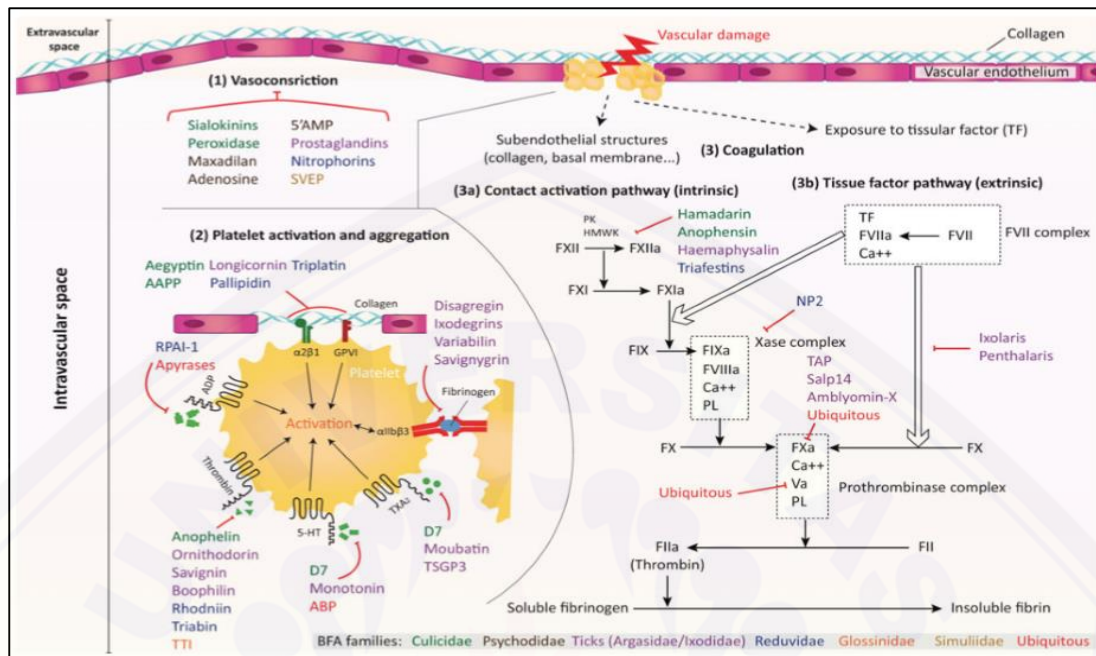
Tabel 2.1 Komponen kelenjar saliva *Aedes* dan fungsi biologisnya

No	Nama Protein	Berat Molekul (kDa)	Aktivitas dan Fungsi Biologis	Referensi
1.	SGS	200-500	spesifik protein imunogenik	f
2.	Saglin	72-100	spesifik protein imunogenik	f, n
3.	<i>Apyrase, a-glucosidase</i>	61-68, 67	anti agregasi platelet, <i>sugar digestion</i> dan alergen	a, c, d, e, g, h, l, q
4.	<i>Adenosin deaminase, anticoagulant-factor xa</i>	50-60	anti koagulan, antiinflamasi, antihemostasis	a, c, d, e, g, h, o
5.	Serpin	40-49	inhibitor protease	a, c, e, g, i, j, k
6.	Aed a X1, Aed a X2	37-44	antikoagulan, antiinflamasi, alergi	a, c, e, g, i, j, k
7.	D7 salivary protein	31-37	menghambat aksi amina biogenic, vasodilator, antikoagulan, immunomodulator	a, b, c
8.	<i>Angiopietins-like protein</i>	23-30	regulator utama metabolisme lipoprotein	m

No	Nama Protein	Berat Molekul (kDa)	Aktivitas dan Fungsi Biologis	Referensi
9.	<i>Lectins</i> <i>Lysozyme</i>	17-20 -	opsonisasi, pengenalan sistem imun	g, k
10.	<i>Gambicin lysozyme</i> <i>defensins</i>	6.8	aktivitas antimikrobia	P

Sumber: (a) Almeras *et al.*, 2010; (b) Calvo *et al.*, 2006; (c) Doucoure *et al.*, 2013, (d) Fontaine *et al.*, 2011; (e) Juhn *et al.*, 2011; (f) King *et al.*, 2001; (g) Luplertlop, 2014; (h) Oktarianti *et al.*, 2015; (i) Peng *et al.*, 1998 ; (j) Peng *et al.*, 1999; (k) Peng *et al.*, 2007; (l) Peng *et al.*, 2016; (m) Schreiber *et al.*, 1997; (n) Septiawan *et al.*, 2017, (o) Stark dan James, 1998; (p) Vizioli *et al.*, 2001; (q) Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010

Protein imunogenik terdapat pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Kelenjar saliva *Ae. aegypti* mengandung protein imunogenik pada berat molekul 31 kDa dan 56 kDa (Oktarianti *et al.*, 2015), sedangkan protein imunogenik pada kelenjar saliva nyamuk *Ae. albopictus* terdeteksi pada protein dengan berat molekul 60-70 kDa (Doucoure *et al.*, 2013). Berdasarkan penelitian Oktarianti *et al.* (2015), protein imunogenik dari kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* dianalisis menggunakan *Liquid Chromatography – Tandem Repeat Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) dan diketahui bahwa protein 31 kDa teridentifikasi sebagai protein D7 pada berat molekul 37 kDa serta protein 56 kDa teridentifikasi sebagai *apyrase* pada berat molekul 62 kDa. Kemudian berdasarkan hasil penelitian menggunakan analisis *Western Blot* pada nyamuk *Ae. albopictus* diketahui bahwa protein dengan berat molekul 67 kDa merupakan protein imunogenik yang diduga mengandung *apyrase* (Khasanah, 2019). *Apyrase* dapat ditemukan pada protein antara berat molekul 61-68 kDa (Doucoure *et al.*, 2013 dan Peng *et al.*, 2001). Protein *apyrase* dimiliki oleh golongan *Arthropoda* famili *Culicidae* (Fontaine *et al.*, 2011).



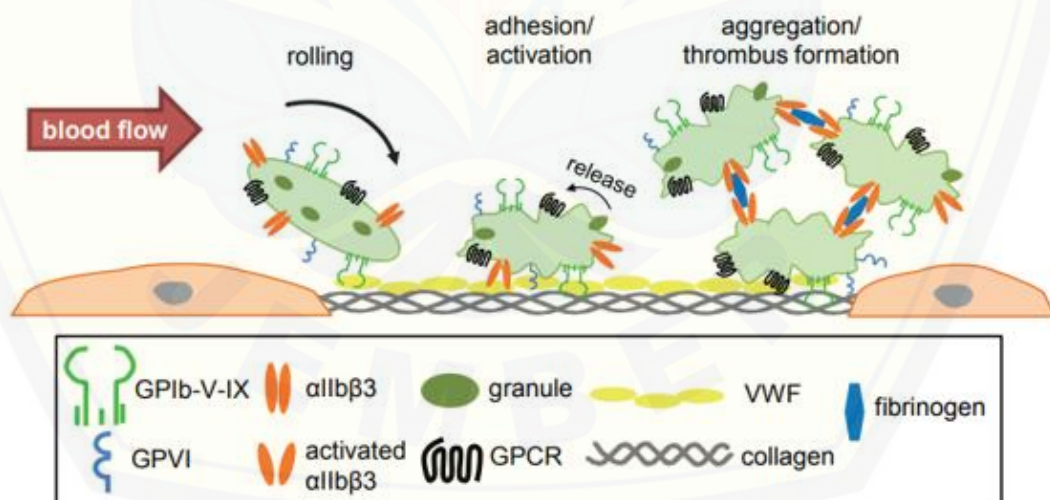
Gambar 2.3 Peran protein kelenjar saliva (Fontaine *et al.*, 2011)

Mekanisme nyamuk melakukan *blood feeding* bertujuan untuk mencegah darah agar tidak menggumpal. Paparan dari tusukan *proboscis* nyamuk akan menimbulkan inflamasi akibat respon imun dari tubuh. *Proboscis* nyamuk menusuk ke dalam *endothelium* inang sehingga rusaknya pembuluh darah akan mengaktifkan platelet akibat aktivitas dari kolagen dan reseptor-reseptor yang ada di permukaan platelet diantaranya *glikoprotein*, *GPCR*, dan *integrin* (Fontaine *et al.*, 2011) yang dapat dilihat pada Gambar 2.3. ADP memiliki fungsi penting dalam menjaga hemostasis, karena mampu menginduksi aktifnya agregasi platelet dalam upaya mempercepat pembekuan darah dibagian tubuh yang terluka (Iyu *et al.*, 2015). Namun dengan adanya komponen antikoagulan seperti *apyrase* pada saliva nyamuk, menyebabkan proses agregasi platelet terhambat (Hughes, 2013). ADP yang secara normal dapat berikatan dengan GPCR dan berperan sebagai induser terbentuknya *trombus*, menjadi terhambat interaksinya. Komponen *apyrase* mampu menghambat terbentuknya agregat sehingga nyamuk dapat mudah melakukan *blood feeding*. *Apyrase* termasuk *nukleosida trifosfat-*

difosfohidrolase pada organisme *haematophagus* yang merupakan anggota dari kelompok gen pengkode *5' nucleotidase*. *Apyrase* berperan dalam proses *blood feeding* karena mampu menghidrolisis ADP menjadi AMP dan fosfat inorganik dalam menghambat agregasi platelet yang dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Hughes, 2013).

2.3 Aktivitas Agregasi Platelet dalam Sistem Hemostasis

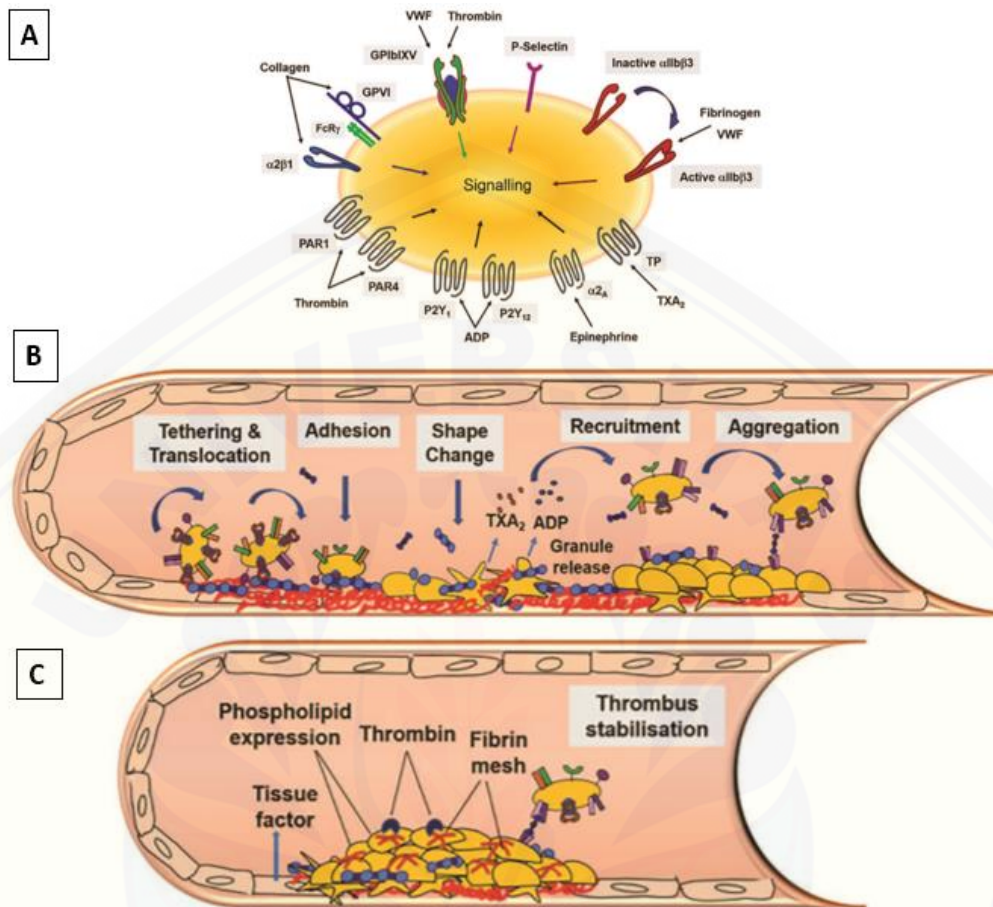
Platelet merupakan bagian di dalam darah yang memiliki peranan penting dalam kaitannya dengan hemostatis. Platelet (trombosit) dihasilkan dalam sumsum tulang dengan cara melepaskan diri (fragmentasi) dari perifer sitoplasma sel induknya (megakariosit) melalui rangsangan *trombopoetin*. Agregasi platelet merupakan perlekatan antar sesama trombosit. Ketika platelet dalam keadaan tidak teraktivasi, asam sialik yang terdapat pada permukaan platelet bermuatan negatif, sehingga antar platelet yang satu dengan yang lain saling menolak dan tidak terjadi perlekatan (Twomey *et al.*, 2018).



Gambar 2.4 Mekanisme agregasi platelet dan pembentukan *thrombus* (Gizt, 2013)

Komponen yang terlibat dalam agregasi platelet adalah endotelium yang melapisi pembuluh darah, platelet, fibrinogen dan faktor koagulasi. Kerusakan vaskuler menyebabkan terbukanya *Sub-endothelial Extracellular Matrix* (ECM), sehingga protein-protein reseptor akan aktif saat terjadi interaksi platelet. Protein-protein reseptor diantaranya GPIb-V-IX, GPVI, *Integrin* (α IIb β 3), dan GPCR. Inisiasi awal pada kerusakan dinding pembuluh arteri yaitu kolagen akan menutup di area luka dan terjadi interaksi antara *glycoprotein* GPIb-V-IX dengan *Von Willebrand Factor* (VWF). Platelet dapat berinteraksi dengan kolagen melalui reseptor GPVI yang memicu platelet aktif dan bergerak menuju kolagen. Hal tersebut juga menyebabkan aktifnya GPCR dan protein *integrin* (α IIb β 3) sehingga terjadi pelepasan granula yang berisi ADP dan *Tromboxan A2* (TxA2). *Integrin* (α IIb β 3) yang aktif akan menyebabkan fibrinogen teraktivasi dan menjadi jembatan antar platelet sehingga membentuk *thrombus* seperti yang terlihat pada Gambar 2.4 (Gizt, 2013; Jackson, 2007).

Agregasi platelet dapat dirangsang oleh *Adenosine Diphosphate* (ADP) yang berperan sebagai induser (Periyah *et al.*, 2016). Platelet membentuk agregasi atau gumpalan saat terjadi luka pada pembuluh darah. Agregat tersebut terbentuk dari agregat-agregat platelet yang disebut dengan *thrombus*. Adanya kontak permukaan dan pembebasan ADP dari platelet lain yang melekat ke permukaan endotel menjadi awal terjadinya agregasi yang disebut gelombang agregasi primer (*reversibel*). Selanjutnya semakin banyak platelet, maka semakin banyak membebaskan ADP sehingga terjadi gelombang agregasi sekunder (*irreversibel*) (Ghoshal dan Bhattacharyya, 2014) yang dapat dilihat pada Gambar 2.5.

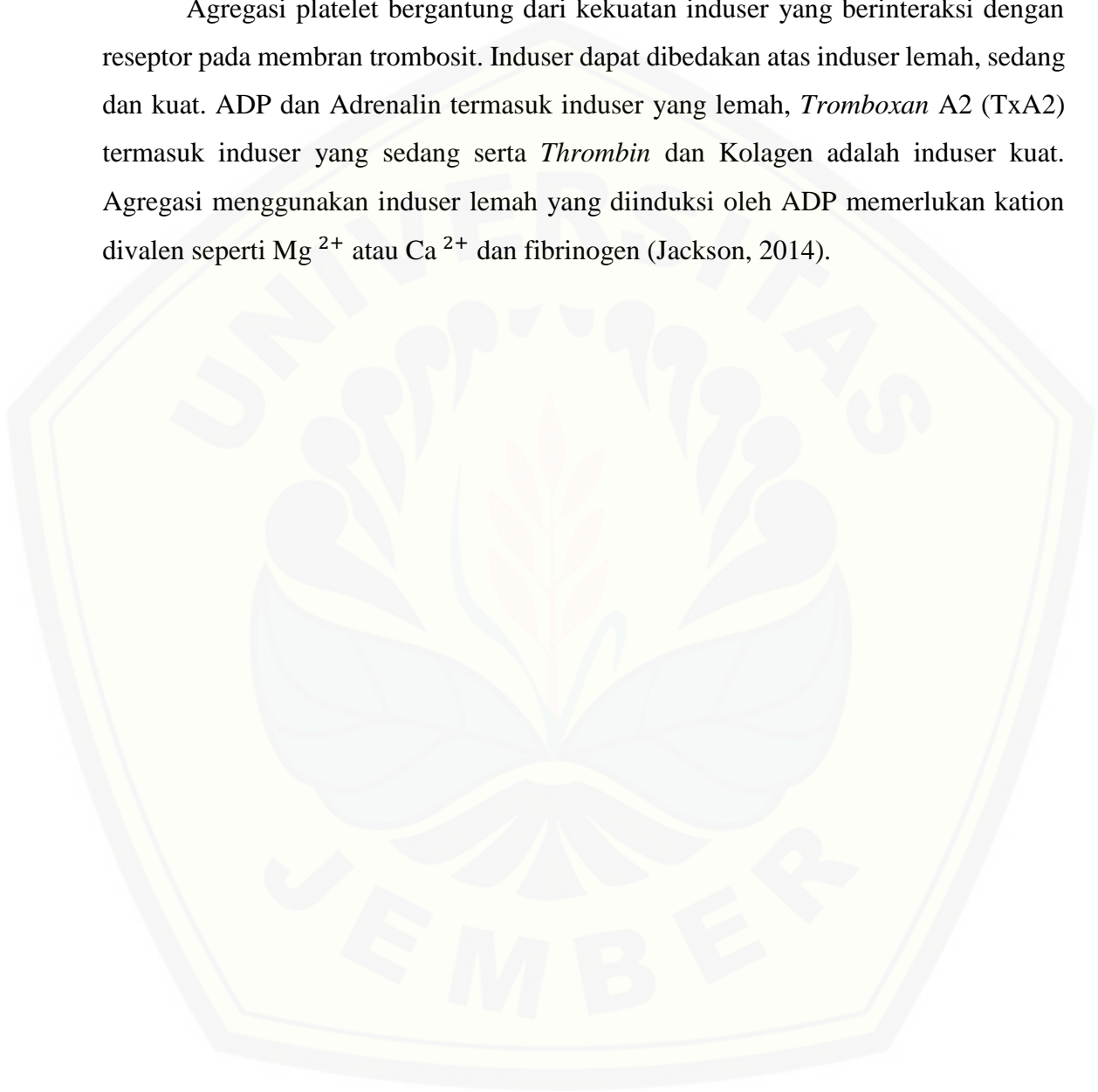


Gambar 2.5 Mekanisme agregasi pletelet pada *vascular*. (A) *Signaling*, (B) *Haemostasis primer* (C) *Haemostasis sekunder* (Twomey *et al.*, 2018)

Platelet yang aktif akan membebaskan ADP yang kemudian akan berikatan dengan reseptor membran platelet lainnya. Adanya ikatan tersebut akan mengakibatkan aktifnya enzim fosfolipase yang dapat menghidrolisis fosfolipid di membran platelet menjadi asam arakhidonat. Asam arakhidonat berperan penting dalam agregasi melalui jalur prostaglandin. Asam arakhidonat diubah di sitoplasma platelet oleh *Cyclooxygenase* (Miladiyah, 2012). Agregasi platelet memegang peranan penting

dalam patogenesis trombosis akut pada penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (Jagroop *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2001).

Agregasi platelet bergantung dari kekuatan induser yang berinteraksi dengan reseptor pada membran trombosit. Induser dapat dibedakan atas induser lemah, sedang dan kuat. ADP dan Adrenalin termasuk induser yang lemah, *Tromboxan A2* (TxA2) termasuk induser yang sedang serta *Thrombin* dan Kolagen adalah induser kuat. Agregasi menggunakan induser lemah yang diinduksi oleh ADP memerlukan kation divalen seperti Mg^{2+} atau Ca^{2+} dan fibrinogen (Jackson, 2014).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada November 2019 hingga Juli 2020, bertempat di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Sentral Hayati Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan

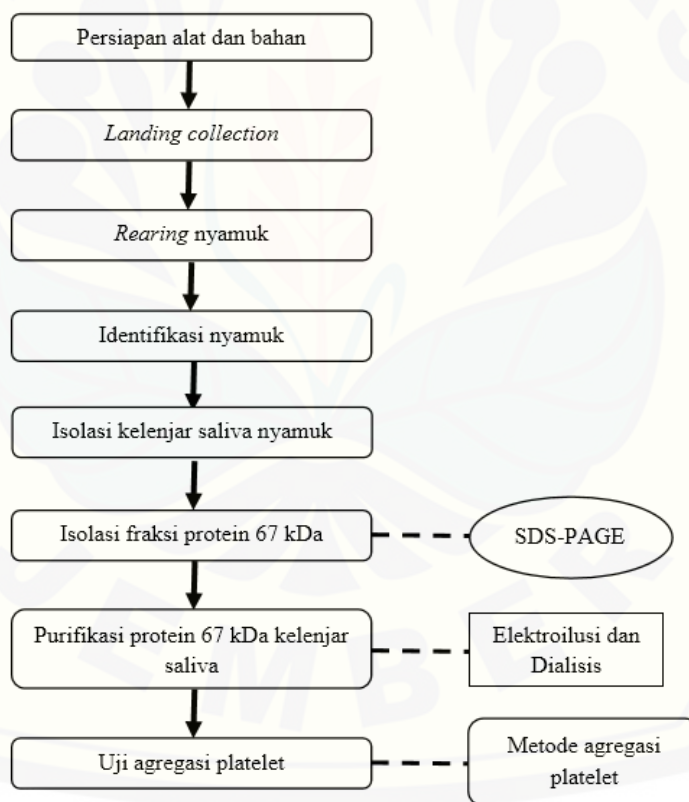
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang nyamuk, pipet plastik, kertas saring, cawan plastik, *tray*, kapas, sungkup tikus, erlenmeyer, aspirator, kain kasa, kain handuk, tabung air yang terbuat dari plastik dan batok kelapa, penutup kawat, mikroskop stereo, jarum diseksi, *object glass*, *beaker glass*, *petri dish*, mikropipet, mikrotip (ukuran 0,5-10 μL , 10-100 μL , dan 100-1000 μL), *microtube* ukuran 1,5 ml, *ice box*, *ice gel*, tisu, *sentrifuge* (Hettich, Jerman), alat SDS-PAGE (Bio-Rad, USA), alat Elektroeluter (Bio-Rad, USA), parafilm, pinset, *thermoshaker*, kompor, gunting penjepit, *magnetic stirrer*, *vacutainer* EDTA (*vaculab EDTA K3*, Indonesia), Nano-Drop, *microplate* dan *microplate reader*.

Bahan-bahan yang dipergunakan terdiri dari nyamuk *Ae. albopictus*, tikus wistar, larutan sukrosa 10%, NaCl 0,5 %, alkohol 70%, *Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride* (PMSF) 1 mM, *buffer* sampel (Tris HCl 1 M pH 6,8, Gliserol 50%, SDS 10%, β -mercaptoethanol, *bromophenol blue*), *buffer* elektroda pH 8,3 (*Tris Base*, *Glycine*, SDS 0,1%), *Acrylamide/Bis-acrylamide* 30% (Sigma-Aldrich, USA), SDS 10%, Tris Cl 1,5 M pH 8,8 dan 0,5 M pH 6,8, larutan staining (*Coomassie Brilliant Blue*, *Methanol*, Asam Asetat Glasial, H₂O), APS 10% (*Bio-Rad*, USA), TEMED (*Sigma-Aldrich*, USA), Marker Protein (*GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder*- Korea

Selatan), *surgical blade*, membran selofan, PBS 1 mM pH 7,4, *etanol absolute*, PRP (*Platelet Rich Plasma*) manusia, ADP (*Sigma-Aldrich*, USA) dan Aspirin (*Cardio Aspirin*, Indonesia).

3.3 Rancangan Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dari preparasi alat, *rearing Ae. albopictus*, identifikasi nyamuk *Ae. albopictus*, isolasi kelenjar saliva *Ae. albopictus*, isolasi fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus*, purifikasi protein 67 kDa, dan uji agregasi platelet. Prosedur penelitian secara detail dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 *Landing Collection* dan *Rearing Ae. albopictus*

Ae. albopictus yang digunakan pada penelitian ini berasal dari hasil *landing collection* yang dilakukan didalam lingkungan Universitas Jember. Nyamuk hasil *landing collection* kemudian *direaring* pada *Animal Care Unit* Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. *Landing collection* larva dan nyamuk *Ae. albopictus* dilakukan di luar ruangan yaitu dengan memasang kendi berisi air yang diletakkan di pekarangan atau lahan kosong. Alat yang digunakan untuk menangkap nyamuk adalah aspirator. Nyamuk yang tertangkap kemudian dimasukkan ke dalam jebakan berupa gelas kertas yang ditutup kain kasa dan kapas dengan dirapatkan menggunakan karet.

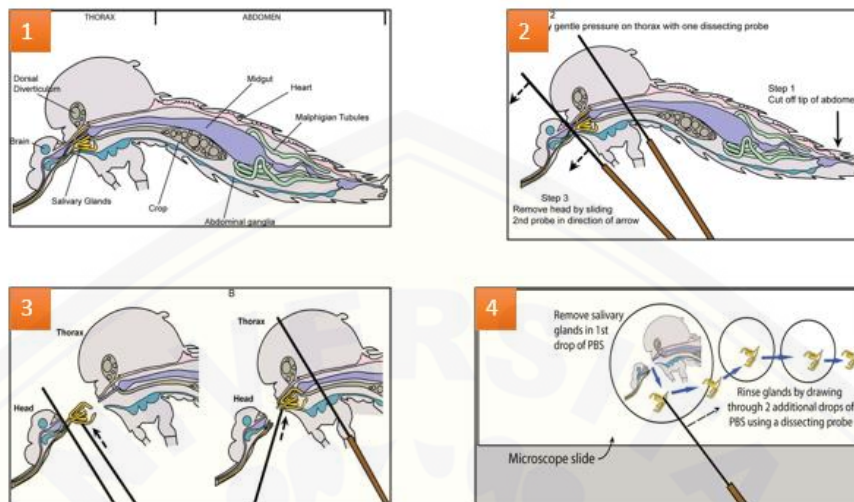
Selanjutnya *Ae. albopictus* diidentifikasi morfologinya sebelum dimasukkan ke dalam kandang. Kemudian larva yang didapat diletakkan pada *tray* yang telah diisi air. Selama pertumbuhan, larva diberi makan dengan makanan berupa pelet. Larva tersebut dibiarkan tumbuh dan berkembang hingga menjadi pupa. Selanjutnya pupa dipindahkan menggunakan pipet plastik ke dalam cawan pupa. Cawan pupa kemudian dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga tumbuh menjadi nyamuk dewasa. Cawan lain yang terbuat dari plastik atau batok kelapa juga dapat digunakan sebagai tempat bertelur nyamuk dewasa. Selanjutnya dibuat larutan sukrosa 10 % sebagai sumber nutrisi nyamuk *Ae. albopictus* jantan. Nyamuk betina diberikan Seekor tikus wistar yang diletakkan pada kandang kecil untuk kebutuhan *blood feeding* pada waktu pagi dan sore hari. Ketika akan melakukan isolasi saliva, nyamuk dewasa diambil menggunakan aspirator dan dimasukkan ke dalam tabung nyamuk yang ditutup dengan kain kasa.

3.4.2 Identifikasi Morfologi *Ae. albopictus*

Nyamuk *Ae. albopictus* difreezing dalam lemari pendingin bersuhu -20°C selama ± 20 detik. Kemudian nyamuk ditempatkan pada cawan petri dan diletakkan dalam *ice box* agar nyamuk tidak sadar kembali. Sebelum dilakukan isolasi kelenjar saliva, terlebih dahulu nyamuk hasil *landing* maupun *rearing* diidentifikasi morfologinya. Spesies nyamuk *Aedes* dapat diidentifikasi melalui *lyre marking* pada bagian *mesonotum*. *Ae. albopictus* memiliki satu deretan sisik putih pada bagian *mesonotum*. Bagian *mesepleuron* dengan sekumpulan sisik putih yang menyatu serta tungkai pada bagian femur anterior hitam tanpa garis putih yang menjadi pembeda dengan *Ae. aegypti*. Kemudian identifikasi jenis kelamin dapat dilakukan dengan melihat bentuk *Antenna*. *Antenna* dengan rambut yang sedikit (*pilose*) dimiliki oleh nyamuk betina, sedangkan *Antenna* dengan rambut tebal dan lebat (*plumose*) dimiliki oleh nyamuk Jantan (Rueda, 2004).

3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva *Ae. albopictus*

Isolasi kelenjar saliva dilakukan pada *Ae. albopictus* betina dengan teknik *microdissection* menggunakan jarum diseksi (Gambar 3.1) (Schmid *et al.*, 2017). Nyamuk diletakkan diatas gelas objek yang telah ditetesi $\pm 30 \mu\text{L}$ NaCl 0,5%. NaCl berfungsi sebagai larutan isotonis terhadap sel-sel dari kelenjar saliva supaya tidak mudah lisis (Regenmortel *et al.*, 2017). Kelenjar saliva *Ae. albopictus* berada di bagian toraks dan kepala nyamuk. Dua jarum diseksi diletakkan di bagian toraks dan kepala *Ae. albopictus*, lalu secara perlahan dipisahkan kepala hingga terlepas dari toraks. Apabila tarikan benar, maka akan tampak lobus-lobus kelenjar saliva berwarna bening. Kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain. Kelenjar saliva kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam *microtube* steril yang telah diisi $10\mu\text{L}$ PMSF dalam PBS pH 7,4 steril dan disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.



Gambar 3.2 Isolasi kelenjar saliva teknik *microdissection* (Schmid *et al.*, 2017).

3.4.4 Isolasi dan Purifikasi Fraksi Protein Immunogenik 67 kDa Kelenjar Saliva *Ae. albopictus*

a. Analisis SDS-PAGE

Ekstraksi protein menggunakan sepuluh pasang kelenjar saliva pada masing-masing *microtube* dengan 10 μ L PMSF 1 M dalam PBS pH 7,4. Selanjutnya kelenjar saliva yang telah diisolasi kemudian ditambahkan dengan 10 μ L *loading buffer* protein dan dipanaskan menggunakan *Thermo-shaker* pada suhu 95°C selama 4 menit. Sampel protein kemudian dianalisis dengan metode SDS-PAGE menggunakan *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4% (Bollag *et al.*, 1991). Sebanyak 20 μ L sampel protein dimasukkan ke dalam sumuran gel *polyacrilamide* bersama dengan 5 μ L Marker protein (*GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder*, Korea Selatan). Elektroforesis dilakukan pada tegangan konstan 150 V selama 60 menit pada suhu ruang dalam *buffer* elektroda pH 8,3. Larutan pewarna *staining Coomassie Brilliant Blue* (CBB) digunakan untuk mewarnai gel *polyacrilamide* selama 60 menit atau *over*

night. Gel *polyacrilamide* kemudian direndam pada larutan *destaining* 1, *destaining* 2, dan *destaining* 3 masing masing 15 menit untuk menghilangkan pewarna CBB yang tidak berikatan dengan protein. Pita protein dengan berat molekul 67 kDa dipotong dan disimpan di dalam *microtube* yang berisi *buffer* elektroda pH 8,3. Selanjutnya masing-masing *microtube* diisi potongan gel pita protein imunogenik 67 kDa.

b. Purifikasi Fraksi Protein 67 kDa Saliva *Ae. albopictus*

Purifikasi dilakukan pada fraksi protein 67 kDa dengan menggunakan Metode Elektroelusi dan Dialisis di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pita protein 67 kDa dicuci menggunakan akuabides (ddH₂O). Membran selofan dibilas dengan *buffer* elektroda. Kemudian pita protein dimasukkan ke dalam membran selofan dengan panjang 6-8 cm yang berisi larutan *buffer* elektroda pH 8,3 dan direndam horizontal. Elektroelusi dilakukan selama 1 jam pada tegangan konstan 120 V pada suhu 10°C hingga warna gel memudar. Kemudian cairan dalam membran dipindah ke membran selofan baru dan dilakukan dialisis selama 12 jam di dalam 500 mL PBS pH 7,4 suhu 4°C. Cairan membran dikeluarkan dan disimpan di dalam *microtube* steril berisi etanol 95% dengan perbandingan 1:1 selama 24 jam. Sampel tersebut kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit dalam suhu ruang, pelet diambil dan dikering anginkan. Selanjutnya ditambahkan PBS 0,1 mM pH 7,4 sebagai pelarut. Protein 67 kDa yang telah terkumpul diletakkan pada *microtube*. Ekstrak protein 67 kDa kemudian diukur konsentrasinya DI Laboratorium Sentral Hayati Universitas Brawijaya menggunakan *Nano Drop*.

3.4.5 Uji Agregasi Platelet Fraksi Protein Imunogenik 67 kDa Saliva *Ae. albopictus*.

Sampel darah diperoleh dari penduduk sehat Jember yang diambil secara *venipuncture* dan dikumpulkan ke dalam *vacutainer* EDTA (*Vaculab EDTA K3*, Indonesia). Uji agregasi platelet diawali dengan preparasi sampel *Platelet Rich Plasma*

(PRP) manusia. Prosedur pengambilan sampel darah dilakukan berdasarkan *ethical clearance* yang telah disetujui dan diterbitkan oleh Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember No 148/UN25.8/KEPK/DL/2018. Sampel darah yang didapat kemudian di *swirling* perlahan supaya tercampur didalam *vacutainer* EDTA. Selanjutnya setelah terbentuk 2 lapisan, dipindah supernatan yang mengandung trombosit ke dalam tube steril. Tube steril kemudian di *sentrifuge* dengan kecepatan 3200 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. PRP berada di 1/3 bagian bawah dan *Platelet Poor Plasma* (PPP) berada di 2/3 bagian atas (Marques *et al.*, 2013).

Uji Agregasi platelet pada penelitian ini menggunakan Metode Agregasi Platelet yaitu mencampurkan antara PRP dan *agonist* (ADP) untuk kemudian diukur nilai absorbansinya untuk dapat dihitung % pe penghambatan (White dan Lisa, 1999; Chan *et al.*, 2018). Fraksi protein 67 kDa Sebanyak 10 µL diinkubasi dengan 90 µL PRP selama 10 menit pada suhu ruang didalam *microplate* 96 *well*. Kemudian *shaker* dengan kecepatan 500 rpm dan ditambahkan 10 µL ADP 20 µM. *Shaker* selanjutnya dilakukan kembali selama 10 menit.

Selanjutnya perlakuan untuk uji agregasi platelet dikelompokkan menjadi beberapa perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif, fraksi protein 67 kDa, dan ekstrak total kelenjar saliva *Ae. albopictus*. Kontrol negatif menggunakan 2 perlakuan yaitu diberi PBS 1mM pH 7,4 sebagai pelarut protein dan tanpa perlakuan apapun (hanya PRP dan ADP) sedangkan kontrol positif menggunakan Aspirin dengan konsentrasi 0,1 mg/mL dan 2 mg/mL (See *et al.*, 2017). Ekstrak total protein dengan konsentrasi 0,1 mg/mL. Nilai absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 575-650 nm menggunakan *microplate reader* (Chan *et al.*, 2018). Nilai absorbansi yang didapat menunjukkan besarnya nilai penghambatan agregasi platelet. Nilai absorbansi yang semakin kecil menunjukkan bahwa nilai penghambatan agregasi platelet semakin besar, hal ini dikarenakan platelet yang saling berikatan hanya sedikit dan sebaliknya (Mans *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2018 dan See *et al.*, 2017).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Protein 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus* dengan konsentrasi 0,1 mg/mL memiliki persentase penghambatan agregasi platelet lebih tinggi dari Aspirin dengan persentase penghambatan agregasi platelet sebesar 3-37%. Dengan demikian, fraksi protein 67 kDa kelenjar saliva *Aedes albopictus* mengandung *apyrase* sehingga dapat menunjukkan adanya aktivitas penghambatan agregasi platelet.

5.2 Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan mengoptimalkan konsentrasi protein karena konsentrasi protein 67 kDa yang didapat dari hasil elektroelusi rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras, L., A. Fontaine, M. Belghazi, S. Bourdon, E. Boucomont-Chapeaublan., E. Orldani-Pradines, M. Baragatti, N. Corre-Catelin, P. Reiter, B. Pradines, T. Fusai, dan C. Rogier. 2010. Salivary gland protein repertoire from *ae. Aegypti* mosquitoes. *Vector-borne and zoonotic disease*. 10(4): 391-402.
- Amable, P. R., Rosana B.V.C., Marcus V.T., Teixeira., Ítalo C.P., Ronaldo J. F. C.A., José M.G., dan Radovan B. 2013. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy*. 3(4): 67.
- Andrade, B.B., Clarissa R.T., Aldina B., dan Monel B.R. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 665-693.
- Arca, B., Fabrizio, L., Ivo M.B., Francischetti, Van M Pham, Montserrat, M. S., John F. A., dan Jose M.C. R. 2007. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37 : 107–127.
- Aziz, M dan Yadav, KS. 2016. Pathogenesis of atherosclerosis. *Medical & Clinical Reviews*. 2(3) : 22.
- Badimon, L., Teresa, P., dan Gemma, V. 2012. Atherosclerosis, platelets and trombosis in acute ischaemic heart disease. *European Heart Jurnal*. 1(1) : 60-74.
- Berry, J. D., Alan Dyer., Xuan Cai, M.S., Daniel B. Garside, B.S., Hongyan Ning, M.D., Avis Thomas, M.S., Philip Greenland, M.D., Linda Van Horn, R.D., Ph.D., Russell P. Tracy, dan Donald M. Lloyd-Jones. Lifetime risks of cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*. 4 : 321-329.

- Boesri, H. 2011. Biologi dan Peranan *Aedes albopictus* (Skuse) 1894 sebagai Penular Penyakit. *Jurnal Aspirator*. 3(2): 117-125.
- Bollag, D.M., M. D. Rozycki, dan S. J. Edelsteins. 1991. *Protein Method*. USA: Wiley-Liss.
- Bova, J., Sally, Paulson dan Greg Paulson. 2016. Morphological differentiation of the eggs of north american container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 32(3):244–246.
- Calvo, E., B. J. Mans, J. F. Andersen, dan J. M. Ribeiro. 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biom Chem*. 281(4) : 1935-1942.
- Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M., dan James, A. A. (1995). The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(3): 694-698.
- Chan, M. V., Armstrong, P. C., dan Warner, T. D. 2018. 96-well plate-based aggregometry. *Platelets*. 29(7): 650-655.
- Chan, T.C. 1971. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore city. Observation in relation to dengue haemorrhagic fever. *Bull. WHO*. 44: 651 – 657.
- Chen, H. H., Zhang, R. L., Geng, Y. J., Cheng, J. Q., Zhang, S. X., Huang, D. N., dan Zhu, X. Q. 2007. Identification of differentially expressed genes in female *Culex pipiens pallens*. *Parasitology research*. 101(3): 511-515.
- Dhurat, Rachita. 2014. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 7(4) : 189-198.

- Dong, Fang., Yongfeng Fu., Xueping Li., Jianguo Jiang., Jianhua Sun., dan Xunjia Cheng. 2011. Cloning, expression, and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus*. *Parasitol.* 931–937.
- Doucoure, S., S. Cornelié., S. Patramool, F. Mouchet, E. Demettre., M. Seveno., J. S. Dehecq., H. Rutee., J. P. Herve., F. Favier., D. Missé., P. Gasque., dan F. Remoue. 2013. First screening of *Aedes albopictus* immunogenic Salivary proteins. *Insect Molecular Biology.* 1-13.
- Erni, Elisa. 2019. Analisis fraksi protein imunogenik 56 kda kelenjar saliva *Aedes aegypti* sebagai agen trombolitik. *Skripsi.* Jember : Universitas Jember.
- Fontaine, A., Ibrahim, D., Nawal, B., Dorothée, M., Frédéric, P., Thierry, F., Christophe, R., dan Lionel, A. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors.* 4 : 183.
- Ghoshal, K., dan Bhattacharyya, M. 2014. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal.*
- Gizt, Eelo. 2013. *Glycoprotein Iba clustering in platelet storage and function.* Netherland : BOX Press.
- Hughes, A. L. 2013. Evolution of the salivary apyrases of blood-feeding arthropods. *Gene.* 527(1): 123–130.
- Iskandar., Abdul, H., dan Alfridsyah. 2017. Faktor risiko terjadinya penyakit jantung koroner pada pasien rumah sakit umum meuraxa Banda Aceh. *Aceh Nutrition Journal.* 2(1): 32-42.
- Iyu, D., Jackie, R., G. Ann., E. White., Sue C. Fox., dan S. Heptinstall. 2011. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a p2y12 antagonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:416-422.

- Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 109(12) : 5087-5095.
- Jackson, S.P. 2007. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood Journal*. 109(12) : 5087-5094.
- Jagroop, I.A., M. A. Barradas dan D.P. Mikhailidis. 1996. A low molecular weight heparin, nadroparin (Fraxiparine), inhibits thrombin-induced platelet shape change and does not enhance spontaneous platelet aggregation. *Br J Clin Yhrrnzucol*. 41: 163-165.
- 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. 2013. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI.
- Khasanah, R.N. 2019. Identifikasi protein imunogenik kelenjar saliva *Aedes albopictus* vektor potensial demam berdarah dengue (DBD) di wilayah endemik kabupaten jember. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- King, J. G., K. Vernic, J. F. Hilyer. 2001. Members of the salivary gland surface protein family (sgs) are major immunogenic components of mosquito saliva. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *Inc. JBC Papers in Perss*.
- Kour D, Tandon VR, Kapoor B, Mahajan A, Parihar A, Smotra S. 2006. Aspirin resistance. *New Horizons*. 8(2): 116–7.
- Law J. H., Ribeiro J. M. C. dan Wells M. A. (1992) Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu. Rev. Biochem*. 61: 87-111.

- Luplertlop, N. 2014. *Aedes* Mosquito Salivary immune peptides : boost or block dengue viral infection. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(2) : 163-168.
- Malar, Manorenjitha. The Ecology and Biology Of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) And The Resistance Status Of *Aedes albopictus* (Field Strain) Against Organophosphates In Penang Malaysia. *Tesis*.
- Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G., dan Ribeiro, J. M. 2008. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect biochemistry and molecular biology*. 38(1): 22-41.
- Marques , L., Fernanda, T. S., Isabel C. C. C., Nemi S. J., Lucine ía, D. S., dan Joaõ T. R. P. 2013. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. *Platelets*. 1-13.
- Miladiyah, I. 2012. Therapeutic Drug Monitoring (TDM) pada penggunaan aspirin sebagai antireumatik. *Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam*. (2) : 210-229.
- O'Donnell., Martin, G. L., Dali, F.MD., Patrice, A.S, Klaus, L., Richard, H. M., Ralph, A., Daniel, L., dan Geoffrey, H T. 2015. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation. *Circulation*.
- Oktarianti, R., Kartika S., Fatchiyah F., dan Aulanni'am. 2014. Immunogenic protein from salivary gland of *aedes aegypti* against to human sera. *Advances in Naturaland Applied Sciences*. 8(8): 101-107.
- Oktarianti, R., Senjarini, K., Hayano, T., dan Fatchiyah, F. 2015. Proteomic analysis of immunogenic proteins from Salivary glands of *Aedes aegypti*. *Journal of infection and public health*. 8(6): 575-582.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Vermylen, J., dan Hoylaerts, M. F. 2006). The platelet ATP and ADP receptors. *Current pharmaceutical design*. 12(7): 859-875.

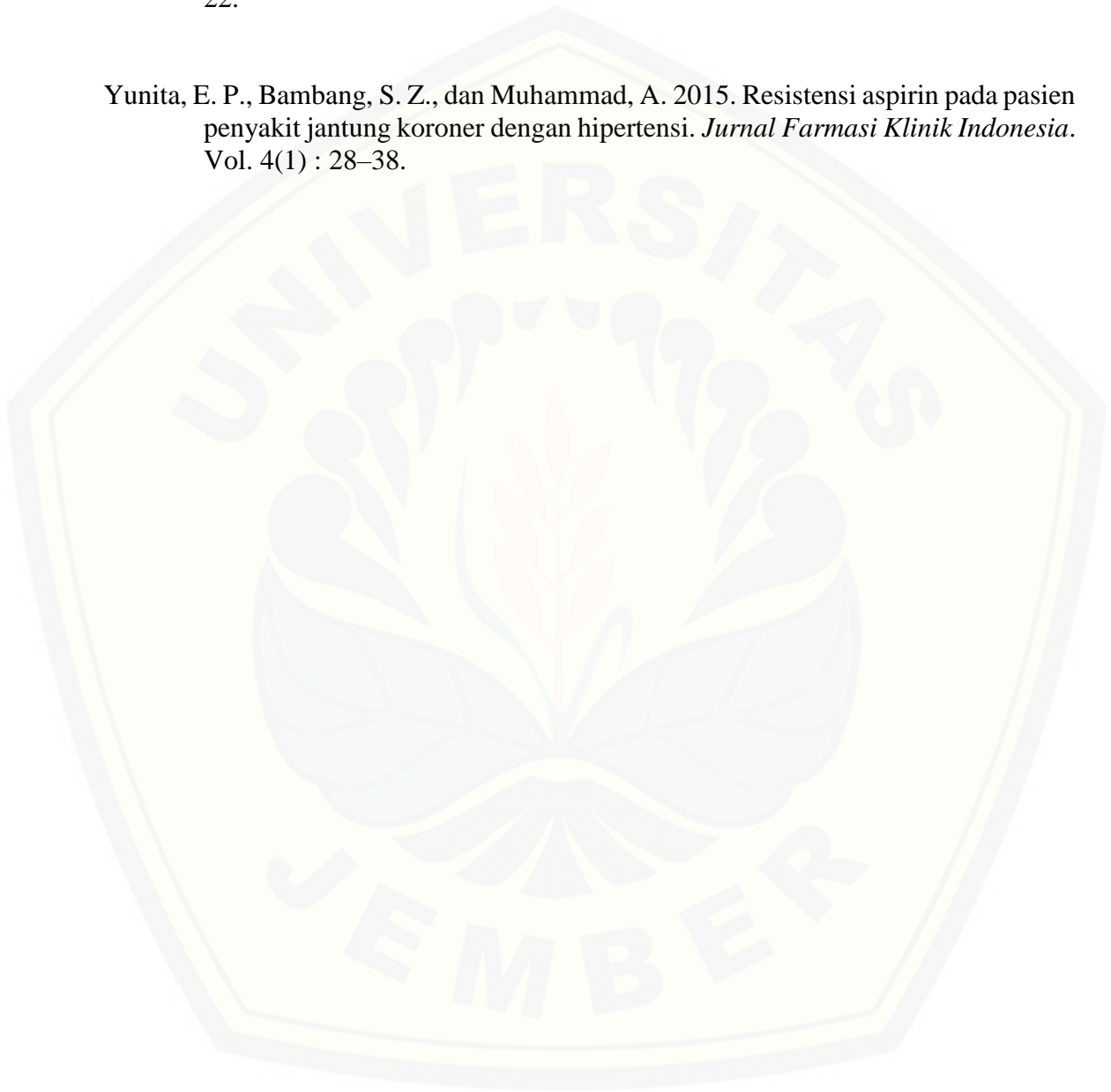
- Peng Z, Lam H, dan Xu W. 1999. Characterization and clinical relevance of two recombinant mosquito *Aedes aegypti* Salivary allergens, rAed a 1 and rAed a 2. *J Allergy Clin Immunol*. 101: 32.
- Peng Z, Yang J, Wang H, Simons FE. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies to two new mosquito *Aedes aegypti* Salivary proteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 29: 1-14.
- Peng, Z dan F. Estelle, R. S. 2007. Mosquito Allergy and Mosquito Salivary Allergens. *Journal Protein dan Peptide Letters*. 7(14) : 975-981.
- Peng, Z. X. W., James, A. A., Lam, H. S. D., Cheng, L., dan Simons, F.E. R. 2001. Expression, purification, characterization, and clinical relevance of rAed a 1—a 68-kDa recombinant mosquito *Aedes aegypti* Salivary allergen. *Int Immunol*. 13: 1445–1452.
- Peng, Z., Li Caihe., Andrew, N. B., Qingdong, G. Anthony, A.J dan Estelle, R. S. 2016. rAed a 4: A New 67-kDa *Ae. aegypti* Mosquito Salivary Allergen for the Diagnosis of Mosquito Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 170: 206–210.
- Periyah, M. H., Halim, A. S., dan Saad, A. Z. M. 2017. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 11(4): 319.
- Rahana, V. K., A. Viswan, dan E. Pushpalatha. 2016. Response on Growth Regulatory Activity of Three Indigenous Plant Extracts Against dengue Vector *Ae. albopictus* (Skuse). *International Journal of Mosquitos Research*. 3(4): 1-5.
- Rahayu, D. F dan A. Ustiawan. 2013. Identifikasi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Balaba : Jurnal litbang pengendalian penyakit bersumber binatang banjarnegara. 9(1): 7-10.

- Reguera dan Leschine. 2017. Fast and Efficient Elution of Proteins from Polyacrylamide Gels Using Nanosep® Centrifugal Devices. *Pall Corporation*. 1 : 1-5.
- Ribeiro J. M. C. 1987. Role of arthropod Saliva in blood feeding. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 463-478.
- Ribeiro JMC, Sarkis JJF, Rossingnol PA, Spielman A, 1984. Salivary apyrase of *Ae. aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol.* 79: 81–86.
- Ribeiro, J.C., Sarkis, J. F., Philippe, A. R., dan Andrew, S. 1984. Salivary Apyrase Of *Aedes Aegypti*: Characterization And Secretory Fate. *Comp.Biochem. Physiol.* 79(1) : 81-86.
- Roy,S dan Vikash, K, 2014. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 3(8): 955-960.
- Rueda, L.M. 2004. *Pictorial Keys for the identification of Mosquitos (diptera: Culicidae) Associated with Dengue Virus Transmission*. Auckland : Magnolia Press.
- Sattayasai, N. 2012. *Chemical Biology*. Licensee IntechOpen : Shanghai.
- Schmid, M. A., Kauffman, E., Payne, A., Harris, E., dan Kramer, L. D. 2017. Preparation of mosquito Salivary gland extract and intradermal inoculation of mice. *Bio-protocol.* 7(14).
- Schreiber MC, Karlo JC, 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.

- See, G. L. L., Lopez, J. A. A., Alterado, E. N. C., dan Arce, F. J. V. In Vitro Platelet Aggregation Inhibition Activity of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) Dc Pod Extract.
- Stark KR dan James AA. 1998. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito. *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*. 273: 1-9.
- Titus, R.G., Bishop, J.V., dan Mejia, J.S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod Saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. 28 : 131–14.
- Trajer, A., Tanczos, B., Hammer, T., Bede-Fazekas, A., Ranvig, K., Schoffhauzer, J., dan Padisak, J. 2017. The complex investigation of the colonization potential of *Aedes albopictus* (diptera: culicidae) in the south pannonian ecoregion. *Applied Ecology And Environmental Research*. 15(1): 275-298.
- Twomey, L., Robert G. Wallace, Philip M. Cummins, Bernard Degryse, Sinead Sheridan, Michael Harrison, Niall Moyna, Gerardene Meade-Murphy, Nastassia Navasiolava, Marc-Antoine Custaud dan Ronan P. Murphy. 2018. Platelets: from formation to function. *IntechOpen* : Chapter 5.
- 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.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramol, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucourse, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demetree, E., Blizard, J.P., Jouin, P., Biron, D. G., Thomas, F., F., Misse, D. 2010. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomic*. 10: 1906-1916.
- White, M. dan Lisa, K.J. 1999. *Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures*. academic press : New York.
- WHO. 2005. *Guidelines for dengue surveillance and mosquito control*. Second edition.

Williams, M., M. P. Mammen Jr., N. S. Zeidner., B. J. Beaty., J. E. Prenni., A. Nisalak., Dan C. D. Blair. Association of human immune response to *Aedes aegypti* salivary proteins with dengue disease severity. *Parasite Immunology*. 34 : 15–22.

Yunita, E. P., Bambang, S. Z., dan Muhammad, A. 2015. Resistensi aspirin pada pasien penyakit jantung koroner dengan hipertensi. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*. Vol. 4(1) : 28–38.



LAMPIRAN

I. Komposisi Larutan

1. Rearing Nyamuk *Aedes albopictus*

- a. Larutan Sukrosa 10 % : 10 gram gula pasir dilarutkan dalam 100 mL air

2. Isolasi Kelenjar Saliva *Aedes albopictus*

- a. 10 mL PMSF dalam PBS : 10 mL PBS (0,08 gram NaCl, 0,0144 gram Na₂HPO₄, 0,0024 gram KH₂PO₄, 0,002 gram KCl kemudian dilarutkan dalam 10 ml akuades) selanjutnya ditambahkan 0,00174 gram PMSF.

- b. NaCl 0,5 % : 0,5 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL akuades

3. SDS-PAGE

- a. 1 mL *Loading Buffer* : 125 µL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 , 2 mL *Glycerol* 100% 250 µL, 200 µL SDS 10 % , 50 µL β-mercaptoetanol, 200 µL Bromofenol Blue 0,5 % 20 µL, 355 µL H₂O.

- b. 1 Liter *Buffer Elektroda* pH 8,3 : 3 gram Tris-base, 14,4 gram Glysin, 1 gram SDS 0,1 % , dan ditambah akuades hingga 1000 mL.

- c. 100 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8: 6,057 gram Tris-Base dilarutkan dalam akuades dan di *adjust* pH menggunakan HCl, ditambahkan akuades hingga 100 mL.

- d. 100 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8: 18,171 gram Tris-Base dilarutkan dalam akuades dan di *adjust* pH menggunakan HCl, ditambahkan akuades hingga 100 mL.

- e. 100 mL Acrilamid/Bisacrilamid 30 %: 29,2 gram Acrilamid, 0,8 gram Bisacrilamid, dan dilarutkan dalam akuades hingga 100 mL.
- f. 100 mL SDS 10 % : 10 gram SDS dilarutkan dalam akuades hingga 100 ml.
- g. 1 Liter *Staining* : 1 gram Comassieblue R250, 450 mL methanol, 100 mL asam asetat glasial dan 450 mL akuades steril.
- h. 1 Liter *Destaining* : 400 mL methanol, 100 mL asam asetat glasial, dan 500 mL akuades steril.
- i. 1 mL APS 10% : 0,1 gram APS dilarutkan dalam 1 mL akuades steril.
- j. TEMED : aliquot 50 μ L dari stok botol asli

4. Pembuatan Gel SDS-PAGE

Bahan-bahan	<i>Separating 12 %</i>	<i>Stacking 4 %</i>
Acrilamid/Bisacrilamid 30 %	4000 μ L	665 μ L
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2500 μ L	-
0,5 M Tris HCl pH 6,8	-	1250 μ L
SDS 10 %	100 μ L	50 μ L
H ₂ O steril	33350 μ L	3050 μ L
APS 10 %	50 μ L	25 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

5. Uji Agregasi Platelet

- a. 100 mL ADP : 0,00085 gram ADP dilarutkan dalam 100 mL akuades.
- b. 50 mL PBS 1 mM pH 7,4 : dicampurkan 0,16 gram NaCl, 0,01 gram KCl, 0,07 gram Na_2HPO_4 , 0,0135 gram KH_4PO_4 dalam aquades hingga 50 ml
- c. 50 mL aspirin 2 mg/mL dan 0,1 mg/mL
 - Membuat stok 100 mL Aspirin 5 mg/mL
 - 50 ml Aspirin 2 mg/mL : 20 mL Aspirin 5 mg/ml dilarutkan dalam akuades hingga 50 mL
 - 50 mL Aspirin 0,1 mg/mL: 1 mL Aspirin 5 mg/mL dilarutkan dalam akuades hingga 50 mL.

6. Ekstraksi Protein Total Kelenjar Saliva dengan Metode Bradford

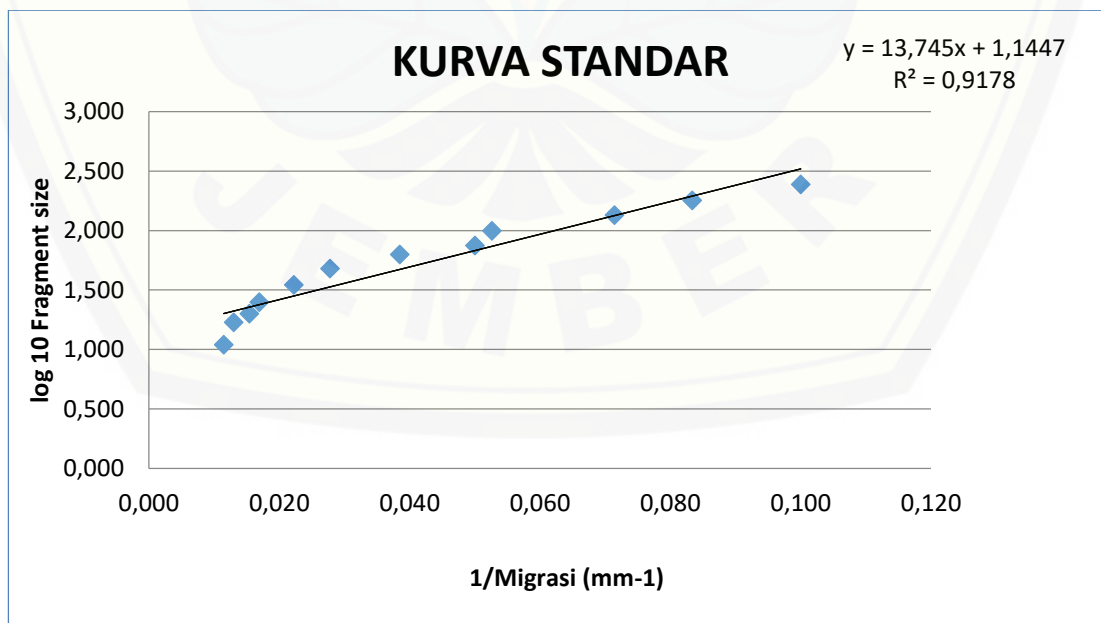
- a) BSA 1000 ppm : 0,001 gram serbuk BSA dilarutkan dalam akuades steril hingga 1 ml
- b) Reagen Bradford : 0,01 gram CBB G250, 5 mL etanol 95%, 10mL *Phosporic Acid*, ditambah akuades hingga 100 mL
- c) Sampel protein dari 300 pasang kelenjar saliva *Ae. albopictus* yang sebelumnya dilakukan pemekatan protein dengan MWCO

II. Perhitungan Pita Protein Hasil SDS-PAGE

A. Migrasi Marker

Jarak Migrasi (mm)	Ukuran Fragmen (kDa)	Log 10 Ukuran Fragmen	1/ Migrasi (mm-1)
10	245	2,389	0,100
12	180	2,255	0,083
14	135	2,130	0,071
19	100	2,000	0,053
20	75	1,875	0,050
26	63	1,799	0,038
36	48	1,681	0,028
45	35	1,544	0,022
59	25	1,398	0,017
65	20	1,301	0,015
77	17	1,230	0,013

B. Kurva Standart Marker

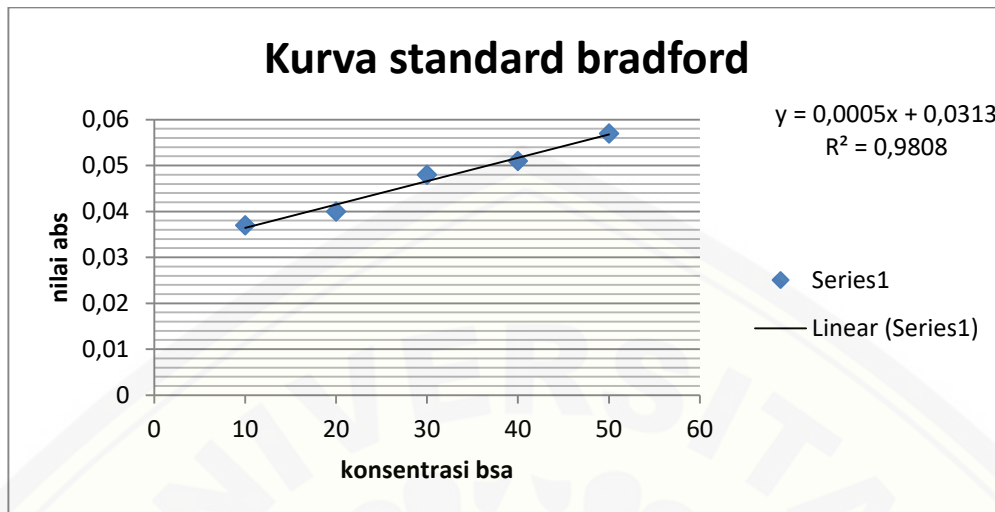


C. Migrasi Sampel Protein

Protein Target	Jarak Migrasi (mm)	1/ Migrasi (mm^{-1})	Log ₁₀ Ukuran Fragmen	Berat Molekul (kDa)
1	11	0,09090909	2,394197961	247,855158
2	12	0,08333333	2,290072587	195,017052
3	17	0,05882353	1,953196376	89,78346797
4	19	0,05263158	1,868090807	73,8058536
5	20	0,05	1,831920941	67,90800009
6	23	0,04347826	1,742282575	55,24367669
7	24	0,04166667	1,717383029	52,16545851
8	26	0,03846154	1,673329986	47,13353208
9	27	0,03703704	1,653750856	45,05581561
10	38	0,02631579	1,506392139	32,0916568
11	39	0,02564103	1,497117814	31,41360759
12	46	0,02173913	1,443488023	27,76438276
13	48	0,02083333	1,43103825	26,97977043

III. Grafik Regresi dan Perhitungan Bradford Ekstrak Protein total Kelenjar Saliva (EPKS)

ppm	Absorbansi
10	0,037
20	0,04
30	0,048
40	0,051
50	0,057



- Maka Konsentrasi Protein EPKS yang didapatkan

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

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

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

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

Kemudian dikalikan faktor pengenceran = $\mathbf{0,0214 \times 20 = 0,428 \text{ mg/mL}}$

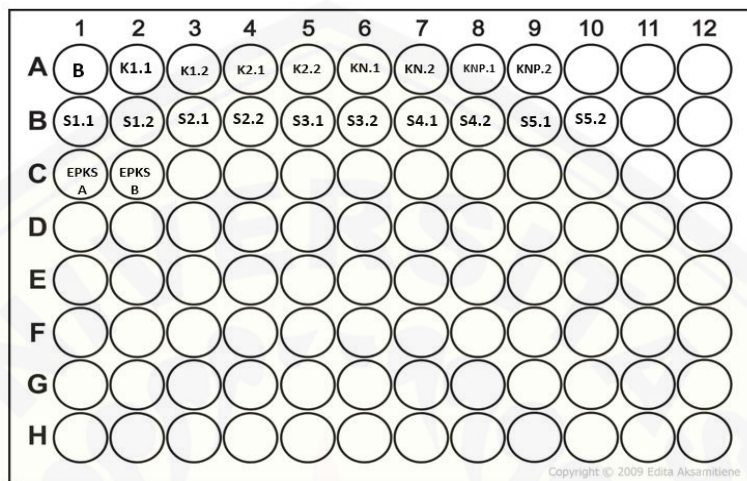
- ❖ Pada penelitian ini protein EPKS diencerkan menjadi $\mathbf{0,1 \text{ mg/mL}}$

IV. Hasil Preparasi Plasma Darah Penduduk Endemik Jember

No	Sampel	Jumlah Plasma
1	S1	520 μL
2	S2	470 μL
3	S3	490 μL
4	S4	510 μL
5	S5	500 μL

V. Uji Agregasi Platelet

A. Peta Uji Agregasi Platelet Pada *Microplate 96 well*



Keterangan :

No	Kode	Keterangan
1	B (Blanko)	Tidak diisi apa-apa
2	K1.1-2 (kontrol positif 1)	90 μ L pool PRP + 10 μ L ADP + 10 μ L Aspirin 2 mg/mL
3	K2.1-2 (kontrol positif 2)	90 μ L pool PRP + 10 μ L ADP + 10 μ L Aspirin 0,1 mg/mL
4	KN.1-2 (kontrol negatif 1)	90 μ L pool PRP + 10 μ L ADP + 10 μ L PBS pH 7,4
5	KNP.1-2 (Kontrol Negatif 2)	90 μ L pool PRP + 10 μ L
6	S1.1-S6.2	90 μ L PRP individu + 10 μ L ADP + 10 μ L SGE 67 kDa 0,1 mg/mL
7	EPKS.1-2	90 μ L pool PRP + 10 μ L ADP + 10 μ L EPKS 0,1 mg/mL

VI. Ethical clearance



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
 (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
 FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No. 148/UN25.8/KEPK/DI/2018

Title of research protocol : "Potensial Immunogenic Protein from Salivary Gland of
 Potensial Vector Dengue *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* 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 3rd, 2018

Place of research : Laboratory of Biotechnology - Jurusan Biologi Fakultas MIPA
 Universitas Jember

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.

Jember, September 5th, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas
 Jember



(Dr. H. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)

Chairperson of Research Ethics Committee
 Faculty of Dentistry Universitas Jember



(Dr. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)