



**ANALISIS FRAKSI PROTEIN IMUNOGENIK 56 kDa
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* SEBAGAI AGEN
TROMBOLITIK**

SKRIPSI

Oleh

**Elisa Erni
NIM 151810401055**

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



**ANALISIS FRAKSI PROTEIN IMUNOGENIK 56 kDa
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* SEBAGAI AGEN
TROMBOLITIK**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Elisa Erni
NIM 151810401055**

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

PERSEMBAHAN

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

1. Ayahanda Suwarno dan Ibunda Halidah atas segala dukungan, motivasi dan do'a-do'a yang selalu beliau panjatkan
2. Adik saya Mila Rosita, dan seluruh keluarga besar di Jawa Timur dan Kalimantan Selatan
3. Guru-guru sejak Taman Kanak-Kanak (TK), MI (Madrasah Ibtidaiyah), SMP, SMA, hingga perguruan tinggi, atas bimbingan dan dukungannya
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Berhenti dari kesibukan itu kelengahan, dan waktu kosong adalah pencuri yang culas.
Adapun akal Anda, tak lain merupakan mangsa empuk yang siap dicabik-cabik oleh
ganasnya terkaman kedua hal tadi; kelengahan dan si “pencuri”

(Dr. ‘Aidh al-Qarni)^{*)}



^{*)} al-Qarni, ‘Aidh . 2004. *La Tahzan*. Jakarta : Qisthi Press

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Elisa Erni

NIM : 151810401055

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Fraksi Protein Immunogenik 56 kDa Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* sebagai Agen Trombolitik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr. Rike Oktarianti, M.Si, Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si., dan Syubbanul Wathon, S.Si, M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 08 Juli 2019

Yang menyatakam,

Elisa Erni
NIM 151810401055

SKRIPSI

**ANALISIS FRAKSI PROTEIN IMUNOGENIK 56 kDa
KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* SEBAGAI AGEN
TROMBOLITIK**

Oleh

**Elisa Erni
NIM 151810401055**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Rike Oktarianti, M.Si
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Fraksi Protein Immunogenik 56 kDa Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* sebagai Agen Trombolitik” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua

Anggota I

Dr. Rike Oktarianti, M.Si
NIP 196310261990022001

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

Anggota II,

Anggota III,

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

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

Mengesahkan
Dekan

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 1961020419871110011

PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Fraksi Protein Imunogenik 56 kDa Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* sebagai Agen Trombolitik”. 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 lepas 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 membimbing dan memberi arahan serta meluangkan waktu dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam penulisan skripsi ini;
3. Syubbanul Wathon, 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. Dra. Mahriani, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd 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. Dina Fitriyah, S.Si, M.Si selaku Teknisi Laboratorium Bioteknologi yang telah banyak membantu kelancaran penulis dalam melakukan penelitian;
8. staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan LSIH Universitas Brawijaya yang telah membantu kelancaran penulis dalam melakukan penelitian;

9. Ayahanda Suwarno, Ibunda Halidah, dan Adik Mila Rosita serta seluruh keluarga besar di Jawa Timur dan Kalimantan Selatan yang telah memberikan curahan kasih sayang, dukungan, motivasi, serta do'a yang tulus;
10. rekan kerja seperjuangan Rocmatul Nuryu, Alfin Putri, Dwi Alfiana, Miatin Alvin, dan Damara yang selama ini telah bekerjasama dan memberi dukungan;
11. kakak-kakak seperjuangan grup riset, Aria Fransisca, Lailly, Ika dan Dewi yang telah memberikan arahan dan dukungan selama bekerja di laboratorium;
12. adik-adik seperjuangan grup riset, Ahmad Tosin, Intan Fitri, Khalid Abdullah, Nuril Azizah, Nadya Risma, Ratis, Yasir dan Riana Agatha yang selama ini telah membantu dan memberikan dukungan selama penulis mengerjakan skripsi;
13. teman karib Risa Charisatin, Kiki Farah, Sindhi Ikrimah, Isna Kurotul, Hilda Aunillah, Rilla Nofita, Dian Al-ghifari, Supriyadi, Angela Enggar, Megantika Lovia, Ita Faidlotul dan Dwi Aftianingsih yang selalu memberikan motivasi serta dukungan selama masa perkuliahan;
14. Fara Difka Afdilla selaku sahabat karib yang selalu mencurahkan kesetiaan, motivasi, dukungan, serta do'a-do'a yang tulus;
15. teman-teman BIOGENES15 angkatan 2015 atas motivasi, dukungan serta kerja sama selama masa perkuliahan;
16. 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 8 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
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 Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> dan Fungsi Biologisnya	4
2.2 Potensi Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> Sebagai Agen Trombolitik.....	6
2.3 Mekanisme Agregasi Platelet.....	7
2.4 Peranan Agen Trombolitik Dalam Terapi Penyakit	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	12
3.2 Alat dan Bahan.....	12
3.3 Prosedur Penelitian.....	13

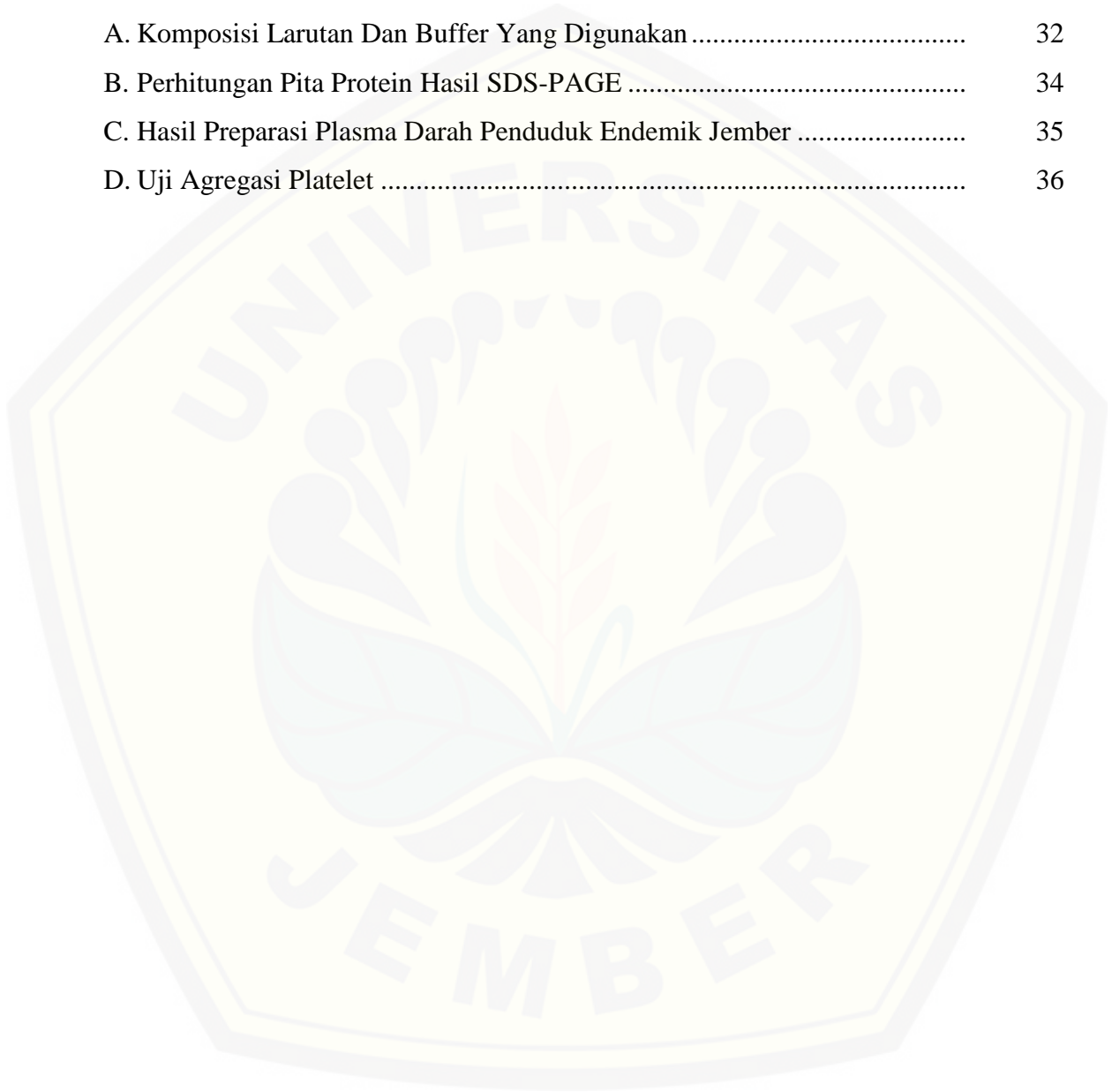
3.3.1 Rearing Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	13
3.3.2 Identifikasi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	14
3.3.3 Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	14
3.3.4 Analisis Profil Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> dengan Metode SDS-PAGE	15
3.3.5 Purifikasi Protein Immunogenik 56 kDa dengan Metode Elektroelusi dan Dialisis	15
3.3.6 Uji Agregasi Platelet Menggunakan Hasil Purifikasi Protein 56 kDa Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Identifikasi dan Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> ..	18
4.2 Profil Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> dan Purifikasi Protein 56 kDa.....	20
4.3 Analisis Uji Penghambatan Agregasi Platelet Protein 56 kDa Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	21
BAB 5. PENUTUP	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN.....	32

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peran protein kelenjar saliva Arthropoda.....	6
2.2 Mekanisme agregasi pletelet pada hemostasis.....	8
4.1 Morfologi nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	19
4.2 Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	20
4.3 Profil Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	21
4.4 Grafik Persentase Penghambatan Agregasi Platelet	22

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Larutan Dan Buffer Yang Digunakan	32
B. Perhitungan Pita Protein Hasil SDS-PAGE	34
C. Hasil Preparasi Plasma Darah Penduduk Endemik Jember	35
D. Uji Agregasi Platelet	36



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tingkat kematian akibat penyumbatan pembuluh darah otak dan *miokard* di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun. Salah satu faktor penting yang berperan dalam proses penyumbatan tersebut adalah trombosis (Canon *et al.*, 2005). Trombosis merupakan suatu pembentukan bekuan darah di dalam pembuluh darah. Terdapat 3 hal yang berperan dalam gangguan trombosis yaitu kerusakan dinding pembuluh darah, perubahan aliran darah, dan perubahan daya beku darah. Trombosis dapat terjadi pada pembuluh arteri maupun vena (Makin, 2002).

Trombosis yang terjadi pada pembuluh arteri yang diakibatkan adanya plak aterosklerosis dapat menyebabkan serangan jantung dan *stroke*. Trombosis pada pembuluh vena adalah salah satu gangguan *vascular* yang paling sering terjadi setelah serangan jantung dan *stroke* (Gross & Weitz, 2009). Insidensi gangguan trombosis yang terjadi pada arteri maupun vena cukup tinggi. Pada tahun 2014 jumlah penderita penyakit jantung di Amerika pada kelompok usia lebih 20 tahun mencapai 80 % dari total populasi dan lebih dari 13 % dari total populasi menderita *stroke* (American Heart Association, 2014).

Proses pembentukan trombus dan patofisiologi hemostasis sangat dipengaruhi oleh fungsi platelet (Harrison, 2005). Apabila proses hemostasis terganggu, seperti menurunnya fungsi atau jumlah platelet, maka resiko perdarahan akan meningkat. Selain itu, jumlah dan reaktivitas platelet yang berlebihan dapat memicu pembentukan trombus abnormal dalam pembuluh darah (Harrison, 2005). Platelet berada dalam bentuk tidak teraktivasi ketika berada dalam sirkulasi darah. Ketika terjadi kerusakan pembuluh darah platelet akan teraktivasi dan menempel pada lapisan sub-endotelium selanjutnya mengalami adhesi (White & Jennings, 1999). Kemudian platelet akan melepaskan isi granul, menarik platelet lain disekitarnya dan membentuk agregat sehingga terbentuk sumbat yang mencegah kehilangan darah.

Kegagalan hemostasis dan perkembangan dari pembekuan darah memerlukan penanganan klinis yang terdiri dari pemberian agen trombolitik intravena (Collen *et al.*, 1988; Collen, 1990; Francis & Marder, 1991), agen trombolitik tersebut dapat berasal dari protein kelenjar saliva Arthropoda. Beberapa protein yang terdapat pada saliva Arthropoda mampu berperan dalam membantu vasodilatasi, menghambat agregasi platelet, dan mencegah koagulasi darah saat vektor melakukan *blood feeding* (Ribeiro *et al.*, 2007). Salah satu Arthropoda yang memiliki kelenjar saliva dengan karakteristik tersebut adalah nyamuk *Aedes aegypti*. Protein kelenjar saliva pada *Aedes aegypti* mengandung beberapa substansi penting yang berperan dalam proses transmisi patogen ketika *blood feeding*. Substansi tersebut berupa vasodilator dan imunomodulator (Andrade *et al.*, 2005). Kedua substansi tersebut berperan dalam *blood feeding* nyamuk. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Oktarianti *et al.*, (2014) terdapat dua protein imunogenik dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa. Berdasarkan analisis *Liquid Chromatography – Tandem Repeat Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), diketahui bahwa protein dengan berat 56 kDa memiliki komponen penyusun utama apirase (Oktarianti *et al.*, 2015).

Apirase merupakan salah satu enzim dalam saliva *haematophagous arthropod* yang mampu menghambat reaksi spesifik pada sistem hemostasis inang yaitu menghambat agregasi platelet. Enzim ini dapat memecah *adenosine triphosphate* (ATP) dan *adenosine diphosphate* (ADP) menjadi *adenosine monophosphate* (AMP) dan *inorganic phosphate* (Pi) (Ribeiro, 1987; Law *et al.*, 1992). ADP merupakan salah satu substrat apirase yang dihasilkan dari granula-granula platelet, dan berperan sebagai induser untuk agregasi platelet melalui reseptor membran (Kunapuli, 2002). Kemampuan penghambatan agregasi platelet melalui hidrolisis ADP dimiliki oleh seluruh *haematophagous arthropods* sebagai komponen vasodilator untuk mempermudah proses *blood feeding*. Aktivitas apirase telah terdeteksi di dalam kelenjar saliva nyamuk (Ribeiro *et al.*, 1984 & Marinotti *et al.*, 1996), *bed bugs* (Valenzuela *et al.*, 1996), *black flies* (Cupp *et al.*, 1995), *ticks* (Ribeiro *et al.*, 1991 & Mans *et al.*, 1998), *fleas* (Ribeiro *et al.*, 1990) dan *Culicoides* (Perez & Tabachnick,

1996). Oleh karena apirase merupakan komponen utama pada protein 56 kDa kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan diketahui mampu menghambat agregasi platelet, sehingga diperlukan analisis lebih lanjut terhadap fraksi protein imunogenik 56 kDa kelenjar saliva *Aedes aegypti* terkait peranannya dalam menghambat agregasi platelet.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah yaitu : Bagaimana aktivitas fraksi protein 56 kDa kelenjar saliva *Aedes aegypti* dalam menghambat agregasi platelet sehingga berpotensi sebagai agen trombolitik?

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis aktivitas fraksi protein 56 kDa kelenjar saliva *Aedes aegypti* dalam menghambat agregasi platelet.

1.3 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktifitas fraksi protein imunogenik 56 kDa kelenjar saliva *Aedes aegypti* sebagai agen trombolitik yang berpotensi dikembangkan sebagai protein terapeutik.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dan Fungsi Biologisnya

Saliva menjadi kunci penting dalam siklus transmisi virus *dengue* ke dalam tubuh inang karena memiliki komponen anti hemostasis, anti inflamasi dan imunomodulator yang dapat memudahkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang. Komponen anti hemostasis pada saliva nyamuk dapat mengganggu hemostasis pada tubuh inang, komponen ini mampu mencegah vasokonstriksi dan pembekuan darah pada pembuluh darah saat nyamuk melakukan *blood feeding*, sehingga nyamuk dapat menghisap darah lebih mudah (Fontaine *et al.*, 2011). Komponen anti inflamasi pada saliva nyamuk dapat mencegah adanya inflamasi yang akan memudahkan vektor mentransmisikan patogen ke dalam tubuh inang (Kazimirova & Stibraniova, 2013). Komponen imunomodulator pada saliva nyamuk dapat memodulasi respon imun inang. Imunomodulator pada saliva *Aedes aegypti* dapat membantu kesuksesan transmisi patogen ke dalam tubuh inang karena mampu memodulasi respon imun inang. Selain itu komponen ini mengandung protein imunogenik yang dapat memunculkan respon imun adaptif, yang menghasilkan antibodi melawan komponen saliva (Schneider & Higgs, 2008).

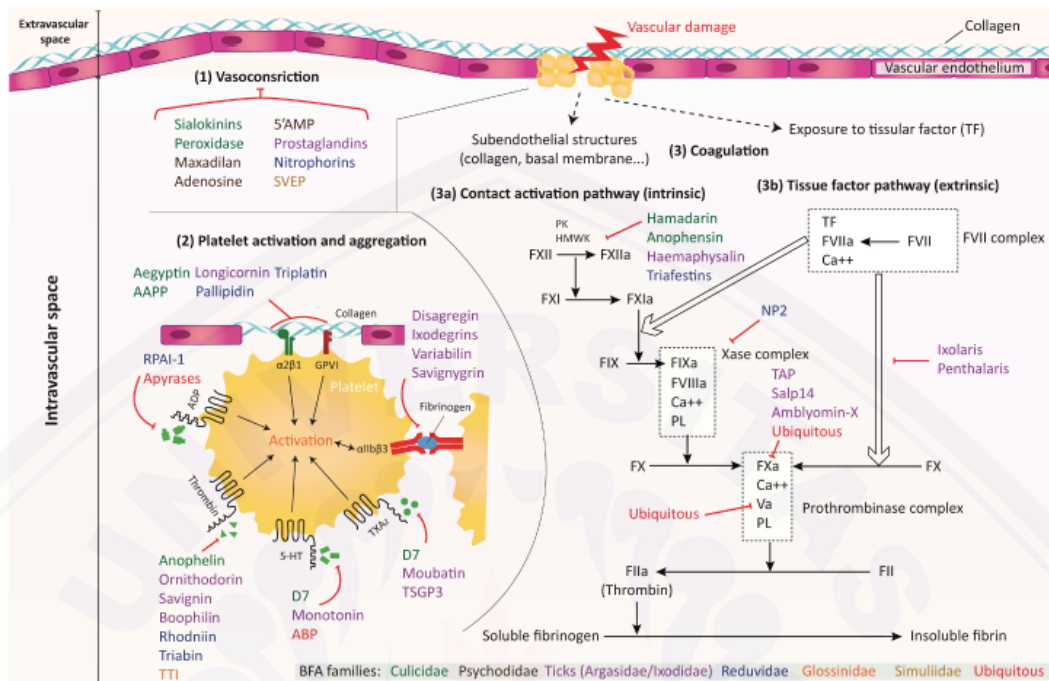
Beberapa protein yang berperan dalam proses *blood feeding* dan dapat menginduksi respon imun inang diantaranya protein D7, *adenosine deaminase*, *purin hidrosilase*, *apirase*, 30 kDa allergen dan *serpin* (Almeras *et al.*, 2010) (Gambar 2.1). Sedangkan berdasarkan analisis transkriptomik dan proteomik, protein yang ada dalam saliva nyamuk diantaranya *apirase*, *serpin 1 dan 2*, protein D7, ADA (*Adenosin deaminase*), *amilase*, *lectin*, *purin* dan *protease* (Ribeiro *et al.*, 2007). Protein yang terdapat pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan fungsinya dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komponen kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan fungsi biologisnya

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

(Sumber : Luplertop, 2014)

Protein D7 merupakan komponen yang jumlahnya paling banyak dalam kelenjar saliva nyamuk *Aedes aegypti* betina dewasa (Calvo *et al.*, 2005). Protein D7 ditemukan pada lobus bagian distal-lateral dan medial kelenjar saliva nyamuk. Protein ini berperan sebagai anti hemostasis dengan cara menghambat aksi dari *amina biogenic* (serotonin, histamin dan norepinefrin) yang menyebabkan gagalnya proses vasokonstriksi dan agregasi platelet, sehingga dapat mempermudah proses *blood feeding* dan transmisi patogen ke dalam tubuh inang (Calvo *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Serotonin akan dilepaskan selama proses aktivasi platelet, menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular, dan berperan sebagai vasokonstriktor. Histamin akan dilepaskan dari jaringan sel mast dan platelet selama inflamasi karena kerusakan jaringan. Selain itu, serotonin dan histamin juga menginduksi sensasi panas dan gatal



Gambar 2.1 Peran protein kelenjar saliva Arthropoda (Fontaine *et al.*, 2011).

yang dirasakan inang sehingga mengganggu *blood feeding* yang dilakukan oleh vektor. Sedangkan norepinefrin menstimulus terjadinya vasokonstriksi (Calvo *et al.*, 2005).

Protein serpin pada saliva nyamuk berperan sebagai antikoagulan. Protein ini dapat menghambat aksi Xa dalam proses koagulasi darah. Protein 30 kDa allergen merupakan protein yang menimbulkan respon alergi pada inang. Protein ini termasuk dalam kelompok *aegyptin*, yang memiliki fungsi sebagai anti hemostasis dengan cara menghambat aktivasi platelet dan agregasi trombosit sehingga dapat mempermudah proses *blood feeding* (Calvo *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2007; Almeras *et al.*, 2010).

2.2 Potensi Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* Sebagai Agen Trombolitik

Berdasarkan hasil analisis *western blot* yang dilakukan Oktarianti *et al.* (2014) terdapat dua protein imunogenik yang berasal dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* dengan masing-masing memiliki berat molekul 31 kDa dan 56 kDa. Analisis lebih lanjut dengan menggunakan *Liquid Chromatography - Tandem Repeat Mass Spectrometry*

(LC – MS/MS), diketahui bahwa protein dengan berat molekul 31 kDa memiliki komponen utama yang disebut D7 dan protein dengan berat molekul 56 kDa memiliki komponen utama apirase (Oktarianti *et al.*, 2015).

Protein apirase adalah nukleosida trifosfat-difosfohidrolase yang banyak ditemukan pada organisme *hematophagous*. Apirase pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* merupakan anggota dari kelompok gen pengkode 5'*nucleotidase* (Champagne *et al.*, 1995). Apirase ditemukan pada lobus kelenjar saliva bagian distal lateral dan medial (Juhn *et al.*, 2011). Protein apirase adalah komponen penyusun utama protein 56 kDa dalam saliva *Aedes aegypti* (Oktarianti *et al.*, 2005). Apirase dapat membantu proses *blood feeding* karena dapat menghambat agregasi platelet dengan cara mendegradasi ATP dan ADP menjadi AMP dan ortofosfat (Champagne *et al.*, 1995).

Saat melakukan *blood feeding*, nyamuk akan menusukkan *proboscis* hingga *endothelium*, sehingga menyebabkan pembuluh darah rusak. Pada keadaan normal rusaknya pembuluh darah akan memicu mekanisme agregasi platelet. Platelet dapat aktif karena adanya aktivitas dari kolagen, thrombin, tromboxan A₂ dan ADP. ADP memiliki fungsi penting dalam menjaga hemostasis, karena dapat menginduksi aktifnya platelet untuk melakukan proses agregasi platelet sehingga terjadi proses pembekuan darah. Namun dengan adanya komponen antikoagulan seperti apirase pada saliva nyamuk, menyebabkan proses agregasi platelet terhambat. Sehingga proses pembekuan darah terhambat dan darah tetap mengalir hingga proses *blood feeding* selesai (Ribeiro *et al.*, 1984).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2018 sampai dengan bulan April 2019, bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember; Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati) Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang nyamuk, kertas saring, pipet plastik, cawan plastik, *tray*, kapas, erlenmeyer, sungkup tikus, aspirator, tabung nyamuk, kain kasa, kain handuk, botol minum tikus, penutup kawat, mikroskop stereo, jarum diseksi, *object glass*, *beaker glass*, cawan petri, mikropipet, mikrotip (ukuran 0,5-10 μL , 10-100 μL , dan 100-1000 μL), *microtube* ukuran 1,5 ml, *ice box*, *ice gel*, tisu, seperangkat alat SDS-PAGE, parafilm, *thermoshaker*, kompor, *magnetic stirer*, *sentrifuge (Hettich Jerman)*, vacutainer berisi EDTA, nano-drop, *microplate*, dan *microplate reader*.

Bahan-bahan yang dipergunakan terdiri atas nyamuk *Aedes aegypti*, tikus wistar, *aquades steril*, larutan sukrosa 10%, NaCl 0,5 %, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF) 1 mM, alkohol 70%, *loading buffer* (Tris, Gliserol, SDS, β -*mercaptoethanol*, *bromophenol blue* dan H₂O), buffer elektroda pH 8,3 (Tris Base, Glycine, SDS), *Acrylamide/Bis-acrylamide* 30%, SDS 10%, Tris – HCl 1,5 M pH 8,8 dan 0,5 M pH 6,8 , larutan staining (*Coomassie Brillint Blue R-250*, methanol, asam asetat glacial, dan H₂O), larutan destaining (methanol, asam asetat glacial, dan H₂O), APS 10%, TEMED (*Nacalai Tesque*), marker protein (*BlueEye Prestained Protein Marker*), *surgical blade*, Tris HCl 0,05 M pH 6,8, membran selofan, PBS pH 7,4, etanol *absolute*, PRP (*Platelet Rich Plasma*) manusia, ADP, dan Aspirin.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dari preparasi alat, *rearing* nyamuk *Aedes aegypti*, isolasi kelenjar saliva *Aedes aegypti*, analisis SDS-PAGE, elektroelusi dan dialisis, dan uji agregasi platelet. Prosedur penelitian secara detail dapat dijelaskan sebagai berikut :

3.3.1 Rearing Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *rearing* koleksi kelompok riset *Vector Biology* yang dilakukan di *Animal Care Unit*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. *Rearing* nyamuk dimulai dengan melakukan *landing collection* larva nyamuk *Aedes aegypti* di bak-bak mandi atau genangan-genangan air. Larva yang telah didapat selanjutnya diletakkan pada nampan plastik (*tray*) yang telah diisi air. Selama pertumbuhannya larva diberi makan dengan pelet ikan, larva-larva tersebut dikembangkan hingga membentuk pupa. Larva yang telah berkembang menjadi pupa dipindahkan menggunakan pipet plastik ke dalam cawan pupa. Selanjutnya cawan pupa dimasukkan ke dalam kandang nyamuk hingga pupa tumbuh menjadi nyamuk dewasa. Diletakkan pula cawan lain yang berisi 2 lembar kertas saring dengan ukuran masing-masing adalah 4 x 12 cm pada sisi bagian dalam cawan yang disusun secara melingkar, fungsi kertas saring tersebut sebagai tempat bertelur nyamuk dewasa. Selain itu di dalam kandang juga diletakkan larutan sukrosa 10 % sebagai sumber nutrisi nyamuk *Aedes aegypti* jantan dan seekor tikus wistar yang diletakkan pada kandang kecil untuk *blood feeding* nyamuk betina.

Nyamuk dewasa diambil menggunakan alat aspirator selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung nyamuk yang ditutup dengan kain kasa dan kapas pada bagian tengahnya. Nyamuk *Aedes aegypti* yang telah ditangkap selanjutnya dilakukan identifikasi morfologi sehingga diperoleh nyamuk *Aedes aegypti* betina untuk diisolasi kelenjar salivanya.

3.3.2 Identifikasi Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes aegypti* hasil *rearing* dimasukkan dalam tabung nyamuk dan selanjutnya diletakkan ke dalam lemari pendingin bersuhu -20°C selama ± 20 detik. Nyamuk yang telah di *freeze* kemudian ditempatkan pada cawan petri yang diletakkan dalam *ice box*, sebelum dilakukan isolasi kelenjar saliva, terlebih dahulu nyamuk hasil *rearing* diidentifikasi jenis kelamin dan spesiesnya. Identifikasi jenis kelamin dapat dilakukan dengan melihat struktur *antenna* nyamuk. Nyamuk jantan memiliki *antenna* dengan rambut yang panjang dan lebat, sedangkan nyamuk betina memiliki *antenna* dengan rambut yang pendek dan kurang lebat. Untuk membedakan spesies nyamuk *Aedes* dapat diketahui melalui deretan rambut putih yang membentuk pola garis pada tubuh bagian dorsal toraks nyamuk. Nyamuk *Aedes aegypti* memiliki 2 deretan rambut putih yang sejajar dan diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade, B.B., Clarissa R.T., Aldina B., & Monel B.R. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 665-693.
- Banerjee, A., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. 2004. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnology Advances*, 22(4), 287-307.
- 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.
- Born, G. V. R. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 194(4832), 927-929.
- Calvo, E., Fuyuki T., Osvaldo M., Jean L. V., Jose M.C.R., & Ivo M. B. 2007. Aegyptin, a Novel Mosquito Salivary Gland Protein, Specifically Binds to Collagen and Prevents Its Interaction with Platelet Glycoprotein VI, Integrin $\alpha 2\beta 1$, and von Willebrand Factor. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282: 26928-26398.
- Calvo, E., B. J. Mans, J. F. Andersen, J. M. Ribeiro. 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biom Chem*. 281(4) : 1935-1942.
- Canon CP, Brownwald E. *Unstable angina and non-ST-elevation myocardial infarction*. In: Kasper DL et al, eds. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill. 2005. p.1444-8.
- Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M., & 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., & Warner, T. D. 2018. 96-well plate-based aggregometry. *Platelets*. 29(7), 650-655.

- Chen, H. H., Zhang, R. L., Geng, Y. J., Cheng, J. Q., Zhang, S. X., Huang, D. N., ... & Zhu, X. Q. 2007. Identification of differentially expressed genes in female *Culex pipiens pallens*. *Parasitology research*. 101(3), 511-515.
- Collen D. Coronary thrombolysis: streptokinase or Francis CW, Marder VJ. Fibrinolytic therapy for venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1991;34(3):193–204. recombinant tissue-type plasminogen activator? *Ann Intern Med* 1990;112:529– 38.
- Collen D, Stump DC, Gold HK. Thrombolytic therapy. *Annu Rev Med* 1988;39:405–23.
- Cupp MS, Cupp EW, Ochoa-A JO, Moulton JK, 1995. Salivary apyrase in New World blackflies (Diptera: Simuliidae) and its relationship to onchocerciasis vector status. *Med Vet Entomol* 9: 325–330.
- Edelman, R. 2007. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. *Center for Vaccine Development*. Vol. 45: 56-60.
- Francis CW, Marder VJ. Fibrinolytic therapy for venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1991;34(3):193–204.
- Francischetti, I. M. 2010. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*.56(7), 1130-1144.
- Gillespie, R.D., Lamine M., & Richard G. T. 2000. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*. Vol 22: 319-331.
- Gross, P. L., & Weitz, J. I. 2009. New antithrombotic drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(2), 139-146.
- Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. 2014. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Halim, S. L. 2006. Tes Agregasi untuk Pencegahan Penyakit Kardiovaskuler. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 14(38).
- Harrison, C.N. 2005. Platelets and Thrombosis in Myeloproliferative Disease. <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/full/2005/1/409>.

- James A., Blackmer K., Racioppi J.V. 1991. A Salivary Gland Specific, Maltase-Like Gene of The Vector Moaquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol*. Vol 44: 245-253.
- Juhn, J., Unsar N.U., Bruno A.M.G., Asif M., Judy C., Paulo F.P.P., Waseem A., Anthony A.J., & Osvaldo M. 2011. Spatial Mapping og Gene Expression in the Salivary Glands of The Dengue Vector Mosquito, *Aedes segypti*. *Parasites & Vectors*.4:1.
- Kazimírová, M., & Stibraniova, I. 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 43.
- Kunapuli, S, P. 2002. P2 Receptor and Platelet activation. *Scientific World Journal* (2) : 424-433.
- Law J. H., Ribeiro J. M. C. and Wells M. A. 1992. Biochemicalinsights derived from insect diversity. *Annu. Rev. Biochem.* 61,87-111.
- Makin, A, and Silverman SH, 2002, Peripheral Vascular Disease and Virchow's Triad forThrombogenesis. *Q J Med* ; 95: 199-210.
- Mans BJ, Gaspar ARMD, Louw AI, Neitz AWH, 1998. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol*. 22: 353–366.
- Mans, B. J., Andersen, J. F., Schwan, T. G., & 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.
- Marcus, A. J., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H., Islam, N., Alyonycheva, T. N., Safier, L. B., ... & Gayle, R. B. 1997. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *The Journal of clinical investigation*.99(6), 1351-1360.
- Marinotti O, de Brito M, Moleria CK, 1996. Apyrase and α -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113: 675–679.
- Murray, T. G., Jaffe, G. J., McKay, B. S., Han, D. P., & Abrams, G. W. 1992. Collagen Shield Delivery of Tissue Plasminogen Activator: Functional and Pharmacokinetic Studies of Anterior Segment Delivery/Comment: Herbert E.

- Kaufman, MD, New Orleans, La/Comment: Robert W. Snyder, MD, PhD, Tucson, Ariz/Comment: Susanne Gardner, DPharm, Atlanta, Ga/Response: Murray and colleagues. *Journal of Refractive Surgery*, 8(1), 44.
- Oktarianti, R., Kartika S., Fatchiyah F., & Aulanni'am. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against to Human Sera. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 101-107.
- Oktarianti, R., Senjarini, K., Hayano, T., & 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-Zsomboki, E., Vermylen, J., & Hoylaerts, M. F. 2006). The platelet ATP and ADP receptors. *Current pharmaceutical design*, 12(7), 859-875.
- Perez de Leon AA, Tabachnick WJ, 1996. Apyrase activity and adenosine diphosphate induced platelet aggregation inhibition by the salivary gland proteins of *Culicoides variipennis*, the North American vector of bluetongue virus. *Vet Parasitol* 61: 327–338.
- Periyah, M. H., Halim, A. S., & 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.
- Rahayu, D. F., & Ustiawan, A. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Balaba: jurnal litbang pengendalian penyakit bersumber binatang banjarnegara*, 7-10.
- Ribeiro, J. M., Arcà, B., Lombardo, F., Calvo, E., Phan, V. M., Chandra, P. K., & Wikel, S. K. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC genomics*. 8(1), 6.
- Ribeiro JMC, Sarkis JJF, Rossingnol PA, Spielman A, 1984. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B* 79: 81–86.
- Rivera-Bou WL, Schraga ED. Thrombolytic therapy [Internet]. 2015 Dec 8. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/811234-overview#aw2aab6b3>
- Ribeiro JMC, Endris TM, Endris R. 1991. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A* 100: 109–112.

- Ribeiro J. M. C. 1987. Role of arthropod saliva in blood feeding. *Ann. Rev. Entomol.* 32, 463-478.
- Robson, S. C., Kaczmarek, E., Siegel, J. B., Candinas, D., Koziak, K., Millan, M., ...& Bach, F. H. 1997. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *Journal of Experimental Medicine.* 185(1), 153-164.
- Rueda, L. M. 2004. *Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission.* Walter Reed Army Inst Of Research Washington Dc Department Of Entomology.
- Schmid, M. A., Kauffman, E., Payne, A., Harris, E., & Kramer, L. D. 2017. Preparation of mosquito salivary gland extract and intradermal inoculation of mice. *Bio-protocol.* 7(14).
- Schneider, B. S., and S. Higgs. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hy.* 102: 400-408.
- See, G. L. L., Lopez, J. A. A., Alterado, E. N. C., & Arce, F. J. V. *In Vitro Platelet Aggregation Inhibition Activity of Psophocarpus tetragonolobus (L.) Dc Pod Extract.*
- Smith, T. M., & Kirley, T. L. 2006. The calcium activated nucleotidases: A diverse family of soluble and membrane associated nucleotide hydrolyzing enzymes. *Purinergic Signalling.* 2(2), 327.
- Titus, R.G., J.V. Bishop, & J.S. Mejia. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology.* Vol 28: 131–141.
- Valenzuela JG, Chuffe OM, Ribeiro JMC, 1996. Apyrase and anti-platelet activities from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Insect Biochem Mol Biol* 21: 557–562.
- Wan, S.W., Chiou-Feng L., Shuying W., Yu-Hu C., Trai-Ming Y., Hsiao-Sheng L., Robert A., & Yee-Shin L. 2013. Current progress in dengue vaccines. *Journal of Biomedical Science.* 20:37.
- Wasinpiyamongkol, L., Sirilaksana P., Suprata T., Pannamas M., Suntaree S., Dorothee M., & Natthanej L. 2012. Protein Expression in the salivary Gland of Dengue Infected *Aedes aegypti* Mosquito and Blood Feeding Succes. Vol 43:1346-1357.

White, M. M., & Jennings, L. K. 1999. *Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures*. Elsevier.

Zeidner, N. S., Stephen H., Christine M.H., Barry J.B., & Barry R.M. 1999. Mosquito Feeding Modulates Th1 and Th2 Cytokines in Flavivirus Susceptible Mice: an Effect Mimicked by Injection of Sialokinins, but not Demonstrated in Flavivirus Resistant Mice. *Parasite Immunology* : 35-44.

