



**KARAKTERISASI PARSIAL FAKTOR IMUNOMODULATOR KELENJAR  
SALIVA *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) SEBAGAI KANDIDAT  
*TRANSMISSION BLOCKING VACCINE* (TBV)  
DEMAM BERDARAH DENGUE**

**SKRIPSI**

oleh

**Syubbanul Wathon  
NIM 081810401013**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**KARAKTERISASI PARSIAL FAKTOR IMUNOMODULATOR KELENJAR  
SALIVA *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) SEBAGAI KANDIDAT  
*TRANSMISSION BLOCKING VACCINE* (TBV)  
DEMAM BERDARAH DENGUE**

**SKRIPSI**

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

oleh

**Syubbanul Wathon  
NIM 081810401013**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua tercinta yang telah memberikan kasih sayang, do'a restu, dan pengorbanan yang tiada henti;
2. semua keluarga besar dan teman-teman yang telah mendukung dan memberi motivasi dalam menempuh pendidikan;
3. semua guru dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan mengajarku, terima kasih yang tak terhingga atas segala ilmu yang diberikan;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

“...Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”  
(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)<sup>1</sup>

“Bersungguh-sungguhlah engkau dalam menuntut ilmu, jauhilah kemalasan dan kebosanan karena jika tidak demikian engkau akan berada dalam bahaya kesesatan”  
(Imam Al Ghazali)<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 1999. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: CV. Asy\_Shyfa'.

<sup>2</sup> Fuadi, A. 2011. *Ranah 3 Warna*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Syubbanul Wathon

NIM : 081810401013

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Parsial Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sebagai Kandidat *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Demam Berdarah Dengue” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian berjudul “Karakterisasi Molekuler Komponen Saliva Nyamuk *Aedes aegypti* Strain Lokal dan Uji Potensi Komponen tersebut sebagai Target untuk Pembuatan Vaksin Melawan Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD)” dan dibiayai program Hibah Riset dan Teknologi DIKTI atas nama Dr. rer. nat. Kartika Senjarini 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Januari 2013

Yang menyatakan,

Syubbanul Wathon  
NIM 081810401013

## **SKRIPSI**

# **KARAKTERISASI PARSIAL FAKTOR IMUNOMODULATOR KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) SEBAGAI KANDIDAT *TRANSMISSION BLOCKING VACCINE* (TBV) DEMAM BERDARAH DENGUE**

Oleh

Syubbanul Wathon  
NIM 081810401013

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Sri Mumpuni Wahyu Widajati S.Pd., M.Si

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Parsial Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sebagai Kandidat *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Demam Berdarah Dengue” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

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

Sri Mumpuni Wahyu Widajati S.Pd., M.Si  
NIP 197105101999032002

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd  
NIP 195805281988021002

Drs. Rudju Winarsa M.Kes  
NIP 196008161989021001

Mengesahkan  
Dekan,

Prof. Drs. Kusno DEA., Ph.D  
NIP 196101081986021001

## RINGKASAN

**Karakterisasi Parsial Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sebagai Kandidat *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Demam Berdarah Dengue;** Syubbanul Wathon, 081810401013; 2013: 34 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) hingga saat ini merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh virus *dengue* dan ditransmisikan ke manusia oleh *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) sebagai vektor primer, sedangkan *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) sebagai vektor sekundernya. DBD merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus maka penanganan untuk penyakit ini masih bersifat simptomatis dan tidak ada terapi kausatifnya. Penanganan terhadap penyakit DBD yang bisa dilakukan adalah dengan pengendalian vektornya. Namun usaha tersebut belum memberikan hasil yang maksimal. Usaha pencegahan lain yang terus dikembangkan adalah pembuatan vaksin. Pendekatan terbaru penanganan DBD yang dikembangkan saat ini adalah pembuatan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) yang salah satunya berbasis saliva vektor. Pendekatan ini dilakukan berdasarkan hipotesis bahwa saliva vektor penyakit Arthropoda mengandung faktor vasodilator dan imunomodulator yang berperan penting dalam proses transmisi patogen. Protein imunomodulator saliva vektor penyakit Arthropoda inilah yang merupakan target potensial dalam pengembangan TBV. Tujuan penelitian ini mengetahui protein putatif ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang berfungsi sebagai faktor imunomodulator. Metode yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 1) *rearing Ae. aegypti*, 2). isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*, 3) ekstraksi protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*, 4). preparasi plasma darah manusia, 5) optimasi *Dot Blot*, 6) analisis SDS-PAGE, 7) analisis *Western Blot*. Hasil



visualisasi SDS-PAGE protein dari 100 pasang kelenjar saliva *Ae. aegypti* menunjukkan adanya beberapa pita protein dengan berat molekul ~ 136, 122, 77, 63, 59, 55, 49, 40, 36, 24, 22 dan 20 kDa. Dari hasil visualisasi *Western Blot* dapat diketahui bahwa protein spesifik yang dikenali plasma darah orang endemik tersebut memiliki berat molekul ~ 37 kDa. Protein spesifik tersebut diduga berperan penting dalam resistensi penduduk endemik terhadap infeksi virus *dengue*. Penelitian ini menunjukkan pentingnya hubungan antara inang dan vektor untuk mengembangkan strategi terpadu dalam mengevaluasi paparan saliva *Ae. aegypti* dan untuk menekan risiko DBD

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul: “Karakterisasi Parsial Faktor Imunomodulator Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) sebagai Kandidat *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Demam Berdarah Dengue”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., dan Sri Mumpuni Wahyu Widajati S.Pd., M.Si., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd., dan Drs. Rudju Winasra M.Kes., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Drs. Moh. Imron Rosyidi M.Sc., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan dan Dra. Rike Oktarianti M.Si., selaku dosen pembimbing proyek yang telah banyak memberikan masukan dan saran selama penelitian berlangsung hingga terselesainya skripsi ini.
4. bapak dan ibu dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati membantu penulis selama dalam masa perkuliahan;
5. Ayahanda Abdur Rohim, Ibunda Lailatus Suhriyah, paman saya Achmad Syahibul Hidajat dan Chairul Askar yang telah mencurahkan segala perhatian,

kasih sayang, do'a tulus dan pendidikan yang selalu mengiringi penulis hingga beranjak dewasa;

6. Kedua saudara Mar'atus Sholihah dan Hayatun Nufus yang selalu memberikan semangat, canda tawa, motivasi, dan do'a di tiap hari kehidupan penulis;
7. rekan kerja seperjuangan Imam Hanafy, Ika Agus Rini, Arif Setiawan, Madaniyah, Dewi Eka Prawita Rani, serta teman-teman lain diantaranya Harmas Suhendi, A.P., Afrian Danny Santoso, Windrarini Rahvian Aridama, Zahira Rajab, Chintia Dwi Ratna Kusumadewi, Hidayah Murtia Ningsih., Frangky, Edia Fitri, Rinda Media Ningtias., Pak Ali Machrus, Pak Adrial, Widya Yuniar, Lutfia Cahyani, Siti Nur Azizah, terima kasih atas kerja sama, dukungan serta bantuan yang diberikan selama penelitian;
8. kakak-kakak seperjuangan Dwi Esti Febriantiningih, Dewi Riskha Nurmalasari, Dina Fitriyah dan adik-adik seperjuangan Rofi'atul dan Moh. Mirza yang selalu memberikan dukungan dan semangatnya;
9. staf B<sub>2</sub>P<sub>2</sub>VRP Salatiga dan teknisi Laboraturium Radiologi RS Bina Sehat, yang telah meluangkan waktu dan tenaganya dalam penyediaan sampel dan lancarnya proses penelitian ini.
10. teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2008 terima kasih atas kebersamaan, persaudaraan, dan tempat berbagi suka dan duka;
11. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga do'a, bimbingan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis sangat mengharapkan segala masukan yang bersifat kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, Januari 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Tujuan</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 Manfaat</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Penyakit DBD dan Penatalaksaaannya</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Pengembangan TBV untuk Penanggulangan Penyebaran         Patogen oleh Vektor Arthropoda</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Vektor DBD dan Transmisi Patogen</b> .....	<b>8</b>

<b>2.4 Protein Imunomodulator Saliva <i>Ae. aegypti</i> Sebagai Kandidat Target TBV DBD .....</b>	<b>11</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>15</b>
3.3.1 Preparasi Alat .....	15
3.3.2 <i>Rearing Ae. aegypti</i> .....	15
3.3.3 Isolasi kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> .....	16
3.3.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> .....	16
3.3.5 Preparasi Plasma Darah .....	17
3.3.6 Optimasi <i>Dot Blot</i> .....	17
3.3.7 Analisis SDS-PAGE.....	18
3.3.8 Analisis <i>Western Blot</i> .....	18
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>20</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>27</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>28</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Protein rekombinan <i>haematophagus</i> saliva Arthropoda dan aplikasi Imunologinya.....	13
4.1 Komparasi profil protein kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> dalam penelitian ini dengan hasil penelitian terdahulu.....	23

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup nyamuk <i>Ae. aegypti</i> .....	8
2.2 Perbedaan morfologi antena <i>Ae. aegypti</i> jantan dan betina .....	9
2.3 Perbedaan toraks bagian dorsal dua spesies genus <i>Aedes</i> .....	10
4.1 Morfologi kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> betina .....	20
4.2 Hasil visualisasi <i>Dot blot</i> .....	21
4.3 Hasil visualisasi SDS-PAGE .....	22
4.4 Hasil visualisasi <i>Western Blot</i> .....	24

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. <b>Komposisi Larutan dan <i>Buffer</i></b> .....	35
B. <b>Penentuan Berat Molekul Protein</b> .....	37
C. <b>Surat Persetujuan Kode Etik</b> .....	38
D. <b><i>Informed Consent</i></b> .....	40
E. <b>Data Dinas Kesehatan Kabupaten Jember</b> .....	41
F. <b>Contoh Data Diagnosis Pasien DBD</b> .....	42



## DAFTAR SINGKATAN

3M	: Menguras, menutup dan mengubur
DENV	: <i>Dengue Virus</i>
DHF	: <i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>
IFN- $\gamma$	: Interferon $\gamma$
IL-2	: Interleukin 2
LAV	: <i>Life Attenuated Vaccine</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PMSF	: <i>Phenyl methyl sulfonyl fluoride</i>
PVDF	: <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TBS	: <i>Tris Buffer Saline</i>
TBV	: <i>Transmission Blocking Vaccine</i>
TDV	: <i>Tetravalent Dengue Vaccine</i>
Th1	: T helper 1
Th2	: T helper 2
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) atau *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) hingga saat ini merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat di dunia. Penyakit DBD ditemukan hampir di seluruh belahan dunia terutama di negara–negara tropik dan subtropik. Namun kasus yang berakibat fatal banyak terjadi di wilayah Pasifik Barat dan Asia Tenggara seperti di Philipina, Thailand dan Indonesia (Gubler, 1998; *World Health Organization*, 2009). Di Indonesia DBD merupakan penyakit yang senantiasa ada sepanjang tahun (Departemen Kesehatan RI, 2004).

DBD merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *dengue* (DENV). Virus ini berasal dari genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae* yang diketahui memiliki empat tipe serotip (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) (Noisakran & Perng, 2008). Sebagaimana diketahui bahwa DBD merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus, maka penanganan untuk penyakit ini masih bersifat simptomatis dan tidak ada terapi kausatifnya. Tidak adanya terapi spesifik untuk DBD dan belum ditemukannya vaksin terlisensi untuk penyakit ini (Aradilla, 2009; Olson *et al.*, 2010), maka cara lain yang bisa dilakukan untuk mencegah dan menanggulangi DBD adalah dengan pengendalian vektor (Mukhlisin & Pratiwi, 2006; Nurfadly, 2009).

Di Asia Tenggara *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) menjadi vektor primer virus *dengue* sedangkan *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) sebagai vektor sekundernya (Cahyati & Suharso, 2006). Pengendalian vektor yang bersifat mekanis seperti pengasapan (*fogging*), gerakan 3M (menguras, menutup dan mengubur), dan memanfaatkan *ovitraps* sudah pernah diprogramkan oleh Pemerintah (Sayono, 2009). Usaha tersebut belum memberikan hasil yang maksimal karena partisipasi dan kesadaran masyarakat yang masih rendah. Selain itu tidak adanya evaluasi serta

lemahnya sistem monitoring dari Dinas Kesehatan. Usaha pencegahan lain yang masih terus dikembangkan adalah pembuatan vaksin DBD (Edelman, 2007).

Sampai saat ini belum dilaporkan vaksin yang berlisensi untuk DBD dan semua masih dalam tahap pengembangan. Kendala dalam pengembangan vaksin DBD adalah kurangnya hewan model yang cocok dan mempunyai infeksi patologis yang sama dengan manusia. Perkembangan ilmu biologi molekuler telah banyak membantu dalam pengembangan vaksin DBD. Salah satu vaksin DBD yang berpotensi adalah virus hidup yang dilemahkan (*Live Attenuated Virus /LAV*) yang dibuat oleh isolat *wild type* virus dalam kultur sel primer dan vaksin *chimeric* virus yang dilemahkan (Lima *et al.*, 2011). LAV memiliki keunggulan yaitu biaya produksi yang cenderung lebih murah dari pada teknologi vaksin lainnya, mendorong respon imunitas humoral dan seluler, menghasilkan vaksin yang kuat, tahan lama dan imunitasnya lebih tinggi (Lauring *et al.*, 2010).

Pengembangan vaksin DBD berlanjut hingga pembuatan vaksin gabungan semua serotip virus *dengue* yang disebut dengan *Tetravalen Dengue Vaccine* (TDV) (Edelman, 2007). TDV dikembangkan dengan cara membuat vaksin hidup dari keempat serotip virus *dengue* (*Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine*), yang telah dilakukan di Thailand (Chanthavanich *et al.*, 2006). TDV dikembangkan dengan tujuan untuk membuat sebuah vaksin yang sekaligus memberikan perlindungan jangka panjang terhadap semua serotip virus *dengue*. Vaksin ini ternyata kurang efektif karena adanya kesulitan dalam menentukan keadaan yang tepat untuk melemahkan virus pada tingkat yang optimal. Selain itu kekhawatiran tentang stabilitas genetik dari vaksin LAV dan kemungkinan menjadi fenotip yang lebih ganas juga menjadi kendala (Schmitz *et al.*, 2011).

Pendekatan terbaru vaksin DBD adalah dengan mencegah transmisi patogen melalui pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) yang salah satunya berbasis vektor. Pengembangan TBV yang telah berhasil adalah vaksin anti-maxandilan (MAX) dan anti-SP 15 untuk penyakit *Leishmaniasis* (Titus *et al.*, 2006).

Keberhasilan ini mendorong pengembangan vaksin lain untuk patogen yang di transmisikan oleh vektor penyakit Arthropoda termasuk virus *dengue*.

Upaya pengembangan TBV salah satunya dengan memanfaatkan komponen saliva vektor penyakit Arthropoda sebagai kandidat target berbasis vektor (Titus *et al.*, 2006). Saliva nyamuk mengandung substansi yang berperan penting dalam proses transmisi patogen, seperti vasodilator, inhibitor koagulasi darah, imunomodulator dan agregasi platelet (Lavazec *et al.*, 2007). Komponen vasodilator dapat menyebabkan pelebaran pembuluh darah sehingga mempermudah nyamuk mengisap darah. Komponen imunomodulator yang bersifat immunosupresif dapat menekan sistem imun inang sehingga dapat mempermudah proses transmisi patogen (James *et al.*, 2003; Titus *et al.*, 2006).

Dengan adanya potensi saliva dalam meningkatkan transmisi patogen ke tubuh inang, maka banyak penelitian dilakukan mengenai identifikasi dan karakterisasi terhadap beberapa molekul yang terkandung di dalam saliva vektor penyakit Arthropoda (Andrade *et al.*, 2005), termasuk faktor imunomodulator (Titus *et al.*, 2006). Pengembangan potensi faktor imunomodulator dalam saliva vektor sebagai target TBV didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu pada penyakit *Leishmaniasis*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya paparan secara berulang saliva vektor penyakit Arthropoda dapat memberikan mekanisme yang protektif terhadap tubuh inang melalui pergeseran respon imun yang justru memberikan kekebalan pada tubuh inang (Titus *et al.*, 2006; Oliviera *et al.*, 2009). Apabila paparan secara berulang saliva vektor penyakit Arthropoda dapat mempengaruhi respon imun inang ke arah yang lebih protektif (Belkaid *et al.*, 1998), maka pendekatan yang mungkin dilakukan untuk mengendalikan transmisi virus *dengue* yaitu melalui vaksinasi tubuh inang dengan protein imunomodulator saliva *Ae. aegypti*. Tubuh inang akan merespon protein imunomodulator yang diinjeksikan dengan membentuk antibodi yang melawan protein imunomodulator tersebut sehingga virus *dengue* tidak dapat ditransmisikan atau memblokir transmisi patogen ke tubuh inang (Titus *et al.*, 2006). Dengan demikian komponen kelenjar saliva

merupakan target potensial TBV dan studi mengenai protein imunomodulator saliva *Ae. aegypti* merupakan strategi yang esensial untuk pengembangan TBV DBD.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimanakah karakteristik parsial protein dalam kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang dapat bereaksi silang dengan plasma darah manusia berkaitan dengan infeksi DBD?

## **1.3 Batasan Masalah**

Penentuan karakteristik parsial protein imunomodulator sebagai target utama dalam pengembangan TBV berbasis saliva vektor Arthropoda pada penelitian ini dibatasi sampai pada tahap penentuan secara kualitatif pita protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang dapat bereaksi silang dengan plasma darah orang sehat dari wilayah endemik, non endemik, dan pasien DBD.

## **1.4 Tujuan**

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi faktor imunomodulator kelenjar saliva *Ae. aegypti* sebagai target potensial dalam pengembangan TBV DBD. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mengetahui protein putatif ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang berfungsi sebagai faktor imunomodulator.

## **1.5 Manfaat**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi faktor imunomodulator kelenjar saliva *Ae. aegypti* sebagai kandidat target potensial pengembangan TBV DBD.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penyakit DBD dan Penatalaksanaannya

Penyakit DBD adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus *dengue*. Virus *dengue* yang termasuk kelompok *B Arthropod Borne Virus (Arboviruses)* yang kini dikenal sebagai genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae* dan mempunyai 4 jenis serotip yaitu: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Infeksi salah satu serotip akan memunculkan antibodi terhadap serotip yang bersangkutan, sedangkan antibodi yang terbentuk terhadap serotip lain sangat kurang, sehingga tidak dapat memberikan perlindungan yang memadai terhadap serotip lain (Wati, 2009). Penyakit DBD terutama menyerang anak-anak dengan ciri-ciri demam tinggi mendadak dengan manifestasi perdarahan dan bertendensi menimbulkan *shock* dan kematian. Namun pada dekade terakhir ini terlihat adanya kecenderungan kenaikan proporsi penderita DBD pada orang dewasa (Siregar, 2004).

Mekanisme patofisiologi dan patogenesis DBD hingga kini belum diketahui secara pasti, tetapi sebagian besar menganut teori "*the secondary heterologous infection hypothesis*" yang menyatakan bahwa gejala DBD lebih parah dapat terjadi apabila seseorang setelah infeksi virus *dengue* pertama mendapat infeksi berulang dengan tipe virus *dengue* yang berlainan. Akibat infeksi kedua oleh tipe virus *dengue* yang berlainan pada seorang penderita respon antibodi anamnestic akan terpicu, menyebabkan proliferasi dan transformasi limfosit dan menghasilkan titer tinggi IgG anti-*dengue*. Proliferasi limfosit juga menyebabkan tingginya angka replikasi virus *dengue*. Hal ini mengakibatkan terbentuknya kompleks virus-antibodi yang selanjutnya mengaktivasi sistem komplemen (Chen, 2009). Pelepasan C3a dan C5a akibat aktivasi C3 dan C5 menyebabkan meningkatnya permeabilitas dinding pembuluh darah dan merembesnya plasma melalui endotel dinding pembuluh darah (Siregar, 2004).

Pada dasarnya terapi DBD adalah bersifat suportif dan simptomatis. Penatalaksanaan ditujukan untuk mengganti kehilangan cairan akibat kebocoran plasma dan memberikan terapi substitusi komponen darah bilamana diperlukan. Dalam pemberian terapi cairan, hal terpenting yang perlu dilakukan adalah pemantauan baik secara klinis maupun laboratoris. Terapi non farmakologis yang diberikan meliputi tirah baring (pada trombositopenia yang berat) dan pemberian makanan dengan kandungan gizi yang cukup, lunak dan tidak mengandung zat atau bahan yang mengiritasi saluran pencernaan. Sebagai terapi simptomatis dapat diberikan antipiretik berupa parasetamol (Chen, 2009).

Sejauh ini belum ditemukan obat yang aman dan efektif bagi penyakit DBD, sehingga kontrol sepenuhnya untuk penyakit ini mengandalkan pada pengendalian vektornya (Nurfadly, 2009). Sebagai kontrol populasi vektor Arthropoda masih bergantung pada penggunaan insektisida. Munculnya fenomena resistensi vektor Arthropoda adalah konsekuensi yang tidak diharapkan dari penggunaan insektisida dan menjadi hambatan untuk aplikasi dimasa yang akan datang (Edelman, 2007). Penanganan secara mekanis seperti gerakan 3M (menguras, menutup dan mengubur), dan memanfaatkan *ovitraps* sudah pernah diprogramkan oleh pemerintah (Sayono, 2009), namun belum memberikan hasil yang maksimal karena partisipasi, kesadaran masyarakat yang masih rendah dan tidak adanya evaluasi serta lemahnya sistem monitoring dari Dinas Kesehatan. Usaha pencegahan lain yang masih terus dikembangkan adalah pembuatan vaksin DBD. Namun sampai saat ini belum ada vaksin yang terlisensi untuk penyakit ini (Olson *et al.*, 2010).

## **2.2 Pengembangan TBV untuk Penanggulangan Penyebaran Patogen oleh Vektor Arthropoda**

Vaksinasi merupakan pendekatan yang berpotensi dapat mencegah dan mengobati penyakit manusia. Vaksin mengandung substansi antigen yang sama dengan patogen asing agar sistem imun dapat mengenal patogen asing dengan menghasilkan sel T dan sel B (Baratawidjaja, 2009). Munculnya ilmu biologi

molekuler telah banyak memberikan pendekatan-pendekatan baru dalam pengembangan vaksin. Pendekatan ini dapat memungkinkan untuk lebih memanfaatkan respon imun pada peningkatan respon antibodi di tubuh manusia yang merupakan kunci bagi keberhasilan semua vaksin yang digunakan saat ini (Plotkin, 2009).

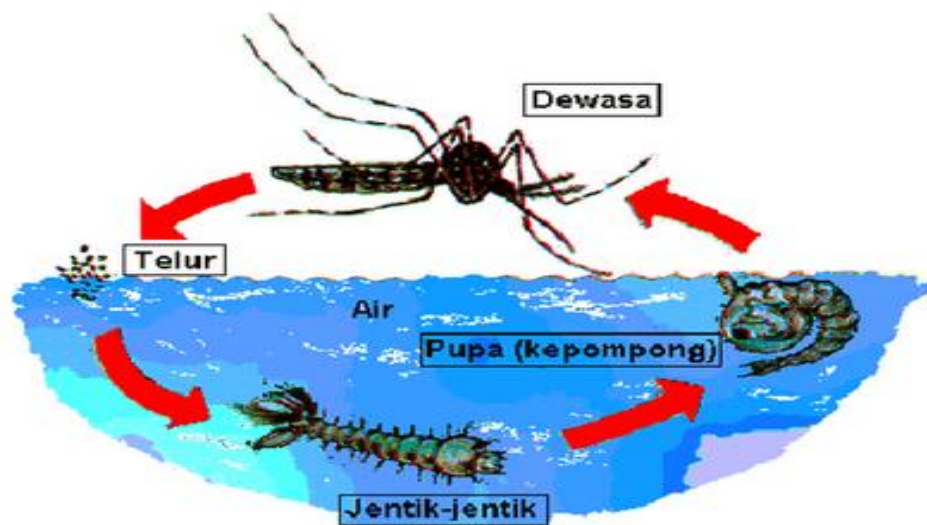
Penelitian tentang vaksin telah banyak dilakukan terutama vaksin untuk penyakit-penyakit di negara berkembang seperti malaria, *Hookworm*, *Enterotoxigenic E. coli*, *Shigella*, *Tuberculosis* dan DBD (Isbagio, 2005). Sampai saat ini penyakit menular masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di negara berkembang termasuk di Indonesia seperti penyakit DBD (Kementrian Negara Riset dan Teknologi RI, 2006). Diperkirakan 50 juta manusia terinfeksi penyakit DBD setiap tahunnya. Program pengendalian penyakit DBD terus menerus dikembangkan sampai pada tingkat pengembangan pembuatan vaksin (Olson *et al.*, 2010).

Vaksinasi adalah strategi yang paling berpotensi untuk mengontrol penyebaran penyakit DBD (Sun *et al.*, 2003; Plotkin, 2009). Penanganan DBD melalui pendekatan vaksin hingga saat masih dikembangkan, termasuk *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) yang dianggap sebagai strategi potensial untuk mengurangi serangan patogen oleh vektor penyakit Arthropoda (Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao, 2010). TBV dapat mencegah transmisi patogen dari inang yang terinfeksi ke inang yang belum terinfeksi. Salah satu target pengembangan vaksin ini adalah molekul (protein) dalam saliva vektor. Hal ini didasarkan karena kelenjar saliva vektor penyakit Arthropoda mengandung substansi yang memegang peranan penting dalam efektifitas proses transmisi patogen ke dalam tubuh inang (James *et al.*, 2003). Pengembangan TBV dalam mencegah transmisi patogen oleh vektor penyakit Arthropoda yang telah berhasil yaitu vaksin anti-maxadilan (MAX) yang bersifat melawan protein target dalam kelenjar saliva sandfly (*Lutzomyia longipalpis*) dan vaksin anti-SP15 yang bersifat melawan protein SP 15 yang terdapat dalam kelenjar saliva sandfly (*Phlebotomus papatasi*) (Titus *et al.*, 2006).



### 2.3 Vektor DBD dan Transmisi Patogen

DBD merupakan penyakit infeksi yang ditularkan oleh nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang telah terinfeksi oleh virus *dengue*. Nyamuk *Ae. aegypti* memiliki siklus hidup sempurna (*holometabola*). Siklus hidup terdiri dari empat stadium, yaitu telur, larva, pupa dan *imago* (dewasa). Stadium telur hingga pupa berada di lingkungan air, sedangkan stadium dewasa berada di lingkungan udara (Sitio, 2009). Siklus hidup *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Siklus hidup nyamuk *Ae. aegypti* (Sumber: Aradilla, 2009)

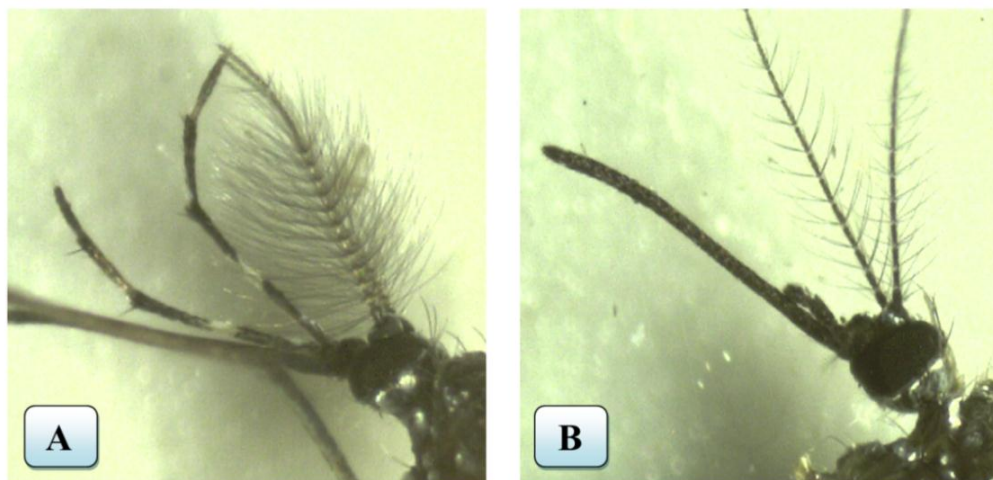
Telur *Ae. aegypti* berbentuk panjang, bulat telur, halus, dan ukuran panjangnya sekitar satu millimeter (Foster & Walker, 2002). Seekor nyamuk betina akan meletakkan 50 sampai 500 butir telur tiap sekali bertelur (Clements, 1992). Nyamuk *Ae. aegypti* betina biasanya meletakkan telurnya satu persatu pada dinding tempat perindukan yang gelap, basah dan lembab, misalnya bak mandi, tempayan, ban bekas, tonggak bambu (Chistopher, 2009).

Telur *Ae. aegypti* jika terendam oleh air akan menetas menjadi larva. Selama pertumbuhan dan perkembangannya, larva akan melewati 4 fase perubahan atau biasa

disebut *instar*. Perubahan *instar* tersebut disebabkan larva mengalami pengelupasan kulit atau biasa disebut *ecdysis/ moulting* (Veriswan, 2006). Larva nyamuk mengalami perubahan keempat tahapan *instar* selama 4-9 hari, kemudian larva akan berubah menjadi pupa. Pupa akan berubah menjadi nyamuk dewasa dalam kurun waktu 1-2 hari (Sivanathan, 2006).

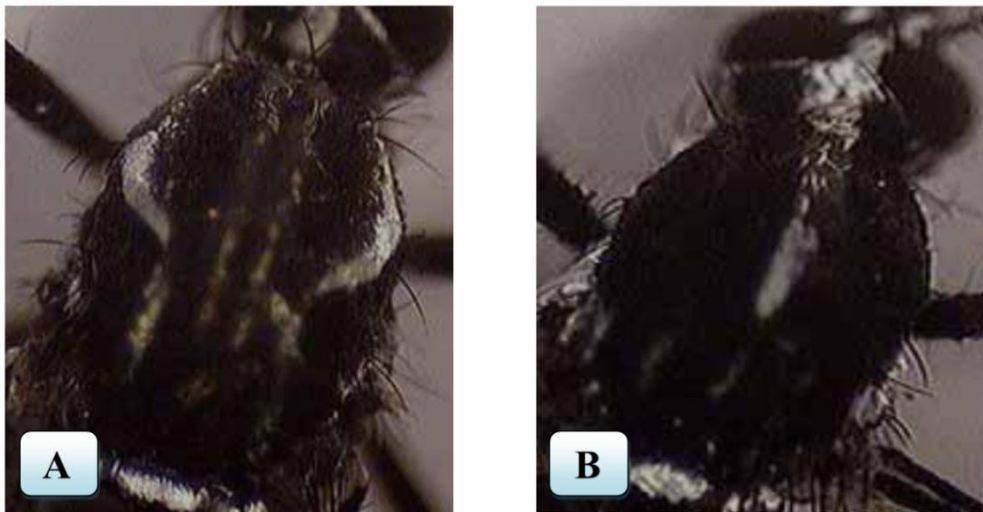
Nyamuk dewasa berukuran sekitar 4 sampai 7 milimeter. *Ae. aegypti* dewasa memiliki dua garis sisik putih pada permukaan dorsal toraks. Setiap segmen tarsal dari kaki belakang memiliki pita basal putih, membentuk seperti garis-garis. Abdomen umumnya berwarna coklat tua sampai hitam, tetapi mungkin juga memiliki sisik putih (Carpenter & La Casse, 1955).

Secara morfologi *Ae. aegypti* jantan dan betina dapat dibedakan dari ukuran tubuhnya. Ukuran tubuh nyamuk betina umumnya lebih besar dari pada nyamuk jantan (Cutwa-Francis & O'Meara, 2007). Selain itu nyamuk jantan dan betina dapat dibedakan pada bagian antenanya seperti yang terlihat pada Gambar 2.2. Antena *Ae. aegypti* jantan memiliki rambut yang banyak (*plumose*) dan pada *Ae. aegypti* betina antenanya memiliki rambut yang jarang (*pilose*) (Aradilla, 2009).



Gambar 2.2 Perbedaan morfologi antena *Ae. aegypti* jantan dan betina, (A) antena *Ae. aegypti* jantan; (B) antena *Ae. aegypti* betina.

Sebagaimana diketahui bahwa *Ae. aegypti* merupakan vektor utama virus *dengue* sedangkan vektor keduanya adalah *Ae. albopictus* (Lai *et al.*, 2007). Secara morfologi *Ae. aegypti* memiliki perbedaan dengan *Ae. albopictus*, yaitu pada pola garis putih pada permukaan dorsal toraks seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. *Ae. aegypti* dewasa memiliki dua garis sisik putih pada permukaan dorsal toraks yang membentuk seperti alat musik biola atau kecapi. Sementara *Ae. albopictus* dewasa hanya memiliki satu garis putih di permukaan dorsal toraks (Carpenter & La Casse, 1955; Sivanathan, 2006).



Gambar 2.3 Perbedaan toraks bagian dorsal dua spesies genus *Aedes*, (A) toraks *Ae. aegypti* ; (B) toraks *Ae. albopictus* (Sivanathan, 2006).

Pada stadium dewasa baik nyamuk jantan maupun betina memanfaatkan gula sebagai sumber energi untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya dan hanya nyamuk betina yang bersifat *haematophagous* (menghisap darah) (Arca *et al.*, 2005). Oleh karena itu penularan DBD dilakukan oleh nyamuk betina saja (Clements, 1992). Protein pada darah juga merupakan sumber protein utama untuk pembentukan telur, sekalipun demikian kondisi nutrisi nyamuk betina yang baru keluar dari pupa sangat berpengaruh terhadap kapasitas reproduksinya. Konsumsi darah pada inang vertebrata merupakan hal penting bagi *Ae. aegypti* betina dewasa untuk menyelesaikan siklus

gonotropiknya. Keberadaan darah di dalam *midgut* nyamuk diketahui dapat menginisiasi endokrin untuk oviposisi dan pematangkan telur (Telang *et al.*, 2005). Sifat sensitif dan mudah terganggu menyebabkan *Ae. aegypti* dapat menggigit beberapa orang secara bergantian dalam waktu singkat (*multiple halter*) dimana hal tersebut menyebabkan *Ae. aegypti* dapat memindahkan virus *dengue* ke beberapa inang sekaligus (Aradilla, 2009).

Virus *dengue* didapatkan nyamuk *Ae. aegypti* pada saat menghisap darah manusia yang sedang mengandung virus *dengue* (*viraemia*). Infeksi virus *dengue* tidak memiliki efek langsung yang bersifat patogen pada vektor. Virus *dengue* tersebut akan tetap berada dalam tubuh nyamuk dan menjadi penular sepanjang hidupnya (Sembiring, 2009). Virus *dengue* di dalam tubuh nyamuk akan menginfeksi sel-sel epitel yang melapisi *midgut*, kemudian lolos dari epitel *midgut* menuju *haemocele* dan menginfeksi kelenjar saliva. Pada akhirnya, virus *dengue* disekresikan dalam saliva, dan ditransmisikan ke inang selama proses *blood feeding* (Widiyanto, 2007; Wasipiyamongkol *et al.*, 2010). Dalam waktu satu sampai dua minggu setelah mengisap darah penderita, nyamuk tersebut siap untuk menularkan penyakit kepada orang lain. Hal ini karena selama 7-14 hari merupakan fase perkembangan virus dari *midgut* ke kelenjar saliva dan siap untuk ditularkan. Penularan penyakit DBD terjadi ketika *Ae. aegypti* betina yang terinfeksi virus *dengue* menghisap darah inang yang belum terinfeksi. Nyamuk akan mengeluarkan cairan saliva melalui *proboscis* ke dalam pembuluh darah. Secara bersamaan cairan saliva dan virus *dengue* dipindahkan dari tubuh nyamuk terinfeksi ke dalam tubuh inang yang belum terinfeksi (Sembiring, 2009).

#### **2.4 Protein Imunomodulator Saliva *Ae. aegypti* Sebagai Kandidat Target TBV DBD**

Saliva vektor penyakit Arthropoda mengandung faktor vasodilator dan imunomodulator merupakan hipotesis yang menjadi suatu konsep baru dalam pengembangan TBV. Kelenjar saliva vektor penyakit Arthropoda mengandung

substansi yang berperan penting dalam proses transmisi patogen. Cairan kelenjar saliva memfasilitasi proses *blood feeding* dan transmisi patogen ke tubuh inang (Dhar & Khumar, 2003). Ketika terjadi proses *blood feeding*, kelenjar saliva nyamuk melepaskan komponen-komponen yang meliputi antihistamin, faktor vasodilator seperti takikinin, antikoagulan (trombin dan FXA) dan faktor imunomodulator. Faktor vasodilator menyebabkan pelebaran pembuluh darah dan mencegah pembekuan darah sehingga mempermudah vektor untuk menghisap darah, sedangkan protein imunomodulator berperan dalam meningkatkan transmisi patogen (Titus *et al.*, 2006). Protein imunomodulator yang bersifat immunosupresif dapat meningkatkan transmisi patogen dengan cara menekan sistem imun inang (Jamez *et al.*, 2003). Sejauh ini telah banyak dilakukan penelitian mengenai protein saliva vektor penyakit Arthropoda termasuk saliva *Ae. aegypti*, namun belum ditemukan protein spesifik yang bertindak sebagai faktor imunomodulator (Fontaine, 2011). Protein rekombinan *hematophagus* saliva Arthropoda dan aplikasi imunologinya dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Pengembangan potensi protein imunomodulator dalam saliva vektor penyakit Arthropoda sebagai target TBV didasarkan pada penelitian terdahulu yaitu pada penyakit *Leishmaniasis*. Hasil penelitian menunjukkan adanya fakta bahwa masyarakat asli di daerah endemik memiliki immunitas yang lebih baik terhadap serangan penyakit *Leishmaniasis*. Fakta ini ditandai dengan meningkatnya kadar sel T *helper* 1 (Th1) yang bersifat imunoprotektif dan menurunkan tingkat keparahan gejala klinis *Leishmaniasis*. Namun masyarakat pendatang dari daerah non endemik memiliki respon imun yang bersifat non-protektif ditandai dengan kadar sel T *helper* 2 (Th2) dan diikuti dengan meningkatnya keparahan gejala klinis *leishmaniasis*. (Titus *et al.*, 2006). Penelitian tersebut menunjukkan fakta bahwa dengan adanya paparan secara berulang saliva vektor penyakit Arthropoda dapat memberikan mekanisme yang protektif terhadap tubuh inang melalui pergeseran respon imun dari Th2 ke arah Th1 yang justru akan memberikan kekebalan pada tubuh inang (Titus *et al.*, 2006; Oliviera *et al.*, 2009).

Jika paparan secara berulang saliva vektor penyakit Arthropoda dapat mempengaruhi respon imun inang kearah yang lebih protektif (Belkaid *et al.*, 1998), maka pendekatan yang mungkin dilakukan untuk mengendalikan transmisi virus *dengue* yaitu melalui vaksinasi tubuh inang dengan komponen protein dalam saliva *Ae. aegypti* yang bertindak sebagai vektornya. Dengan adanya vaksinasi protein imunomodulator saliva *Ae. aegypti* tersebut maka dapat memblokir transmisi virus *dengue* sekaligus menghalangi peningkatan efek dari saliva. Kemungkinan ini memberikan alasan yang kuat untuk mempelajari protein imunomodulator dari saliva *Ae aegypti* karena berpotensi sebagai pendekatan paling strategis untuk mengendalikan penyakit DBD yang hingga saat ini belum ditemukan vaksinnya.

Tabel 2.1 Protein rekombinan *haematophagus* saliva Arthropoda dan aplikasi imunologinya

<b>Protein names</b>	<b>Organism</b>	<b>Additional Information</b>	<b>MW [kDa]</b>	<b>Application</b>
rAed a1	<i>Aedes aegypti</i>	Salivary apyrase	68	Allergy
rAed a2	<i>Aedes aegypti</i>	Belong to the D7 family	37	Allergy
rAed a3	<i>Aedes aegypti</i>	30 kDa salivary gland allergen	30	Allergy
Procalin	<i>Triatoma protracta</i>	Belong to the lipocalin family	20	Allergy
Arg r1	<i>Argas reflexus</i>	Belong to the lipocalin family	17	Allergy
Der-p2	<i>Ixodes ricinus</i>	Dermatophagoides Pteronyssinus allergen like	15.6	Allergy
Tag5	<i>Glossina m. morsitans</i>	Tsetse Antigen	28.9	Allergy
Maxadilan	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	9.5	Vaccine candidate
SP15	<i>Phlebotomus papatasi</i>	-	15	Vaccine candidate
rLIM19	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	11	Vaccine candidate
Salp15	<i>Ixodes scapularis</i>	-	14.7	Vaccine candidate
gSG6	<i>Anopheles gambiae</i>	-	10	Immunological marker of exposure
rTC	<i>Anopheles gambiae</i>	Calreticulin	47.5	Immunological marker of exposure
rLM11	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Yellow-related protein	43	Immunological marker of exposure
rLM17	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Yellow-related protein	45	Immunological marker of exposure

(Sumber: Fontaine *et al.*, 2011).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan April sampai dengan September 2012, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Dasar lantai 2, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang dipergunakan pada penelitian ini meliputi mikropipet, *eppendorf*, *eppendorf* filter 10 KDa, mikrotip, *micropipette*, *refrigerator*, *refrigerated centrifuge*, *vortex*, *handscone*, perangkat alat *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), perangkat alat *Western Blot*, *micropistille*, *water sonicator*, jarum diseksi, mikroskop stereo.

Bahan-bahan yang dipergunakan terdiri atas nyamuk *Ae. aegypti*, *Chloroform* (EMSURE<sup>®</sup>), etanol (EMSURE<sup>®</sup>), *Phenyl methyl sulfonyl fluoride* (PMSF), *Acrylamide/ Bis-acrylamide* 37:1 ratio (Sigma), *buffer* elektroda, *buffer* sampel, *Coomassie Blue R-250*, 40% (v/v) metanol (EMSURE<sup>®</sup>), 10% (v/v) asam asetat glasial, 10% APS, TEMED (Nacalai Tesque). *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *Tris Buffer Saline* (TBS) pH 7,4, *buffer* transfer pH 8,3, *Phosphatase Substrate* (1-Component) (KPL), *buffer* lisis, marker protein (Pro-stain INTRON), membran *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) (Macherey-Nagel), *Affinity Purified Antibody Phosphatase Labeled Goat anti-Human IgG* (H+L) (KPL), plasma darah manusia (sehat endemik, pasien DBD, dan sehat non endemik), ddH<sub>2</sub>O.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur dalam penelitian ini adalah dimulai dengan preparasi alat, *rearing Ae. aegypti*, isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*, Ekstraksi protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*, preparasi plasma darah, optimasi *Dot Blot*, analisis SDS-PAGE dan analisis *Western Blot*. Secara detail prosedur penelitian akan dijelaskan sebagai berikut:

#### 3.3.1 Preparasi Alat

Meja tempat kerja dibersihkan menggunakan etanol 90%. Seluruh *glassware* dan *plasticware* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120°C selama 15 menit.

#### 3.3.2 *Rearing Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan merupakan hasil *rearing* yang dilakukan dalam ruang insektarium bersuhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  (suhu ruang). Kegiatan *rearing* diawali dengan pengumpulan larva nyamuk *Ae. aegypti* yang diambil dari kontainer-kontainer air buatan manusia. Larva selanjutnya dipindahkan dalam nampan plastik (*tray*) untuk dipelihara hingga berubah menjadi pupa. Larva diberi makanan berupa campuran *dog foot* dan pelet ikan. Kemudian pupa di ambil dengan pipet plastik dan dipindah ke dalam cawan pupa. Kemudian cawan pupa dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa. Di dalam kandang koloni dilengkapi dengan cawan lain sebagai tempat bertelur nyamuk yang berisi air dan dilengkapi dengan kertas saring berukuran  $(3 \times 5) \text{ cm}^2$  dan disusun melingkar menutupi bibir mangkuk. Selain itu juga terdapat larutan sukrosa 10% sebagai makanan nyamuk jantan dan seekor marmut yang diletakkan pada kandang kecil untuk dihisap darahnya oleh nyamuk betina. Nyamuk diambil dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator lalu dimasukkan dalam gelas plastik dan ditutup dengan kain kasa pada bagian atasnya untuk diisolasi kelenjar salivanya.



### 3.3.3 Isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*

Nyamuk dimasukkan dalam gelas plastik dan dibius dengan *chloroform*. Sebelum dibedah, terlebih dahulu nyamuk diidentifikasi jenis kelamin dan spesiesnya. Identifikasi jenis kelamin dapat dibedakan dari banyak atau tidaknya rambut pada antena nyamuk. Identifikasi spesies dilakukan dengan cara melihat bagian pola sisik garis pada tubuh bagian dorsal toraks nyamuk (nampak 2 garis sejajar yang diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya) untuk memastikan bahwa nyamuk yang dibedah adalah *Ae. aegypti*. Selanjutnya diatas gelas benda steril diteteskan 50  $\mu$ L NaCl 0.5% dan nyamuk dibedah secara *microdissection* menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva *Ae. aegypti* berada di bagian antara toraks dan kepala nyamuk. Dua jarum diseksi diletakkan di bagian toraks dan kepala *Ae. aegypti* lalu secara perlahan tarik kepala hingga terlepas dari toraks. Apabila tarikan benar, maka akan tampak lobus-lobus kelenjar saliva berwarna bening ikut serta saat bagian kepala ditarik. Kemudian kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain apabila belum bersih. Kelenjar saliva kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum diseksi. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam *ependorf* steril yang telah diisi 100 $\mu$ L PMSF dalam PBS steril dan disimpan pada suhu -80°C hingga dibutuhkan.

### 3.3.4 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *Ae. aegypti*

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang telah diisolasi secara *microdissection* pada tubuh nyamuk bagian toraks ditambahkan dengan *buffer* lisis (perbandingan 1:1). Kemudian sampel dihomogenisasi dengan *micropistille* sampai jaringan kelenjar saliva hancur. Sampel divortex sejenak dan disentrifus (*spin*) sebanyak 3x. Sampel diamati sejenak dibawah mikroskop stereo untuk memastikan bahwa jaringan kelenjar saliva benar-benar sudah hancur. Setelah itu sampel disonikasi menggunakan *water sonicator* selama 30 menit. Kemudian sampel disentrifus 9000 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dan pelet dipisahkan, lalu supernatan disimpan pada suhu -80°C sebagai stok protein. Sampel ditambahkan *buffer* sampel

(perbandingan 1:1). Sampel dipanaskan selama 5 menit sebelum dilakukan uji SDS-PAGE.

### 3.3.5 Preparasi Plasma Darah

*Ethical clearance* dan *inform consent* yang digunakan dalam penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember (terlampir). Sampel darah manusia diambil dari orang sehat di wilayah endemik, orang sehat dari wilayah non endemik, dan pasien DBD. Penentuan kawasan endemik dan non endemik berdasarkan data kejadian DBD dari Dinas Kesehatan Kabupaten Jember. Sedangkan penentuan pasien positif DBD berdasarkan diagnosis dokter dan hasil uji laboratorium di Rumah Sakit (terlampir). Pengambilan sampel darah dilakukan dari pembuluh darah *vena brachial* di lengan. Lima orang sehat dari wilayah endemik dan non endemik diambil sampel darahnya sebanyak @ 3 mL, sedangkan lima pasien DBD diambil darahnya sebanyak @ 2 mL. Darah ditampung dalam vakutainer yang sudah diberi anti-koagulan. Kemudian sampel darah didiamkan 15-45 menit, setelah itu lapisan bening paling atas diambil dan disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C dan supernatannya merupakan plasma darah. Lima sampel plasma darah orang sehat dari wilayah endemik digabung menjadi satu demikian pula dengan lima sampel plasma darah orang sehat non endemik dan pasien DBD. Sampel plasma darah di simpan pada suhu -80°C.

### 3.3.6 Optimasi *Dot Blot*

Membran *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF) (4 potongan membran @ 2,5 x 2,5 cm<sup>2</sup> direndam dalam metanol ± 1 menit. Kemudian membran direndam 5 menit dalam *buffer* transfer lalu dikeringanginkan. Sampel protein kelenjar saliva ditetaskan di atas membran masing-masing sebanyak 10 µl dan dibiarkan hingga kering. Membran yang telah kering diinkubasi dalam “skim milk” 5% yang terlarut dalam TBS selama 30 menit *on shaker*. Kemudian membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS

masing-masing selama 5 menit. Setelah itu membran direndam dengan “skim milk” 5% terlarut dalam TBS yang telah ditambahkan antibodi primer (plasma darah manusia) dengan perbandingan 1:5000 (v/v). Dari 3 potongan membran masing-masing ditambahkan antibodi primer yang berbeda-beda (plasma darah orang sehat endemik, pasien DBD, dan orang sehat non endemik) dan satu potongan membran sebagai kontrol negatif (tanpa ditambahkan antibodi primer). Setelah itu semua membran diinkubasi *on shaker* selama 2 jam pada suhu ruang. Kemudian membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS masing-masing selama 5 menit. Proses selanjutnya, membran direndam dengan “skim milk” 5% terlarut dalam TBS yang telah ditambahkan antibodi sekunder (anti-Human IgG) dengan perbandingan 1:5000 (v/v) dan diinkubasi *on shaker* selama 2 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci dengan 3 x 50 mL TBS masing-masing selama 5 menit lalu membran dikeringanginkan. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian BCIP/NBT 1-Component sebanyak 5 mL selama 5-10 menit.

### 3.3.7 Analisis SDS-PAGE

Sampel protein dielektroforesis dengan analisis SDS-PAGE menggunakan *Separating Gel* 12% dan *Stacking Gel* 4%. Sebanyak 20  $\mu$ L sampel protein dimasukkan kedalam sumuran *gel*. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit, 125 V, pada suhu ruang dalam *buffer* elektroda 1x pH 8,3. Selanjutnya dilakukan pewarnaan *gel* menggunakan larutan pewarna *staining* selama 60 menit dan dilanjutkan *destaining* dan difotoforesis.

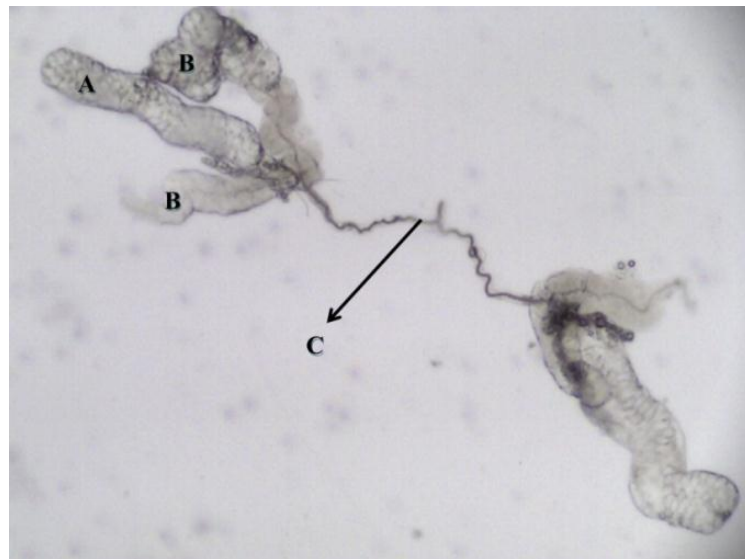
### 3.3.8 Analisis Western Blot

Analisis *Western Blot* dilakukan setelah protein dipisahkan berdasarkan berat molekulnya dengan metode SDS-PAGE. *Gel* akrilamid hasil elektroforesis direndam terlebih dahulu dalam *buffer* transfer sebelum ditransfer ke membran. Begitu pula membran PVDF dan 4 lembar kertas *Whatman* dengan ukuran yang sama dengan *gel* direndam juga dalam *buffer* transfer. Kemudian dibuat tumpukan menyerupai

*sandwich* tersusun atas busa, 2 lembar kertas *Whatman*, *gel* akrilamid hasil SDS-PAGE, membran PVDF, 2 lembar kertas *Whatman*, dan busa. Diantara tumpukan diatas harus rapat dan tidak ada gelembung udara. Protein pada *gel* akrilamid hasil SDS-PAGE ditransfer ke membran PVDF melalui aliran listrik sebesar 220 mA selama 120 menit pada suhu 4°C. Proses inkubasi dengan antibodi primer dan sekunder serta pewarnaan pita protein sama dengan prosedur *Dot Blot*.

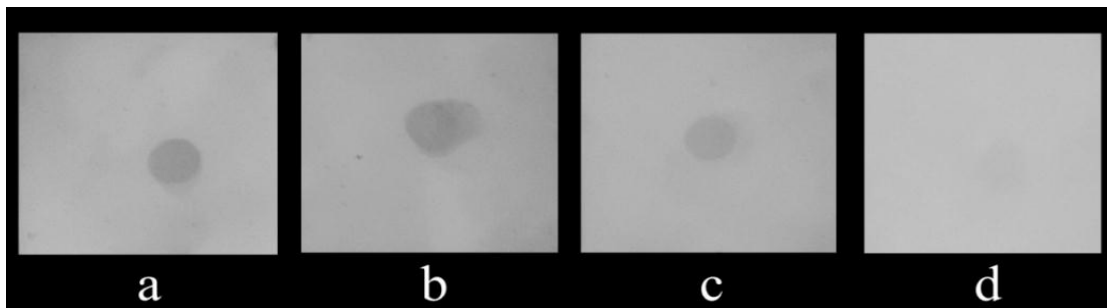
## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan merupakan hasil *rearing* yang diawali dengan pengumpulan larva di lapangan. Pengambilan larva dilakukan di wadah-wadah penampung air/ kontainer buatan manusia yang merupakan habitat potensial bagi larva *Ae. aegypti* (Gratz, 1993). Sebanyak 800 pasang kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina berhasil diisolasi dari tubuh nyamuk bagian toraks menggunakan teknik *microdissection* (Bruce-Chwatt, 1980). Sepasang kelenjar saliva nyamuk masing-masing terdiri atas tiga lobus, yaitu 2 lobus lateral dan 1 lobus medial (Gambar 4.1). Masing-masing lobus kelenjar saliva diketahui mensintesis protein yang berbeda-beda, misalnya lobus medial yang memproduksi sialokinin, protein vasodilator, angiopoietin, dan lektin, sementara lobus lateral bagian distal yang memproduksi serpin, apirase, purin nukleosidase yang kesemuanya berperan dalam proses *haematophagus* (Juhn *et al.*, 2011).



Gambar 4.1 Morfologi kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina; (A) Lobus medial; (B) Lobus lateral; (C) Duktus salivarius (menggunakan Olympus stereo mikroskop, pembesaran 400x, kamera: Sony Cybershoot DSC W30).

*Dot Blot* dilakukan sebagai pemeriksaan awal keberadaan protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang dapat dikenali dan berikatan dengan beberapa sampel plasma darah manusia. Dari hasil optimasi *Dot Blot* nampak adanya lingkaran kelabu pada membran kecuali pada kontrol negatif seperti yang terlihat pada Gambar 4.2. Hasil ini menunjukkan bahwa protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat dikenali dan berikatan dengan sampel plasma darah orang sehat endemik, pasien DBD dan orang sehat non endemik meskipun intensitas warna lingkaran kelabu pada ketiga membran berbeda. Untuk mengetahui berat molekul dari protein kelenjar saliva yang dapat dikenali dan berikatan dengan plasma darah manusia maka dilakukan analisis SDS-PAGE dan dilanjutkan dengan analisis *Western Blot*.

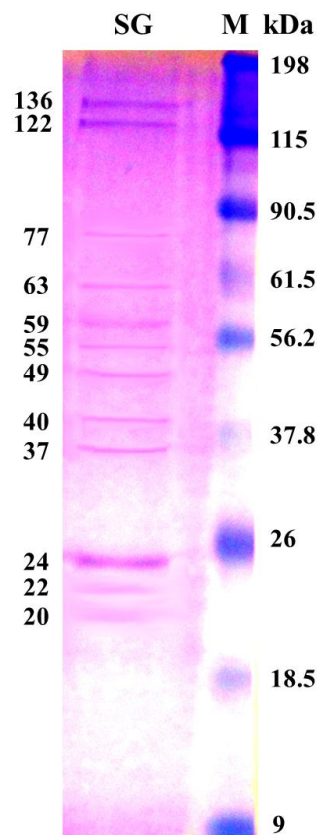


Gambar 4.2 Hasil visualisasi *Dot Blot*, membran PVDF diinkubasi dengan plasma darah ;(a) pasien DBD; (b) orang sehat endemik; (c) orang sehat non endemik; (d) kontrol negatif (kamera: Sony Cybershoot DSC W30).

Informasi mengenai identitas dan fungsi dari protein-protein yang terdapat dalam kelenjar saliva *Ae. aegypti* ternyata masih sedikit. Sejauh ini telah dilakukan karakterisasi beberapa protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* baik secara transkriptomik maupun proteomik. Melalui pendekatan transkriptomik dan proteomik dapat dimungkinkan melakukan analisis kelenjar saliva untuk menentukan senyawa dan fungsi protein penyusun kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Sebagai contoh penelitian yang dilakukan Almeras *et al.*, (2010) telah mengidentifikasi 120 jenis protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* dan 15 jenis berhasil diidentifikasi sebagai protein sekretoris yang

terlibat dalam proses *blood feeding*. Beberapa protein diantaranya telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya.

Dari hasil SDS-PAGE nampak beberapa pita protein dengan berat molekul yaitu ~136, 122, 77, 63, 59, 55, 49, 40, 37, 24, 22, dan 20 kDa (perhitungan terlampir) seperti yang terlihat pada Gambar 4.3. Jika dibandingkan ternyata pita-pita protein yang tampak dari hasil penelitian ini memiliki kisaran berat molekul protein yang mendekati dengan hasil penelitian transkriptomik dan proteomik terdahulu seperti yang terlihat pada Tabel 4.1. Hal ini menunjukkan bahwa pita protein yang nampak dari hasil visualisasi SDS-PAGE pada penelitian ini relevan dengan protein-protein yang memang terdapat pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* hasil penelitian sebelumnya.



Gambar 4.3 Hasil visualisasi SDS-PAGE, (SG) protein 100 pasang kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina; (M) marker (Pre-stain Intron) (kamera: Sony Cybershoot DSC W30).

Tabel 4.1 Komparasi profil protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* dalam penelitian ini dengan hasil penelitian terdahulu.

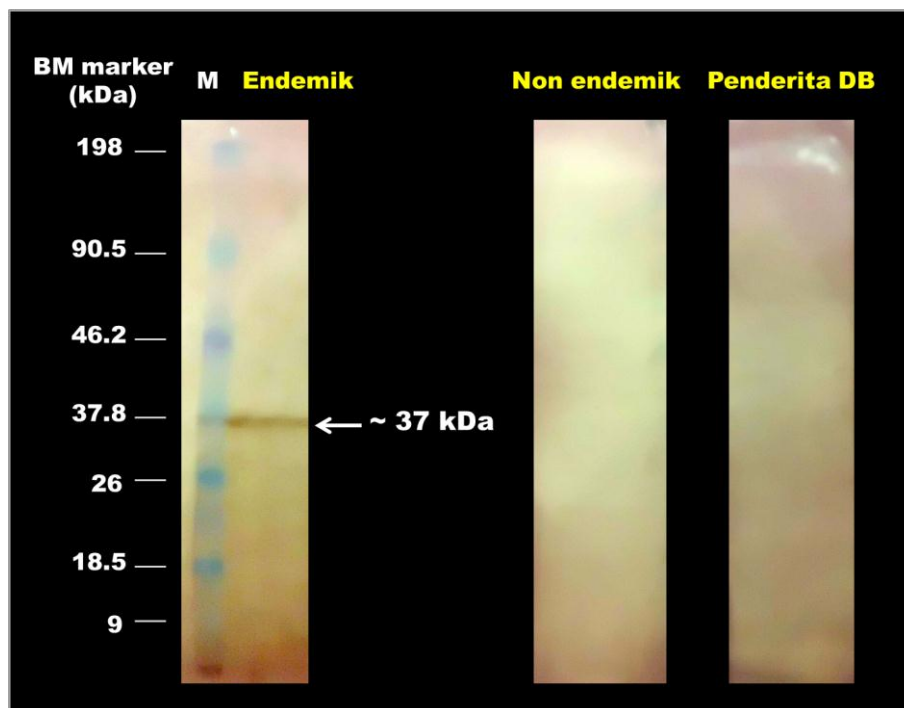
Kisaran berat molekul protein yang teridentifikasi dalam penelitian ini	Nama dan berat molekul tentatif protein dari identifikasi terdahulu (*)	Fungsi tentatif protein yang sudah teridentifikasi
122, 136 kDa	SGS (a, b) 110 - 270 kDa	Spesifik Aedes Imunogenik
77 kDa	<i>Dengue virus binding protein</i> (d) 77 kDa	Mediator pengikatan virus <i>dengue</i> dalam kelenjar saliva nyamuk
63 kDa	<i>Apyrase</i> (a, e, g) 63 - 68 kDa	Antikoagulan (antiplatelet)
59 kDa	<i>Dengue virus binding protein</i> (d) 58 kDa	Mediator pengikatan virus <i>dengue</i> dalam kelenjar saliva nyamuk
55 kDa	<i>Aspartate ammonia lyase</i> 54,78 kDa (a)	Anti-hemostasis
49 kDa	<i>Succinyl-coa synthetase beta chain</i> (a) 48,64 kDa	Allergen
40 kDa	<i>Serpin</i> (a, j) 40 - 47 kDa	Antikoagulan
37 kDa	D7 Family (a, c, f, h, i, j) 15 - 37 kDa	Vasodilator, antikoagulan, imunomodulator
24 kDa	<i>Putative 30 kDa Allergen-like protein</i> (a) 23,79 kDa	Allergen
22 kDa	<i>Calcium-binding protein, putative</i> (a) 22,12 kDa	Mediator pengikatan kalsium dalam kelenjar saliva nyamuk
20 kDa	<i>Myosin light chain 1, putative</i> (a) 18,30 kDa	Belum diketahui fungsinya

(\*) Keterangan referensi tabel: (a) Almeras *et al.*, 2010; (b) Scheider *et al.*, 2004; (c) James *et al.*, 1994; (d) Lormeau & Mai, 2009; (e) Champagne *et al.*, 1995; (f) Fontaine *et al.*, 2011; (g) Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010; (h) Valenzuela *et al.*, 2002; (i) Calvo *et al.*, 2006; (j) Ribeiro *et al.*, 2007.

*Western Blot* dilakukan untuk menentukan berat molekul protein target kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang dapat dikenali dan berikatan dengan antibodi dalam



plasma darah orang sehat endemik, non endemik dan pasien DBD. Dari hasil visualisasi *Western Blot* terlihat bahwa antibodi di dalam plasma darah orang sehat dari wilayah endemik dapat mengenali salah satu protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan berat molekul ~ 37 kDa. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya pita protein hanya pada membran yang diinkubasi dengan sampel plasma darah orang sehat dari wilayah endemik seperti yang terlihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil visualisasi *Western Blot*, nampak satu pita protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* (~ 37 kDa) pada membran yang diinkubasi dengan plasma darah orang sehat dari wilayah endemik sedangkan membran yang diinkubasi dengan plasma darah orang sehat non endemik dan pasien DBD tidak nampak pita protein; (M) Marker (Pre-stain Intron) (kamera: Sony Cybershoot DSC W30).

Protein yang dikenali antibodi dalam plasma darah orang sehat dari wilayah endemik tidak dikenali oleh antibodi di dalam plasma darah pasien DBD dan orang sehat dari wilayah non endemik. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ini, diantaranya adalah efisiensi transfer protein dari *gel* akrilamid ke membran PVDF.

Adanya kemungkinan hanya sebagian protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang tertransfer dari *gel* akrilamid ke membran PVDF dapat menyebabkan antibodi dalam plasma darah pasien DBD dan orang sehat non endemik tidak mampu mengenali protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Faktor lain yang mempengaruhi hasil ini adalah kemungkinan rendahnya titer protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang digunakan sehingga ketika proses inkubasi antibodi dalam plasma darah pasien DBD dan orang sehat non endemik tidak mampu mengenali protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Efisiensi transfer protein dan pengukuran titer protein sangat mempengaruhi hasil akhir dari analisis *Western Blot* (Urban *et al.*, 2007).

Kemungkinan lain adalah memang ada protein-protein yang tidak dikenali antibodi dalam plasma darah orang sehat non endemik tetapi dapat dikenali antibodi dalam plasma darah orang sehat endemik. Penelitian yang dilakukan Orlandi *et al.* (2007) menunjukkan bahwa antibodi dalam plasma darah orang sehat dari wilayah non endemik tidak mengenali protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Hal ini dimungkinkan karena respon antibodi penduduk non endemik tidak spesifik terhadap saliva *Ae. aegypti* sehingga tidak menunjukkan adanya reaksi silang antigen-antibodi. Selain itu dimungkinkan juga karena rendahnya titer antibodi anti-saliva *Ae. aegypti* dari penduduk di wilayah non endemik.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa didalam plasma darah orang sehat dari wilayah endemik terdapat antibodi yang mengenali protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang diduga berkaitan dengan resistensinya terhadap virus *dengue*. Protein spesifik yang dikenali oleh plasma darah orang dari wilayah endemik tersebut memiliki berat molekul ~ 37 kDa. Keberadaan protein spesifik tersebut menunjukkan bahwa di dalam tubuh penduduk endemik telah berkembang antibodi terhadap protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Orang sehat di wilayah endemik lebih sering terpapar oleh saliva *Ae. aegypti* sehingga didalam tubuhnya terbentuk protein anti-saliva yang diindikasikan penting untuk resistensi terhadap virus *dengue*. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Cornelie *et al.* (2007) pada penduduk endemik malaria yang mengembangkan protein (antibodi) anti-saliva *Anopheles gambiae*

dalam tubuhnya karena adanya paparan secara berulang saliva *Anopheles gambiae* di wilayah endemik.

Selain dalam kasus Malaria diatas, penelitian lain mengenai pengembangan resistensi alami penduduk endemik akibat tingginya frekuensi terpapar saliva vektor penyebar penyakit sebagian telah dilakukan. Salah satu contohnya adalah penelitian yang dilakukan oleh Kamhawi *et al.* (2000). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa paparan secara berulang saliva *Phlebotomus papatasi* dapat menyebabkan penduduk endemik menjadi resisten terhadap penyakit *Leishmania major* karena adanya peningkatan sitokin-sitokin yang berkaitan dengan imunitas seluler.

Penelitian yang dilakukan Peng & Simons (2004) telah mendeskripsikan beberapa protein sekretoris kelenjar saliva *Ae aegypti* sebagai protein yang dapat memodulasi respon imun inang meliputi kelompok protein D7, adenosin deaminase (ADA), purin hidrosilase, apirase, 30 kDa alergen. Protein dengan berat molekul ~ 37 kDa dalam penelitian ini diduga termasuk dalam kelompok protein famili D7. Kelompok protein famili D7 merupakan protein sekretoris yang pertama kali dilaporkan ada pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* (James *et al.*, 1991). D7 merupakan protein yang berperan dalam menghambat aksi amina biogenik seperti serotonin, histamin, norepineprin yang bertanggung jawab dalam proses *blood feeding*. Protein famili D7 telah diakui secara spesifik dinyatakan terdapat dalam kelenjar saliva Diptera dewasa (Calvo *et al.*, 2006). Gen D7 mengkodekan protein sekretori yang utamanya disintesis dalam kelenjar saliva nyamuk betina (James *et al.*, 1991).

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa didalam tubuh orang sehat endemik terbentuk antibodi terhadap protein spesifik ~ 37 kDa dan diduga menyebabkan resistensinya terhadap infeksi virus *dengue*. Apabila dikembangkan anti terhadap protein spesifik ~ 37 kDa (immunomodulator putatif) maka hal ini merupakan suatu terobosan penting untuk memblok transmisi dan infeksi virus *dengue* sehingga merupakan kandidat target potensial untuk pengembangan TBV DBD. Oleh karena itu, perlu adanya studi lanjutan untuk mengidentifikasi secara molekuler dan menguji aktivitas dari protein spesifik ~ 37 kDa tersebut.

## **BAB. 5 PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Hasil SDS-PAGE dari protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* menunjukkan adanya beberapa pita protein dengan berat molekul ~ 136, 122, 77, 63, 59, 55, 49, 40, 37, 24, 22, dan 20 kDa. Dari hasil *Western Blot* dapat diketahui bahwa protein spesifik yang dikenali antibodi dalam plasma darah orang sehat endemik tersebut memiliki berat molekul ~ 37 kDa. Protein spesifik ini diduga berperan penting dalam resistensi penduduk endemik terhadap infeksi virus *dengue*. Penelitian ini menunjukkan pentingnya hubungan antara inang dan vektor untuk mengembangkan strategi terpadu dalam mengevaluasi paparan saliva *Ae. aegypti* dan untuk menekan risiko DBD.

### **5.2 Saran**

Perlu adanya peningkatan efisiensi transfer protein dari *gel* akrilamid ke membran PVDF dan perlu dilakukannya pengukuran titer protein kelenjar saliva yang akan digunakan agar hasil akhir dari analisis *Western Blot* menjadi maksimal.

## DAFTAR PUSTAKA

### Buku

- Baratawidjaja, K. G., & Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar Edisi Ke-8*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Bruce-Chwatt, L. J. 1980. *Essential Malariology*. London: William Heinemann Medical Books Ltd.
- Cahyati, W. H., & Suharso. 2006. *Dinamika Aedes aegypti Sebagai Vektor Penyakit*. Semarang: Universitas Negeri Semarang Press.
- Carpenter, S. J., & La Casse, W. J. 1955. *Mosquitoes of North America (North of Mexico)*. California: University of California Press, Berkeley, CA. 360 pp.
- Chen, K., Pohan, H. T., & Sinto, R. 2009. *Diagnosis dan Terapi Cairan pada Demam Berdarah Dengue*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press.
- Chistopher, A. P. 2009. *Optimalisasi Kegiatan Pemberantasan Jentik Berkala di Wilayah Kerja Pelabuhan Kampung Dalam-Pekanbaru*. Riau: Fakultas Kedokteran Universitas Riau Press.
- Clements, A. N. 1992. *The Biology of Mosquitoes*. Vol I: Development, Nutrition and Reproduction. New York: Chapman Hall.
- Departemen Kesehatan RI. 2004. *Kebijaksanaan Program P2 DBD dan Situasi Terkini DBD Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal PPM PL Departemen Kesehatan RI.
- Foster W. A., & Walker, E. D. 2002. *Mosquitoes (Culicidae)*. In Mullen, G., Durden, L. (Eds.) *Medical and Veterinary Entomology* (p 203-262). Academic press, Sand Diego, CA. 597 pp.
- Isbagio, D. W. 2005. Masa Depan Pengembangan Vaksin Baru. *Cermin Dunia Kedokteran*. Jakarta: PT. Temprint.
- Kementrian Negara Riset dan Teknologi RI. 2006. *Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bidang Kesehatan dan Obat*. Jakarta: Kementrian Negara Riset dan Teknologi RI.

### Tidak Diterbitkan

- Aradilla, A. S. 2009. "Uji Efektivitas Larvasida Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Terhadap Larva *Aedes aegypti*." Tidak Diterbitkan. Laporan Akhir Penelitian. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Nurfadly. 2009. "Deteksi dan Penentuan Serotip Virus Dengue Tipe 1 dari Nyamuk *Aedes aegypti* dengan Menggunakan Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) di Kota Medan". Tidak Diterbitkan. Tesis. Medan: Program Pascasarjana Universitas Sumatra Utara.
- Sayono. 2008. "Pengaruh Modifikasi Ovitrap Terhadap Jumlah Nyamuk Aedes Yang Terperangkap." Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
- Sembiring, O. 2009. "Efektifitas Beberapa Jenis Insektisida Terhadap Jamuk *Aedes aegypti* (L.)." Tidak Diterbitkan. Tesis. Medan: Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Siregar, F. A. 2004. *Epidemiologi dan Pemberantasan Demam Berdarah Dengue (DBD) di Indonesia*. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatra Utara.
- Sitio, A. 2008. "Hubungan Perilaku Tentang Pemberantasan Sarang Nyamuk dan Kebiasaan Keluarga dengan Kejadian Demam Berdarah *Dengue* di Kecamatan Medan Perjuangan Kota Medan Tahun 2008." Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
- Sivanathan, M. M. 2006. "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". Thesis. Penang: University Sains Malaysia Penang.
- Veriswan, I. 2006. "Perbandingan Efektivitas Abate dengan Papain dalam Menghambat Pertumbuhan Larva *Aedes aegypti*". Tidak Diterbitkan. Artikel Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Wati, W. E. 2009. "Beberapa Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Demam Berdarah *Dengue* (DBD) di Kelurahan Ploso Kecamatan Pacitan Tahun 2009." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surakarta: Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Widiyanto, T. 2007. "Kajian Manajemen Lingkungan Terhadap Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kota Purwokerto Jawa Tengah." Tidak Di Terbitkan. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
- WHO. 2009. *Dengue, Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New Edition. France: WHO Library Cataloguing.

### Terbitan Berkala

- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S. 2010. Salivary Gland Protein Repertoire from *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. Vol. 10 (4): 391-402.
- Andrade, B. B., Teixeira, C. R., Barral, A., Barral-Netto, M. 2005. Haematophagous Arthropod Saliva and Host Defense System: a Tale of Tear and Blood. *An Acad Bras Cienc*. Vol. 77 (4): 665-693.
- Arca, B., Lombardo, F., Valenzuela, J. G., Fransischetti, I. M. B., Marinotti, O., Coluzzi, M., & Ribeiro, J. M. C. 2005. An Updated Catalogue of Salivary Gland Transkripts in the Adult Female Mosquito, *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 208: 3971-3986.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E. Ribeiro, J., & Sacks, D. L. 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 (10): 1941-1953.
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M. 2006. Function and Evolution of a Mosquito Salivary Protein Family. *J Biol Chem*. Vol. 281 (4): 1935-1942.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 92: 694-698.
- Chanthavanich, P., Luxemburger, C., Sirivichayacul, C., Lapphra, K., Pengsaa, K., Yogsan, S., Sabchareon, A., & Lang, J. 2006. Short Report: Immun Response and Occurrence of Dengue Infection in Thai Children Three to Eight Years After Vaccination with Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. Vol. 75 (1): 26-28.

- Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., NDiaye, T., Sauvage, F. X., Boulanger, D., Simondon, F. 2007. An Insight into Immunogenic Salivary Proteins of *Anopheles gambiae* in African Children. *Malaria Journal*. Vol. 6: 75.
- Coutinho-Abreu, I. V., & Ramalho-Ortigao, M. 2010. Transmission Blocking Vaccine to Control Insect-Borne Disease: A Review. *Mem Inst Oswaldo Crus*. Vol. 105 (1): 1-12.
- Dhar, R. & Kumar, N. 2003. Role of Mosquito Salivary Gland. *Current Science*. Vol. 85 (9).
- Edelman, R. 2007. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. *Supplement Article*. University of Maryland School of Medicine Inc.
- Fontaine, A., Pascual, A., Diouf, I., Bakkali, N., Bourdon, S., Fusai, T., Rogier, C., & Almeras, L. 2011. Mosquito Salivary Gland Protein Preservation in the Field for Immunological and Biochemical Analysis. *Parasites & Vectors*, Vol. 4: 33.
- Gratz, N. G. 1993. Lessons of *Aedes aegypti* Control in Thailand. *Journal Medical and Veterinary Entomol*. Vol. (7): 1-10.
- Gubler, D. J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 11 (3): 480-496.
- James, A. A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C. R., Racioppi, J. V., 1991. Isolation and Characterization of the Gene Expressing the Major Salivary Gland Protein of the Female Mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol*. Vol. 44: 245-254.
- James, A.A. 1994. Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bull Inst Pasteur*. Vol. 92: 113-150.
- James, A. A. 2003. Review: Blocking Malaria Parasite Invasion of Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206: 3817-3821.
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Guedes, B. A. M., Majid, A., Coleman, J., Pimenta, P. F. P., Akram, W., James, A. A & Marinotti, O. 2011. Spatial Mapping of Gene Expression in the Salivary Glands of the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. Vol. 4: 1.



- Kamhawi, Belkaid, Modi, Rowton, Sacks. 2000. Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. *Science*. Vol. 290: 1351-1354.
- Lai, C. J., Monath, T. P. 2007. Chimeric Flaviviruses: Novel Vaccines Against Dengue Fever, Tick-borne Encephalitis, and Japanese Encephalitis. *Adv Virus Res*. Vol. 61: 469–509.
- Lauring, A. S., Jones, J. O., Andino, R. 2010. Rationalizing the Development of Live Attenuated Virus Vaccines. *Nat Biotechnol*. Vol. 28: 573–579.
- Lavazec, Boundin, Lacroix, Bonnet, Diop, Thiberge, Boisson, Tahar, Bourgomn. 2007. Carboxipeptidase B of *Anopheles gambiae* Target for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*. Vol. 75 (4): 1635-1642.
- Lima, D. M., De-Paula, S. O., Franca, R. F., Palma, P. V., Morais, F. R., Gomes-Ruiz, A. C. 2011. DNA Vaccine Candidate Encoding the Structural prM/E Proteins Elicits a Strong Immune Response and Protects Mice Against Dengue-4 Virus Infection. *Vaccine*. Vol. 29: 831–8.
- Lormeau, C., Mai, V. 2009. Dengue Viruses Binding Proteins From *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Salivary Glands. *Virology Journal*. Vol. 10: 1186-1743.
- Muhlisin, A., & Pratiwi, A. 2006. Penanggulangan Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kelurahan Singopuran Kartasura Sukoharjo. Vol. 9 (2): 123-129.
- Noisakran, S., & Perng, G. C. 2008. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. *Experimental Biology and Medicine*. Vol. 233: 401-408.
- Oliviera, Ryan, Jochim, Valenzuela, & Kamhawi. 2008. Sand Flies, Leishmania, and Transcriptome-borne Solution. *NIH Public Acces parasitology int*. Vol. 58 (1): 1-5.
- Olson, K. E., Alphey, L., Carlson, J. O., & James, A. A. 2010. Genetic Approaches in *Aedes aegypti* for Control of Dengue: *an Overview*.
- Orlandi, P. E., Almeras, L., Senneville, D. L., Barbe, S., Remoue, F., Villard, C., Cornelié, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Page's, P., Laffite, D., Boulanger, D.,

- Simondon, F. O., Pradines, B., Fusa, T., Rogier., C. 2007. Antibody Response Against Saliva Antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in Travellers in Tropical Africa. *Microbes and Infection*. Vol. 9: 1454-1462.
- Peng, Z., & Simons, F. E. R. 2004. Mosquito Allergy: Immune Mechanisms and Recombinant Salivary Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. Vol. 133: 198-209.
- Plotkin, S. A. 2009. Vaccines: the Fourth Century. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 16 (12): 1709-1719.
- Ribeiro, J. M. C., Arca, 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*. Vol. 8: 6.
- Schmitz, J., Roehrig, J., Barret, A., Hombach, J. 2011. Next Generation Dengue Vaccines : Review of Candidate in Preclinical Development. *Vaccine*. Vol. 29: 7276-7284.
- Schneider, B., Soong, L., Zeidner, N., Higgs, S. 2004. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-viral and Th1/Th2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. *Viral Immunology*. Vol. 17 ( 4) : 565-573.
- Sun, W., Edelman, R., Kanasa-Thanan, N., Eckels, K. H., Putnak, J. R., King, A. D., Houg, H. S., Tang, D., John, M. Scherer, Hoke, C. H., and Innis, B. L. 2003. Vaccination Of Human Volunteers With Monovalent And Tetravalent Live-Attenuated Dengue Vaccine Candidates. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. Vol. 69 (6): 24-31.
- Telang, A., Li, Y., Noreiega, F. G. & Brown, M. R. 2005. Effect of Larval Nutrition on the Endocrinology of Mosquito Egg Development. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 209: 645-655.
- Titus, R. G., Bishop, J. V., & Mejia, J. S. 2006. The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for these Factors to Serve as Vaccine to Prevent Pathogen. *Parasite Immunology*. Vol. 28: 131-141.
- Urban, M., Woo, L., 2007. *Molecular Weight Estimation and Quantitation of Protein Samples using Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, the Immun-Star™ WesternC Chemiluminescent Ditection Kit, And Molecular Imager® ChemiDox™ XRS Imaging System*. USA: Bio-Rad Laboratories, Inc.

- Valenzuela J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., Miranda-Santos, I. K. F., Marinotti, O., Francischetti, I. M., Ribeiro, J. M. C. 2002. The D7 family of salivary proteins in blood sucking Diptera. *Insect Mol. Biol.* Vol. 11(2): 149-155.
- Wasinpiyamongkol, L., Patramol, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucourse, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demettre, E., Blizard, J.P., Jouin, P., Biron, D. G., Thomas, F., Misse, D. 2010. Blood-Feeding and Immunogenic *Aedes aegypti* Saliva Proteins. *Proteomic.* Vol. 10: 1906-1916.

### **Media Elektronik**

- Cutwa-Francis, M. M., O'Meara, G. F., 2007. An Identification Guide to the Common Mosquitoes of Florida. Florida Medical Entomology Laboratory. [on line]. <http://fme1.ifas.ufl.edu/Key/index.htm> [06 September 2012].

## A. KOMPOSISI LARUTAN DAN BUFFER

### A. 1 Elektroforesis SDS-PAGE

- a. Akril/ bis-Ak. 40% : 37 gr akrilamid; 1 gr bisakrilamid; dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL.
- b. *Buffer* elektroda 1x : 3 gr Trisma basa, 14,4 gr glisin, 0,1% (b/v) SDS; dilarutkan dalam 800 mL akuades dan pH diatur hingga 8,3 kemudian ditambahkan akuades sampai volume total 1 L.
- c. *Buffer* sampel : 1 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml gliserol 50% (v/v); 1,6 mL SDS 10% (b/v); 0,4 mL 2- $\beta$  *mercaptoethanol*; *bromphenol blue* 1% (b/v); dilarutkan dalam akuades sampai volume 8 mL.
- d. Larutan *Staining* : 1 gr *Coomassie brilliant blue* R-250; 450 mL metanol; 450 mL akuades; 100 mL asam asetat glasial.
- e. Larutan *Destaining* : 50% (v/v) akuades; 40% (v/v) metanol; 10% (v/v) asam asetat glasial.

### Komposisi bahan untuk gel pada SDS-PAGE

Bahan	Jenis gel	Separating Gel	Stacking Gel
		12%	4%
Akril/ Bis-Ak. 40%		3 mL	0,997 mL
1,5 M Tris HCl pH 8,8		2,5 mL	-
0,5 M Tris HCl pH 6,8		-	2,5 mL
10% SDS		100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O		4,34 mL	6,423 mL
APS 10%		50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED		5 $\mu$ L	10 $\mu$ L

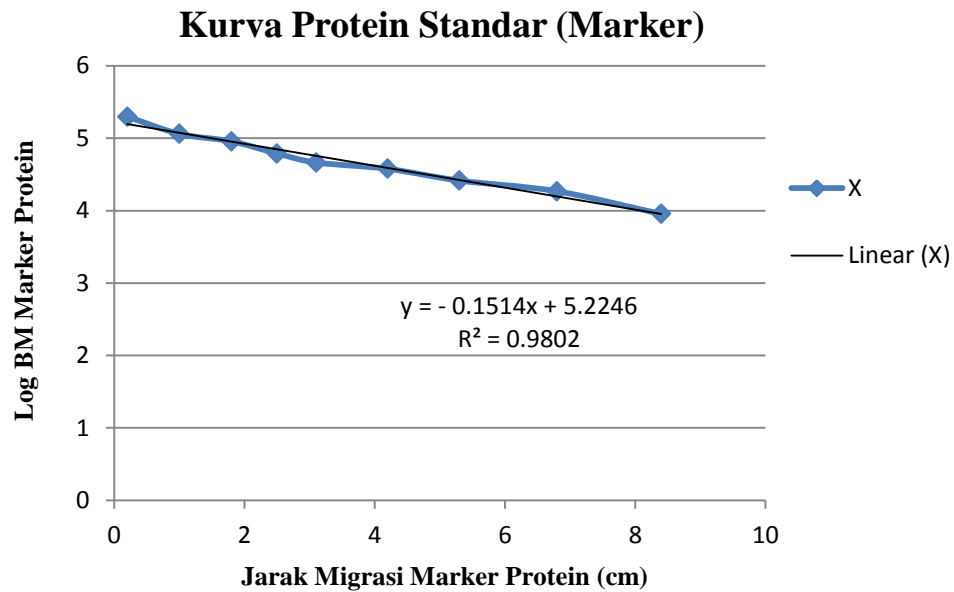
**A. 2 Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva Nyamuk**

- a. *Buffer* Lisis : 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA-NaOH; 10 mM NaCl; 1% Nonidet P-40.

**A. 3 Dot blot dan Western blot**

- a. TBS : 8,77 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 3,02 gr Trisma basa; dilarutkan dalam 800 ml akuades dan pH diatur hingga 7,4 kemudian ditambahkan akuades sampai volume total 1 L.
- b. *Buffer* Transfer : 39 mM glisin; 48 Mm Trisma basa; 0,037% (b/v) SDS; 20% methanol (v/v) ditambahkan akuades sampai 1 L, diatur pH 8,3.
- c. BCIP/NBT (pewarna) : *Phosphatase Substrate (1-Component)* (KPL) 100 mL.

## B. PENENTUAN BERAT MOLEKUL PROTEIN



X (Jarak migrasi marker)	Y (Log BM marker)	X1 (Jarak migrasi sampel)	$y = -0,1514x+5,2246$	BM sampel (Da)
0,20	5,29	0,60	5,13	136.069,25
1,00	5,06	0,90	5,08	122.557,53
1,80	4,95	2,20	4,89	77.896,86
2,50	4,78	2,70	4,81	63.436,49
3,10	4,66	3,00	4,77	58.938,62
4,20	4,57	3,20	4,74	54.969,27
5,30	4,41	3,50	4,69	49.510,80
6,80	4,26	4,10	4,60	40.166,13
8,40	3,95	4,40	4,55	36.177,62
		5,60	4,37	23.810,03
		5,80	4,34	22.206,49
		6,00	4,31	20.710,94

## C. SURAT PERSETUJUAN KODE ETIK



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL  
 UNIVERSITAS JEMBER  
 KOMISI ETIK PENELITIAN  
 Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877  
 Jember 68121 – Email : fk\_unej@telkom.net

### KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

*ETHICAL APPROVAL*

Nomor : 126 /H25.1.11/KE/2011

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul : *The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*


**PENGEMBANGAN TRANSMISSION BLOCKING VACCINES ( TBV ) BERBASIS KELENJAR SALIVA NYAMUK VEKTOR PADA KASUS DEMAM BERDARAH DENGUE ( DBD ) DAN MALARIA**

Nama Peneliti Utama : Dra. Rike Oktarianti, M.Si  
*Name of the principal investigator*

Nama Institusi : Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 11 Mei 2011

  
 dr. Cholis Abrori, M.Kes



### TANGGAPAN ANGGOTA KOMISI ETIK

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir - butir isian diatas dan telaah terhadap protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya )

tidak ada hal teknis lainnya.  
perimbangan kerahasiaan prior

Jember, 11 Mei 2011



Nama : dr. Chous Abrori, M.K



## D. INFORMED CONSENT

### **Penjelasan untuk Mengikuti Penelitian Berjudul Pengembangan Vaksin Yang Menghambat Transmisi (Penyebaran) *Dengue***

1. Kami adalah Dr. rer. nat Kartika Senjarini, Dra. Rike Oktarianti M.Si., dan dr. Yunita Armiyanti, M.Kes., staf peneliti dari Fakultas MIPA dan Fakultas Kedokteran dari Universitas Jember, dengan ini meminta bapak/ibu untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul Pengembangan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) Melawan *Dengue*.
2. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan protein dari kelenjar ludah (saliva) nyamuk yang bersifat imunogenik sebagai bahan vaksin, sehingga hasil penelitian ini dapat memberi manfaat berupa vaksin *dengue* yang dapat mencegah penyebaran penyakit dengue/demam berdarah. Penelitian ini akan berlangsung selama kurang lebih lima tahun dengan sampel berupa kelenjar ludah nyamuk *Aedes aegypti* vektor dengue dan darah penduduk di wilayah endemis demam berdarah.
3. Prosedur pengambilan sampel darah dari penduduk di wilayah endemis adalah dengan menggunakan spuit disposable steril 3 ml atau 10 ml untuk mengambil darah dari pembuluh *vena brachialis* di lengan. Cara ini mungkin akan menyebabkan rasa nyeri di tempat suntikan, tetapi bapak/ ibu tidak perlu khawatir karena tidak akan menimbulkan dampak apapun setelah pengambilan darah karena dilakukan secara aseptis.
4. Keuntungan yang bapak/ ibu peroleh dengan keikutsertaan bapak/ ibu dalam penelitian kami adalah bapak/ ibu telah berperan nyata dalam mewujudkan vaksin dengue yang dapat mencegah penyebaran DBD, sehingga dapat menanggulangi dan mengeliminasi penyakit DBD di wilayah bapak/ ibu.
5. Seandainya bapak/ ibu tidak menyetujui cara ini, maka bapak/ ibu boleh tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk itu bapak/ ibu tidak akan dikenai sanksi atau konsekuensi apapun.
6. Nama dan jatidiri bapak/ ibu akan tetap dirahasiakan.

## E. DATA DINAS KESEHATAN KABUPATEN JEMBER

### KASUS DEMAM BERDARAH DENGUE (DBD) TAHUN 2005 s/d 2012 SE KABUPATEN JEMBER

No.	Kecamatan	Kasus DBD Kec.	Puskesmas	Kasus DBD Pusk	Jumlah Kasus DBD Per Tahun							
					2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012 s/d Agst
1	Kencong	203	1 Kencong	130	25	9	23	17	30	20	0	6
			2 Cakru	73	18	2	11	3	21	12	0	6
2	Gumukmas	241	3 Gumukmas	139	22	25	22	28	21	19	2	0
			4 Tembokrejo	102	27	24	9	17	12	13	0	0
3	Puger	590	5 Puger	339	54	93	51	19	42	69	4	7
			6 Kasiyan	251	71	76	56	16	9	20	2	1
4	Wuluhan	283	7 Wuluhan	130	39	17	22	5	9	25	1	12
			8 Lojejer	153	34	32	24	2	36	20	0	5
5	Ambulu	244	9 Ambulu	108	38	18	16	1	15	20	0	0
			10 Sabrang	85	10	13	17	13	11	19	1	1
6	Tempurejo	107	11 Andongsari	51	12	5	6	3	7	15	1	2
			12 Tempurejo	77	12	10	15	8	10	20	1	1
7	Silo	69	13 Curahnongko	30	6	6	6	2	0	8	1	1
			14 Silo I	46	1	7	3	3	10	20	1	1
8	Mayang	92	15 Silo II	23	1	8	4	2	2	6	0	0
			16 Mayang	92	6	9	10	6	8	51	1	1
9	Mumbulsari	70	17 Mumbulsari	70	12	7	15	6	11	17	1	1
			18 Jenggawah	84	8	13	27	9	11	16	0	0
10	Jenggawah	207	19 Kemuningsari K.	123	12	14	47	14	4	30	0	2
			20 Ajung	198	23	23	22	36	38	42	8	6
11	Ajung	198	21 Rambipuji	109	17	18	29	10	10	24	0	1
			22 Nogosari	59	6	12	9	4	8	17	3	0
12	Rambipuji	168	23 Karangduren	154	29	36	46	10	13	19	0	1
			24 Balung	212	29	43	69	12	25	31	1	2
13	Balung	366	25 Umbulsari	197	22	26	47	27	34	40	0	1
			26 Paleran	73	11	4	14	3	12	26	1	2
14	Umbulsari	270	27 Semboro	162	20	29	19	10	57	26	0	1
			28 Jombang	82	10	4	23	6	14	22	0	3
15	Semboro	162	29 Sumberbaru	16	2	4	4	0	4	2	0	0
			30 Rowotengah	31	0	2	4	6	9	7	1	2
16	Jombang	82	31 Tanggul	140	20	28	13	24	17	25	4	9
			32 Klatakan	35	0	0	13	4	5	9	0	4
17	Sumberbaru	47	33 Bangsalsari	84	14	10	13	3	4	35	0	5
			34 Sukorejo	73	6	6	14	7	16	19	3	2
18	Tanggul	175	35 Pantl	46	2	3	9	13	3	13	1	2
			36 Sukorambi	52	4	4	7	9	7	20	1	0
19	Bangsalsari	157	37 Arjasa	48	11	4	1	1	11	19	0	1
			38 Pakusari	84	12	10	9	6	9	31	1	6
20	Panti	46	39 Kalisat	135	15	16	10	15	42	28	2	7
			40 Ledokombo	8	1	1	0	0	0	4	0	2
21	Sukorambi	52	41 Sumberjambe	2	0	0	0	1	0	1	0	0
			42 Sukowono	38	0	5	3	10	5	11	2	2
22	Arjasa	48	43 Jelbuk	14	1	1	0	4	2	6	0	0
			44 Kaliwates	479	44	62	77	64	76	120	7	29
23	Pakusari	84	45 Mangli	210	18	31	30	26	36	65	2	2
			46 Jember Kidul	330	59	55	53	40	51	65	4	3
24	Kalisat	135	47 Sumbersari	729	156	86	106	81	124	157	10	9
			48 Gladakpakem	458	60	59	93	74	93	74	4	1
25	Ledokombo	8	49 Patrang	576	77	80	93	100	99	116	6	5
			30 Sumbersari	1187	729	156	86	106	81	124	157	10
26	Sumberjambe	2										
27	Sukowono	38										
28	Jelbuk	14										
29	Kaliwates	1019										
30	Sumbersari	1187										
31	Patrang	576										
<b>JUMLAH</b>		<b>6940</b>		<b>6940</b>	<b>1077</b>	<b>1050</b>	<b>1214</b>	<b>780</b>	<b>1093</b>	<b>1494</b>	<b>77</b>	<b>155</b>

## F. CONTOH DATA DIAGNOSIS PASIEN DBD

### F. 1 Anamnesa dan Diagnosa

Gejala awal pasien mengalami demam mendadak tinggi, sakit kepala, adanya bintik-bintik merah dikulit, mimisan, nyeri perut, muntah-muntah, diare, nyeri otot, nyeri tulang, tinja berwarna hitam.

### F. 2 Uji Laboratorium

No.	Parameter	Nilai Normal	Nilai Uji darah Pasien
1.	HGB [g/dL]	L = 13,0 – 18,0 P = 11,5 – 16,5	15,1
2.	RBC [ $10^6/\mu\text{L}$ ]	L = 4,5 – 5,5 P = 4,0 – 5,0	5,37
3.	HCT [%]	L = 40,0 – 50,0 P = 37,0 – 45,0	45,9
4.	MCV [fL]	82,0 – 92,0	85,5
5.	MCH [pg]	27,0 – 31,0	28,1
6.	PLT [ $10^3/\mu\text{L}$ ]	150 – 400	38*
7.	WBC [ $10^3/\mu\text{L}$ ]	4,0 – 11,0	6,14*
	EO% [%]	0 – 1	0,0*
	BASO% [%]	0 – 1	0,5*
	NEUT% [%]	50 – 70	62,5*
	LYMPH% [%]	20 – 40	25,6*
	MONO% [%]	2 – 8	11,1*

HGB	=	Uji kadar hemoglobin
RBC	=	Uji kadar eritrosit
HCT	=	Uji kadar hematocrit
MCV, MCH	=	Uji gejala anemia
PLT	=	Uji kadar trombosit
WBC	=	Uji kadar leukosit (eusinofil, basofil, neutrofil, limfosit, monosit)