



**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MANUSIA TERHADAP  
PROTEIN IMUNOGENIK 31 kDa DARI KELENJAR SALIVA  
*Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)**

**SKRIPSI**

Oleh

**HASA BELLA  
NIM 111810401035**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MANUSIA TERHADAP  
PROTEIN IMUNOGENIK 31 kDa DARI KELENJAR SALIVA  
*Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**HASA BELLA  
NIM 111810401035**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua tercinta yang telah memberikan kasih sayang, doa 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 mengajar saya, terima kasih yang tak terhingga atas segala ilmu yang diberikan;
4. almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“Orang yang berilmu dan ahli ibadah memiliki derajat lebih tinggi daripada orang biasa dan ahli ibadah. Oleh karena itu, jangan mau menjadi orang biasa-biasa saja.

Jadilah orang yang paham ilmu dunia dan ilmu akhirat.

Hikmahnya bukan hanya untuk diri kita sekarang,  
tapi juga untuk anak cucu kita nantinya” (HR. Muslim)<sup>i</sup>

---

<sup>i</sup>Abdullah bin Abdurrahman Alu Bassam. 2011. *Syarah Hadist Pilihan Bukhari-Muslim*. Bekasi: PT. Darul Falah.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hasa Bella

NIM : 111810401035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Manusia Terhadap Protein Immunogenik 31 kDa Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 Juni 2013

Yang menyatakan,

Hasa Bella

NIM 111810401035

**SKRIPSI**

**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MANUSIA TERHADAP  
PROTEIN IMUNOGENIK 31 kDa DARI KELENJAR SALIVA  
*Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)**

**Oleh**

**Hasa Bella  
NIM 111810401035**

**Pembimbing:**

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Manusia Terhadap Protein Imunogenik 31 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)”

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 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

Eva Tyas Utami S.Si., M.Si  
NIP 197306012000032001

Mengesahkan

Dekan,

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

## RINGKASAN

**Respon Imun Humoral (IgG) Manusia Terhadap Protein Immunogenik 31 kDa Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae);** Hasa Bella; 111810401035; 2015; 34 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit infeksi yang ditularkan melalui paparan nyamuk *Aedes (Ae.) aegypti* yang membawa virus *dengue* (DENV). Salah satu upaya pengendalian DBD yang hingga saat ini dalam tahap pengembangan yaitu pembentukan vaksin. Pengembangan terbaru vaksin DBD saat ini dilakukan dengan berbasis vektor, yang diharapkan dapat menjadi Vaksin Penghambat Transmisi (*Transmission Blocking Vaccine*, TBV). Molekul yang digunakan pada pengembangan TBV DBD saat ini berupa protein dari kelenjar saliva. Protein kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* mengandung beberapa substansi penting yang berperan dalam proses transmisi patogen ketika *blood feeding*. Substansi tersebut seperti vasodilator dan imunomodulator. Sehingga semakin banyak paparan kelenjar saliva *Ae. aegypti* maka kadar IgG akan semakin tinggi.

Penelitian oleh Oktarianti *et al.* (2014), telah berhasil mengkarakterisasi protein 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* sebagai protein imunogenik, oleh karena itu protein tersebut berpotensi sebagai substansi imunomodulator dalam pengembangan TBV DBD. Potensi imunomodulator protein 31 kDa dapat dilihat berdasarkan kadar IgG pada serum darah manusia. Hal tersebut karena IgG merupakan antibodi yang memiliki kadar lebih tinggi setelah terjadi paparan berulang. Oleh karena itu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui respon imun humoral terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* berdasarkan kadar IgG pada serum darah manusia. Faktor lain yang dapat mempengaruhi kadar IgG didalam serum adalah umur. Pematangan sistem imun yang berbeda pada setiap individu akan mempengaruhi proliferasi dan fluktuasi sel B yang menghasilkan IgG. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai



respon imun (IgG) humoral terhadap protein imunogenik 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* berdasarkan kelompok umur pada penderita DBD.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan respon imun humoral (IgG) manusia terhadap protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* melalui perbedaan kadar IgG antar kelompok neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat. Selain itu penelitian ini juga membuktikan bahwa respon individual antar penderita DBD pada kelompok umur yang sama memiliki respon imun IgG yang bervariasi. Protein imunogenik 31 kDa dapat memodulasi respon imun dan menghasilkan antibodi berupa IgG dalam serum darah. Oleh karena itu, pengembangan vaksin berbasis ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* harus melibatkan protein 31 kDa.

## PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Manusia Terhadap Protein Immunogenik 31 kDa dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L. (Diptera :Culicidae)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si dan Sri Mumpuni WW S.Pd., M.Si selaku dosen pembimbing, yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd dan Eva Tyas Utami S.Si., M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberi banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
3. Dra. Dwi Setyati M.Si. 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 FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;

5. ayah Saiful Hadi Sulistiyono, mama Artiningsih, dan adik tercinta Masyal Ulwan yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, doa tulus, dan pendidikan yang selalu mengiringi penulis hingga beranjak dewasa;
6. abang Januar Adi Putra S.Kom yang selalu memberikan semangat, canda tawa, motivasi, dan doa disetiap hari kehidupan penulis;
7. rekan kerja seperjuangan Suci Umami Roziqotul Qudsiyah, Izzay Afkarina, Zakiyatul Khoiriyah, Dewi Masruroh, dan Amatulloh Sholihah terimakasih atas kerjasama dan dukungan serta bantuannya selama ini;
8. kakak-kakak seperjuangan Washilul Arham, Moh. Mirza Nuryadi, Renam Putra, Elisa Nurma Riana dan adik-adik seperjuangan serta teman-teman seperjuangan yang selalu memberikan dukungan dan semangatnya;
9. teman-teman Biologi angkatan 2011 yang tergabung dalam “Ampibi”, atas motivasi, dukungan serta bantuan dalam pengerjaan skripsi ini;
10. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA .....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Batasan Masalah .....	4
1.5 Manfaat .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Penanggulangannya .....	5
2.2 Pengembangan Vajsin Dengue .....	6
2.3 Potensi Kelenjar Saliva Vektor Arthropoda Sebagai Target TBV .....	8
2.4 Mekanisme Respon Imun Manusia Terhadap Saliva <i>Aedes</i> <i>aegypti</i> .....	9
2.5 Komponen Penyusun Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> .....	10

2.6 Hipotesis .....	11
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>12</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	12
3.2 Rancangan Penelitian .....	12
3.3 Alat dan Bahan .....	13
3.4 Prosedur Penelitian.....	13
3.4.1 Preparasi Alat .....	13
3.4.2 Rearing <i>Aedes aegypti</i> .....	14
3.4.3 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> .....	15
3.4.4 Analisis SDS PAGE .....	16
3.4.5 Preparasi Serum Darah.....	18
3.4.6 ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>20</b>
4.1 Respon Imun IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva <i>Ae. aegypti</i> .....	20
4.2 Respon Imun IgG Anti Protein 31 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> Pada Penderita DBD Berdasarkan Kelompok Umur... ..	24
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>29</b>
5.1 Kesimpulan .....	29
5.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN .....</b>	<b>35</b>

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Virus <i>dengue</i> .....	5
Gambar 2.2 Peran dari Protein Kelenjar Saliva Arthropoda.....	9
Gambar 3.1 Toraks Nyamuk <i>Aedes albopictus</i> dan <i>Aedes aegypti</i> .....	15
Gambar 3.2 Perbedaan Maxillary Palp <i>Aedes aegypti</i> Jantan dan Betina.....	15
Gambar 3.3 Struktur Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> Betina .....	16
Gambar 3.4 Hasil Visualisasi SDS PAGE .....	17
Gambar 4.1 Kadar IgG Anti Protein 31 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> Pada Neonatus, Penderita DBD, dan Manusia Sehat.....	20
Gambar 4.2 Perbandingan Kadar IgG Pada Rata-rata Serum Secara Individual dan <i>Pool</i> Serum Terhadap Protein 31 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> .....	23
Gambar 4.3 Kadar IgG Anti Protein 31 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> Pada Penderita DBD Berdasarkan Kelompok Umur .....	25
Gambar 4.4 Kadar IgG Anti Protein 31 kDa Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> Pada Penderita DBD Berdasarkan Rata-rata Kelompok Umur Individual dan <i>Pool</i> Serum .....	27
Gambar L.2 Penentuan Berat Molekul Hasil Visualisasi SDS PAGE.....	37

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Kandidat Vaksin DBD .....	7
Tabel 2.2 Substansi Kelenjar Saliva Vektor Arthropoda .....	8
Tabel 2.3 Protein Kelenjar Saliva <i>Ae. aegypti</i> .....	11
Tabel L.1 Komposisi Bahan Untuk Gel SDS PAGE .....	36

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Larutan dan Buffer .....	35
Lampiran 2. Penentuan Berat Molekul Protein.....	37
Lampiran 3. Surat Persetujuan Kode Etik.....	39
Lampiran 4. Informed Consent .....	41



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit infeksi yang ditularkan melalui paparan nyamuk *Aedes (Ae.) aegypti* yang membawa virus *dengue* (DENV) (Soegijanto, 2003). Virus *dengue* termasuk dalam genus *Flavivirus* famili *Flaviviridae* dengan empat serotip yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (Wan *et al.*, 2013). Setiap serotip virus *dengue* dapat memicu timbulnya penyakit DBD karena keempat serotip tidak menghasilkan proteksi silang (Gubler, 1998).

Upaya penanganan kasus DBD yang telah dilakukan oleh pemerintah Indonesia hingga saat ini masih sebatas pengendalian vektor, seperti abatisasi, pengasapan (*fogging*), gerakan 3M (Menguras, Menutup, dan Mengubur), dan PSN (Pemberantasan Sarang Nyamuk). Upaya tersebut tidak memberikan pengaruh yang signifikan karena kasus DBD masih mengalami peningkatan setiap tahunnya (Fathi *et al.*, 2005). Salah satu cara pengendalian DBD yang hingga saat ini dalam tahap pengembangan yaitu pembentukan vaksin. Pengembangan terbaru vaksin DBD saat ini dilakukan dengan berbasis vektor, yang diharapkan dapat menjadi Vaksin Penghambat Transmisi (*Transmisiion Blocking Vaccine*, TBV) (Cautinho & Marcelo, 2010).

Molekul yang digunakan pada pengembangan TBV DBD saat ini berupa protein dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Protein kelenjar saliva tersebut 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.

Substansi vasodilator pada saliva nyamuk menyebabkan pelebaran pada pembuluh darah (vasodilatasi) (Titus *et al.*, 2006). Substansi imunomodulator dapat

menekan terbentuknya sistem imun pada tubuh inang. Kedua substansi tersebut dapat mempermudah proses *blood feeding* yang secara bersamaan dimanfaatkan patogen untuk transmisi ke tubuh inang (James, 2003). Faktor imunomodulator yang terdapat pada saliva nyamuk secara imunologi dapat dikembangkan menjadi vaksin TBV untuk *dengue*. Sehingga semakin banyak paparan kelenjar saliva *Ae. aegypti* maka kadar IgG akan semakin tinggi.

Penelitian oleh Oktarianti *et al.* (2014), telah berhasil mengkarakterisasi protein 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* sebagai protein imunogenik, oleh karena itu protein tersebut berpotensi sebagai substansi imunomodulator dalam pengembangan TBV DBD. Menurut penelitian James *et al.* (1991) protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan berat molekul 17-35 kDa termasuk dalam kelompok protein D7. Protein D7 memiliki ikatan amina biogenik yang bekerja secara antagonis dengan proses vasokonstriksi dan agregasi platelet. Kelenjar saliva yang digunakan berasal dari nyamuk betina karena protein D7 merupakan protein dominan pada nyamuk *Ae. aegypti* betina dewasa. Protein D7 diproduksi pada lobus distal lateral dan lobus median kelenjar saliva *Ae. aegypti* (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012).

Potensi imunomodulator protein 31 kDa dapat dilihat berdasarkan kadar IgG pada serum darah manusia. Hal tersebut karena IgG merupakan antibodi yang memiliki kadar lebih tinggi setelah terjadi paparan berulang (Bratawidjaja & Iris, 2014). Oleh karena itu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui respon imun humoral terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* berdasarkan kadar IgG pada serum darah manusia.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi kadar IgG didalam serum adalah umur. Pematangan sistem imun yang berbeda pada setiap individu akan mempengaruhi proliferasi dan fluktuasi sel B yang menghasilkan IgG. Pada penelitian Douncoure *et al.* (2012) terdapat perbedaan kadar IgG anti protein kelenjar saliva pada penduduk endemik DBD dengan kelompok umur yang berbeda dari anak-anak hingga dewasa. Selain itu pada penelitian Remue *et al.* (2007) juga menunjukkan perbedaan kadar IgG pada setiap kelompok umur anak-anak umur satu hingga enam tahun. Maka dari

itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai respon imun (IgG) humoral terhadap protein imunogenik 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* berdasarkan kelompok umur pada penderita DBD.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* telah berhasil dikarakterisasi pada penelitian sebelumnya. Namun demikian modulasinya terkait dengan respon imun humoral manusia dalam hal ini IgG belum diketahui. Sehingga pada penelitian ini permasalahan yang ingin dijawab adalah:

1. Bagaimana respon imun humoral (IgG) manusia terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*?
2. Bagaimana respon imun humoral (IgG) manusia berdasarkan umur terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*?

### **1.3 Tujuan**

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang ada, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

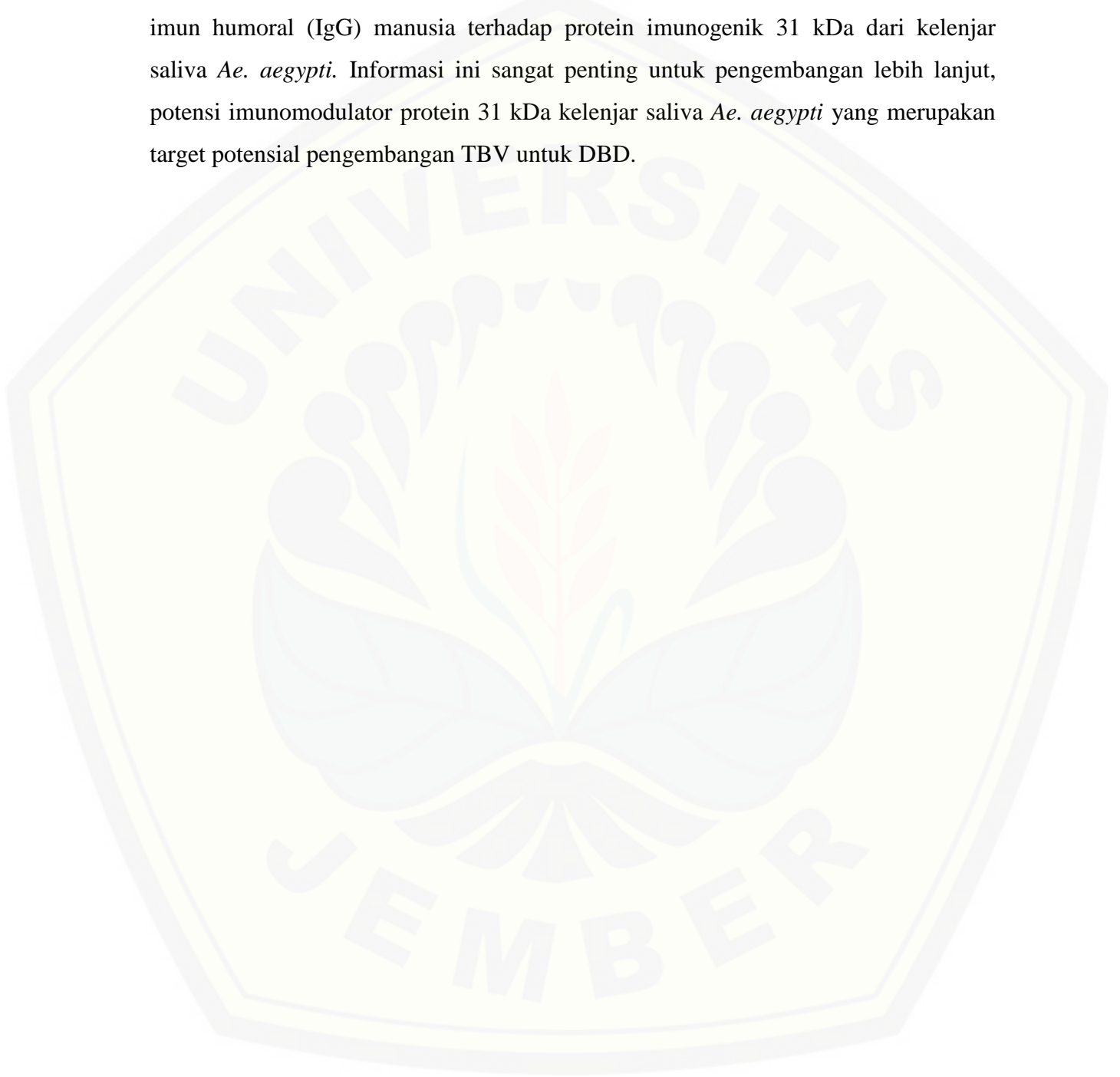
1. Mengetahui respon imun humoral (IgG) manusia terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*?
2. Mengetahui respon imun humoral (IgG) manusia berdasarkan umur terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*?

### **1.4 Batasan Masalah**

Pengamatan respon imun humoral dalam penelitian ini difokuskan pada analisis IgG secara kuantitatif. Serum yang digunakan untuk analisis tersebut berasal dari serum darah neonatus, orang sehat dari wilayah endemik, dan pasien DBD. Sementara itu respon imun humoral berdasarkan umur diamati hanya dari serum penderita DBD.

### 1.5 Manfaat

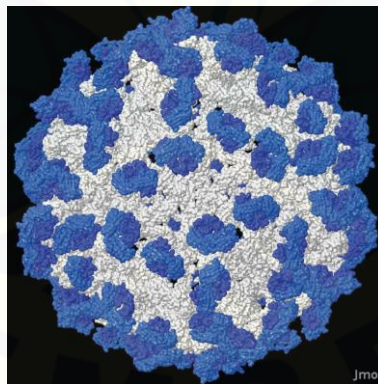
Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai respon imun humoral (IgG) manusia terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Informasi ini sangat penting untuk pengembangan lebih lanjut, potensi imunomodulator protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang merupakan target potensial pengembangan TBV untuk DBD.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Demam Berdarah *Dengue* (DBD) dan Penanggulangannya

DBD merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus Dengue (Gambar 2.1) dari kelompok *Arthropod-Borne Virus* (Arbovirus) (Rothman, 2009). Virus Dengue diketahui memiliki empat tipe serotip yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (WHO, 2009). Setiap serotip dapat menimbulkan penyakit DBD melalui gigitan nyamuk *Ae. aegypti* atau *Ae. albopictus* (Rothman, 2009). Keempat serotip dari virus Dengue ditemukan di wilayah Indonesia dengan serotip DENV-3 yang memiliki kelimpahan tertinggi (Ishartadiati, 2013). Antibodi yang ditimbulkan oleh serotip virus Dengue tidak dapat menimbulkan imunitas dengan proteksi silang (*cross-protective*), sehingga penderita DBD dapat mengalami infeksi sebanyak empat kali oleh masing-masing serotip (Wilschut *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Struktur virus *Dengue* PDB entry 2r6p6, putih: protein membran, biru: *antibody fragments* (Sumber: PDB, 2008).

DBD ditemukan hampir di seluruh belahan dunia terutama di daerah tropik dan subtropik, baik sebagai penyakit endemik maupun epidemik (Wati *et al.*, 2011). DBD

pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 1968 di Surabaya (Soegijanto, 2003). Indonesia merupakan salah satu negara endemik DBD dengan lebih dari 30% populasi manusia hidup di daerah perkotaan. Sebanyak 25.000 kasus DBD terjadi di Jakarta dan Jawa Barat. Peningkatan kasus DBD disebabkan virus *dengue* menyebar dengan cepat di wilayah perkotaan maupun pedesaan, virus *dengue* tercatat sebagai arbovirus dengan kecepatan penyebaran tertinggi di dunia (WHO, 2009).

Penanganan DBD hingga saat ini masih bersifat simptomatis (Chanthavanich *et al.*, 2006). Hingga saat ini masih belum ditemukan vaksin yang efektif untuk mencegah penyakit DBD (Soegijanto, 2003), maka dari itu pengendalian vektor perlu dilakukan terutama di daerah endemik. Pemerintah Indonesia telah melakukan program pengendalian vektor DBD seperti pengasapan (*fogging*), abatisasi, Pemberantasan Sarang Nyamuk (PSN), gerakan 3M (Menguras, Menutup, dan Mengubur), serta pemanfaatan ovitrap (Fathi *et al.*, 2005). Namun pengendalian vektor yang telah dilakukan kurang efektif sehingga jumlah penderita DBD semakin meningkat setiap tahunnya, sehingga perlu dilakukan pencegahan penyakit DBD melalui pengendalian transmisi patogen seperti pembentukan vaksin.

## 2.2 Pengembangan Vaksin *Dengue*

Vaksin merupakan substansi dari mikroorganisme atau suspensi mikroorganisme yang digunakan untuk menginduksi sistem imun dalam tubuh inang (Radji, 2010). Vaksin yang dikembangkan untuk pengendalian penyakit DBD sangat banyak, hanya saja semua vaksin masih sampai tahap praklinis atau uji laboratorium. Pada Tabel 2.1 terdapat berbagai macam vaksin yang telah dikembangkan beserta tahap penelitiannya.

Tabel 2.1 Kandidat Vaksin DBD

JENIS VAKSIN	STATUS
Vaksin Subunit Rekombinan	Kandidat vaksin pada NHPs dan Mencit
Vaksin DNA	Kandidat vaksin pada NHPs dan Mencit
Vaksin VLP	Kandidat vaksin pada Mencit
Vaksin Vektor Virus	Kandidat vaksin pada NHPs dan Mencit
Purifikasi Virus Inaktif	Kandidat vaksin pada NHPs
Live Attenuated Virus Vaksin (LAV)	Kandidat vaksin pada NHPs dan Mencit
Heterologous prime-boost approaches	Kandidat vaksin pada NHPs

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

Vaksin pengendali DBD yang telah dikembangkan hingga saat ini diantaranya *Live Attenuated Virus Vaccine (LAV)* dan *Live Attenuated Tetravalen Dengue Vaccine (TDV)*. LAV merupakan salah satu pengembangan vaksin dengan menggunakan virus hidup yang telah dilemahkan (Lima *et al.*, 2011). LAV memiliki beberapa keunggulan dibandingkan vaksin lainnya seperti biaya produksi lebih murah, vaksin yang ditimbulkan lebih kuat dan tahan lama, imunitas yang dibentuk lebih tinggi, dan mendorong munculnya respon humoral dan seluler (Lauring *et al.*, 2010). Akan tetapi LAV kurang efektif karena terdapat 4 serotip virus *dengue* yang dapat menyerang tubuh orang yang sama.

TDV merupakan gabungan dari 4 serotip virus *dengue* yang dikembangkan dengan tujuan memberikan perlindungan jangka panjang terhadap keempat virus *dengue* sekaligus (Edelman, 2007). TDV dinilai kurang efektif karena adanya kesulitan dalam menentukan keadaan optimal dalam melemahkan virus. Selain itu penentuan stabilitas vaksin TDV dan pengaruh interaksi keempat serotip dalam pembentukan sistem imun humoral masih menjadi kendala (Sun *et al.*, 2003). Sehingga perlu dilakukan pengembangan vaksin dengan metode yang lebih efektif. Pengembangan terbaru vaksin DBD saat ini berbasis vektor yang diharapkan dapat menjadi Vaksin Penghambat Transmisi (*Transmission Blocking Vaccine, TBV*).

### 2.3 Potensi Kelenjar Saliva Vektor Arthropoda sebagai Target TBV

Pengembangan TBV didasarkan pada penghentian transmisi patogen agar tidak dapat menginfeksi tubuh inang. TBV umumnya dilakukan dengan imunisasi pada tubuh inang baik yang telah terinfeksi maupun belum terinfeksi. Imunisasi dilakukan dengan menggunakan molekul yang berasal dari patogen untuk mengurangi infeksi dari patogen tersebut (Cautinho & Marcelo, 2010).

Molekul yang digunakan pada pengembangan TBV DBD ini berupa protein dari kelenjar saliva. Kelenjar saliva nyamuk digunakan dalam pengembangan TBV karena kelenjar saliva mengandung substansi yang berperan penting saat proses transmisi patogen ke tubuh inang (James, 2003). Kelenjar saliva mengandung faktor vasodilator dan imunomodulator yang membantu dalam transmisi patogen ke tubuh inang. Substansi yang terdapat pada kelenjar saliva sebagai akibat dari adanya faktor vasodilator dan imunomodulator ditunjukkan pada Tabel 2.2. Substansi tersebut diantaranya sialokinin, peroxidase, maxadilan, aegyptin, apyrase, dan ubiquitos. Substansi tersebut berperan dalam menghambat vasokonstriksi, agregasi dan aktivasi platelet, serta penggumpalan darah. Substansi dalam kelenjar saliva nyamuk bervariasi disetiap vektor, substansi ini bersifat immunosupresif dan juga dapat mempermudah transmisi patogen ke tubuh inang (Belkaid *et al.*, 1998).

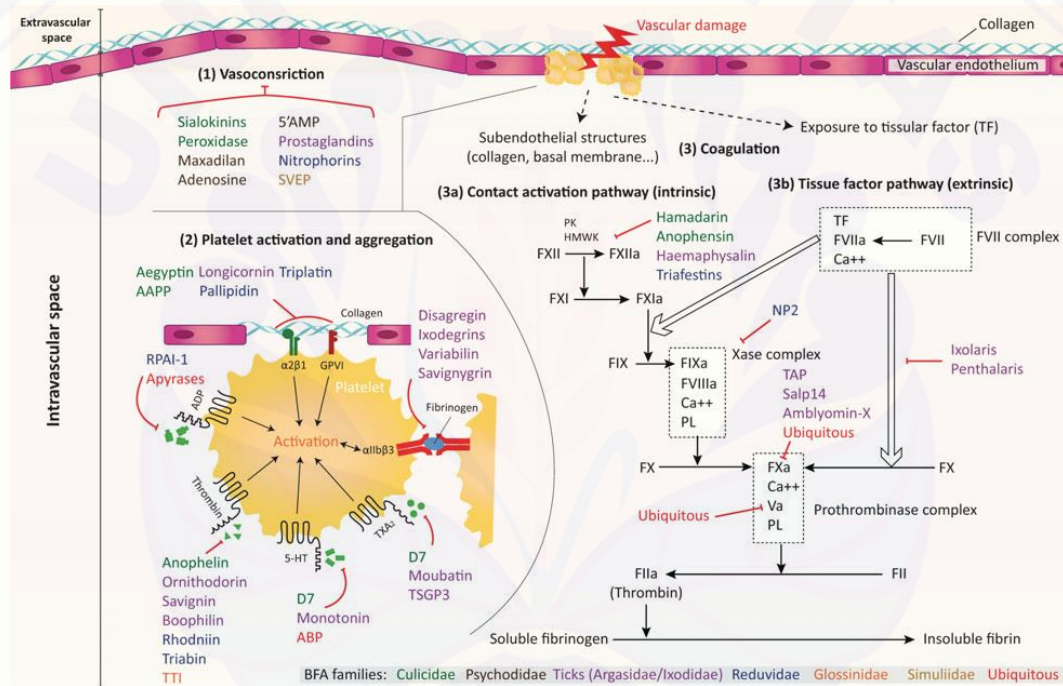
Pada Gambar 2.2 dapat diketahui beberapa jenis protein yang berperan dalam vasokonstriksi, agregasi platelet, dan koagulasi yang terdapat pada saliva Arthropoda saat melakukan *blood feeding* pada tubuh inang. Beberapa protein diantaranya juga dimiliki oleh *Ae. aegypti* seperti adenosin, aegyptin, D7, dan apyrase (Riberio *et al.*, 2007). Protein imunogenik sebagai faktor imunomodulator yang terdapat pada saliva nyamuk *Ae. aegypti* merupakan kandidat penting sebagai target pengembangan TBV.



Tabel 2.2 Substansi Kelenjar Saliva Vektor Arthropoda

Arthropod	Vasodilatory and immunomodulatory activities
Mosquitoes	Inhibits T- and B-cell activation
	Neutrophil chemotactic factor
	Inflammation inhibitors
	Cytokine modulators
	Anticoagulants
	Inhibits activation of the plasma contact system

(Sumber: Titus *et al.*, 2006)



Gambar 2.2 Peran dari protein kelenjar saliva Arthropoda saat *blood feeding* (Sumber: Fontaine *et al.*, 2011)

#### 2.4 Mekanisme Respon Imun Manusia Terhadap Saliva *Aedes aegypti*

*Ae. aegypti* betina membutuhkan darah untuk pematangan telur. Darah yang diambil dari inang didapat dengan cara menusukkan proboscis nyamuk pada bagian kulit inang hingga bagian endotelium (Fontaine *et al.* 2011). Pada saat bersamaan dengan proses *blood feeding* nyamuk juga mengeluarkan komponen biokimia yang

terdapat dalam saliva nyamuk guna memudahkan pengambilan darah. Komponen biokimia yang terdapat pada saliva akan mendapatkan respon imunologi dari tubuh inang, baik respon antibodi spesifik (*adaptive*) maupun nonspesifik (*innate*).

Respon imun nonspesifik merupakan mekanisme pertama dari tubuh inang saat terdapat gigitan nyamuk. Sel yang berperan dalam respon imun nonspesifik diantaranya sel *Natural killer* (NK), *mast cell*, dan neutrofil (Radji, 2010). Selain respon imun nonspesifik pada tubuh inang terjadi respon imun spesifik dengan bantuan dari APC (*Antigen Presenting Cell*), sel T, dan sel B (Peng *et al.*, 2002). Proses *blood feeding* akan mempengaruhi respon imun spesifik yang akan menghasilkan antibodi seperti IgG, IgE, IgD, IgA, dan IgM.

Paparan primer oleh kelenjar saliva *Ae. aegypti* pada tubuh inang akan mengaktifkan sel B dan sel T, sel B berproliferasi menghasilkan IgM dalam jumlah yang besar. Pada paparan selanjutnya atau paparan sekunder, produksi IgG akan meningkat lebih banyak dibandingkan antibodi lainnya. Penelitian Schneider *et al.* (2010) menyatakan bahwa paparan berulang kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat menurunkan modulasi Th1 melalui penurunan kadar  $IF\gamma$  dan  $IF\beta$ , serta dapat meningkatkan modulasi Th2 melalui kenaikan kadar IL4 dan IL10.

Pada penelitian Schneider *et al.* (2001) diketahui bahwa paparan saliva *Ae. aegypti* akan menyebabkan polarisasi sistem imun inang menjadi respon Th2, perubahan respon tersebut ditunjukkan dengan meningkatnya kadar sitokin IL-4 dan IL-10 (sitokin yang menginduksi Th2) dan menurunnya kadar sitokin proinflamatori seperti  $IFN-\gamma$  dan IL-12. Peningkatan kadar sitokin IL-4 dan IL-10 menjadi aktifator sel Th 2 yang sekaligus menginduksi sel B yang pada akhirnya dapat membentuk antibodi spesifik seperti IgG.

## 2.5 Komponen Penyusun Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Sebanyak 24 protein pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* telah berhasil diidentifikasi dengan analisis transkriptomik dan proteomik, diantaranya apyrase,

serpin 1 dan 2, protein D7, adenosin deaminase (ADA), amylase, lectin, purin, dan protease (Riberio *et al.*, 2007). Selain melalui analisis tersebut diketahui pula protein penyusun kelenjar saliva melalui analisis SDS PAGE berdasarkan berat molekul (Tabel 2.3).

Kelenjar saliva vektor Arthropoda mengandung substansi penting dalam transmisi patogen, beberapa penelitian menemukan bahwa kelenjar saliva nyamuk seperti *Ae. aegypti* mengandung komponen yang bersifat imunogenik (Gillespie *et al.*, 2000). Hal ini dapat terbukti dengan munculnya respon antibodi natural pada penduduk wilayah endemik yang sering terpapar patogen (Cornelie *et al.*, 2007).

Penelitian Oktarianti *et al.* (2014) menyatakan bahwa terdapat dua protein yang bersifat imunogenik yaitu 31 kDa dan 56 kDa yang telah diidentifikasi dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Protein tersebut dapat bereaksi silang dengan sampel serum dari orang yang tinggal di wilayah endemik. Protein 56 kDa masih belum banyak dipublikasikan dibandingkan dengan protein 31 kDa. Protein 31 kDa termasuk dalam protein alergen yang kaya akan asam amino glisin, asam glutamat, dan asam aspartat. Selain itu protein 31 kDa diketahui memiliki peran penting dalam proses *blood feeding*, sehingga secara tidak langsung protein 31 kDa memiliki korelasi positif dalam transmisi patogen ke inang (Calvo *et al.*, 2007).

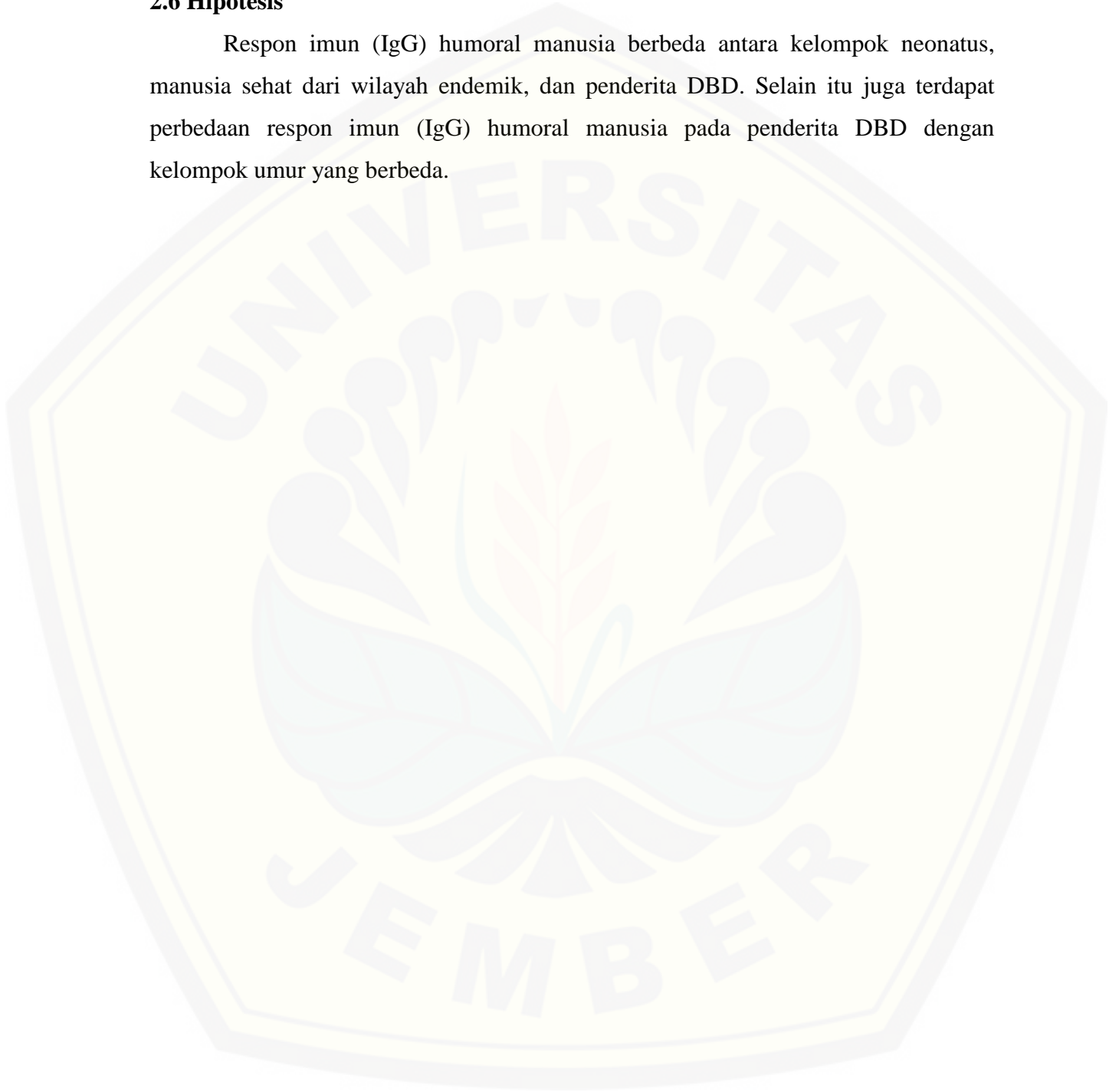
Tabel 2.3 Protein kelenjar saliva *Ae. aegypti*

Protein	Berat Molekul
Apyrase (Aed a1)	62-68 kDa
Anticoagulant-faktor Xa	54 kDa
Salivary serpin putatif antikoagulan	47-50 kDa
Aed aX1, Aed aX2	37-44 kDa
D7	36-39 kDa
Aed a3, Putatif 30 kDa allergen-like protein	23-30 kDa
Adenosin deaminase	53-59 kDa
Angiopoietin-like protein	23-30 kDa
Antigen 5 protein family	23-30 kDa
Vasodilator sialokinin	1.4 kDa

(Sumber: Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012)

## 2.6 Hipotesis

Respon imun (IgG) humoral manusia berbeda antara kelompok neonatus, manusia sehat dari wilayah endemik, dan penderita DBD. Selain itu juga terdapat perbedaan respon imun (IgG) humoral manusia pada penderita DBD dengan kelompok umur yang berbeda.



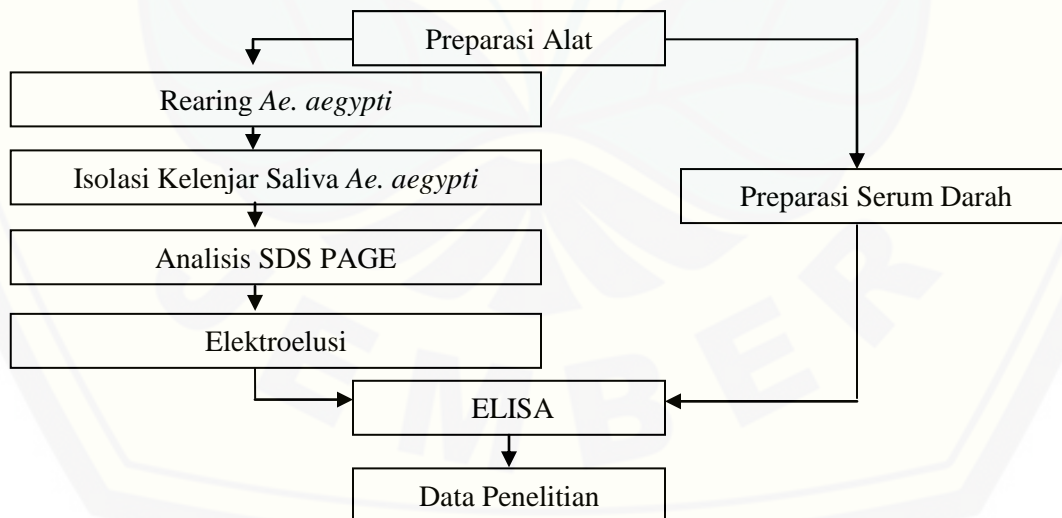
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan Desember 2014 sampai dengan bulan April 2015, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Dasar, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Rancangan penelitian meliputi tujuh tahap yaitu preparasi alat, rearing *Ae. aegypti*, isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*, analisis SDS PAGE, elektroelusi, preparasi serum, dan ELISA. Diagram alir tahapan penelitian seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir respon imun humoral terhadap protein imunogenik 31 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*.

### 3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang *Ae. aegypti*, nampan plastik, cawan pupa, pipet plastik, kertas saring, aspirator, mikropipet, jarum *microdissection*, mikroskop stereo, *vortex*, kamera optilap, *eppendorf*, mikrotip, *micropipette*, *refrigerator*, *handscone*, perangkat alat *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), perangkat alat *Elektroelusi*, perangkat alat ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Bahan-bahan yang dipergunakan terdiri atas nyamuk *Ae. aegypti*, tikus wistar, alkohol 70%, pelet ikan, sukrosa 10%, *Phenyl methyl sulfonyl fluoride* (PMSF) dalam PBS, *Acrilamide/ Bis-acrilamide* (Sigma), *buffer* elektroda, *buffer* sampel, *Coomassie Blue R-250*, 40% (v/v) metanol (EMSURE®), 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), *Affinity Purified Antibody Phosphatase Labeled Goat anti-Human IgG* (H+L) (KPL), serum darah manusia, ddH<sub>2</sub>O, *Bicarbonatte buffer*, BSA, TMB, dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dari preparasi alat, *rearing Ae. aegypti*, isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti*, Analisis SDS-PAGE, preparasi serum darah, dan ELISA. Prosedur penelitian secara detail akan dijelaskan sebagai berikut:

#### 3.3.1 Preparasi Alat

Alat-alat berbahan *glassware* dan *plasticware* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120°C selama 30 menit. Sebelum memulai pekerjaan seluruh lingkungan seperti meja kerja, tangan, dan jas lab dibersihkan menggunakan etanol 90%.

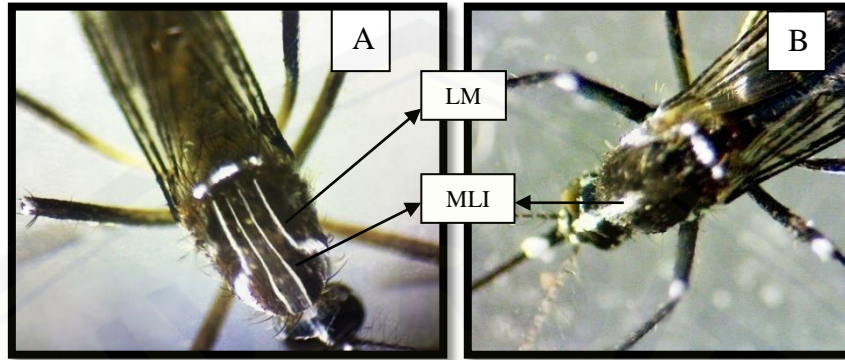
### 3.3.2 *Rearing Aedes aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan pada penelitian merupakan hasil *rearing* yang dilakukan dalam ruang insektarium bersuhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  (suhu ruang). *Rearing* diawali dengan mengumpulkan larva nyamuk *Ae. aegypti* dari genangan air buatan manusia. Larva selanjutnya dipindahkan dalam nampan plastik (*tray*) untuk dipelihara hingga menjadi pupa. Selama perkembangan larva diberi makan pelet ikan.

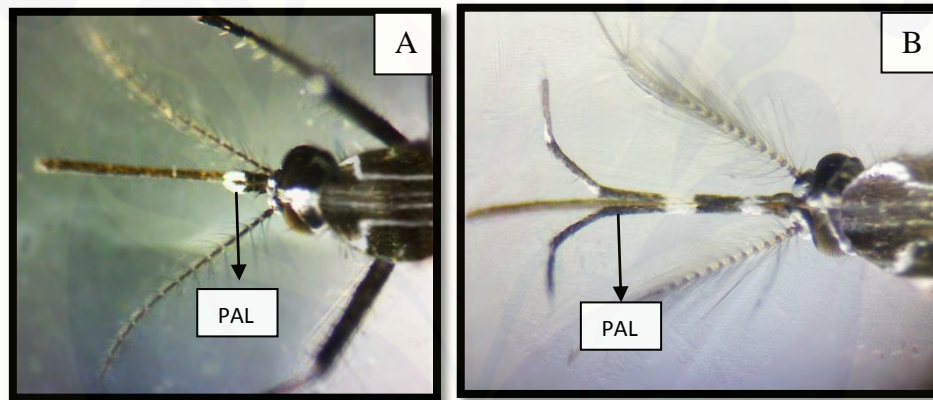
Pupa yang ada dalam *tray* dipindahkan dengan menggunakan pipet plastik pada cawan pupa. Pada bibir cawan pupa diberi kertas saring berukuran 3x4 cm yang disusun melingkar untuk tempat bertelur nyamuk dewasa. Kemudian cawan pupa dimasukkan pada kandang koloni hingga pupa menjadi nyamuk dewasa. Selain itu di dalam kandang koloni juga disiapkan larutan sukrosa 10% sebagai makanan nyamuk jantan dan seekor tikur wistar yang diletakkan pada kandang kecil untuk dihisap darahnya oleh nyamuk betina. Nyamuk dewasa diambil dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator lalu dimasukkan dalam gelas plastik yang ditutup dengan kain kasa pada bagian atasnya untuk diisolasi kelenjar salivanya.

Morfologi *Ae. aegypti* dewasa secara umum terbagi menjadi tiga bagian yaitu caput, toraks, dan abdomen. Karakteristik yang mudah digunakan dalam identifikasi *Ae. aegypti* dapat dilihat pada bagian dorsal toraks. Dorsal toraks *Ae. aegypti* memiliki empat garis putih (Kusumawardani, 2012) seperti pada Gambar 3.1a. Masing-masing garis terdiri atas dua garis *Lyre Marking* (LM) dan dua garis *Submedial longitudinal line* (MLI) (Andrew & Ananya, 2013). Sedangkan pada *Ae. albopictus* hanya terdapat satu garis putih pada bagian dorsal toraks (Gambar 3.1b).

Nyamuk *Ae. aegypti* dewasa dapat dibedakan antara jantan dan betina menggunakan beberapa karakteristik. *Maxillary palp* pada caput merupakan salah satu karakteristik yang mudah untuk diamati. *Maxillary palp* pada betina sangat pendek dibandingkan *proboscis*, dengan pita putih pada ujung *maxillary palp*. Sedangkan *maxillary palp* pada jantan memiliki panjang yang hampir sama dengan *proboscis* dan terdapat lima pita putih (Andrew & Ananya, 2013). Perbedaan *maxillary palp* jantan dan betina dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1 Toraks nyamuk, LM (*Lyre Marking*); MLI (*Submedial Longitudinal Line*); (A) *Ae. aegypti*; (B) *Ae. albopictus* (menggunakan Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 12X, kamera: Optilab)

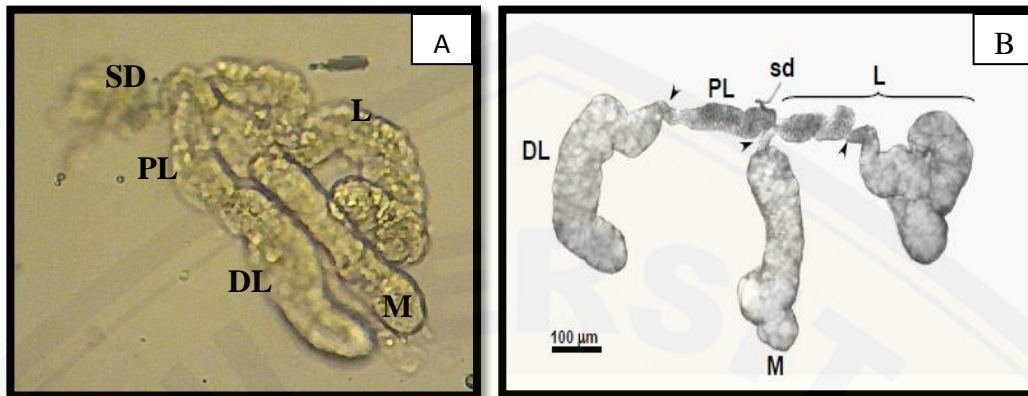


Gambar 3.2 Perbedaan *Maxillary palp* (PAL) nyamuk (A) *Ae. aegypti* betina dan (B) *Ae. aegypti* jantan (menggunakan Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 40X, kamera: Optilab)

### 3.3.3 Isolasi Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* betina dimasukkan dalam gelas plastik dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin 4°C selama 3 menit. Selanjutnya diatas gelas benda steril ditetaskan 50  $\mu$ L NaCl 30% 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





Gambar 3.3. Struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina; (M) lobus median, (L) Lobus Lateral, (SD) salivary ductus, (DL) lobus Distal Lateral, (PL) lobus Proximal Lateral. A: menggunakan Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 400X, kamera: Optilab. B: Juhn *et al.*, 2011.

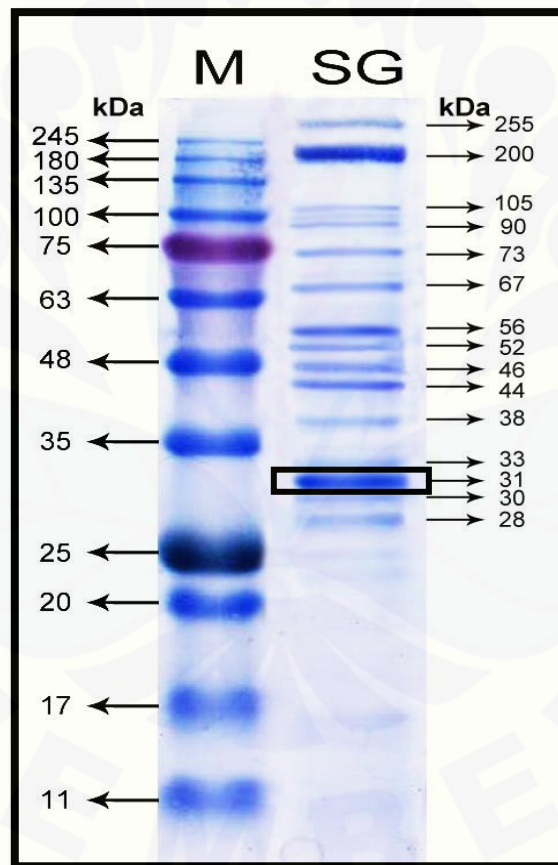
*Ae. aegypti* lalu secara perlahan tarik kepala hingga terlepas dari toraks. Apabila tarikan benar, maka akan tampak lobus-lobus kelenjar saliva berwarna bening ikut serta saat bagian kepala ditarik. Kemudian kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain. Kelenjar saliva kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum diseksi. Sepuluh pasang kelenjar saliva dikumpulkan dalam *ependorf* steril yang telah diisi 10 µL PMSF dalam PBS steril dan disimpan pada suhu -20°C. Komposisi larutan PMSF dalam PBS steril dapat dilihat pada Lampiran 1. Sebanyak 1000 pasang kelenjar saliva yang dibutuhkan dalam penelitian ini.

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* berjumlah sepasang yang masing-masing terdiri atas tiga lobus, dua lobus lateral dan satu lobus medial (M). Lobus lateral terdiri dari lobus Proximal Lateral (PL) dan Distal Lateral (DL). Kedua pasang kelenjar saliva dihubungkan oleh pembuluh kelenjar (Gambar 3.3) (Juhn *et al.*, 2011).

#### 3.3.4 Analisis SDS-PAGE

Ekstraksi protein menggunakan sepuluh pasang kelenjar saliva pada 10 µL PMSF dalam PBS hasil isolasi ditambahkan dengan 10 µL buffer sampel protein dan

dipanaskan menggunakan air mendidih selama 2 menit. Sampel protein hasil ekstraksi dielektroforesis dengan analisis SDS-PAGE menggunakan *Separating Gel* 12% dan *Stacking Gel* 4% (Lampiran 1). Sebanyak 20  $\mu$ L sampel protein dimasukkan kedalam sumuran *gel*. Elektroforesis dilakukan selama 120 menit, 120 V, pada suhu ruang dalam *buffer* elektroda 1x pH 8,3. Gel hasil elektroforesis diwarnai menggunakan larutan pewarna *staining* CBB selama 120 menit dan dilanjutkan *destaining* 1, *destaining* 2, dan *destaining* 3 masing masing 30 menit. Gel hasil elektroforesis seperti pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Hasil visualisasi SDS-PAGE, (SG) Protein 10 pasang kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina; (M) marker (Pre-stain Intron) (Canon MP280 Series Printer)

Protein 31 kDa diperoleh dengan melakukan pemotongan pada pita protein dengan berat molekul 31 kDa yang disimpan pada buffer elektroda hingga dielektroelusi. Elektroelusi dilakukan untuk mendapatkan ekstrak protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Elektroelusi dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 3.3.5 Preparasi Serum Darah

Sampel darah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari manusia yang tinggal di wilayah Jember yang merupakan salah satu wilayah endemik DBD di Indonesia (DepkesRI, 2014). Sampel darah yang digunakan sebanyak sembilan sampel neonatus, sembilan sampel penderita DBD, sembilan sampel manusia sehat, tiga sampel penderita DBD berumur kurang dari 15 tahun, tiga sampel penderita DBD berumur antara 15 hingga 40 tahun, dan tiga sampel penderita DBD berumur lebih dari 40 tahun.

Sampel darah neonatus diperoleh melalui ibu hamil yang tinggal di Jember sebagai wilayah endemik, darah neonatus diperoleh dari tali pusar bayi saat dilahirkan. Sedangkan sampel darah manusia sehat dan penderita DBD diperoleh dari pembuluh darah *vena brachial* di lengan. Sembilan orang dari masing-masing kelompok sampel diambil sampel darahnya sebanyak 3 mL. Serum penderita DBD diperoleh dari rumah sakit yang ada di wilayah Jember dengan penderita DBD merupakan manusia yang tinggal dan berasal dari kabupaten Jember.

Darah yang telah diperoleh ditampung dalam vakutainer tanpa antikoagulan. Kemudian sampel darah didiamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan dengan lapisan bening di bagian atas. Lapisan bening yang terbentuk dipindahkan dalam *eppendorf* steril lalu disentrifus dengan kecepatan 3200 rpm selama 15 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang diperoleh setelah sentrifus dipindahkan pada *eppendorf* baru dan disimpan pada suhu -20°C sebagai stok serum darah. *Ethical*

*clearance* dan *inform consent* yang digunakan dalam penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember (Lampiran 3 dan 4).

### 3.3.6 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA termasuk dalam EIA (*Enzyme Immuno Assay*) yang paling banyak digunakan. Teknik ELISA yang digunakan pada penelitian ini adalah ELISA tidak langsung yang digunakan untuk mendeteksi antibodi (Radji, 2010). Teknik awal ELISA dilakukan dengan melakukan *coating* antigen pada dasar sumuran *microtiter plate* dan diinkubasi *overnight*. Selanjutnya antiserum dimasukkan pada sumuran yang telah mengandung antigen dan diinkubasi 1 jam, sehingga akan terjadi reaksi antigen antibodi apabila terdapat antibodi yang spesifik. Serum yang tidak berikatan akan terlepas saat pencucian dengan PBS Tween.

Setelah inkubasi 1 jam dilakukan penambahan antibodi sekunder dengan menambahkan Anti-human IgG dan *blocking buffer* perbandingan 1:5000 lalu diinkubasi 1 jam. Tahap selanjutnya yaitu penambahan substrat berupa TMB yang dilakukan di ruang gelap selama 30 menit, lalu ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> agar reaksi pada substrat terhenti. Pembacaan hasil analisis ELISA dilakukan pada panjang gelombang 450 nm.

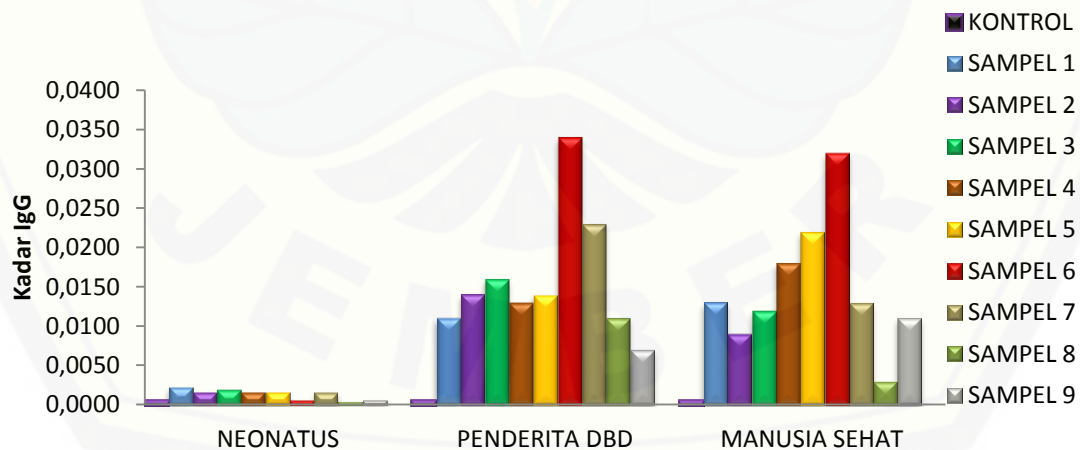
Optikal Density (OD) ditentukan dengan pembaca *microtiter plate* pada panjang gelombang 450 nm. Setiap sampel serum dilakukan pengulangan tiga kali dan pada sumuran kontrol tanpa diberikan protein saliva 31 kDa. Tingkat antibodi IgG dinyatakan sebagai ( $\Delta$ OD), yang dihitung dengan nilai rata-rata antara OD sumuran perlakuan (dengan protein saliva 31 kDa) dikurangi nilai OD dari sumuran kontrol (tanpa protein saliva 31 kDa) (Fontaine *et al.*, 2011). Kadar IgG didapatkan dengan cara mengkonversi OD dengan faktor pengenceran menjadi mg/ml.

**BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**4.1 Respon Imun IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti***

Aktifitas spesifik protein 31 kDa *Ae. aegypti* dapat dihitung secara kuantitatif menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). ELISA dilakukan dengan menggunakan sampel protein 31 kDa hasil elektroelusi dengan konsentrasi 10 µg/mL. Hasil pengukuran IgG anti protein saliva 31 kDa *Ae. aegypti* dapat dilihat Gambar 4.1.

Protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* merupakan protein imunogenik (Oktarianti *et al.*, 2014) yang berperan sebagai antigen. Antigen merupakan substansi yang dapat berinteraksi dengan antibodi (Bratawidjaja & Iris, 2014). Aktifitas protein 31 kDa pada penelitian ini diukur berdasarkan kadar IgG. Hal ini karena IgG serum darah memiliki kadar tertinggi dibandingkan kadar antibodi lainnya. IgG pada serum sekitar 13 mg/ml atau 75% dari keseluruhan antibodi yang terdapat pada serum (Lefranc & Gerard, 2001).



Gambar 4.1 Kadar IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* pada neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat dari wilayah endemik.

Berdasarkan data pada Gambar 4.1 kadar IgG kontrol pada kelompok serum neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat adalah nol. Hal ini karena pada kelompok kontrol tidak terdapat protein 31 kDa yang berperan sebagai antigen. Sehingga antibodi pada serum darah tidak dapat berikatan dengan antigen protein 31 kDa (Neuberger & Deenen, 1987). Kelompok kontrol pada penelitian ini juga membuktikan bahwa kadar IgG yang terdeteksi pada kelompok neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat merupakan IgG anti protein 31 kDa *Ae. aegypti*.

Serum darah kelompok neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat memiliki kadar IgG. Kadar IgG kelompok neonatus sampel satu hingga sampel sembilan berturut-turut adalah 0.002 mg/ml, 0.002 mg/ml, 0.002 mg/ml, 0.002 mg/ml, 0.002 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.002 mg/ml, 0.000 mg/ml, dan 0.002 mg/ml. Kadar IgG kelompok penderita DBD sampel satu hingga sampel sembilan berturut-turut adalah 0.011 mg/ml, 0.014 mg/ml, 0.016 mg/ml, 0.013 mg/ml, 0.014 mg/ml, 0.034 mg/ml, 0.023 mg/ml, 0.011 mg/ml, dan 0.007 mg/ml. Kadar IgG kelompok manusia sehat sampel satu hingga sampel sembilan berturut-turut adalah 0.013 mg/ml, 0.009 mg/ml, 0.012 mg/ml, 0.018 mg/ml, 0.022 mg/ml, 0.032 mg/ml, 0.013 mg/ml, 0.003 mg/ml, dan 0.011 mg/ml.

Kadar IgG yang terdapat pada ketiga sampel tersebut menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara antibodi pada serum darah manusia dengan antigen protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Ikatan antigen antibodi tersebut menunjukkan bahwa sampel telah terpapar protein 31 kDa melalui paparan nyamuk *Ae. aegypti* secara langsung maupun melalui plasenta ibu saat di dalam kandungan. Hal ini disebabkan IgG merupakan satu-satunya antibodi yang dapat disalurkan ibu pada janin selama masa kehamilan.

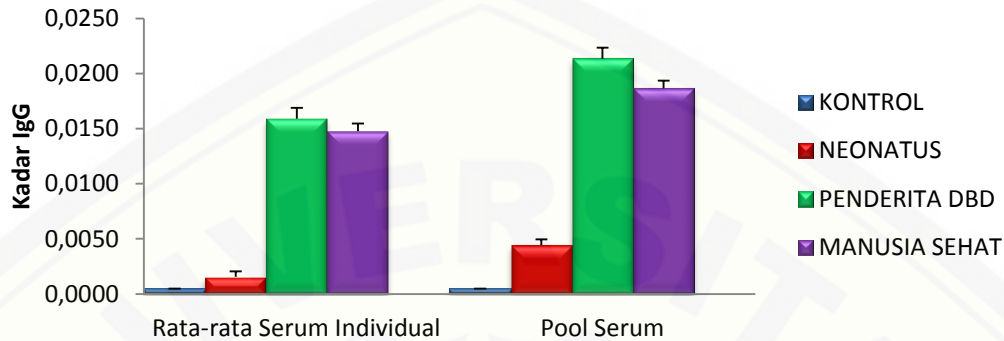
Paparan protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* pada inangnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti kepadatan nyamuk dan frekuensi paparan nyamuk perhari (Candra, 2010). Semakin tinggi kepadatan nyamuk di lingkungan dan

semakin tinggi frekuensi paparan nyamuk perhari, maka paparan protein 31 kDa akan semakin tinggi. Semakin tinggi jumlah paparan protein 31 kDa maka jumlah antibodi IgG yang dihasilkan semakin tinggi (Neuberger & Deenen, 1987).

Menurut Bratawidjaja & Iris (2014) paparan antigen pertama kali (primer) mengaktifkan sel T dan sel B, sel B kemudian berdiferensiasi dan berproliferasi menghasilkan IgG dalam jumlah sedikit. Sedangkan paparan ulangan (sekunder) dengan antigen yang sama akan meningkatkan proliferasi sel B untuk memproduksi IgG dalam jumlah yang lebih banyak. Pada penelitian Zeidner *et al.* (1999) paparan kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat menurunkan modulasi Th1 (IF $\gamma$  dan IL2) dan meningkatkan modulasi Th2 (IL4 dan IL10). Peningkatan kadar sitokin IL-4 dan IL-10 menjadi aktifator sel Th2 untuk menginduksi sel B yang pada akhirnya dapat membentuk antibodi spesifik seperti IgG. Sehingga semakin banyak paparan protein 31 kDa, maka semakin meningkat juga kadar IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Pernyataan ini sesuai dengan penelitian Fountaine *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa jumlah paparan nyamuk dapat mempengaruhi sistem imun melalui perubahan kadar IgG.

Setiap sampel serum yang telah diuji memiliki kadar IgG yang bervariasi (Gambar 4.1) baik pada serum kelompok neonatus, penderita DBD, maupun manusia sehat. Aktifitas protein 31 kDa antar kelompok serum dapat dilihat berdasarkan hasil rata-rata kadar IgG individual dibandingkan dengan kadar IgG pada kelompok populasi serum. Perhitungan kadar IgG untuk kelompok populasi serum dilakukan dengan cara mereaksikan sembilan serum setiap kelompok secara bersamaan.

Kadar IgG  $\pm$  SD pada hasil rata-rata serum individual neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat berturut-turut 0.001 mg/ml  $\pm$  0.000, 0.016 mg/ml  $\pm$  0.008, dan 0.015 mg/ml  $\pm$  0.008. Sedangkan kadar IgG  $\pm$  SD pada *pool* serum neonatus, penderita DBD, dan manusia sehat berturut-turut 0.008 mg/ml  $\pm$  0.001, 0.010 mg/ml  $\pm$  0.008, dan 0.019 mg/ml  $\pm$  0.010. Perbandingan kadar IgG anti protein 31 kDa tersebut dapat dilihat lebih lanjut pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Perbandingan kadar IgG pada rata-rata serum secara individual dan *pool* serum terhadap protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*.

Pada Gambar 4.2 terlihat perbedaan kadar IgG pada kedua kelompok, akan tetapi keduanya memiliki pola perbandingan yang sama. Serum dengan kadar IgG tertinggi hingga terendah secara berurutan yaitu penderita DBD, manusia sehat, dan neonatus. Kadar IgG pada penderita DBD dan manusia sehat cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan neonatus. Pada manusia sehat dan penderita DBD kadar IgG tersebut dipengaruhi oleh jumlah paparan langsung protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* melalui proses *blood feeding* nyamuk betina. Sedangkan pada neonatus kadar IgG dipengaruhi oleh jumlah IgG yang diperoleh dari ibu selama dalam kandungan.

Semakin tinggi jumlah paparan maka antibodi spesifik protein 31 kDa kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* akan semakin meningkat. Penelitian oleh Oktarianti *et al.* (2014) menyatakan bahwa antibodi spesifik oleh protein 31 kDa kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* ditemukan pada manusia yang hidup di wilayah endemik DBD dan tidak terdapat pada manusia yang tinggal di wilayah non endemik.

Kadar IgG pada penderita DBD dan manusia sehat hampir sama (Gambar 4.2). Hal ini disebabkan karena sampel serum penderita DBD dan manusia sehat diambil dari wilayah endemik, sehingga diduga memiliki kemungkinan yang sama untuk



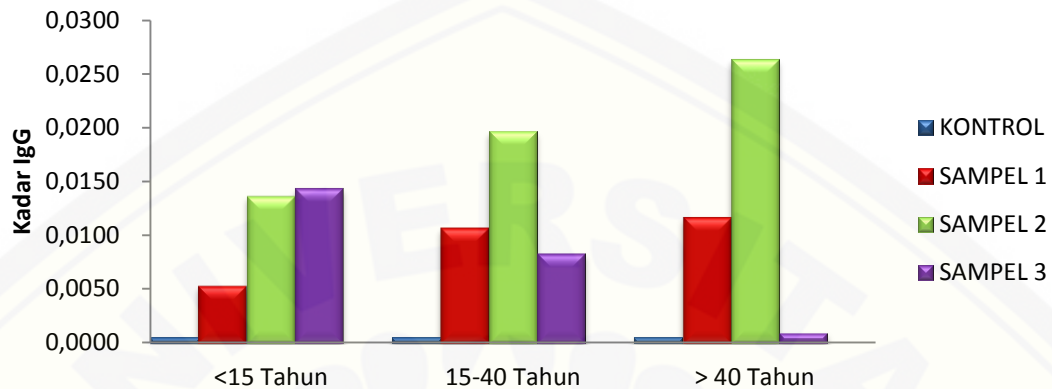
terpapar protein 31 kDa nyamuk *Ae. aegypti*. Walaupun kadar IgG pada manusia sehat dan penderita DBD hampir sama, akan tetapi tidak semua individu terkena infeksi virus *dengue*. Hal ini karena manusia sehat terpapar saliva yang tidak mengandung virus *dengue*, sedangkan penderita DBD terpapar saliva yang mengandung virus *dengue*. Sehingga terinfeksi maupun tidak terinfeksi virus *dengue* tidak menentukan kadar IgG anti protein 31 kDa. Hal tersebut karena protein 31 kDa terdapat spesifik pada semua nyamuk *Ae. aegypti* betina (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012) baik pada nyamuk pembawa virus *dengue* maupun tidak membawa virus *dengue* (Williams *et al.*, 2012).

Neonatus memiliki kadar IgG lebih rendah dibandingkan dengan penderita DBD dan manusia sehat. Hal ini karena serum neonatus diperoleh melalui tali pusar saat dilahirkan, sehingga diasumsikan neonatus tidak pernah mengalami paparan langsung protein 31 kDa. Menurut Lefranc & Gerard (2001) neonatus memiliki pertahanan tubuh spesifik berupa IgG yang diperoleh dari plasenta ibu. Ibu dari sampel neonatus diasumsikan telah terpapar protein 31 kDa karena tinggal di wilayah endemik, sehingga telah memiliki IgG anti protein 31 kDa. Pada Gambar 4.2 juga tampak kadar IgG bervariasi walau berada pada kelompok serum yang sama. Hal ini diduga adanya perbedaan pada jumlah paparan dan sistem kekebalan tubuh individu sampel.

#### **4.2 Respon Imun IgG Anti Protein 31 kDa Kelenjar Saliva *Ae. Aegypti* Pada Penderita DBD Berdasarkan Kelompok Umur**

Kelompok umur pada penderita DBD dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu umur kurang dari 15 tahun, umur antara 15 hingga 40 tahun, dan umur diatas 40 tahun. Perbandingan kadar IgG tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.3. Kadar IgG kontrol pada kelompok serum penderita DBD dengan umur kurang dari 15 tahun, 15 hingga 40 tahun, dan lebih dari 40 tahun adalah nol. Hal tersebut karena pada

kelompok kontrol tidak dilakukan penambahan antigen protein 31 kDa. Sehingga tidak terdapat ikatan antigen dan antibodi pada perlakuan kontrol disetiap kelompok



Gambar 4.3 kadar IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur.

umur. Kontrol tanpa pemberian antigen dilakukan untuk mengetahui bahwa kadar IgG yang terdeteksi merupakan antibodi yang berikatan dengan antigen protein 31 kDa.

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa penderita DBD pada kelompok umur yang sama memiliki kadar IgG yang bervariasi. Variasi kadar IgG tersebut karena setiap individu sampel tinggal di lingkungan tempat tinggal yang berbeda. Berdasarkan penelitian Remoue *et al.* (2007) kadar IgG pada anak yang tinggal di wilayah endemik DBD bervariasi antara desa satu dan desa lainnya pada kota yang sama. Perbedaan lingkungan sangat mempengaruhi jumlah paparan protein 31 kDa. Lingkungan tempat tinggal dengan pengendalian vektor yang berbeda akan mempengaruhi jumlah populasi *Ae. aegypti* di wilayah tersebut, sehingga dapat mempengaruhi jumlah paparan protein 31 kDa (Palgunadi & Asih, 2014).

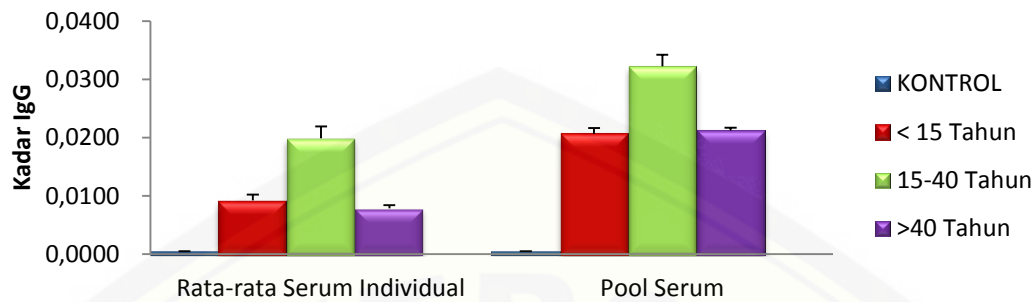
Protein 31 kDa merupakan protein imunogenik (Oktarianti *et al.*, 2013) yang dapat memodulasi respon imun inang. Paparan oleh protein 31 kDa dapat meningkatkan kadar IgG melalui proliferasi sel B. Pada penelitian Donovan *et al.* (2007) ekstrak kelenjar saliva *Ae. aegypti* meningkatkan respon imun Th2

(meningkatnya kadar sitokin IL4 dan IL10) yang menyebabkan kadar IF $\gamma$  dan IF $\beta$  (Th1) menurun secara signifikan. Peningkatan kadar IL4 dan IL10 ini dapat menjadi aktivator sel Th2 dan menginduksi sel B membentuk IgG.

Perbandingan kadar IgG anti protein 31 kDa pada penderita DBD berdasarkan kelompok umur juga dilihat berdasarkan populasi (*pool*) serum. Perbandingan berdasarkan *pool* umur dilakukan agar dapat melihat dengan mudah perbedaan antara tiga kelompok umur secara langsung. Sebanyak tiga sampel setiap perlakuan direaksikan secara bersamaan terhadap protein 31 kDa. Kadar IgG yang didapatkan dibandingkan dengan rata-rata IgG yang dihasilkan oleh reaksi individual terhadap protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*.

Kadar IgG  $\pm$  SD pada hasil rata-rata serum individual penderita DBD dengan umur kurang dari 15 tahun, umur 15 hingga 40 tahun, dan umur lebih dari 40 tahun berturut-turut 0.009 mg/ml  $\pm$  0.005, 0.020 mg/ml  $\pm$  0.008, dan 0.008 mg/ml  $\pm$  0.006. Sedangkan kadar IgG  $\pm$  SD pada *pool* serum penderita DBD dengan umur kurang dari 15 tahun, umur 15 hingga 40 tahun, dan umur lebih dari 40 tahun berturut-turut 0.023 mg/ml  $\pm$  0.009, 0.030 mg/ml  $\pm$  0.008, dan 0.021 mg/ml  $\pm$  0.007. Perbandingan kadar IgG anti protein 31 kDa tersebut dapat dilihat lebih lanjut pada Gambar 4.4.

Berdasarkan Gambar 4.4 dapat diketahui bahwa kadar IgG anti protein 31 kDa *Ae. aegypti* memiliki pola yang sama antara rata-rata serum individual dengan *pool* serum. Kadar IgG dari tinggi ke rendah berturut-turut ialah penderita DBD dengan umur 15 hingga 40 tahun, umur kurang dari 15 tahun, dan umur lebih dari 40 tahun. Menurut Bratawidjaja & Iris (2014) umur merupakan salah satu faktor penentu sistem imun pada manusia, pada masa produktif sel B dapat berproliferasi dengan cepat dikarenakan aktifitas sel T memori dan pembentukan sistem imun spesifik dalam keadaan optimal. Keadaan optimal sistem imun pada usia produktif juga dipengaruhi oleh nutrisi dan hormon. Nutrisi yang baik akan meningkatkan resistensi terhadap patogen (Lefranc & Gerard, 2001) sehingga pembentukan antibodi pada masa produktif sangat baik ketika terdapat patogen yang masuk dalam tubuh.



Gambar 4.4 Kadar IgG anti protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* pada penderita DBD berdasarkan rata-rata kelompok umur individual dan *pool* serum.

Hormon pada manusia setelah pubertas atau berumur lebih dari 15 tahun dipengaruhi oleh adanya hormon sex seperti estrogen dan androgen (Bratawidjaja & Iris, 2014). Hormon sex dapat mempengaruhi sistem imun melalui fluktuasi sel B yang menghasilkan IgG. Berdasarkan beberapa faktor tersebut kelompok umur 15 hingga 40 tahun memiliki kadar antibodi paling tinggi terhadap protein 31 kDa.

Kadar IgG usia kurang dari 15 tahun dan lebih dari 40 tahun lebih rendah dari pada usia 15 hingga 40 tahun. Akan tetapi kedua kelompok umur ini memiliki kadar IgG yang hampir sama. Rendahnya kadar IgG pada kedua kelompok umur tersebut dapat dikarenakan beberapa faktor. Pada masa anak-anak atau pada usia kurang dari 15 tahun, sistem imun masih dalam tahap pematangan (Bratawidjaja & Iris, 2014). Sehingga proliferasi sel B yang menghasilkan IgG dalam tubuh masih belum sempurna. Pada usia lebih dari 40 tahun terdapat penurunan terhadap resistensi dan terjadi imun toleran terhadap paparan jangka panjang (Douncoure *et al.*, 2012). Selain itu pada usia lanjut sering ditemukan penurunan nutrisi yang dapat berakibat pada penurunan sistem imun (Bratawidjaja & Iris, 2014).

Hasil penelitian ini sesuai dengan konsep yang dipaparkan oleh Fountain *et al.* (2011) bahwa paparan protein 31 kDa melalui paparan nyamuk saat *blood feeding* dapat menginduksi sel B yang pada akhirnya dapat membentuk antibodi spesifik seperti IgG. Selain itu hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Douncoure *et*

*al.* (2012) bahwa umur dapat mempengaruhi produksi antibodi dalam tubuh terhadap protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti*.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa respon imun humoral IgG anti protein 31 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan kadar IgG tertinggi hingga terendah berturut-turut yaitu penderita DBD, manusia sehat, dan neonatus. Respon imun penderita DBD berdasarkan kelompok umur dengan kadar IgG tertinggi hingga terendah berturut-turut yaitu berumur 15 hingga 40 tahun, berumur kurang dari 15 tahun, dan berumur lebih dari 40 tahun.

### 5.2 Saran

Rearing *Ae. aegypti* dilakukan dengan suhu yang sesuai dan menggunakan air yang bersih, sehingga perkembangan nyamuk tidak terhambat. Selain itu isolasi *Ae. aegypti* dilakukan setelah nyamuk melakukan *blood feeding* sehingga mempermudah saat isolasi kelenjar saliva. Sebelum melakukan metode ELISA sebaiknya dilakukan dengan menggunakan ekstrak total kelenjar saliva, sehingga kesalahan yang akan dilakukan saat menggunakan sampel penelitian dapat diminimalisir.

**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.
- Almeras L., Fontaine A., Belgazi M., Bourdon S., Boucomont C.E., Orlandi P. E., Baragatti M., Corre-Catelin N., Reiter P., Pradines B., Fusal T., & Rogier C. 2010. Salivary Gland Protein Repertoire From *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic*. Vol 10: 391-402.
- Andrew, J., & Ananya B. 2013. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annual Review & Research in Biology*. 3: (1) 52-69.
- Bratawidjaja, K.G., & Iris R. 2014. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- 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.
- 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.
- Candra, A. 2010. Demam Berdarah *Dengue* : Epidemiologi, Patogenesis, dan Faktor Resiko Penularan. *Aspirator*. Vol. 2 No. 2 :110-119.
- Cautinho, I. V., & Marcelo R. O. 2010. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 105(1): 1-12.

- Chanthavanich, P., Christine L., Chukiat S., Keswadee L., Krisana P., Sutee Y., Arunee S., & Jean L. 2006. Short Report: Immune Response and Occurrence of *Dengue* Infection in Thai Children Three to Eight Years After Vaccination with Live Attenuated Tetravalent *Dengue* Vaccine. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 26–28.
- Cornelie, S., Franck R., Eric A., Cheikh S., Badara C., Souleymane D., Francois M., Denis B., & Francois S. 2007. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Tropica*. 104: 108–115.
- Donovan, JM, Messmore AS, Scrafford DA, Sacks DL, Kamhawi S, & McDowell MA. 2007. Uninfected Mosquito Bites Confer Protection against Infection With Malaria Parasites. *J. of Infection and Immunity*. Vol.75:2523-2530.
- Douncoure, S., Francois M., Amandine C., Gilbert L. G., Sylvie C., Yelin RE., Mabel G.G., Zaira B.S., Roxanna L., Dorothee M., Joge V. F., Annie W., Christophe R., Jean P.H., & Franck R. 2012. Human Antibodi Response to *Aedes aegypti* Saliva in an Urban Population in Bolivia: A New Biomarker of Exposure to *Dengue* Vektor Bites. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 504-510.
- Edelman, R. 2007. *Dengue* Vaccines Approach the Finish Line. *Center for Vaccine Development*. Vol. 45: 56-60.
- Fathi., Soedjajadi K., & Chatarina U. W. 2005. Peran Faktor Lingkungan dan Perilaku Terhadap Penularan Demam Berdarah *Dengue* di Kota Mataram. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. Vol. 2: 1 – 10.
- Fontaine, A., Diouf., Ibrahima, Bakkali., Misse D., Pages F., Fusai, Thiery; Rogier, Christophe; & Almeras, L. 2011. Implication of Haematophagous Arthropod Salivary Proteins in Host-Vector Interaction. *J Parasite & Vectors*. 4: 187.
- Gillespie, R.D., Lamine M., & Richard G. T. 2000. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*. Vol 22: 319-331.
- Gubler, J.D. 1998. *Dengue* and *Dengue Hemorrhagic Fever*. *Clinical Microbiology Review*. Vol 11: 480.
- Ishartadianti, K. 2013. *Aedes aegypti* sebagai Vektor Demam Berdarah *Dengue*. Tidak diterbitkan. Skripsi. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma.



- James A., Blackmer K., Racioppi J.V. 1991. A Salivary Gland Specific, Maltase-Like Gene of The Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol*. Vol 44: 245-253.
- James A. 1994. Molecular and Biochemical analyses of the Salivary Gland of Vector Mosquitoes. *Bull Inst Pasteur*. Vol 92: 113-150.
- James, A. 2003. Review Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 206: 3817-3821.
- 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.
- Kusumawardani, E. 2012. Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Wilayah Pedesaan Tahun 2012 (Daerah perbatasan Kabupaten Bogor dan Kabupaten Lebak). Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Lauring, S.A., Jeremy O.J., & Raul A. 2010. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol*. Vol 6: 573-579.
- Lefranc, M. P., & Gerard L. 2001. *The Immunoglobulin Fact Book*. London : Gulf Profesional Publising.
- Lima, D.M., Sergio O.P., Rafael F.O.F., Patricia V.B.P., Fabiana R.M., Alessandra C.G.R., Maria T.P.A., & Benedito A.L.F. 2011. A 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: 831-838.
- Neuberger, A., & L.L.M.V. Deenen. 1987. *Molecular Genetics of Immunoglobulin*. New York: Elsevier Science Publiser.
- Oliveira, F., Ryan C.J., Jesus G.V., & Shaden K. 2009. Sand flies, Leishmania, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol*.58(1): 1-5.
- Oktarianti, R., Kartika S., Fatchiyah F., & Aulanni'am. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against to Human Sera. *Advances in Naturaland Applied Sciences*. 101-107.

- Palgunadi, B.U., & Asih R. 2014. *Aedes aegypti sebagai Vektor Demam Berdarah Dengue*. Tidak diterbitkan. Skripsi. Surabaya: Universitas Wijaya Kusuma.
- Peng ZN, Rasic N, Liu Y & Simons FER. 2002. Mosquito saliva specific IgE and IgG Antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Lin Immunol*. Vol 110: 1-5
- PDB. 2008. Dengue Virus. *Protein Data Bank RCSB*.
- Radji, M. 2010. *Imunologi & Virologi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.
- Remoue, F., Alix, E., Cornelie, S., Sokhna, C., Cisse, B., Doucoure, S., Mouchet, F., Boulanger, D., & Simondon, F. 2007. IgE and IgG Antibody Responses to *Aedes aegypti* in African Children. *Acta Tropica* 104: 108-115.
- Riberio, J.M.C., Bruno A., Fabrizio L., Eric C., Van M.P., Phafulla K.C., & Stephen K.W. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*.
- Rothman, A.L. 2009. *Dengue Virus*. USA: Springer.
- Sayono. 2008. "Pengaruh Modifikasi Ovitrap Terhadap Jumlah Nyamuk Aedes yang Terperangkap". Tidak diterbitkan. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Schmitz, J., John R., Alan B., & Joachim H. 2011. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. *Vaccine*. 7276– 7284.
- Schneider, B. S., Lynn S., Nordin S.Z. & Stephen H. 2004. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-Viral and Th1/Th2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. *Viral Immunology*. Vol 17 : 565-573.
- Soegijanto, S. 2003. *Patogenesis dan Perubahan Patofisiologi Infeksi Virus Dengue*. Tidak diterbitkan. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Sukohar, A. 2014. Demam Berdarah Dengue (DBD). *Medula*. Vol 2 No 2.
- Sun, W., Robert E., Niranja K.T., Keeneth H.E., Robert P., Alan D.K., Huo-Shu H., Douglas T., John M.S., Charles H.H., & Bruce L.I. 2003. Vaccination of Human Volunteers with Monovalent and Tetravalent Live-Attenuated Dengue Vaccine Candidates. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 24–31.

- 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.
- 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.
- Wati, W. E., Dwi A., & Sri D. 2011. Beberapa Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kelurahan Ploso Kecamatan Pacitan Tahun 2009. *Jurnal Vektoral*. Vol III No. 1.
- WHO. 2009. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva: WHO Press.
- Williams, C. M., M.P. Mammen JR., N.S Zeidner, B.J. Beaty, J.E. Prenni, A. Nisalak, & C.D. Blair. 2012. Association of Human Immune Response to *Aedes aegypti* Salivary Protein with dengue Diseases Severity. *Parasite immunology*. Vol. 34 : 15-22.
- Wilschut, J., Izabella A., Rodenhuis Z., & Jolanda M.S. 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating Infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:2773–2786.
- 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.

**LAMPIRAN 1. KOMPOSISI LARUTAN DAN BUFFER****1.A Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk *Ae. aegypti***

- a. PMSF dalam PBS : 0,08 gr NaCl; 0,0144 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,0024 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,002 gr KCl dilarutkan dalam 10 mL aquades kemudian ditambahkan 0,00174 gr PMSF
- b. NaCl 30% : 30 gr NaCl dilarutkan dalam 100 mL Aquades

**1.B Analisis Protein dengan Metode SDS PAGE**

- a. 100 mL Lower Gel Buffer (LGB) : 18,17 gram 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 0,4 gram SDS 0,4%; 100 mL dH<sub>2</sub>O
- b. 50 mL Upper Gel Buffer (UGB) : 3,02 gram 0,5 M Tris pH 6,8; 0,2 gram SDS 0,4%; 50 mL dH<sub>2</sub>O
- c. 100 mL 30% Acril/ Bis-Acril : 29,2 gram Acrilamid; 0,8 gram Bis-Acrilamid; dH<sub>2</sub>O hingga 100 mL
- d. 100 mL SDS 10% : 10 gram SDS; dH<sub>2</sub>O hingga 100 mL
- e. 100 mL Tris HCl 1,5 M pH 8,8 : 18,2025 gram Trisma base; dH<sub>2</sub>O hingga 100 mL
- f. 100 mL Tris HCl 1 M pH 6,8 : 12,135 gram Trisma Base; dH<sub>2</sub>O hingga 100 mL
- g. 10 mL Buffer Sampel : 1,25 mL UGB; 2 mL Gliserol; 200 µL 0,1% Bromfenol Blue; 4 mL 10% SDS; dH<sub>2</sub>O sampai 10 mL

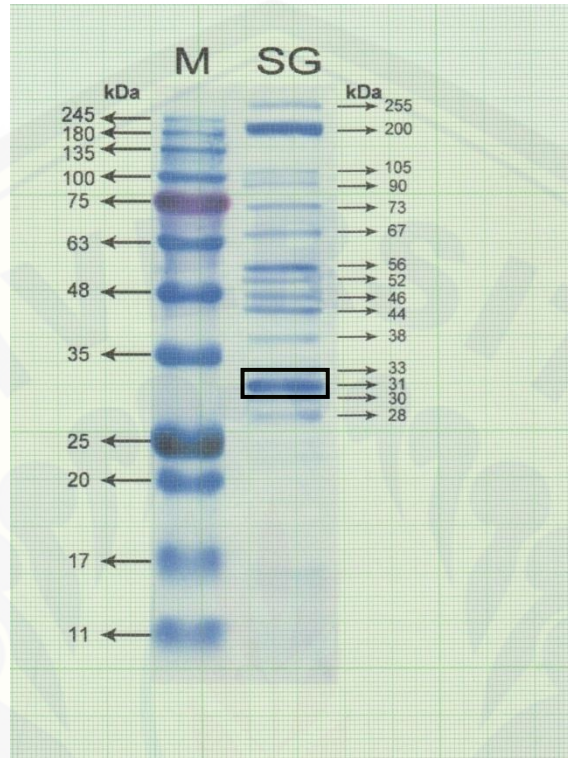
- h. 1000 mL Staining : 1 gram Coomasie Blue R-250; 450 mL Metanol; 100 mL Asetat Glisial Asam; 450 mL dH<sub>2</sub>O
- i. 1000 mL Destaining : 400 mL Metanol; 100 mL Asam Asetat Glisial; 500 mL dH<sub>2</sub>O
- j. 1000 mL Buffer Elektroda 1X : 3 gram Tris base; 14,4 gram glisin; 1 gram SDS 0,1%; dH<sub>2</sub>O hingga 1000 mL

Tabel L1. Komposisi bahan untuk gel pada SDS- PAGE

BAHAN	SEPARATING GEL 12,5%	STACKING GEL 4,5%
30 % Acrylamide	4150 $\mu$ L	450 $\mu$ L
4X LGB	2500 $\mu$ L	750 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3300 $\mu$ L	1800 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	4,5 $\mu$ L
APS	50 $\mu$ L	10 $\mu$ L

### 1.C Analisis Protein dengan Metode ELISA

- a. *Bicarbonate Buffer* : 0,039 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,073 gr NaHCO<sub>3</sub> dilarutkan dalam 25mL *DI Water* kemudian pH diatur hingga 7,4
- b. PBST : 2,56 gr NaCl; 0,460 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,076 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,064 gr KCl dilarutkan dalam 320 mL Aquades kemudian ditambahkan 160  $\mu$ l *Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate*, kemudian pH diatur hingga 7,4
- c. *Blocking Buffer* : 0,35 gr *Albumin Bovine Serum* dilarutkan dalam 35 mL PBST

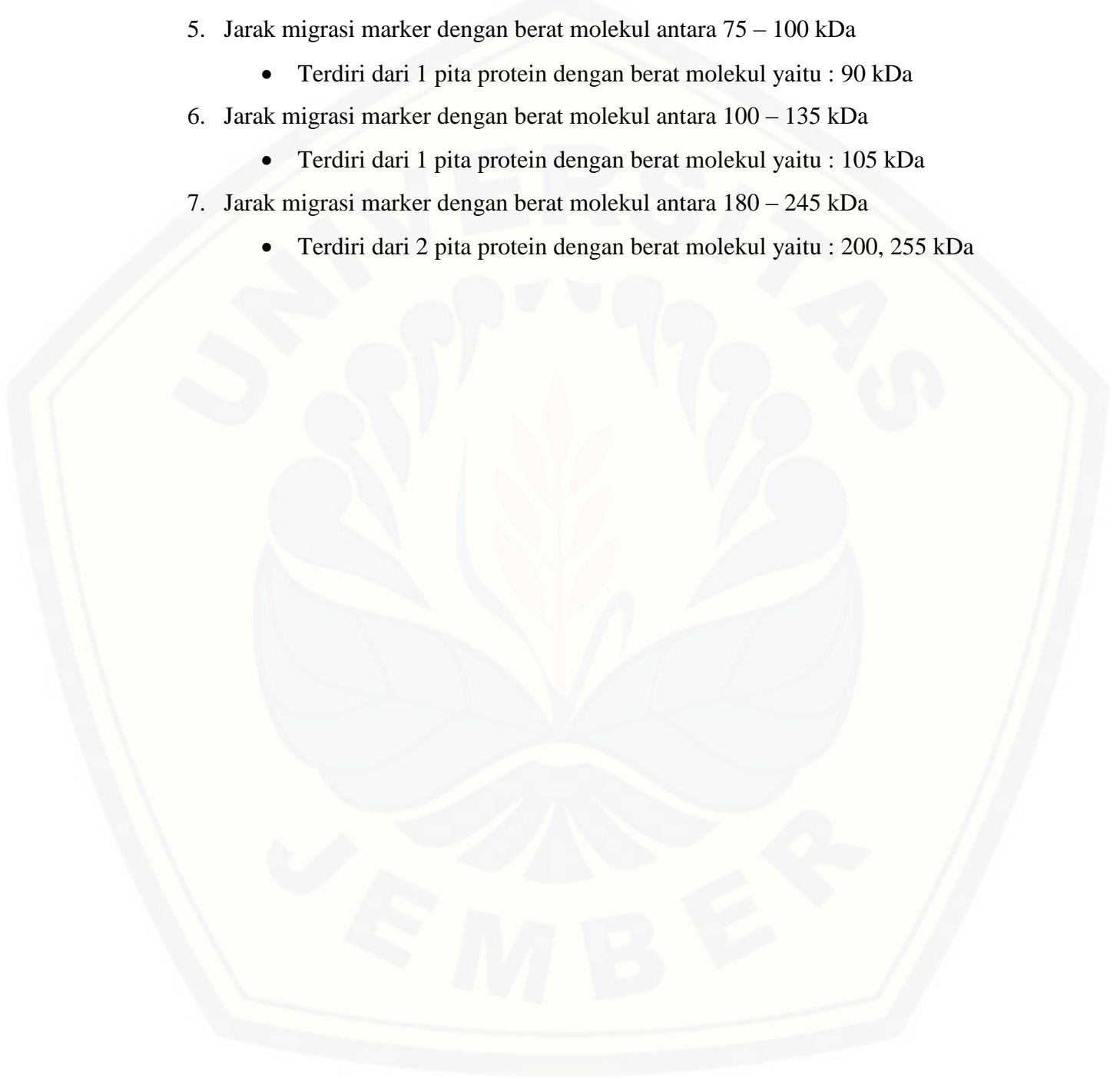
**LAMPIRAN 2. PENENTUAN BERAT MOLEKUL PROTEIN**

Gambar L2. Penentuan berat molekul hasil visualisasi SDS-PAGE, (SG) Protein 10 pasang kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina; (M) marker (Pre-stain Intron) (Canon MP280 Series Printer)

**Keterangan:**

1. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 25 – 35 kDa
  - Terdiri dari 4 pita protein dengan berat molekul yaitu : 28, 30, 31, 33 kDa
2. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 35 – 48 kDa
  - Terdiri dari 3 pita protein dengan berat molekul yaitu : 38, 44, 46 kDa
3. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 48 – 63 kDa
  - Terdiri dari 2 pita protein dengan berat molekul yaitu : 52, 56 kDa

4. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 63 – 75 kDa
  - Terdiri dari 2 pita protein dengan berat molekul yaitu : 67, 73 kDa
5. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 75 – 100 kDa
  - Terdiri dari 1 pita protein dengan berat molekul yaitu : 90 kDa
6. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 100 – 135 kDa
  - Terdiri dari 1 pita protein dengan berat molekul yaitu : 105 kDa
7. Jarak migrasi marker dengan berat molekul antara 180 – 245 kDa
  - Terdiri dari 2 pita protein dengan berat molekul yaitu : 200, 255 kDa



**LAMPIRAN 3. 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 khusus.  
pertimbangan kerahasiaan proses

Jember, 11 Juli 2011  
Nama: dr. Cholis Abrori, M.Eds



**LAMPIRAN 4. 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 jati diri bapak/ ibu akan tetap dirahasiakan.

