

# **PROPOSAL INSENTIF RISET SINAS**

**Uji Potensi Protein Immunogenik 31 kD dan 56 kD dari Kelenjar Saliva  
Aedes aegypti sebagai Kandidat Target Baru Vaksin Penghambat  
Transmisi berbasis Vektor**

**Kode Proposal: RD-2015-0148**

**Bidang Prioritas: Riset Pengembangan Vaksin  
(tuberkulosis, dengue, H5N1, hepatitis B)**

**Jenis Riset: Insentif Riset Dasar (RD)**

**Universitas Jember  
Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121  
2015**

**LEMBAR  
PENGESAHAN**

**Uji Potensi Protein Immunogenik 31 kD dan 56 kD dari Kelenjar Saliva  
Aedes aegypti sebagai Kandidat Target Baru Vaksin Penghambat  
Transmisi berbasis Vektor**

**Bidang Prioritas Iptek Teknologi:** Teknologi Kesehatan dan Obat

**Jenis Insentif Riset:** Insentif Riset Dasar

**Produk Target:** Riset Pengembangan Vaksin (tuberkulosis, dengue, H5N1, hepatitis B)

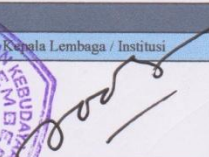
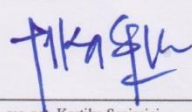
**Cara Pelaksanaan:** Non Konsorsium

**Lokasi Penelitian:** Jawa Timur

Keterangan Peneliti Utama				
Nama Peneliti Utama	:	Dr. rer. nat. Kartika Senjarini		
Nama Lembaga/Institusi	:	Universitas Jember		
Unit Organisasi	:	Jurusan Biologi Fakultas MIPA		
Alamat	:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121		
Telepon/HP/Faksimili/e-mail	:	Telp: 0331338696 / HP: 081358346388 / Fax: 0331330225 / kartika_senjarini@yahoo.com		
Keterangan Lembaga				
Lembaga Pengusul				
Nama Pimpinan Lembaga	:	Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. PhD		
Nama Lembaga	:	Universitas Jember		
Alamat	:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121		
Telepon/HP/Faksimili/e-mail	:	Telp: 0331-337818, 339385 / HP: 08123483361 / Fax: 0331-337818 / ketua.lemli@unej.ac.id		
Rekapitulasi Biaya				
No.	Uraian	Sharing Biaya (Rp)		
		Total	Insentif KRT	Ketua
1	Gaji dan Upah	30,000,000	30,000,000	0
2	Bahan Habis Pakai	108,250,000	108,250,000	0
3	Perjalanan *)	9,500,000	9,500,000	0
4	Lain-lain	7,250,000	7,250,000	0
<b>JUMLAH</b>		<b>155,000,000</b>	<b>155,000,000</b>	<b>0</b>

\*) Dana Insentif KRT tidak untuk perjalanan Luar Negeri

Jawa Timur, 23 Agustus 2014

Setuju diusulkan:	
Kepala Lembaga / Institusi	Peneliti Utama
 Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. PhD	 Dr. rer. nat. Kartika Senjarini



## Abstrak

Dengue fever, dikenal di Indonesia sebagai Demam Berdarah Dengue (DBD) masih merupakan permasalahan yang sangat serius dengan angka mortalitas tinggi. Penyakit ini disebabkan oleh virus yang transmisinya ke manusia diperantarai vektor nyamuk *Ae. aegypti*. Saliva vektor artropoda, lebih khusus lagi nyamuk, telah terbukti mengandung komponen penting yang berfungsi sebagai vasomodulator dan immunomodulator. Faktor immunomodulator yang bersifat imunogenik dapat meningkatkan transmisi patogen oleh vektor yang berarti bersifat immunosupresif terhadap inang. Komponen immunosupresif yang berada di saliva vektor artropoda inilah yang merupakan komponen penting bagi basis dalam pengembangan vaksin melawan patogen yang ditransmisikan. Jika substansi dalam saliva vektor mampu meningkatkan infeksi patogen yang dibawanya, maka melakukan vaksinasi terhadap inang dengan komponen lawan substansi tersebut, dapat mengendalikan transmisi patogen (Transmission-Blocking Vaccine, TBV). Vaksin berbasis saliva vektor ini merupakan pendekatan baru yang tidak hanya akan melindungi inang (manusia) terhadap patogen yang dibawa vektor tersebut, lebih jauh lagi akan mampu memotong transmisinya. Sampai saat ini eksplorasi terhadap saliva vektor penyakit di Indonesia khususnya 2 penyakit penting yaitu Malaria dan DBD, belum dilakukan. Kelompok riset kami merupakan satu satunya kelompok riset di Indonesia yang berusaha untuk eksplorasi potensi saliva vektor dalam hal aktivitas dan komposisi biomolekulernya untuk dikembangkan sebagai kandidat target potensial dalam pengembangan TBV. Hasil penelitian terdahulu dari kelompok penelitian kami telah berhasil mengidentifikasi fraksi protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang bersifat imunogenik dan diduga berperan penting dalam resistensi manusia terhadap patogen penyebab DBD yaitu protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa. Analisis lebih lanjut dengan Spektrofotometri Massa (LC-MS, analisis hasil dengan software Protein Pilot), menunjukkan bahwa terdapat 5 sub-unit protein dan 3 sub unit protein yang konsisten menyusun 31

KD dan 56 KD. Hasil analisis dengan sekuen database protein (UNIPROT), secara umum kebanyakan subunit tersebut belum teridentifikasi, sebagian sub unit mirip dengan protein sekresi 37 KD dan Apirase dari kelenjar saliva *Ae.*. Untuk lebih menspesifikkan target pengembangan vaksin, maka perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap sub unit spesifik beserta aktivitasnya terkait patogenesis Dengue. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji potensi terhadap kedua fraksi protein tersebut berkaitan dengan kemampuannya untuk intervensi infeksi dan/atau patogenesis Dengue secara *in vitro*. Oleh karena itu akan dilakukan isolasi dan pemurnian terhadap fraksi protein tersebut dari kelenjar saliva *Ae. Aegypti* yang direaring pada skala Laboratorium. Kedua fraksi protein tersebut kemudian akan diuji potensinya berkaitan dengan patogenesis Dengue *in vitro*. Uji potensi ini juga berkaitan dengan kemampuannya sebagai immunomodulator dalam membangkitkan respon imun seluler dengan pengamatan secara kuantitatif terhadap sitokin-sitokin berikut IFN- $\gamma$  & IL-4 pada kultur sel. Fraksi protein yang “imunogenik aktif tentatif” yang kemudian dapat dikarakterisasi lebih lanjut dan disebut berpotensi sebagai kandidat target TBV Dengue.

# PENDAHULUAN

## Outline

1. Nyamuk *Ae. Aegypti* dalam penelitian ini didapatkan dengan rearing pada skala Lab. di dalam ruang insektarium bersuhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  (suhu ruang). Yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk betina dewasa yang diberi blood feeding dengan marmut ditangkap dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator.
2. Preparasi kelenjar saliva (KS) *Ae. aegypti* dilakukan dengan mengisolasi dari nyamuk betina dewasa yang telah blood feeding dan dimatikan chloroform. Dilakukan identifikasi terlebih dahulu untuk meyakinkan spesiesnya. Isolasi KS dilakukan secara microdissection menggunakan jarum serangga melalui pengamatan dengan mikroskop stereo. Kelenjar saliva *Ae. aegypti* berada di bagian antara thorax dan kepala nyamuk.
3. Ekstraksi protein total KS *Ae. Aegypti*, dilakukan dengan homogenisasi dengan micropistile yang dilanjutkan dengan ekstraksi dengan sentrifugasi. Isolasi dan purifikasi fraksi protein 31 kD dan 56 kD dilakukan dengan memotong secara aseptik pita protein target hasil SDS PAGE. Pemurnian dilakukan dengan teknik elektroelusi dan diukur kadar proteinnya dengan spektrofotometer. Protein yang telah dimurnikan digunakan untuk analisis aktivitas lebih lanjut.
4. Uji kekuatan imunogenitas dalam serum darah manusia secara kuantitatif dengan ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay). Fraksi protein 31 dan 56 kD yang telah dimurnikan dicoating pada microtiter plate ELISA sebagai antigen. Perbandingan kekuatan imunogenitas akan dilakukan dengan mereaksi silangkan antigen protein diatas dengan serum manusia (sebagai Ab primer) yang hidup didaerah non-endemik (1), endemik dan jelas terpapar gigitan (2) serta pasien dari RS yang didiagnosa positif terinfeksi Dengue.
5. Uji potensi imunomodulator fraksi protein in vitro berkaitan dengan infeksi Dengue dilakukan secara in vitro dengan menggunakan Human dendritic cell line (DCs) yang dapat dipesan dari perusahaan Bio-Lab. Perlakuan akan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kultur yang diperlakukan hanya dengan pelarut fraksi protein saja (1), kultur yang hanya diinfeksi serotipe DENV saja (2) kultur yang diperlakukan dengan memaparnya dengan kedua fraksi protein saja (3) serta yang dipapar dengan kedua fraksi protein dan selanjutnya diinfeksi dengan serotipe DENV. Analisis secara kuantitatif dilakukan pada sitokin berikut ini: IFN  $\gamma$  & IL4. Selain itu efek apoptosis kultur sel akibat infeksi virus dan/atau paparan fraksi protein tersebut juga akan diamati.

## Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD/Dengue Hemorrhagic Fever) dan Sindrom Demam Renjatan (DSS/Dengue Shock Syndrome) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan virus dengue dan ditransmisikan oleh nyamuk *Ae. aegypti*. Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor utama sedangkan vektor keduanya adalah *Aedes albopictus* (Lai et al, 2007). Dalam beberapa dekade terakhir, kasus DBD telah berkembang secara drastis sehingga menjadi masalah kesehatan utama di dunia. Lebih dari 2,5 miliar orang beresiko untuk menderita demam berdarah pada lebih dari 100 negara di daerah tropis dan subtropis. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengklasifikasikan bahwa DBD sebagai penyakit yang sulit untuk dikontrol karena terjadinya urbanisasi besar, overpopulasi, dan kualitas standar hidup. Di Indonesia demam berdarah masih menjadi kejadian luar biasa (KLB) di berbagai propinsi. Dari tahun 1998 sampai dengan tahun 2000 di propinsi Jawa Timur insiden tertinggi DBD terjadi di Surabaya. Proporsi kematian DBD dari tahun 1999 sampai dengan 2000 menurut kelompok umur yang tertinggi adalah kelompok umur 5-9 tahun (Soegijanto 2004). DKI Jakarta yang merupakan ibu kota negara merupakan propinsi dengan jumlah penderita DBD terbanyak yaitu 14.071 dengan case fatality rate (CFR) 0,42% pada tahun 2003. Pada tahun 2005 di DKI Jakarta terjadi peningkatan insiden mencapai 23.466 orang dengan CFR 0,34% (Daniel 2008). Di wilayah kabupaten Jember khususnya kepadatan larva *A. Aegypti* menunjukkan nilai lebih dari batas aman yang ditetapkan WHO. Salah satunya seperti yang ditemukan di kecamatan Sumbersari yang mencapai 14 % House Index dan 10,7% Container Index (WHO normal <5%) (Nurdian 2004). Hal inilah yang dapat menjadi salah satu faktor pemicu peningkatan kasus DB 80- 90% kasus pertahunnya sejak tahun 2004 sampai 2007 (Dinkes 2008) sehingga Jember merupakan wilayah endemis DBD.

Walapun telah dilakukan usaha yang intensif untuk mempelajari awal patofisiologi klinik dari infeksi Dengue dengan tujuan untuk mengidentifikasi penyebab potensial timbulnya DBD, namun demikian data dari berbagai wilayah dan etnik menunjukkan adanya inkonsistensi untuk memberikan landasan teori umum berkaitan dengan patogenesis DBD. Lebih jauh lagi karena penyakit ini disebabkan oleh virus, tidak ada terapi kausatif untuk DB. Terapi yang selama ini diterapkan hanya berkaitan dengan terapi untuk menghilangkan dan/atau menurunkan gejala dan efek dari infeksi. Karena ketiadaan terapi yang spesifik dan belum adanya vaksin yang adekuat, maka salah satu alternatif untuk mencegah dan mengatasi penyakit adalah dengan pengendalian vektor yaitu *Ae. aegypti* (e.g Santos et al. 2003). Beberapa program untuk pengendalian vektor sudah disosialisasikan oleh Departemen Kesehatan diantaranya adalah pengasapan, aplikasi temephos (Abate<sup>Ó</sup>), ” dan gerakan 3M (menguras, menutup dan mengubur)”. Namun demikian, upaya nasional untuk menggerakkan seluruh komponen masyarakat dibawah bimbingan petugas Puskesmas belum memberikan hasil yang maksimal karena tidak adanya evaluasi dan lemahnya sistem monitoring terutama di daerah-daerah (Baskoro dan Nalim 2007). Lebih jauh lagi, monitoring kelimpahan dan distribusi *A. Aegypti* juga merupakan hal penting dalam memprediksi epidemik DBD atau resiko akibat aktivitas *Aedes* (e.g. Tilak et al. 2005). Pada beberapa tahun terakhir ini berkembang cara pengendalian vektor dengan memanfaatkan ovitrap untuk survey dalam rangka monitoring populasi *A. Aegypti*. Metode ini sudah banyak diterima karena sifat sensitifnya bahkan ketika populasi vektor sangat sedikit (e.g. Dibo et al. 2005). Namun demikian, penerapan metode ini di lapangan memerlukan partisipasi dan kesadaran masyarakat yang tinggi. Sistem evaluasi dan monitoring yang lemah masih merupakan permasalahan dalam pemanfaatan metode ini dimasyarakat.

Upaya pencegahan lainnya yang masih terus dikembangkan saat ini adalah pembuatan vaksin dengue. Kemajuan dalam pengembangan vaksin dengue dengan target virus photogennya berjalan lambat karena virus ini sulit tumbuh pada kultur sel dan tidak ada hewan coba yang tepat untuk virus dengue. Lebih jauh lagi adanya 4 serotype virus penyebab yang bisa bereaksi silang, maka vaksin dengue berbasis virus haruslah mampu menginduksi perlindungan terhadap keempat serotipe virus patogen tersebut (Monath 2007). Pendekatan lain dengan memanfaatkan bioteknologi untuk menghasilkan vaksin dengue diantaranya vaksin DNA (e.g. Costa et al. 2005), vaksin subunit antigen (e.g. Putnak et al. 2005), dan vaksin chimera virus dengue (e.g. Deauvieu et al. 2007). Namun demikian sampai saat ini belum dilaporkan hasil yang memuaskan berkaitan dengan vaksin dengue tersebut.

Pada dekade terakhir ini berkembang pendekatan yang baru dalam pengembangan vaksin melawan penyakit diperantarai vektor arthropoda yaitu dengan memanfaatkan komponen dalam saliva vektor (dalam hal ini nyamuk *Aedes aegypti*). Pendekatan ini berdasarkan hipotesis bahwa saliva vektor arthropoda mengandung komponen vasomodulator dan imunomodulator (e.g. Sack & Kamhawi 2001, Titus et al. 2006). Komponen vasomodulator menyebabkan terjadinya vasodilatasi pembuluh darah, sehingga membantu nyamuk untuk menghisap darah. Komponen imunomodulator dapat membantu meningkatkan terjadinya transmisi agen-agen patogen seperti virus dengue. Saat ini telah diketahui bahwa ternyata komponen imunomodulator tersebut bersifat immunosupresif (Kamhawi 2000). Komponen immunosupresif yang berada di saliva vektor arthropoda inilah yang merupakan komponen penting bagi basis dalam pengembangan vaksin melawan patogen yang ditransmisikan. Jika substansi dalam saliva vektor mampu meningkatkan infeksi dan transmisi patogen yang dibawanya, maka melakukan vaksinasi terhadap inang dengan komponen lawan substansi tersebut, dapat menurunkan infektifitas patogen yang ditransmisikan (e.g. Belkaid et al. 1998) sekaligus mengendalikan transmisi. Vaksin berbasis saliva vektor ini merupakan pendekatan baru yang tidak hanya akan melindungi inang (manusia) terhadap patogen yang dibawa vektor tersebut, lebih jauh lagi akan mampu memotong transmisinya. Oleh karena itu, komponen imunomodulator dalam saliva nyamuk DBD merupakan kandidat penting sebagai target dalam pembuatan vaksin penghambat transmisi patogen (Transmission Blocking Vaccine) melawan penyakit dan epidemi DBD. Pendekatan baru dalam pengembangan vaksin melawan DBD dengan pengembangan vaksin berbasis vektor ini lebih inovatif karena juga berperan dalam menghambat transmisi patogen penyebab penyakit DBD sehingga menanggulangi epideminya. Vaksin berbasis vektor tidak hanya akan melindungi terhadap patogen yang ditularkan oleh vektor tetapi juga memberikan proteksi terhadap orang lain yang belum terinfeksi (Titus et al., 2006; Miller, 2010).

Target vaksin berbasis vektor ini adalah bagian dari tubuh vektor atau antigen patogen dalam siklus hidupnya ketika berada di dalam tubuh vektor (Carter, 2001; Abreu & Ortigao, 2010). Transmisi patogen ke inang dapat sukses dilakukan oleh vektor arthropoda oleh karena di dalam saliva vektor tersebut mengandung sejumlah komponen vasodilator dan imunomodulator yang mempunyai aktivitas sebagai anti haemostasis, anti inflamasi dan memicu respon imun pada inang yang berpotensi meningkatkan transmisi patogen (Titus et al., 2006; Wasinpiyamongkol et al., 2010; Wongkamchai et al., 2010 ). Paparan saliva *Aedes aegypti* pada hewan coba yang diinfeksi dengan sindbis virus memberikan reaksi imun inang melalui modulasi respon sistemik sitokin-sitokin pada inang. Selanjutnya inokulasi bersama ekstrak saliva *Aedes aegypti* dan infeksi Sindbis virus akan menyebabkan penurunan IFN  $\beta$  dan IFN  $\gamma$  dan sebaliknya IL4 dan IL10 terjadi peningkatan (Schneider et al., 2004). Pada pengamatan in vitro menunjukkan bahwa saliva *Aedes aegypti* yang diinokulasikan secara bersama dengan virus dengue pada dendritic cell akan menghambat perkembangan virus tersebut. Oleh karena itu disimpulkan bahwa saliva *Aedes aegypti* berperan sebagai pelindung dalam membatasi infeksi virus dengue pada dendritic cell (Ader et al., 2004). Hal ini dijelaskan secara hipotetis bahwa saliva arthropoda hematofagus mengandung komponen protein aktif yang dapat memodifikasi respon haemostasis dan respon imun seluler serta dapat menginduksi antibodi spesifik IgG pada orang-orang yang tinggal di daerah endemik sehingga meningkatkan resistensinya terhadap infeksi Dengue (Fontaine et al., 2011).

Namun demikian, sampai saat ini masih belum diidentifikasi senyawa kandidat sebagai target spesifik bagi pengembangan TBV dengan memanfaatkan saliva nyamuk *Aedes aegypti* yang berperan sebagai satu- satunya vektor DBD. Oleh karena itu penelitian di bidang ini merupakan peluang baru untuk menemukan komponen yang tepat sebagai target TBV dan diharapkan nantinya memberikan kontribusi yang besar dalam menciptakan vaksin Dengue yang efektif dan efisien.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya tentang identifikasi protein imunomodulator kelenjar saliva *Ae. aegypti* berbasis reaksi antigen antibodi vektor dan inang manusia, telah diperoleh protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa (Senjarini et al., 2011; Oktarianti et al. 2012). Protein tersebut merupakan protein target yang potensial untuk dikembangkan sebagai vaksin dengue. Hal ini didasari bahwa protein tersebut bersifat imunogenik dapat memunculkan respon imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik.

## **Tujuan dan Sasaran**

Walaupun penelitian berkaitan dengan pengembangan TBV di dunia telah diintensifkan selama dekade terakhir ini, namun demikian sampai saat ini masih belum ada kelompok penelitian di Indonesia yang fokus untuk mengembangkan bidang penelitian vaksin berbasis vektor. Hal ini sangat disayangkan karena fakta bahwa Indonesia sebagai negara tropis memiliki kasus yang sangat tinggi dalam hal penyakit diperantarai vektor artropoda, khususnya vektor nyamuk yang menyebabkan 2 epidemi besar di Indonesia yaitu malaria dan Dengue. Penelitian ini akan merupakan terobosan inovatif baru dalam penelitian pengembangan vaksin DBD. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan dan melokalisasi komponen saliva nyamuk *Aedes aegypti* yang bertanggung jawab sebagai faktor imunomodulator yang juga berperan dalam transmisi virus penyebab DBD. Penelitian ini pada akhirnya akan menjadikan komponen tersebut sebagai target spesifik dalam pembuatan Transmission Blocking Vaccine (TBV) melawan penyakit dan epidemi DBD. Secara khusus tujuan dari proposal pada penelitian tahun ini adalah untuk menguji potensi protein 31 kDa dan 56 kDa dari kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* sebagai kandidat target potensial dalam pembuatan TBV melawan DBD. Sampai saat ini masih belum diidentifikasi senyawa yang menjadi target spesifik untuk menjadi komponen target pembuatan TBV dari kelenjar saliva nyamuk *Ae. aegypti* yang merupakan vektor utama DBD di Indonesia. Oleh karena itu karakterisasi molekuler beserta uji potensi terhadap protein dalam kelenjar saliva vektor tersebut yang dapat mengintervensi patogenesis Dengue merupakan langkah strategis yang akan membuka peluang baru ditemukannya komponen penting sebagai kandidat target baru Vaksin.

# Metode

## 4. Metode

### 4.1. Rearing (pemeliharaan) *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* direaring di dalam ruang insektarium bersuhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  (suhu ruang). Kegiatan rearing diawali dengan pengumpulan jentik nyamuk *Ae. aegypti* yang diambil dari lingkungan sekitar, baik yang ada di lingkungan alami maupun dari genangan air dari kontainer buatan manusia. Jentik nyamuk selanjutnya dipindahkan dalam nampan plastic (tray) untuk dipelihara hingga berubah menjadi pupa. Jentik diberi makanan berupa campuran dog foot dan pelet ikan. Kemudian pupa dipipet dan dimasukkan ke dalam cawan enamel, lalu dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa. Di dalam kandang koloni dilengkapi dengan mangkuk enamel 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 dewasa ditangkap dari dalam kandang koloni menggunakan alat aspirator lalu dimasukkan dalam gelas plastik dan ditutup dengan kain kassa pada bagian atasnya.

### 4.2. Preparasi sampel (isolasi) SG *Ae. aegypti*

Nyamuk dimatikan dengan cara dimasukkan dalam gelas plastik dan dibius dengan chloroform. Dilakukan identifikasi terlebih dahulu untuk meyakinkan spesiesnya dan menentukan jenis kelamin, sampel yang digunakan adalah nyamuk betina. Selanjutnya diatas gelas benda steril diteteskan  $50\mu\text{L}$  NaCl 0.5% dan nyamuk dibedah secara microdissection menggunakan jarum serangga. Kelenjar saliva *Ae. aegypti* berada di bagian antara thorax dan kepala nyamuk. Jarum serangga diletakkan di bagian thorax dan kepala *Ae. aegypti* lalu secara perlahan tarik kepala hingga terlepas dari thorax. Apabila tarikan benar, maka akan tampak lobus-lobus saliva berwarna bening ikut serta saat bagian kepala ditarik. Kemudian kelenjar saliva dipisahkan dari badan lemak atau jaringan lain apabila belum bersih, kemudian diambil secara perlahan dengan menggunakan jarum nyamuk. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam eppendorf steril yang telah diisi  $100\mu\text{L}$  PBS dalam PMSF steril.

### 4.3. Ekstraksi protein total SG *Ae. Aegypti*, isolasi dan purifikasi fraksi protein 31 kD dan 56 kD

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang telah diambil secara microdissection pada daerah thorax nyamuk dihomogenisasi dengan micropistile. Kemudian ditambahkan  $100\mu\text{L}$  Laemmli buffer (Tris HCl 0,5 M pH 6,8, gliserol, SDS 10 %,  $\beta$ - mercaptethanol, bromphenol blue 1%, dH<sub>2</sub>O) dan divortex sejenak. Setelah itu disentrifuge 3200 rpm selama 2 menit. kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan kembali  $100\mu\text{L}$  Laemmli buffer dan divortex kembali. Sampel dipanaskan selama 5 menit untuk mendenaturasi protein lalu diletakkan sejenak diatas es. Kemudian disentrifuge kembali 14000 rpm selama 10 detik. Supernatan diambil dan digunakan sebagai sampel untuk analisis SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). SDS-PAGE menggunakan konsentrasi stacking gel 4% (b/v) dan separating gel 10-12% (b/v). Larutan sampel crude extract SGE dicampur dengan bufer sampel dengan perbandingan 1:1 (v/v) hingga volume total

$20\mu\text{L}$ . Sampel dalam bufer sampel dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit untuk mendenaturasi protein dan didinginkan pada suhu kamar. Sampel dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak  $20\mu\text{L}$ . Elektroforesis dilakukan pada tegangan 200 V selama 1 jam. Pewarnaan hasil elektroforesis dilakukan menggunakan larutan pewarna selama 30 menit dan dilanjutkan "destaining" untuk menghilangkan warna pada gel yang tidak mengandung larik protein.

Pita Protein target (31 kD & 56 kD) hasil SDS Page protein yang diinginkan dipotong dari gel pisau steril dan teknik aseptis. Pemurnian dilakukan dengan teknik elektroelusi dan diukur kadarproteinnya dengan spektrofotometer. Satu sumuran gel hasil SDS Page bersi marker dan satu sumuran berisi sampel diwarnai dengan CBB dan bagian sumuran lain yang tidak diwarnai. Bagian gel yang tidak diwarnai dipotong pada posisi 31 kD dan 56 kD, potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 1-2 ml 0.05 M buffer phosphat. Selofan dimasukkan ke dalam chamber elektroelusi yang berisi 300 ml 0.01 M buffer phosphat. Elektroelusi dilakukan dalam cool chamber 4 celcius dan power supply pada kondisi konstan current 20 mA, 250 volt overnight. Protein yang telah dimurnikan digunakan untuk analisis aktivitas lebih lanjut.

#### 4.4. Uji kekuatan imunogenitas dalam serum darah manusia secara kuantitatif dengan ELISA (Enzyme Link Imunosorbent Assay)

Fraksi protein 31 dan 56 kD yang telah dimurnikan dicoating pada microtiter plate ELISA sebagai antigen. Serum darah manusia digunakan sebagai antibodi primer dengan perbandingan pengenceran 1:5000 (v/v). Perbandingan kekuatan imunogenisitas akan dilakukan dengan mereaksi silangkan antigen protein diatas dengan serum manusia yang hidup didaerah non-endemik (1), endemik dan jelas terpapar gigitan (2) serta pasien dari RS yang didiagnosa positif terinfeksi Dengue. Untuk itu inform concents sekaligus ethical clearance berkaitan dengan penelitian ini juga telah diproses. Antibodi sekunder yang digunakan adalah anti human IgGconjugate buffer phosphatedengan perbandingan pengenceran 1:5000. Development dilakukan dengan mereaksikan dengan NBT-BCIP dan reaksi diakhiri dengan pencucian. Pengamatan kekuatan respon imun dilakukan dengan membandingkan kekuatan titer IgG yang berhasil mengenali kedua fraksi protein tersebut untuk menentukan fraksi protein yang paling poten bereaksi silang dengan serum darah manusia. Konsentrasi IgG ditetapkan dalam units per milliliter dan dihitung dari kurva standart untuk setiap assay yang didapatkan dengan membandingkannya dengan standart.

#### 4.5. Uji potensi imunomodulator fraksi protein in vitro berkaitan dengan infeksi Dengue

Uji potensi fraksi protein tersebut dilakukan secara in vitro dengan menggunakan Human dendritic cell line (DCs) yang dapat dipesan dari perusahaan Bio-Lab. Preparasi dilakukan sesuai instruksi manual. Protein yang telah dimurnikan akan diinkubasi dalam kultur DCs. Perlakuan akan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kultur yang diperlakukan hanya dengan pelarut fraksi protein saja (1), kultur yang hanya diinfeksi serotype DENV saja (2) kultur yang diperlakukan dengan memaparnya dengan kedua fraksi protein saja (3) serta yang dipapar dengan kedua fraksi protein dan selanjutnya diinfeksi dengan serotype DENV. OptEIA ELISA kits akan digunakan dan dianalisis sesuai dengan instruksi manuail untuk menganalisis secara kuantitatif level dari IFN  $\gamma$  & IL4. Sampel diukur pada SpectraMax 340 plate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Selain itu juga akan diamati apoptosis pada DCs yang dipanen 48 jam setelah dipapar dengan fraksi protein kelenjar saliva dan diinfeksi dengan serotype DENV dengan mewarnai sel dengan propidium iodide dan FITC yang berkonjugasi dengan mAb against Annexin-V menggunakan Annexin-V FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson).



## **DAMPAK DAN MANFAAT**

Penelitian ini dilakukan dalam rangka mendukung program pemerintah untuk mengatasi wabah penyakit demam berdarah. Saat ini pemerintah telah melaksanakan berbagai program untuk mencegah dan menanggulangi wabah tersebut, diantaranya Pemberantasan Sarang Nyamuk (PSN), Abatesasi, dan pembentukan Jumantik (Petugas Pemantau Jentik nyamuk *Aedes aegypti*) di desa-desa. Namun demikian, hasilnya tidak optimal karena kurangnya kesadaran masyarakat untuk melaksanakan program-program tersebut secara mandiri. Angka mortalitas akibat Sindroma Syok Dengue juga cukup tinggi yang disebabkan oleh kurangnya pengetahuan masyarakat mengenai penyakit ini. Tingginya angka mortalitas tersebut juga disebabkan oleh penatalaksanaan yang belum tepat karena hanya meliputi penanganan terhadap gejala penyakit saja (terapi suportif) bukan membunuh virusnya (terapi kausatif). Oleh karena itu perlu dilakukan terobosan baru untuk menanggulangi wabah DBD melalui pendekatan preventif yaitu vaksinasi.

Keberhasilan riset ini akan memberikan sumbangan yang sangat berarti bagi pemerintah, industri obat, maupun masyarakat nasional dan internasional dalam penanggulangan wabah DBD karena TBV: dapat mencegah terjadinya wabah DBD dimasyarakat dengan dihambatnya infeksi virus (1), dapat memutus rantai transmisi virus penyebab DBD sehingga memungkinkan dilakukannya eradikasi DBD di Indonesia (2), dibidang industri, dapat menstimulasi produksi vaksin baru dengan target yang lebih spesifik (3), bagi masyarakat terutama pada anak-anak, dengan vaksinasi akan memberikan proteksi sehingga meningkatkan kualitas kesehatan mereka (4).





# LAMPIRAN

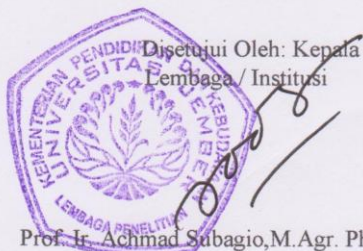
## RINCIAN ANGGARAN BELANJA (RAB)

### REKAPITULASI BIAYA in-cash:

No.	Uraian	Jumlah / Sumber		
		Sharing Biaya (Rp)		
		Total	Insentif KRT Ketua	
1	Gaji dan Upah	30,000,000	30,000,000	0
2	Bahan Habis Pakai	108,250,000	108,250,000	0
3	Perjalanan *)	9,500,000	9,500,000	0
4	Lain-lain	7,250,000	7,250,000	0
JUMLAH		155,000,000	155,000,000	0

\*) Tidak untuk perjalanan Luar Negeri

Disetujui Oleh: Kepala  
Lembaga / Institusi



Prof. Ir. Achmad Subagio, M. Agr. PhD

Jawa Timur, 23 April 2015

Diusulkan Oleh,  
Peneliti Utama



Dr. rer. nat. Kartika Senjarini

## 1. Gaji - Upah

No.	Pelaksana	Jml	Jam / Minggu	Honor / Jam	Sharing Biaya (Rp)		
					Total	Insentif KRT	Ketua / Lembaga Pengusul
1	Peneliti Utama	1	15	28,000	13,440,000	13,440,000	0
2	Peneliti	2	10	17,500	11,200,000	11,200,000	0
3	Pembantu Peneliti	0	0	0	0	0	0
4	Teknisi	1	10	13,000	4,160,000	4,160,000	0
5	Tenaga Administrasi	1	5	7,500	1,200,000	1,200,000	0
6	Tenaga Harian	0	0	0	0	0	0
Jumlah					30,000,000	30,000,000	0

## 2. Bahan

No.	Bahan	Volume	Biaya Satuan (Rp)	Sharing Biaya (Rp)		
				Total	Insentif KRT	Ketua / Lembaga Pengusul
1	Sangkar Nyamuk	5	400,000	2,000,000	2,000,000	0
2	Tray Pemeliharaan Larva	20	20,000	400,000	400,000	0
3	Jarum Serangga Set	5	400,000	2,000,000	2,000,000	0
4	Pakan Buatan	5	20,000	100,000	100,000	0
5	Marmut	10	30,000	300,000	300,000	0
6	Mikrotips 10 mikro	1	1,200,000	1,200,000	1,200,000	0
7	Mikrotips 100 mikro	2	1,125,000	2,250,000	2,250,000	0
8	Mikrotips 1000 mikro	3	975,000	1,950,000	1,950,000	0
9	Rak mikrotip 3 ukuran @ 2	6	825,000	4,950,000	4,950,000	0
10	Eppendorf Mikrotube 1,5 ml	3	925,000	27,750,000	27,750,000	0
11	Acrylamide/Bisacrylamide 40% 100 mL	1	1,650,000	1,650,000	1,650,000	0
12	TEMED 25 mL	1	950,000	950,000	950,000	0
13	APS 25 gr	1	775,000	775,000	775,000	0
14	Glycine 500 gr	1	1,350,000	1,350,000	1,350,000	0
15	Bromphenolblue 25 gr	1	1,850,000	1,850,000	1,850,000	0
16	Methanol 2,5 L	1	1,925,000	1,925,000	1,925,000	0
17	Mercaptoethanol 100 mL	1	1,125,000	1,125,000	1,125,000	0
18	Protein Marker Colorburst	2	2,750,000	5,500,000	5,500,000	0
19	Trizma Base 500 gr	1	1,750,000	1,750,000	1,750,000	0
20	Kit ELISA R&D System IFN Y	2	6,500,000	13,000,000	13,000,000	0
21	Kit ELISA R&D System IL4	2	6,500,000	13,000,000	13,000,000	0
22	DC Human Cell Line, system/kit	1	9,000,000	9,000,000	9,000,000	0
23	Protein Advance Assay Kit 500 mL	1	2,850,000	2,850,000	2,850,000	0
24	KH2PO4 500 gr	1	1,650,000	1,650,000	1,650,000	0
25	NaCl 500 gr	1	975,000	975,000	975,000	0
26	RPMI Media 1 L	1	1,350,000	1,350,000	1,350,000	0
27	Tween-80 500 mL	1	1,200,000	1,200,000	1,200,000	0
28	Ethanol 1 L p.a	1	1,600,000	1,600,000	1,600,000	0

29	Goat anti-human IgG 1 mL	1	3,850,000	3,850,000	3,850,000	0
Jumlah				108,250,000	108,250,000	0

### 3. Perjalanan

No.	Perjalanan	Volume	Biaya Satuan (Rp)	Sharing Biaya (Rp)		
				Total	Insentif KRT	Ketua / Lembaga Pengusul
1	Jakarta (tentative, publikasi) untuk 2 orang	1	3,500,000	7,000,000	7,000,000	0
2	Jember dan daerah endemik sekitar Jember (sampling serum)	5	500,000	2,500,000	2,500,000	0
Jumlah				9,500,000	9,500,000	0

### 4. Lain - Lain

No.	Kegiatan	Volume	Biaya Satuan (Rp)	Sharing Biaya (Rp)		
				Total	Insentif KRT	Ketua / Lembaga Pengusul
1	Penggandaan Laporan (ATK & Fotocopy)	1	3,000,000	3,000,000	3,000,000	0
2	Dokumentasi	2	625,000	1,250,000	1,250,000	0
3	Management Fee	1	3,000,000	3,000,000	3,000,000	0
Jumlah				7,250,000	7,250,000	0

### Sharing In-kind

(Untuk Anggota Konsorsium atau Mitra untuk KP)

No.	Nama Alat / Sarana / Prasarana	Status	Alokasi Waktu Pemakaian (Jam)	Nilai Ekonomis (Rp)			Sewa (x Rp. 1.000,-)
		Siap Pakai, Perlu Perbaikan/Perawatan, Beli Baru)		Perbaikan / Perawatan / Beli Baru	Ketua / Lembaga Pengusul	Total	
1	2	3	4	5	6	7	8
Jumlah				0	0		

## PENGALAMAN LEMBAGA

Nama Lembaga: Universitas Jember					
Nama Kepala Unit		:	Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr. PhD		
Unit Organisasi		:	Lembaga Penelitian		
Alamat		:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121		
No. Telp/Fax		:	0331-337818		
No. HP		:	08123483361		
E-mail		:	ketua.lemlit@unej.ac.id		
Hasil Litbang 5 Tahun Terakhir					
No	Judul	Tahun	Perlindungan KI	Komersialisasi	File Pendukung
1	Potential Use of Mosquito's Salivary Components as Novel Target for The Development of Transmission Blocking Vaccine (TBV)	2013			<i>Terlampir</i>
2	Immunogenic Protein from Salivary Gland of Aedes aegypti Against to Human Sera.	2014			<i>Terlampir</i>



**CV**  
**(Dr. rer. nat. Kartika Senjarini)**

Nama Peneliti: Dr. rer. nat. Kartika Senjarini		
Institusi	:	Universitas Jember
Unit Organisasi	:	Jurusan Biologi Fakultas MIPA
Alamat	:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121
No. HP	:	081358346388
Fax	:	0331330225
E-mail	:	kartika_senjarini@yahoo.com
Pengalaman Riset		
No	Judul	File Pendukung
1	HIPAH PASCASARJANA - DIKTI 2013-2014: Potensi Arthropod-Odorant Binding Protein, D7 dari Saliva Vektor Anopheles maculatus dan Anopheles aconitus dalam menghambat patogenesis parasit malaria	<i>Terlampir</i>
2	HIBAH FUNDAMENTAL DIKTI 2014-2015: KARAKTERISASI PROTEIN TARGET UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE : ANALISIS PROTEOMIK TERHADAP PROTEIN IMUNOMODULATOR HASIL REAKSI SILANG KELENJAR SALIVA Aedes aegypti DENGAN SERUM	<i>Terlampir</i>
3	INSENTIF RISTEK 2011: Molecular Characterization of Immunomodulatory Factor Ae. aegypti salivary gland and its possible use as novel target for the development of TBV against Dengue Fever	<i>Terlampir</i>
Publikasi Ilmiah		
No	Judul	File Pendukung
1	Potential Use of Mosquito's Salivary Components as Novel Target for The Development of Transmission Blocking Vaccine (TBV)	<i>Terlampir</i>
2	Immunogenic Protein from Salivary Gland of Aedes aegypti Against to Human Sera.	<i>Terlampir</i>
3	Application of fluorescence markers for the diagnosis of bacterial abundance and viability in aquatic ecosystem	<i>Terlampir</i>

Jawa Timur, 23 Agustus 2014

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP.



(Dra. Rike Oktarianti, MSi.)

Nama Peneliti: Dra. Rike Oktarianti, MSi.		
Institusi	:	Universitas Jember
Unit Organisasi	:	Jurusan Biologi FMIPA
Alamat	:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121
No. HP	:	081213906624
Fax	:	0331330225
E-mail	:	rike.oktarianti@yahoo.com
Pengalaman Riset		
No	Judul	File Pendukung
1	HIBAH FUNDAMENTAL DIKTI 2014-2015: KARAKTERISASI PROTEIN TARGET UNTUK PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE : ANALISIS PROTEOMIK TERHADAP PROTEIN IMUNOMODULATOR HASIL REAKSI SILANG KELENJAR SALIVA <i>Aedes aegypti</i> DENGAN SERUM	<i>Terlampir</i>
2	INSENTIF RISTEK 2011: Molecular Characterization of Immunomodulatory Factor <i>Ae. aegypti</i> salivary gland and its possible use as novel target for the development of TBV against Dengue Fever	<i>Terlampir</i>
Publikasi Ilmiah		
No	Judul	File Pendukung
1	Immunogenic Protein from Salivary Gland of <i>Aedes aegypti</i> Against to Human Sera.	<i>Terlampir</i>

Jawa Timur, 23 Agustus 2014

Dra. Rike Oktarianti, MSi.  
NIP.

(dr. Yunita Armiyanti, MKes.)

Nama Peneliti: dr. Yunita Armiyanti, MKes.		
Institusi	:	Universitas Jember
Unit Organisasi	:	Fakultas Kedokteran
Alamat	:	Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember 68121
No. HP	:	0817543738
Fax	:	0331337778
E-mail	:	yunitaarmi@yahoo.co.id
Pengalaman Riset		
No	Judul	File Pendukung
1	HIBAh STRANAS DIKTI 2010-2011: POTENSI SALIVA ANOPHELES SEBAGAI KANDIDAT TARGET DALAM PEMBUATAN TRANSMISSION BLOCKING VACCINE (TBV) MELAWAN MALARIA: UJI AKTIVITAS SALIVA Anopheles aconitus PADA MENCIT Galur BALB/c PASCA INFEKSI dengan Plasmodium berghe	<i>Terlampir</i>
2	INSENTIF RISTEK 2011: Molecular Characterization of Immunomodulatory Factor Ae. aegypti salivary gland and its possible use as novel target for the development of TBV against Dengue Fever	<i>Terlampir</i>
Publikasi Ilmiah		
No	Judul	File Pendukung
1	Mosquito Saliva-mediated Inhibition of Parasites Rates on Mice Model for Malaria	<i>Terlampir</i>

Jawa Timur, 23 Agustus 2014

dr. Yunita Armiyanti, MKes.  
NIP.

# PENELUSURAN PATEN DAN PUBLIKASI

## Hasil Penelusuran Paten

Penelusuran terhadap dokumen paten diketahui ada 3 paten berkaitan dengan ekstrak kelenjar saliva dari vektor *Aedes aegypti* (US Patent 6500420, 7425217, 8383589). Namun demikian, ketiga paten tersebut protein dengan berat molekul yang berbeda dan diambil dari vektor yang berasal bukan dari Indonesia. Hasil pengajuan melalui program UBER HKI DIKTI tentang pemrosesan paten terhadap kedua fraksi protein diatas (31 & 56 kDa) yang berasal dari vektor di Indonesia dan ditekankan keterkaitannya dengan patogenesis DBD yang nantinya akan dikembangkan menjadi target TBV tersebut sudah diterima (atas nama peneliti utama), saat ini sedang dalam pemrosesan dokumen untuk pendaftaran paten. Oleh karena itu sudah merupakan keniscayaan untuk menguji lebih lanjut tentang potensi protein tersebut

## Hasil Penelusuran Publikasi

Walaupun penelitian berkaitan dengan pengembangan TBV di dunia telah diintensifkan selama dekade terakhir ini, namun demikian sampai saat ini masih belum ada kelompok penelitian di Indonesia yang fokus untuk mengembangkan bidang penelitian vaksin berbasis vektor. Hal ini sangat disayangkan karena fakta bahwa Indonesia sebagai negara tropis memiliki kasus yang sangat tinggi dalam hal penyakit diperantarai vektor artropoda, khususnya vektor nyamuk yang menyebabkan 2 epidemi besar di Indonesia yaitu Dengue dan Malaria. Penelitian ini akan merupakan terobosan inovatif baru dalam penelitian pengembangan vaksin untuk Dengue dan Malaria.

Target vaksin berbasis vektor ini adalah bagian dari tubuh vektor atau antigen patogen dalam siklus hidupnya ketika berada di dalam tubuh vektor (Carter, 2001; Abreu & Ortigao, 2010). Vaksin ini banyak digunakan untuk membangkitkan antibodi guna melawan molekul vektor yang terlibat dalam perkembangan patogen. Transmisi patogen ke inang dapat sukses dilakukan oleh vektor arthropoda oleh karena di dalam saliva vektor tersebut mengandung sejumlah komponen vasodilator dan imunomodulator yang mempunyai aktivitas sebagai anti haemostasis, anti inflamasi dan memicu respon imun pada inang yang berpotensi meningkatkan transmisi patogen, maka memungkinkan untuk melakukan pengontrolan transmisi tersebut dengan cara melakukan vaksinasi terhadap inang dengan molekul yang bersifat melawan protein dalam kelenjar saliva (Titus et al., 2006; Wasinpiyamongkol et al., 2010; Wongkamchai et al., 2010). Perkembangan penelitian terbaru menunjukkan bahwa saliva nyamuk dan arthropoda lain mengandung bahan yang bersifat imunogenik yaitu dapat memunculkan respon imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik (Gillespie et al., 2000; Remoue et al., 2006, 2007), atau pada wisatawan yang terpapar oleh vektor di daerah tropis (Pradines et al., 2007). Beberapa penelitian membuktikan bahwa gigitan vektor memberikan pengaruh positif terhadap reaksi imun inang. Penelitian yang dilakukan oleh Kamhawi et al. (2000), menunjukkan bahwa gigitan berulang dari *Phlebotomus* yang tidak terinfeksi dapat menyebabkan resistensi terhadap *Leishmania* mayor karena adanya peningkatan sitokin-sitokin yang berkaitan dengan imunitas seluler. Paparan saliva *Ae. aegypti* juga memberikan efek yang sama pada hewan coba melalui modulasi respon sistemik sitokin-sitokin pada inang (Schneider et al., 2004). Hasil penelitian Donovan et al. (2007), menunjukkan bahwa pada hewan coba tikus yang sebelumnya dipapar dengan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* dapat meningkatkan respon imun dan menghambat perkembangan parasit di hepar maupun pada stadium darah. Menurut Gomes et al. (2002), kekebalan tersebut merupakan respon imun yang dimediasi oleh Th1 yang bersifat protektif. Saliva haematophagous arthropoda mengandung komponen protein aktif yang dapat memodifikasi respon haemostasis dan respon imun seluler serta dapat menginduksi antibodi spesifik IgG pada orang-orang yang tinggal di daerah endemik. (Fontaine et al., 2011). Dengan alasan tersebut maka komponen saliva dapat dijadikan target dalam pengembangan vaksin untuk menghambat transmisi patogen (Lavazec et al., 2007; King et al., 2011).

Berkaitan dengan patogenesis virus Dengue, secara lebih spesifik telah dilaporkan bahwa paparan saliva *Ae. aegypti* pada hewan coba yang diinfeksi dengan Sindbis virus memberikan reaksi imun inang melalui modulasi respon sistemik sitokin-sitokin pada inang. Selanjutnya inokulasi bersama ekstrak saliva *Ae. aegypti* dan infeksi Sindbis virus akan menyebabkan penurunan IFN  $\beta$  dan IFN  $\gamma$  dan sebaliknya IL4 dan IL10 terjadi peningkatan (Schneider et al., 2004). Pada pengamatan in vitro menunjukkan bahwa saliva *Ae. aegypti* yang diinokulasikan secara bersama dengan virus dengue pada dendritic cell akan menghambat perkembangan virus tersebut. Oleh karena itu disimpulkan bahwa saliva *Ae. aegypti* berperan sebagai pelindung dalam membatasi infeksi virus dengue pada dendritic cell (Ader et al., 2004). Hal ini dijelaskan secara hipotetis bahwa saliva vektor utama Dengue, yaitu *Ae. aegypti* mengandung komponen protein aktif yang dapat memodifikasi respon haemostasis dan respon imun seluler serta dapat menginduksi antibodi spesifik IgG pada orang-orang yang tinggal di daerah endemik sehingga meningkatkan resistensinya terhadap infeksi Dengue (Fontaine et al., 2011).

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dari kelompok penelitian kami tentang identifikasi protein imunomodulator kelenjar saliva *Ae. aegypti* berbasis reaksi antigen antibodi vektor dan inang manusia, telah diperoleh protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa (Oktarianti et al. 2013, Senjarini 2014). Karakterisasi molekuler lebih lanjut terhadap kedua fraksi protein tersebut Spektrofotometri Massa (LC-MS, analisis hasil dengan software Protein Pilot), menunjukkan bahwa terdapat 5 sub-unit protein dan 3

sub unit protein yang konsisten menyusun 31 dan 56 KD. Hasil analisis dengan sekuen database protein (UNIPROT), secara umum kebanyakan subunit tersebut belum teridentifikasi, sebagian sub unit mirip dengan protein sekresi 37 KD dan Apirase dari kelenjar saliva *Ae* (Tabel 2.1). Protein tersebut beserta sub unit yang menyusunnya merupakan protein yang potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat target baru TBV dengue. Hal ini didasari bahwa protein tersebut bersifat imunogenik sehingga dapat memunculkan respon imun adaptif yang mampu merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik.

Secara lebih khusus penelitian ini akan melakukan uji potensi terhadap kedua fraksi protein tersebut berkaitan dengan kemampuannya untuk intervensi infeksi dan/atau patogenesis Dengue secara *in vitro*. Untuk itu akan dilakukan isolasi dan purifikasi terhadap kedua fraksi protein yang kemudian diuji kekuatan imunogenitasnya berkaitan dengan kemampuannya dalam intervensi infektivitas virus Dengue *in vitro*. Lebih jauh lagi, spesifitas target untuk pengembangan TBV akan diuji dengan karakterisasi lebih lanjut terhadap fraksi protein yang patogenesis Dengue *in vitro* di atas. Tujuan akhir dari penelitian ini pada akhirnya adalah untuk mendapatkan target spesifik baru dalam pengembangan Transmission Blocking Vaccine DBD berbasis saliva vektor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abreu IVC. & Ortigao MR. 2010. Transmission Blocking Vaccines to Control Insect-Borne Diseases - A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 105, (1).
- Almeras L, Fontaine A, Belghazi M, Bourdon S. 2010. Salivary gland protein repertoire from *Ae aegypti* mosquitoes. Vector Borne and Zoonotic Diseases. Vol 10 (4) : 391-402
- Andrade BB, Teixeira CR, Barral A, Barral-Netto M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. An. Acad. Bras. Cienc. 77(4), 665-693.
- Brennan JD, Kent M, Dhar R, Fujioka h, Kumar N, 2000. Anopheles gambiae salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 97(25):13859-13864.
- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM, 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. J. Biol. Chem. 281 (4) : 1935-1942
- Calvo E, Tokomasu F, Marinoti O, Villeval J, Ribeiro J, Francischetti. 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. 282 (37) : 26928-26938
- Carter R.2001. Transmission Blocking Malaria Vaccine. Vaccine 19: 2309-2314.
- DeRoeck D, Deen J, Clemens JD, 2003. Policymakers' views on dengue fever/dengue haemorrhagic fever and the need for dengue vaccines in four southeast Asian countries. Vaccine. 22:121-9.
- Donovan MJ, Messmore AS, Scrafford DS, Sacks DL, kamhawi S, McDowell MA. 2007. Infection and immunity 75 : 2523-2530
- Edelman R. 2007. Dengue Vaccine Approach the Finish Line. Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine Baltimore St. CID : 45: 556-560
- Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras L. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. Parasit & Vector 4 : 187
- Fontaine A, Paradines EV, Diouf I, Remoese F, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras L. 2011. Relationship between exposure to vector bites and antibody response to mosquito SGE. Plus One 6 (12)

- Gillespie, RD, Mbow, ML, Titus, RG. 2000. The Immunomodulatory Factors of Blood Feeding Arthropod Saliva. *Parasite Immunol.* 22: 319-331.
- Gomes R.B., Brodskyn C., De Oliveira Cl, Costa Y, Miranda JC, Caldas A, Venezuela JG., Barral Netto M., Barral A. 2002. Serokonversion against *Lutzomyia longipalpalis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186: 1530-1534.
- Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, Iwata H, Valenzuela JG. 2009. Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi* a vector of *Leishmania major*. *J. Insect. Physiol.* 55:1044-1049.
- Honorio NA, Silva WC, Letie PJ, Goncalves JM, Lounimbos Oliveira RL. 2003. Dispersal of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) In an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. Rio de Janeiro* 98 (2): 191-198
- Iqbal R & Munir MK. 2011. Dengue Fever. *Pakistan Journal of Medical Research.* Vol 50. No.1 : 42-44.
- Jariyapan, N, Roytrakul S, Paemanee A, Junkum A, Saeung A, Thongsahuan S, Sor-suwan S, Phattanawiboon B, Poovorawan Y, Choochote W. 2012. Proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles barbirostris* species A2 (Diptera : Culicidae) by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitol Res.* Published online : 15 may 2012
- Kamhawi, S., Belnaid, Y., Modi, G., Rowton, E. Sacks, D. 2000. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science.* 290: 1351-1354.
- King JG, Kenneth D, Vernick, Julian FH. 2011. Members of the salivary gland surface protein family (SGS) are major immunogenic components of mosquito saliva. *JBC Papers in Press.* 1-21
- Lavazec, Boudin C, LacroixR, Bonnet S, Diop A, ThibergeS, Boisson B, Tahar R, BourgominC. 2007. Carboxypeptidase B of *Anopheles gambiae* Target for a *Plasmodium falciparum* Transmission- Blocking Vaccine. *Infection and Immunity.* 75(4) : 1635-1642
- Lima DM, de Paula SO, Franca RF, Palma PV, Morais FR, Gomes-Ruiz AC, et al. 2011. ADNA vaccine candidate encoding the structural prM/E proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection. *Vaccine.*29:831-8.
- Luplertlop N, Surasombattana P, Patramool S, Dumas E, wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, Piquemal d, Yssel H, Briant L, Misse D. 2011. Induction of peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Ae. aegypti* salivary gland following infection with dengue virus. *Plos. Pathogens.* 7 : 1-15
- Miller N, 2010. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr. Opinion Mol. Ther.* 12(1):31-8.



- Murrel S, Chin-Wu S, Butler M. 2011. Review of dengue virus and the development of Vaccine. *Biotechnology Advances*. 29: 239-247
- Nuttall PA, Paesen GC, Lawrie CH, Wang H, 2000. Vector-host interactions in disease transmission. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:381-386
- Oktarianti R, Senjarini K, Fatchiyah, Aulani'am. 2014. Immunogenic Protein from Salivary Gland of *Aedes aegypti* Against to Human Sera. *Adv. in Nat. & Appl. Sci.* 8(8):101-107.
- Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S. 2007. Antibody Response Against Saliva Antigens of *Anopheles gambiae* and *Ae. aegypti* in Travellers in Tropical Africa. *Microbes. Infect.* 9: 1454–1462.
- Peng Z & Simons FER, 2004. Mosquito allergy : immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 133 : 198-209
- Remoue F, Alix E, Cornelie S, Sokhna C. 2007. IgE and IgG4 Antibody Responses to *Ae. Saliva* in African Children. *Acta. Trop.*104: 108–115.
- Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C. 2006. Evaluation of the Antibody Response to *Anopheles* Salivary Antigens as a Potential Marker of Risk of Malaria. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 100: 363–370.
- Ribeiro JMC, Charlab R, Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*. *The Journal of Experimental Biology* 204 ; 2001-2010
- Ribeiro JMC, and Francischetti IM. 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood feeding: sialome and post-sialome perspective. *Ann. Rev. Entomol.* 48:73-78.
- Ribeiro JMC, Arca B, Lombardo F, Calvo E, Phan VM, Chandra PK, & Wikel SK. 2007. An Annotated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito, *Ae. aegypti*. *BMC Genomics.* 8:6.
- Rohousova I, Volf P. 2006. Sand fly saliva effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia. Parasitol.* 53:161-171.
- Senjarini K. 2013. Potential Use of Mosquito's Salivary Components as Novel Target for The Development of Transmission Blocking Vaccine (TBV). *Microbiology Indonesia* 7(4): 186-191.
- Schneider B, Soong L, Zeidner N, Higgs S. 2004. *Ae. aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunology.* 17 ( 4 ) : 565-573

- Schneider B, Higgs S. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (5) : 400-408
- Schneider B, Soong L, Coffey LL, Stevenson HL, McGee CE, Higgs S. 2010. *Ae. aegypti* saliva alters leucocyte recruitment and cytokine signaling by antigenpresenting cells during west Nile virus infection. *Plos One.* 5: 7: 11704
- Simasathien S, Watanaveeradej V. 2005. Dengue vaccine. *J. Med. Assoc. Thai* . 88(Suppl 3):S363–77.
- Sivanathan, M M. 2006. The ecology and biology of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera : Culicidae) and the resistance status of *Ae. albopictus* against organophosphates in Penang Malaysia. Thesis.
- Soegijanto, S. 2004. Demam Berdarah Dengue. Airlangga University Press. Surabaya. Pp1-99.
- Tangamani S, Wikel S. 2009. Differential expression *Ae. aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. *Parasites & Vectors* 2 : 34
- Titus R.G, Bishop JV, Mejia JS. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology.* 28: 131-141.
- Valenzuela JG, Francischetti IM, Pam VM, Garfield MK, Ribeiro JM. 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33 : 717-732
- Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, Miranda-Santos IKF, Marinotti O, Francischetti IM, Ribeiro JMC, 2002. The D7 family of salivary proteins in blood sucking Diptera. *Insect Mol. Biol.* 11(2):149-155.
- Wasserman HA, Singh S, Champagne DE. 2004. Saliva of the yellow fever mosquito, *Ae. aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite Immunology.* 26 : 295-306
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Seveno M, Martial, Remouse F, demettré E, Brizard JP, Jouin P. 2010. Blood feeding and immunogenic *Ae. aegypti* saliva proteins. *Proteomic.* 10: 1906-1916
- Webster DP, Farrar J, Jones SR. 2009. Progress toward dengue infection. *Lancet Infect. Dis.* 9 : 678-687
- Wongkamchai S, Khongtak P, Leemingsawa S, Komalamisra N, Junsong N, Kulthanan K, wisuthsarewong W, Boitano J. 2010. Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 28 : 162169.