

**INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY
“PAVE THE WAY TO A BETTER LIFE”**

MAKALAH POSTER

**Protein profile of Salivary Gland from
Anopheles sundaicus as Potential Target for
Transmission Blocking Vaccine (TBV) against Malaria**

Yunita Armiyanti, Pulong Wijang Pralampita, Rizka Arifani, Kartika Senjarini

PROCEEDING - ISBN 978-602-9042-11-5

UDAYANA UNIVERSITY, 23-24 September 2010, BALI - INDONESIA



Udayana University
Press

ISBN: 978-602-9042-11-5

PROCEEDINGS

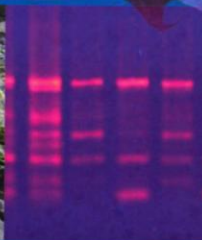
2nd International Conference
on Biosciences and Biotechnology

PAVE THE WAY TO A BETTER LIFE

Udayana University, Bali, Indonesia | 23-24 September 2010

EDITORS:

Yan Ramona (Udayana University)
Yenni Ciawi (Udayana University)
Made Pharmawati (Udayana University)
Anom Sutrisna Wijaya (Udayana University)
Nyoman Sri Budayanti (Udayana University)
Wardhana Suryapratama (Soedirman University)
Edy Kurnianto (Diponegoro University)
I Nyoman Sutarpa Sutama (Udayana University)
Ida Bagus Wayan Gunam (Udayana University)
I Made Mastika (Udayana University)
A.A. Kartini (Udayana University)
I Nyoman Sumerta Miwada (Udayana University)
I Gede Suranjaya (Udayana University)
I Gusti Putu Nugraha Yasa (Udayana University)



DAFTAR ISI

12	ANALYSIS OF PHYSIO-ACUSTIC TO DETEMINE OPTIMUM ACUSTIC PARAMETER OF GAMELAN JAWA Prisanti Putri	PBE-42
POSTER PRESENTATION: HEALTH		
1	CELLULAR SIGNALING OF LEPTIN RESISTANCE IN OBESITY I G. A. Dewi Ratnayanti, I G. N. Mayun, I. A. Ika Wahyuniari and N. M. Linawati	PH-1
2	DESIGN RECOMBINANT PRODUCTION OF LUMBROKINASE AND PREDICTION OF HOST WITH <i>INSILICO</i> MAPPING APPROACH Fadilah, Surya Dwira, Aryo Tedjo and Fatmawaty	PH-6
3	ANALYSIS INTERACTION OF HEMAGLUTININ INHIBITOR OF INFLUENZA A FROM SPONGES COMPOUNDS BY MOLECULAR DOCKING APPROACH Fatmawaty, Fadilah, Aryo Tedjo and Arfiyanti	PH-10
4	DIFFERENTIATION OF PLASMA IL-10/TNF- α RATIO BETWEEN OF MALARIA FALCIPARUM PATIENTS WITH ANEMIA AND WITHOUT ANEMIA I Nyoman Wande, Endang Retnowati, Ni Md Linawati and Puspa Wardhani	PH-15
5	FORMULATION AND TEST OF STERILITY STERILE COMBINATION GEL ALOE VERA EXTRACT (<i>ALOE BARBADENSIS</i> MILL.) AND THE BANANA'S STEM EXTRACT (<i>MUSA PARADISIACA</i> LINN.) Insan Sunan K., Sriwidodo and Grace Evanda	PH-19
6	DIFFERENCES IN PLASMA ADIPONECTIN LEVELS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS ON VARIOUS LEVELS OF HBA1C CONCENTRATION AS A CRITERIA OF DIABETES MELLITUS MONITORING Ni Md Linawati, Ni Md Ratna Saraswati, I Nym Wande, Wyn Sugiritama, IA Wahyuniari and IGA Dewi Ratnayanti	PH-24
7	THE ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) SUBTYPES ON S (Surface) REGION GENES FROM PATIENT IN MENGWI DISTRICT, BADUNG REGENCY, BALI Made Agus Hendrayana, Retno Handajani, Maria Inge Lusida and Soetjijpto	PH-27
8	REALLY NECESSARY FOR THE RECONSTRUCTION OF PENIS ENLARGEMENT? Made Oka Negara	PH-33

9	THE POTENCY OF L-AMINO ACIDS AND DIPEPTIDES AS POTENTIATOR OF GABA _B RECEPTORS IN RAT NEOCORTICAL SLICES Ni Made Puspawati, Rolf H Prager, David I.B.Kerr, and Jenny Ong	PH-38
10	RESISTANCE OF <i>EXTENDED-SPECTRUM BETA LACTAMASES</i> (ESBLs) PRODUCTION AMONG <i>Escherichia coli</i> AND <i>Klebsiella pneumoniae</i> TO THE THIRD-GENERATION CEPHALOSPORIN IN CLINICAL LABORATORY SANGLAH HOSPITAL DENPASAR DAP.Rasmika Dewi, AAN. Subawa, DG.Diah Dharma Santhi and Ida Sri Iswari	PH-42
11	FORMULATION OF BURN INJURY GEL FROM AMBON BANANA STEM FRACTION (<i>MUSA X PARADISIACA</i> LINN) AND ALOE VERA EXTRACT Sriwidodo, Yasmiwar Susilawati and Melinda Januari	PH-46
12	CHROMOGENIC METHOD IN ENDOTOXIN TESTING FOR INTRAVENA INJECTION PREPARATION Sohadi Warya, Iyan Sopyan, Insan Sunan K. and Dzikry Ilhami	PH-51
13	ANTIMICROBIAL ACTIVITY of MOTHER STARTER KEFIR towards <i>SALMONELLA</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS</i> and <i>E.Coli</i> IN VITRO S.A Lindawati., A.A.S.Kartini., H.Martini., I.N.S.Miwada., N.W. T, Inggriati., K.Nuraini., I.N.T.Ariana and A.T.Umiarti	PH-55
14	ETHANOL LEVEL IN BLOOD OF WISTAR RATS AFTER ACUTELY PERORAL ALCOHOL CONSUMPTION Ni Made Suaniti	PH-58
15	THE CORRELATION OF WORK STRESS, NUTRITIONAL STATUS, AND METABOLIC SYNDROME IN ADULT MALE WORKERS Sutadarma IWG	PH-62
16	PROTEIN PROFILE OF ANOPHELES SUNDAICUS SALIVARY GLAND AS POTENSIAL TARGET FOR TRANSMISSION BLOCKING VACCINE (TBV) AGAINST MALARIA Yunita Armiyanti, Pulong Wijan Pralampita, Riska Arifani, and Kartika Senjarini	PH-67
17	THE COMPARISON EFFECT OF NATURAL HONEY AND SYRUP OF STORAGE ROOT BALINESE SWEET PURPLE POTATOES (<i>IPOMOEA BATATAS L</i>) LIPID PROFILE OF THE BLOOD IN RATS WITH HYPER CHOLESTEROL DIET I Wayan Sumardika, I Made Jawi, and A. Wiwiek Indrayani	PH-72
18	MALIGNANT TRANSFORMATION PAPILLARY THYROID CARCINOMA IN HASHIMOTO'S THYROIDITIS : A CASE REPORT I Gusti Ayu Sri Mahendra Dewi	PH-76

**Karakterisasi Protein Saliva Nyamuk *Anopheles sundaicus*
sebagai Target Potensial dalam Pembuatan *Transmission Blocking Vaccine* (TBV)
Melawan Malaria**

Yunita Armiyanti * Pulong Wijang Pralampita Riska Arifani** Kartika
Senjarini*****

***Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember**

**** Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember**

***** Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember**

Abstrak

Malaria sampai saat masih merupakan masalah kesehatan yg utama baik di dunia maupun di Indonesia. Diperkirakan 300-500 juta orang di dunia terinfeksi malaria setiap tahun dan hampir 3 juta merupakan kasus yang fatal. Berbagai usaha telah dilaksanakan untuk menekan penyebaran penyakit ini diantaranya dengan pembuatan vaksin malaria, namun hasilnya belum optimal. Vaksin yang tepat untuk pencegahan penyakit malaria adalah yang mencakup pencegahan untuk siklus pre-eritrositik, siklus eritrositik dan proses transmisi. Perkembangan penelitian yang terbaru menunjukkan saliva nyamuk mengandung bahan yang bersifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai vaksin yang dapat menghambat transmisi (*Transmission-Blocking Vaccine* (TBV)). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi protein Salivary gland *A.sundaicus* dan isolasi RNANYa sebagai template untuk pembuatan pustaka cDNA. Telah berhasil dilakukan isolasi *salivary gland* (SG) dari *A. sundaicus*. *Salivary Grand* Telah dilakukan SDS PAGE SG untuk melihat profil protein kasar SG guna deteksi awal keberadaan imunomodulator. SG kemudian diekstraksi untuk mendapatkan RNA sebagai templat untuk pembuatan pustaka cDNA SG *A. sundaicus* .RNA SG *A. sundaicus* diisolasi dari 80 pasangan salivary gland pairs nyamuk betina dewasa menggunakan *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Isolasi RNA belum menunjukkan signal positif dimungkinkan karena jumlah sampel SG yang terbatas. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk melakukan karakterisasi molekuler dan fungsional komponen saliva nyamuk *Anopheles sundaicus* yang bertanggung jawab sebagai faktor imunomodulator sebagai target potensial dalam pengembangan TBV.Oleh karena itu untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan sampling kembali *A. sundaicus* dan isolasi SG yang kemudian dilanjutkan dengan isolasi RNA dengan menggunakan metode yang lain.

Kata kunci : kelenjar saliva, imunomodulator, TBV, malaria, A. sundaicus

Abstract

Malaria is a mosquito-borne disease of world-wide concern as well as in Indonesia causing 1.5 to 2.7 million people dying each year. Many attempts to overcome this disease have been conducted including with vaccine. The ideal malaria vaccine strategy should include several stages of parasite life cycles during infection i.e. pre-erythrocytic, erythrocytic and transmission. Recently, it has been shown that mosquito salivary gland contains components which are immunogenic, thus it would be very potential to serve as targets for the development of *Transmission-Blocking Vaccine* (TBV). The objective of this research was to characterize the protein profile of *Anopheles sundaicus* salivary gland and to collect mRNA as template for RT-PCR to construct cDNA library.

Salivary gland (SG) of *A. sundaicus* has been isolated from the mosquitoes following landing collection. SDS-PAGE was conducted to elucidate crude protein profile of Salivary Gland Extract (SGE) for preliminary detection of the existing of immunomodulator proteins. Furthermore, SG was then extracted to collect mRNA as template for RT-PCR to construct cDNA library. Protein profile investigation showed that there were protein bands corresponding with the putative immunomodulatory proteins which are previously published from *Anopheles* Salivary Glands. Using *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (Invitrogen, San Diego, CA, USA) showed negative result. This research is a preliminary research to molecularly and functionally characterize the salivary components from salivary gland of *A. sundaicus* which are responsible as an immunomodulatory factor as a potential target for the development of TBV. Therefore it was suggested to use another method instead of using mRNA kit for further isolation of RNA from *A. sundaicus*.

Keywords : salivary gland, immunomodulator, TBV, malaria, *Anopheles sundaicus*

PENDAHULUAN

Malaria sampai saat masih merupakan masalah kesehatan yg utama di dunia. Diperkirakan 300-500 juta orang di dunia terinfeksi malaria setiap tahun dan hampir 3 juta merupakan kasus yang fatal (Lou *et al*, 2001). Keadaan tersebut semakin diperparah dengan munculnya masalah resistensi baik pada Plasmodium sebagai parasit penyebab malaria maupun pada nyamuk Anopheles sebagai vektornya (Donovan *et al*, 2007). Di Indonesia, malaria masih menjadi masalah kesehatan yang besar karena selain merupakan daerah endemis, sejak tahun 1997 terjadi peningkatan prevalensi di beberapa daerah. Pada dekade terakhir ini juga mulai muncul resistensi pada beberapa obat malaria seperti klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin (Dachlan 2004).

Beberapa strategi telah dikembangkan untuk mengatasi penyakit malaria dengan sasaran pada penyakit atau mekanisme transmisinya. Salah satunya adalah dengan mengembangkan vaksin untuk malaria, namun hasilnya belum memuaskan. Siklus hidup parasit malaria sangat kompleks dengan melibatkan stadium pada manusia yang berakibat munculnya penyakit dan stadium pada nyamuk yang berperan dalam penularan (Lavazec *et al*, 2007). Oleh karena itu masih belum ditemukan vaksin yang bisa bekerja secara efektif dan tepat dapat mencegah berkembangnya parasit di semua stadium.

Vaksin yang tepat untuk pencegahan penyakit malaria adalah yang mencakup pencegahan untuk siklus pre-eritrositik, siklus eritrositik dan proses transmisi. Saat ini telah banyak dikembangkan vaksin berdasarkan antigen pada parasit malaria baik pada siklus pre-eritrositik maupun siklus eritrositik, namun belum memberikan hasil yang optimal.

Perkembangan penelitian yang terbaru menunjukkan saliva nyamuk mengandung bahan yang bersifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai vaksin yang dapat menghambat transmisi (*Transmission-Blocking Vaccine (TBV)*) (Lavazec *et al*, 2007).

Saliva nyamuk mengandung bahan-bahan yang memudahkan nyamuk untuk menghisap darah seperti zat antihemostatik, anti-inflamasi dan immunosupresi. Keadaan tersebut juga memberikan keuntungan bagi agen penyakit seperti Plasmodium yang ada di dalam saliva untuk masuk ke dalam tubuh hospes (Donovan *et al*, 2007). Sampai saat ini belum banyak diteliti zat yang berfungsi sebagai imunomodulator dari saliva nyamuk dan belum diketahui apakah sama untuk semua spesies Anopheles. Jika substansi dalam saliva nyamuk mampu berperan sebagai imunomodulator maka isolasi dan karakterisasi komponen tersebut akan merupakan basis bagi pengembangan metode untuk mengendalikan atau bahkan menghambat transmisi dan perkembangan parasit yang dibawa oleh nyamuk. 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 dalam saliva nyamuk merupakan kandidat penting sebagai target pembuatan vaksin penghambat transmisi patogen (TBV) melawan epidemi malaria.

Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi molekuler dan fungsional komponen saliva nyamuk *Anopheles sundaicusi* yang bertanggung jawab sebagai faktor imunomodulator dengan menentukan dan mendapatkan sekuen-sekuen cDNA pengkode molekul yang diduga berperan sebagai faktor

imunomodulator pada saliva nyamuk *A. Sundaicus*, sebagai langkah awal dilakukan isolasi protein kelenjar saliva *A.sundaicus* untuk melihat profil proteinnya.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (true eksperimental) dengan melakukan isolasi kelenjar saliva nyamuk *A.sundaicus* sebagai bahan untuk karakterisasi molekuler dan karakterisasi profil proteinnya.

Koleksi Nyamuk *A. sundaicuss* dan Preparasi Salivary Gland

Koleksi nyamuk *A. subpictus* dilakukan dengan metode *landing collection* baik *indoor* (di dalam rumah) maupun *outdoor* (di luar rumah) di daerah pantai endemis malaria, tepatnya di desa Pathuk, Kec. Purwodadi, Purworejo. Metode ini menggunakan umpan manusia yang dilindungi oleh kelambu dan nyamuk yang hinggap di kelambu ditangkap dengan menggunakan aspirator. Nyamuk yang telah ditangkap dikumpulkan dalam gelas kertas yang ditutup dengan kasa dan diberi diet air sirup/gula. Sebelum diambil kelenjar salivanya, nyamuk betina dewasa dimatikan lebih dahulu dengan menggunakan chloroform, selanjutnya diidentifikasi berdasarkan kunci identifikasi Reid (1966). Diseksi kelenjar saliva nyamuk betina dilakukan dengan cara (Bruce-Chwatt, 1980): (1) meletakkan nyamuk di bawah mikroskop stereo pada sisi kanan slide, (2) jarum diseksi ditangan kiri menekan dengan lembut pada bagian toraks dan jarum diseksi di tangan kanan menarik bagian kepala dengan perlahan-lahan, (3) kelenjar saliva yang melekat pada bagian kepala (bentuk seperti sosis, berupa badan refraktil) dipotong dan dipindah ke dalam PBS steril. Kelenjar saliva yang telah diisolasi disimpan dalam suhu -75°C sampai diperlukan.

Isolasi m-RNA SG Nyamuk *A. sundaicus*
mRNA SG *A. sundaicus* diisolasi dari 80 pasangan SG salivary gland pairs nyamuk betina dewasa pada hari menggunakan *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Visualisasi dilakukan pada gel agarosa 1,1% dengan *ethidium bromide* ($1,5\text{ mg ml}^{-1}$).

Isolasi Protein dengan SDS PAGE.

Ekstraksi protein dilakukan dengan memasukkan kelenjar saliva ke dalam ependorf dan disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang ada dibuang, kemudian ditambahkan $100\mu\text{L}$ buffer sample ke dalam ependorf dan dibekukan dalam freezer selama 1 malam. Selanjutnya, ependorf berisi sample pun di rebus dalam air mendidih selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan *vortex* hingga tercampur rata.

Sementara itu, gel SDS PAGE yang terdiri dari separating gel 12% dan Stacking gel disiapkan dalam alat. Sample yang telah divortex disuntikkan ke dalam “suluran” yang ada pada gel, dan *running* dalam voltase 200 V selama 30 – 60 menit. Untuk melihat hasilnya, maka dilakukan *staining* pada gel-nya selama 30 menit, dilanjutkan dengan *destaining* yang diulang 3x pada shaker dengan kecepatan 43 rpm selama masing masing 15 menit dan 30 menit. Gel pun dilihat pada electrophoresis photo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampling dan Pemetaan Vektor Malaria *Anopheles sp.*

22 dari 80 spesies *Anopheles* yang ditemukan di Indonesia telah diidentifikasi sebagai vektor malaria (DepKes 2009). Diantara ke 22 spesies vektor tersebut yang berperan penting diantaranya adalah *A. sundaicus* yang merupakan spesies

Anopheles yang dilaporkan merupakan vektor utama malaria di Pulau Jawa dan Bali. Sampling untuk mendapatkan isolat Anopheles telah dilakukan di 3 lokasi yang diduga merupakan atau pernah menjadi daerah endemik malaria yaitu di daerah Pantai Bande Alit Jember, Pantai Watudhodhol Kec. Wongsorejo Banyuwangi dan di desa Pathuk, Kel. Purwodadi, Kec. Purworejo Salatiga. Larva dan nyamuk Anopheles tidak ditemukan di daerah laguna Pantai Bande Alit Jember. Beberapa faktor yang menjadi penyebab diantaranya adalah tempat perindukan nyamuk pernah diberi ikan (1), laguna yang dekat tepi laut masih berhubungan dengan laut, sehingga terpengaruhi arus (2), masih turun hujan sehingga kondisi perairan laguna mengalami pasang surut yang tidak regular menyebabkan tidak memungkinkannya tempat tersebut digunakan sebagai tempat perindukan (3).

Sampling di laguna daerah Pantai Watudhodhol didapatkan banyak larva Anopheles (Gambar 2b dan 3a). Larva-larva tersebut kemudian di bawa ke laboratorium Mikrobiologi untuk dilakukan rearing skala Laboratorium (Gambar 3b).

Hasil identifikasi berdasarkan kunci identifikasi Reid (1968) pada nyamuk yang berhasil dibiakkan pada rearing skala Laboratorium, menunjukkan bahwa *A. sundaicus* tidak diketemukan pada daerah tersebut, namun demikian ditemukan keberadaan spesies spesies berikut: *A. barbitrosis*, *A. maculatus*, *A. vagus* dan *A. subpictus*. Berbeda dengan penelitian

Shinta *et al.* (2005) pada daerah yang sama, disamping spesies-spesies tersebut, dilaporkan juga ditemukan *A. sundaicus*, *A. flavirostris*, *A. anularis*, dan *A. indefinitus*. Namun demikian sampling yang mereka lakukan adalah *landing collection*, tidak mengembangkan dari larva nyamuknya. Spesies yang tidak ditemukan pada sampling kali ini tidak mengindikasikan ketidak beradaan spesies tersebut, tetapi dimungkinkan ketidak mampuan larva untuk aklimatisasi di laboratorium kami sehingga banyak larva yang mati sebelum berkembang menjadi pupa. Mempertimbangkan jumlah nyamuk yang dapat dikembangkan dalam skala Laboratorium ini sangat sedikit (hanya sekitar 5% dari total larva yang didapatkan), maka isolat *A. sundaicus* selanjutnya disampling dengan metode *landing collection* dari desa Pathuk, Kel. Purwodadi, Purworejo. Identifikasi dari nyamuk yang didapatkan dari sampling pada daerah tersebut menunjukkan bahwa 120 diantaranya merupakan spesies *A. sundaicus* betina.

Isolasi Kelenjar Saliva *A. sundaicus* (SG)

Isolasi awal kelenjar saliva (SG) *A. sundaicus* dilakukan di Laboratorium BPVRT Salatiga. Dari 120 *A. sundaicus* hasil sampling telah berhasil diisolasi 100 pasang SG dengan *microdissection* (Gambar 2). SG tersebut selanjutnya dibekukan dalam PBS dan disimpan di -20°C untuk pemrosesan selanjutnya.



Gambar1. Daerah sampling menggunakan dipper keberadaan larva nyamuk Anopheles
Dan pengambilan larva nyamuk Anopheles menggunakan pipet.

Karakterisasi Profil Protein Kelenjar Saliva *A.sundaicus*

Strategi lain telah dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan imunomodulator secara langsung pada profil protein SG *A. sunndaicus*. Profil protein dari *A. sunndaicus*, *A. maculatus*

dan *A. aconitus* diamati dengan menggunakan SDS PAGE. Ketiga spesies tersebut menunjukkan profil protein yang tidak jauh berbeda. Profil tersebut nampak sangat tipis pada gel hasil elektroforesis dimungkinkan karena jumlah sampel SG yang masih kurang (Gambar 6).

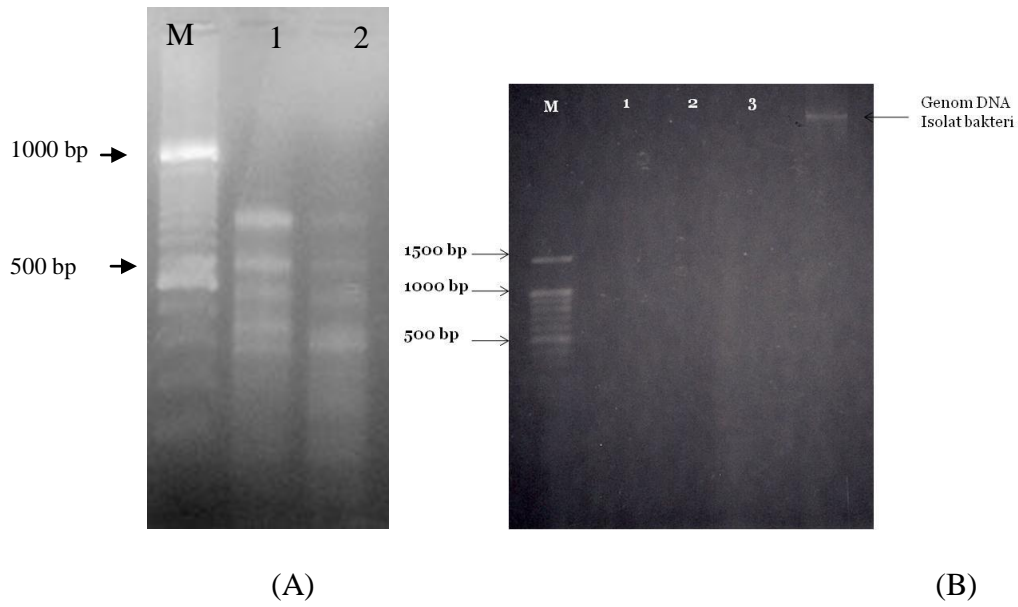


(A)



(B)

Gambar 2. Proses isolasi kelenjar saliva nyamuk *A. sunndaicus* dengan menggunakan mikroskop stereo di BPVRP Salatiga (A) kelenjar saliva nyamuk *A. sunndaicus* yang berhasil diisolasi (B) mikroskop stereo Nikon, perbesaran 8x (*cropping closed up*), kamera NOKIA N73).



Gambar 3. Hasil isolasi RNA dengan menggunakan *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (A) metode Trizol reagen, larutan ekstraksi sebelumnya diperlakukan dengan DEPC (B). Keterangan : M = marker 1= *A. maculatus* 2= *A. aconitus* 3= *A. sundaiacus*

Berat molekul dari protein-protein dari SG ketiga nyamuk *Anopheles* tersebut adalah antara 90-118 kDa dan 34 kDa. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Cornelia *et al* (2007) pada nyamuk *An. gambiae* yang berhasil mengisolasi sekitar 20 polipeptida dengan berat molekul 103, 94, 74, 62, 54, 49, 41, 39, 31, 30, 28, 26, 24, 16, 14, 13,5, dan 12 kDa. Dijelaskan pula pita protein yang memberikan hasil positif terhadap serum anak-anak yang tinggal di wilayah endemis pada reaksi imunoblot IgG adalah dengan berat molekul 175 dan 72 kDa. Hasil yang berbeda bisa didapatkan apabila penelitian ini dilanjutkan dengan reaksi imunoblotting. Keberadaan imunomodulator nantinya akan dideteksi dengan mereaksi silangkan profil protein tersebut dengan serum dari penderita malaria dengan metode Western Blot. Hanya pita-pita protein dengan berat molekul tertentu

yang menunjukkan respon positif terhadap serum penderita malaria yang kemudian diduga sebagai imunomodulator. Profil protein pada SG nyamuk *Anopheles* nampaknya dapat berbeda-beda pada spesies yang berbeda pula. Pada penelitian yang dilakukan oleh Jariyapan *et al* (2007) pada nyamuk *An. dirus B* menunjukkan profil protein dari SG yang berbeda, yaitu didapatkan pita-pita protein dengan berat molekul 63, 44, 43, 35, 33, 30 kDa.

Isolasi mRNA Kelenjar Saliva *A. sundaiacus*

Dua kali isolasi mRNA dari 40 pasang SG *A. sundaiacus* dengan menggunakan *Micro-FastTrack mRNA isolation kit* (Invitrogen, San Diego, CA, USA) menunjukkan hasil yang negatif dengan A260 mendekati 0 (0,0001) (Gambar 3a). Selanjutnya karena keterbatasan SG dari *A. sundaiacus* yang tersedia, maka optimasi isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan SG dari *A.*

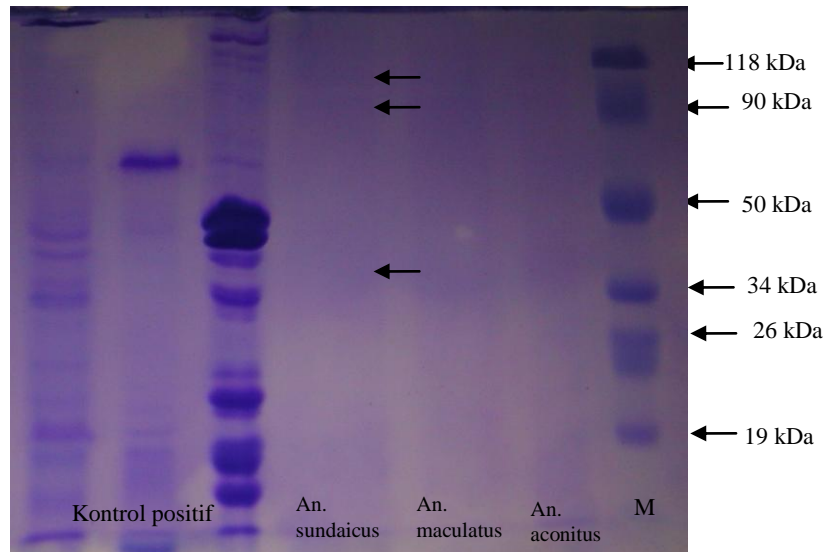
maculatus dan *A. aconitus* hasil rearing skala Laboratorium di BPVRT Salatiga. Optimasi dengan menggunakan SG tersebut dengan metode yang sama masih menunjukkan hasil yang negatif. Selanjutnya digunakan metode isolasi RNA dengan metode lainnya yaitu menggunakan reagen Trizol (e.g. Calvo *et al.* 2006, 2009).

Perubahan lainnya yang dilakukan juga adalah penambahan DEPC pada PBS. Sterilisasi dengan autoklav tidak menjamin bahwa RNase seluruhnya bisa inaktif. Penambahan DEPC akan meningkatkan inaktivasi RNase. DEPC akan bereaksi dengan gugus amina, hidroksi dan thiol pada protein sehingga dapat menginaktivasi RNase dan enzim lainnya (Bédad & Jarvis 2005). Namun demikian DEPC harus segera di keluarkan dari reaksi dengan cara autoklav sekitar 15 menit karena dapat mengurangi efisiensi isolasi RNA karena dapat memodifikasi residu purin pada RNA melalui karboksi metilasi (Qiagen 2009). Dengan menggunakan reagen Trizol dan treatment menggunakan DEPC inilah, RNA total berhasil diisolasi dari 250 pasang SG *A. maculatus* dan *A. aconitus*. Konsentrasi RNA dengan pengukuran secara spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm adalah 0,824 µg/µl untuk *A. aconitus* dan 0,832 µg/µl untuk *A. maculatus*. Oleh karena keterbatasan SG *A.*

sundaicus, maka sampai saat ini masih belum dilakukan isolasi RNA dari spesies tersebut. Awal Januari direncanakan akan melakukan *Landing collection* kembali untuk mendapatkan *A. sundaicus* dan mengisolasi SG sebanyak banyaknya sehingga mendapatkan jumlah SG yang cukup. Telah dilakukan *first strand synthesis* of ss DNA dan Long Distance PCR pada RNA *A. aconitus* dan *A. maculatus* hasil isolasi tersebut sesuai dengan manual pada *SMART cDNA library construction kit*. Pada tahap ini menunjukkan signal yang positif, saat ini hasil 2 tahap pembuatan pustakan cDNA disimpan dalam -20°C untuk perlakuan selanjutnya.

KESIMPULAN

Telah berhasil dilakukan isolasi *salivary gland* (SG) dari *A. sundaicus*. SG kemudian diekstraksi untuk mendapatkan RNA sebagai templat untuk pembuatan pustaka cDNA SG *A. sundaicus*. SDS didapatkan pita-pita protein dengan berat molekul antara 90-118 kDa dan 34 kDa. Isolasi RNA belum menunjukkan signal positif dimungkinkan karena jumlah sampel SG yang terbatas, namun demikian isolasi RNA dari spesies Anopheles lainnya berhasil dilakukan dengan menggunakan metode Trizol dan DEPC.



Gambar 4. Profil protein SG Anopheles pada SDS PAGE 12 %, keterangan : tanda panah dalam gambar menunjukkan profil protein SG An.sudaicus

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade, B.B, Teixeira, C.R., Barral, A., Barral-Netto, M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc.* 77(4), 665-693.
- Belnaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks D.L. 1998. Development of natural models of cutaneous Leishmaniasis: powerful effect of vector saliva and saliva preexposure on the long term outcome of Leishmaniasis Major infection the mouse ear dermis. *J Exp Med.* 188: 1941-1953.
- Carter, R. 2001. Transmission Blocking Malaria Vaccine. *Vaccine* 19: 2309-2314.
- Cornelie S et al. 2007. An Insight Immunogenic Salivary Protein of *Anopheles gambiae* in African Children. *Malaria Journal*, 6:75.
- Dachlan, Y.P. 2004. Resistancy Problem of malaria and Drug Efficacy in Purnomo, B.B. et al (Ed). *Proc Third Basic molecular Biology Course on Infectious Disease*, Universitas Brawijaya, Malang.
- Departemen Kesehatan. 2007.
- Donovan, M.J., Messmore, A.S., Scrafford, D.A., Lacks, D.L., Kamhawi, S., McDowell, M.A. 2007. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with Malaria parasite. *Infection and Immunity.* 75(5) : 2523-2530.
- Harijanto, P.N. 2003. Manifestasi Klinis Malaria Berat, Makalah dalam Kursus

- Malaria 2003, Kongres nasional PETRI IX, Manado, 9-11 Agustus 2003.
- Jariyapan n et al. 2007. Salivary Gland Protein of Human Malaria vector *Anopheles dirus B* (Diptera Culicidae). *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo*. 49(1): 5-10.
- 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.
- Laihad, F.J. 2003. Epidemiologi Resistensi Malaria di Indonesia, Makalah dalam Kursus Malaria 2003, Kongres nasional PETRI IX, Manado, 9-11 Agustus 2003.
- Lavazec,c., Boudin, C., Lacroix,R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R., Bourgomin, C. 2007. Carboxypeptidase B of *Anopheles gambiae* Target for a *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*, 75(4) : 1635-1642.
- Lou,J., Lucas,R., Graw G.E. 2001. Pathogenesis of Cerebral Malaria : Recent Experimental Data and possible Application for Human. *Clinical Microbiology reviews*, 14(4): 810-820.
- Peng, Z. and Simons, F.E. 2004. Mosquito Allergy: Immune mechanism and recombinant salivary allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 133: 198-209.
- Ribeiro, J.M., and Francischetti, I.M. 2003. Roelof Arthropod Saliva in Blood feeding: sialome and post-sialome perspective. *Ann. Rev. Entomol*. 48:73-78.
- Schneider, B.S., Soony, L., Ziednen, N.S., andHiggs, S. 2004. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunol*. 17: 565-573.
- Shinta, Sukowati S., Mardiana. 2005. Komposisi Spesies dan Dominasi Spesies Nyamuk *Anopheles* di Daerah Pantai Banyuwangi, Jawa Timur. [www.litbang .depkes.go.id/media](http://www.litbang.depkes.go.id/media) (11 Desember 2009).
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia, Z.S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 28: 131-141.
- World Health Organization. 2005. World Malaria Report. <http://rbm.who.int/wmr 2005>. Diakses 17 Mei 2008.



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that

Yunita Armiyanti

has participated as

PRESENTER

in 2nd International Conference on **Bioscience and Biotechnology**

PAVE THE WAY FOR A BETTER LIFE

23 - 24 September 2010

Bali, Indonesia

organized by Udayana University



[Signature]
Prof. Dr. dr. L Mude Bakta, Sp.PD (KH OM)
Rector of Udayana University



[Signature]
Dr. Yan Ramona
Head of Organising Committee