

**RESPON ANTIBODI MANUSIA TERHADAP PROTEIN SALIVARY GLAND (SG)  
*Aedes aegypti* BERPOTENSI SEBAGAI INDIKATOR RESISTENSI  
TERHADAP DEMAM BERDARAH (DBD)**

**(Natural Human Immune Response to Salivary Gland Proteins of *Aedes aegypti* as Resistance Indicator Against Dengue Fever)**

**Rike Oktarianti<sup>1</sup>, Syubbanul Wathon<sup>2</sup>, Dwi Esti F<sup>3</sup> Kartika Senjarini<sup>4</sup>**

<sup>1 & 4</sup> Researcher and Lecturer at Biology Department-Mathematics and Natural Sciences Faculty-  
University of Jember

<sup>2&3</sup> Student at Biology Department-Mathematics and Natural Sciences Faculty-University of Jember  
Corresponding author: [rike\\_oktarianti@yahoo.com](mailto:rike_oktarianti@yahoo.com)

**ABSTRACT**

Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) is an acute Flavivirus infection transmitted by several species of *Aedes* mosquitoes, e.g. *Aedes aegypti*. During blood feeding, arthropod vectors inject saliva into vertebrate hosts. The saliva is biochemically complex and pharmacologically active, and may play an important role in pathogen transmission. The aim of this research is to distinguish immune response from healthy people in endemic and non-endemic region, and dengue patients as well. To examine whether mosquito saliva could elicit humoral immune response in humans under natural conditions, we have collected plasma from dengue patients, healthy villagers, and people from a non-dengue region around Jember (East Java). This study was a part of the project approved by the Ethical Committee of Medical Faculty of Jember University for the human subject protocol. All participants gave written, informed consent before entering the study. SDS-PAGE analysis was performed to profile the protein contents of the salivary glands from *Ae. aegypti*, which revealed a number of proteins with molecular weight ranged from ~28 to  $\geq 142$  kDa. To identify which proteins of the salivary glands are immunogenic in eliciting antibody responses in humans, we analyzed the salivary gland extracts of female *Ae. aegypti* by Western Blot with human plasma. Here we have demonstrated that anti-dengue salivary protein antibodies occurred predominantly in healthy people from endemic region which revealed a specific protein with molecular weight ~ 37 kDa, whereas people from a non-dengue region had no such antibodies. These immunogenic salivary protein may serve well as an indicator of immune response in human. Furthermore, these protein may be excellent candidates for the development of dengue vaccine. Therefore, the extend molecular activity and identification of ~ 37 kDa protein should be further investigated.

Key words: Immune Response, Salivary Gland, *Aedes aegypti*, Dengue Haemorrhagic Fever

## PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit yang ditularkan oleh vektor serangga dengan vektor utamanya adalah *Aedes aegypti*. Penyakit ini menyebabkan kematian sekitar 1,5 juta manusia setiap tahunnya (Hill *et al.* 2005). Selain menyebabkan mortalitas juga morbiditas, akibat infeksi penyakit tersebut menyebabkan kerugian ekonomi yang besar terutama pada negara-negara berkembang (Coutinho-Abreu & Ramalho-Ortigao, 2010). Kasus demam berdarah dengue (demam dengue/DBD) telah berkembang secara drastis, dan dua perlima dari populasi manusia dunia beresiko terkena infeksi dengue, dengan peningkatan jumlah kasus pertahun. Virus ini sekarang endemik di lebih dari 100 negara di daerah tropis dan subtropis, seperti Asia Tenggara dan Pasifik Barat (WHO, 2009; Simasathien dan Watanaveeradej, 2005; Gubler dan Meltzer, 1999).

Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan oleh virus Dengue (DENV) yang meliputi 4 serotipe yaitu DENV1, DENV2, DENV3 dan DEN4. Virus ini termasuk dalam virus RNA genus Flavivirus, familia Flaviviridae (Whitehead *et al.*, 2007; Edelman, 2007; Murell *et al.*, 2011). Transmisi virus dengue ke host manusia terjadi pada saat nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina melakukan *blood feeding*. *Blood feeding* tersebut dilakukan oleh nyamuk betina selain untuk memperoleh nutrisi, juga untuk perkembangan telur dalam menyelesaikan siklus gonotropiknya (Gubler, 1998). Vertebrata sebagai host mempunyai 3 sistem yang berperan dalam menghambat proses *blood feeding* yaitu haemostasis, inflamasi dan imunitas. Haemostasis merupakan respon inang untuk mengontrol kehilangan darah akibat gigitan vektor dengan mekanisme agregasi trombosit, koagulasi darah dan vasokonstriksi. Inflamasi merupakan respon inang akibat kerusakan jaringan, ditandai dengan rasa nyeri, kemerahan dan timbulnya panas. Kemerahan dan timbulnya panas terjadi akibat adanya vasodilatasi. Respon imun inang berkaitan dengan adanya paparan antigen asing dalam interaksi antara vektor dan inang sekaligus transmisi virus yang dibawa melalui respon imun spesifik dan non-spesifik (Ribeiro & Francischetti, 2003). Sebagai “*counter-attack*” terhadap mekanisme inang vertebrata dalam menghambat *blood feeding*, *Salivary Gland* (SG) vektor artropoda memiliki peranan yang sangat penting. SG vektor arthropoda berpotensi kuat menghambat hemostasis inang vertebrata melalui proses anti koagulasi untuk menghambat vasokonstriksi (vasodilator), mengandung molekul spesifik (imunomodulator) yang berfungsi sebagai faktor anti inflamasi dan dapat menginduksi respon imun inang yang dapat berupa respon alergi yang diwujudkan oleh rasa gatal di kulit dan kemerahan di lokasi gigitan. (Andrade *et al.*, 2005; Tangamani & Wikel, 2009; Fontaine *et al.*, 2011). Adanya komponen vasodilator dan imunomodulator pada SG “dimanfaatkan” oleh pathogen untuk

meningkatkan infektivitas mereka di host vertebrata khususnya manusia (Nuttall *et al*, 2000; Rohousova & Volf, 2006).

Dengan melihat potensi saliva atau SG vektor dalam meningkatkan transmisi pathogen ke inang, maka banyak peneliti telah melakukan identifikasi dan karakterisasi terhadap beberapa molekul yang terkandung di dalam SG vektor arthropoda (Andrade *et al*, 2005). Pada dekade terakhir, studi transcriptomes telah mengalami peningkatan, dan telah dipelajari tentang *salivary transcriptomes* dan *proteomik* dari sejumlah vektor artropoda (King *et al*, 2011). Dari analisis *transcriptome* dan *proteomik* protein SG diduga beberapa kandidat telah diidentifikasi sebagai protein potensial yang memiliki aktivitas imunogenik yaitu SGS1 (387 kDa) pada *Ae aegypti* (King *et al*, 2011). Hasil penelitian Ribeiro *et al*. 2007, dengan mass spectrometri berhasil diidentifikasi 24 protein, antara lain : apyrase, serpin 1 dan 2, protein D7, adenosin deaminase (ADA), serin protease, amylase, actin, purin nucleosidase, lectin. Dengan pendekatan yang sama Almeras *et al* (2010) telah mengidentifikasi 120 jenis protein SG *Ae. aegypti* dan 15 jenis berhasil diidentifikasi sebagai protein sekretoris yang terlibat dalam proses *blood feeding*. Beberapa protein sekretoris telah dideskripsikan sebagai protein yang dapat memodulasi respon imun adalah protein anggota dari kelompok D7 (37kDa), adenosin deaminase (ADA), purin hydrosilase, apyrase (68kDa),  $\alpha$ -glukosidase (67 kDa), 30 kDa allergen (Peng & Simons, 2004).

Oleh karena saliva atau SG sangat berperan dan merupakan faktor penentu dalam meningkatkan transmisi pathogen dari vektor arthropoda ke inang manusia, maka melakukan penelitian tentang “Respon antibodi manusia terhadap komponen protein SG vektor *Ae. aegypti* berpotensi sebagai indikator resistensi terhadap Demam Berdarah Dengue (DBD)” merupakan langkah awal untuk mengetahui potensi SG *Ae. aegypti* sebagai kandidat target pengembangan vaksin berbasis vektor dalam menghambat transmisi pathogen ke manusia untuk melawan Dengue.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Rearing *Ae. aegypti*, Isolasi SG dan Preparasi sampel Protein SG**

Rearing nyamuk *Ae. aegypti* dilakukan di dalam ruang insektarium bersuhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  (suhu ruang). Identifikasi spesies dan jenis kelamin terhadap nyamuk dewasa dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan pembiusan dengan menggunakan *chloroform*. Isolasi SG *Ae. Aegypti* betina secara *microdissection* menggunakan jarum serangga diatas gelas benda steril ditetaskan 50 $\mu\text{L}$  NaCl 0.5%. SG sejumlah 75 pasang hasil isolasi dikumpulkan dalam eppendorf steril yang telah berisi 100  $\mu\text{L}$  PMSF dalam PBS. SG dihomogenisasi dengan

*micropistile*, divortex dan dilakukan spin sebanyak 3 kali kemudian disimpan sebagai stok protein pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Isolasi Plasma Darah**

*Ethical clearance* dan *inform consent* untuk pelaksanaan penelitian telah disetujui oleh komisi etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sampel darah manusia diambil dari penduduk sehat wilayah endemik DBD, sehat dari wilayah non endemik, dan dari penderita DBD. Pengambilan sampel darah dilakukan dari pembuluh vena cubiti di lengan, sebanyak 10 ml untuk penduduk yang sehat baik dari wilayah endemik maupun non endemik, sedangkan bagi penderita DBD sebanyak 3 ml. Darah ditampung dalam vacultainer yang sudah diberi anti-koagulan, disentrifuge 3200 rpm 10', supernatannya merupakan plasma darah.

### **Analisis SDS Page**

Sampel protein dirunning dengan analisis *SDS-PAGE* menggunakan *Separating Gel* 12% (akril/ bis akril 40%, 1,5 M Tris HCL pH 8,8, 10% SDS, H<sub>2</sub>O steril, 10% APS dan TEMED) (b/v) dan *Stacking Gel* 4% (akril/ bis akril 40%, 0,5 M Tris HCL pH 6,8, 10% SDS, H<sub>2</sub>O steril, 10% APS dan TEMED) (b/v).

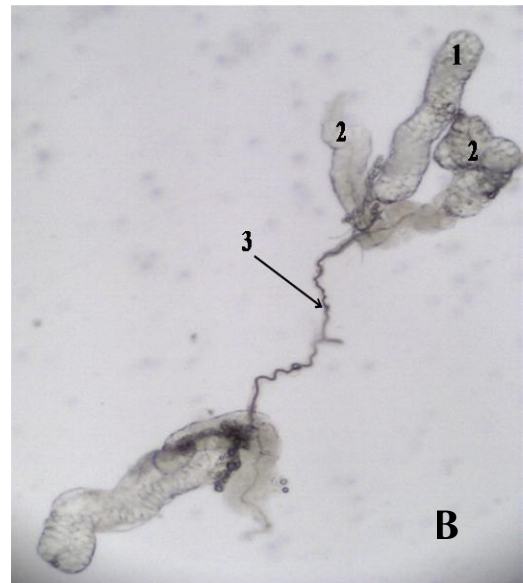
### **Analisis Western Blot**

Analisis *Western Blot* dilakukan untuk melihat hasil reaksi silang antara antigen vektor berupa protein SG *Ae. aegypti* dengan antibodi dari plasma orang sehat dari daerah endemik DBD, sehat dari daerah non endemik serta dari penderita DBD.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Isolasi SG *Ae. aegypti***

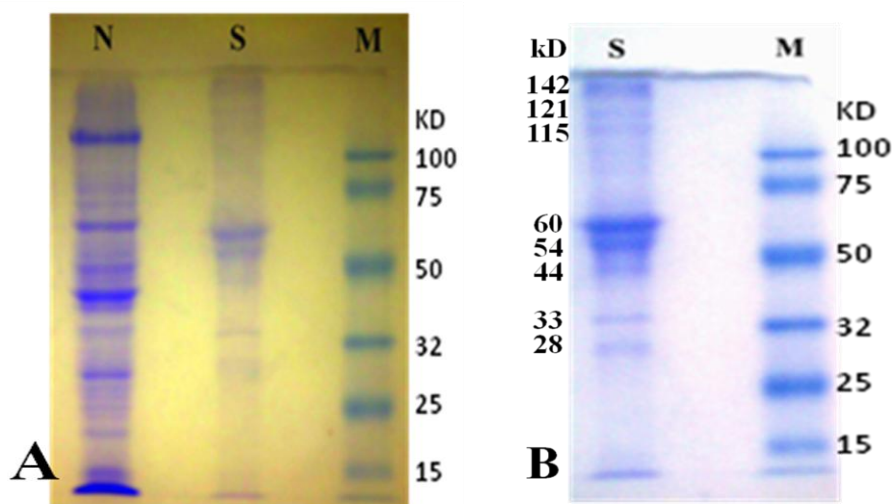
Struktur SG berpasangan, pada yang betina ukurannya lebih besar. Setiap SG terdiri atas 3 lobus (gambar 1B), dua di lateral dan satu buah di median. Lobus median dan distal-lateral mengekspresikan gen yang produk protein berupa apyrase, antikoagulan dan vasodilator yang berperan dalam haematophagi ( Arcá *et al.*, 1999).



gambar 1. (A) Nyamuk *Ae. aegypti*, betina (a) dan jantan (b), perbedaan jelas dapat dilihat pada antena (B) salivary gland *Ae. aegypti* betina, masing-masing SG terdiri atas 3 lobus [(1) lobus medial; (2&3) lobus lateral; (3) ductus salivarius] (stereo microscopy Nikon, perbesaran 8x)

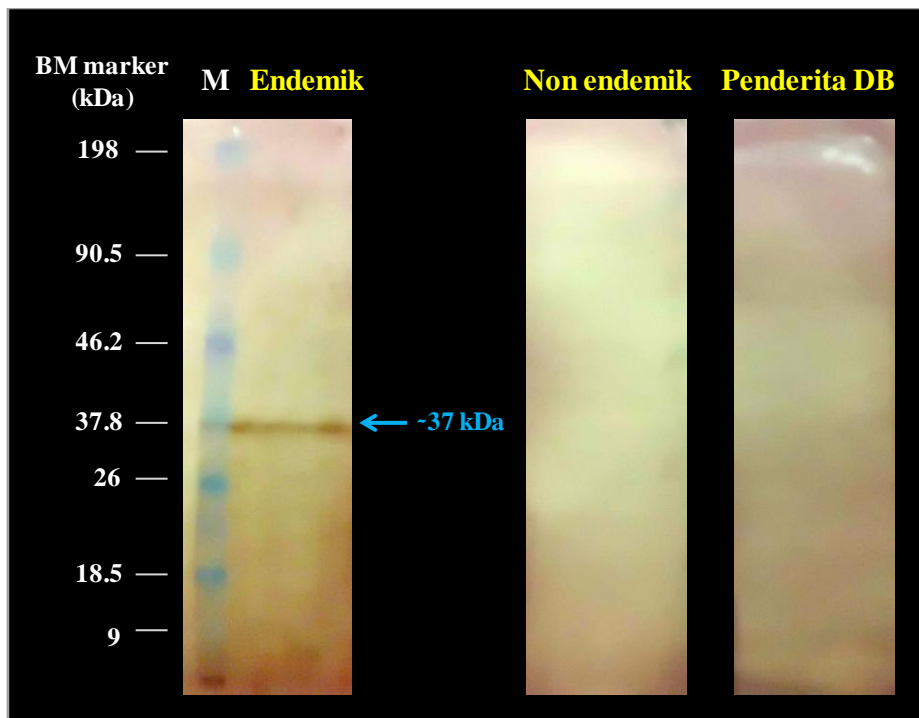
### Analisis SDS Page dan Western Blot

Hasil elektroforesis SDS-PAGE terhadap protein SG *Ae. aegypti* dan ekstrak protein seluruh tubuh nyamuk menunjukkan adanya perbedaan profil protein. Hasil identifikasi menunjukkan terdapat beberapa protein SG *Ae. aegypti* dengan berat molekul ~ 142, 121, 115, 60, 54, 44, 33, 28 kDa (gambar 2). Protein yang terkandung dalam SG tersebut selain merupakan protein yang terdapat pada lamina basal (sel epithelium SG) juga protein sekresi saliva (Lormeau, 2009).



Gambar 2. Profil protein dari ekstrak SG *Ae. aegypti* (S), dan profil protein ekstrak seluruh tubuh nyamuk (N). M: marker (A). hasil isolasi 25 pasang SG *Ae. aegypti* dan (B). hasil isolasi dari 50 pasang SG *Ae. aegypti*

Hasil *Western Blot* untuk melihat reaksi silang antara protein SG *Ae. aegypti* dengan plasma darah sampel orang sehat dari wilayah endemik dan non endemik serta plasma penderita DBD ditunjukkan pada gambar 3. Dari hasil *Western Blot* tersebut nampak jelas bahwa sampel yang menunjukkan reaksi silang positif ditunjukkan dengan munculnya pita, merupakan sampel dari plasma darah orang sehat dari wilayah endemik. Hal ini menunjukkan bahwa pada orang sehat yang tinggal di wilayah endemik mempunyai protein spesifik yang diduga berkaitan dengan resistensi mereka terhadap virus dengue karena protein tersebut tidak dijumpai pada pasien DBD maupun sehat non endemik. Protein spesifik ini merupakan protein SG yang dikenali oleh antibodi yang terbentuk pada orang tersebut akibat sering terpapar oleh saliva yang membawa virus dengue karena tinggal di wilayah endemik. Pengembangan resistensi alami penduduk daerah endemik akibat seringnya terpapar saliva yang mengandung patogen dilaporkan pertama kali dalam kasus leishmaniasis oleh Davies & Gavani (1999). Lebih lanjut, pendapat ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Kamhawi *et al.* (2000) menunjukkan bahwa gigitan berulang dari *Phlebotomus* yang tidak terinfeksi dapat menyebabkan resistensi terhadap *Leishmania major* karena adanya peningkatan sitokin-sitokin yang berkaitan dengan imunitas seluler. Gigitan nyamuk juga memberikan efek yang sama pada hewan coba melalui modulasi respon sistemik sitokin-sitokin pada hospes (Schneider *et al.* 2004). Beberapa penelitian berikutnya membuktikan bahwa gigitan vektor memberikan pengaruh positif terhadap reaksi imun inang. Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan Donovan *et al.* (2007) yang menunjukkan bahwa pada inang (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.



Gambar 3. Hasil *Western blot* menunjukkan satu band protein SG *Ae. aegypti* (~37 kDa) tampak pada membran yang diinkubasi dengan plasma darah orang sehat dari wilayah endemik sedangkan membran yang diinkubasi dengan plasma darah orang sehat non endemik dan penderita DB tidak nampak band protein; (M) Marker.

Protein spesifik yang terdeteksi dari hasil *Western Blot* (gambar 3) yang diduga berkaitan dengan resistensi mereka terhadap virus dengue karena protein tersebut hanya dijumpai pada orang sehat dari wilayah endemik menunjukkan berat molekul ~ 37 kDa. Protein tersebut diduga termasuk dalam kelompok protein D7, hal ini didukung oleh hasil penelitian Almeras *et al* (2010) telah mengidentifikasi 120 jenis protein SG *Ae. aegypti* dan 15 jenis berhasil diidentifikasi sebagai protein sekretoris yang terlibat dalam proses *blood feeding*, beberapa diantara protein tersebut telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Beberapa protein sekretoris telah dideskripsikan sebagai protein yang dapat memodulasi respon imun adalah anggota dari kelompok D7 protein, adenosin deaminase (ADA), purin hydrosilase, apyrase, 30 kDa allergen. Protein saliva *Ae. aegypti* yang sudah berhasil diidentifikasi sebagai allergen sedikitnya ada 8 macam, antara lain protein apyrase (68 kDa),  $\alpha$ -glukosidase (67 kDa), protein D7 (37 kDa), protein 30 kDa (Peng & Simons, 2004). Kelompok D7 protein merupakan protein sekretoris, pertama kali dilaporkan ada pada SG *Ae. aegypti* dan pada hampir semua spesies nyamuk pada tahun 1991 (James *et al.* 1991). Protein D7 ini berkerabat dengan kelompok odorant-binding protein (OBP) (Valenzuela *et al.*, 2002). D7 protein berkaitan dan berperan dalam menghambat aksi amina biogenik seperti serotonin,

histamin, norepinephrine yang bertanggung jawab dalam proses *blood feeding* (Calvo *et al*, 2006). Pada orang sehat endemik terbentuknya antibodi terhadap protein spesifik ~ 37 kDa SG *Ae. aegypti*, diduga menyebabkan resistensinya terhadap infeksi virus Dengue. Hal ini karena saliva berperan penting dalam transmisi patogen yang dibawanya (Titus *et al*, 2006) Oleh karena itu jika dikembangkan anti terhadap protein spesifik ~ 37 kDa SG *Ae. aegypti* (immunomodulator putatif), dapat merupakan langkah penting untuk memblokir transmisi dan infeksi virus dengue sehingga merupakan kandidat target potensial untuk pengembangan TBV (Titus *et al*, 2006). Oleh karena itu, identifikasi molekuler lanjutan dan uji aktivitas terhadap protein spesifik ~ 37 kDa perlu dilakukan.

## KESIMPULAN

Profil protein SG *Ae. aegypti* dan ekstrak protein seluruh tubuh nyamuk menunjukkan adanya perbedaan. Hasil identifikasi menunjukkan adanya beberapa protein SG *Ae. aegypti* dengan berat molekul ~ > 142, 121, 115, 60, 54, 44, 33, 28 kDa. Respon antibodi terhadap protein SG *Ae. aegypti* berupa protein spesifik ~ 37 kDa ditemukan pada plasma orang sehat dari wilayah endemik.

## DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Arcá, B., Lombardo, F., de Lara Capurro Guimarães, M., della Torre, A., Dimopoulos, G., James, A. A. and Coluzzi, M. 1999. Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1516-1521.
- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM, 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem*. Vol 281 : 4 : 1935-1942
- Coutinho - Abreu I. & Ramalho - Ortigao M. 2010. Transmission Blocking Vaccines to Control Insect-Borne Diseases - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 105 (1).
- 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



- Gomes R.B., Brodskyn C., De Oliviera CI, 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.
- Gubler DJ. 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 4: 442-450.
- Gubler DJ, Meltzer M. 1999. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res*: 5 : 35–70.
- Hill CA, Kafatos FC, Stansfield SK, Collins FH 2005. Arthropodborne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol* 3: 262-268.
- James AA, Blackmer K, Marinotti O, Ghosh CR, Racioppi JV, 1991. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol.* 44: 245-254.
- 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
- Lormeau, VMC, 2009. Dengue viruses binding protein from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary gland. *Virology Journal* (6) :35 ; 1-4
- 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.
- Peng Z & Simons FER, 2004. Mosquito allergy : immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 133 : 198-209
- Ribeiro JM, 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, PhanVM, Chandra PK, & Wikel SK. 2007. An Annotated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 8:6
- Rohousova I, Volf P. 2006. Sand fly saliva effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol (Praha).* 53:161-171.
- Simasathien S, Watanaveeradej V. 2005. Dengue vaccine. *J Med Assoc Thai* . 88(Suppl 3): S363–77.
- Schneider B, Soong L, Zeidner N, Higgs S. 2004. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokine responses to Sindbis virus infection. *Viral Immunology.* vol.17 : 4 : 565-573
- Tangamani S, Wikel S. 2009. Differential expression *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. *Parasites & Vectors* 2 : 34
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia, J.S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology.* 28: 131-141.
- 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.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 5(7): 518–28.

World Health Organization. Vector-borne viral infections: dengue fever [online]. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/vector/en/index1.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/vector/en/index1.html) (diakses 17 Maret 2009).