

Identifikasi Protein Immunogenik Kelenjar Saliva Vektor Malaria *Anopheles vagus* Berdasarkan Analisis Mass Spectrometry

Identification of Immunogenic Salivary Proteins of Anopheles vagus based on Mass Spectrometry Analysis

Dwi Esti Febriyantiningasih^{*}, Kartika Senjarini, Rike Oktarianti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)

^{*}E-mail: dwiesti.febriyantiningasih@gmail.com

ABSTRACT

Malaria has been prevalent for a long time in tropical developing regions causing great morbidity and mortality. Among the malaria vectors, *Anopheles vagus* has been known as secondary malaria vector in East Java. Salivary glands of mosquitoes perform various functions for survival of the vectors and also conducive for blood feeding, harbouring of malaria parasites, and eventual parasite transmission. The salivary gland proteomes of *An. vagus* have not been carried out yet. The aim of our study was to identify and characterize the immunogenic proteins of salivary glands proteins of *An. vagus*. A proteomic approach combining one-dimensional electrophoresis (1DE) followed by western blot analysis using human sera from healthy people living in an endemic area (Kendal); liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) and bioinformatic analysis was adopted to provide the first direct insight into identification and characterization of salivary proteins of *An. vagus*. Identification of immunogenic proteins using western blot analysis has revealed three immunogenic bands which had molecular weights of 69, 75 and 232 kDa. Among those proteins analysed by LC-MS/MS, there were alpha,1-4 glucan phosphorylase, putative myosin class I heavy chain which have the highest number of total spectrum count peptide. Other proteins like vitellogenin and heat shock protein 82 (Hsp82) were also identified. The majority of proteins were scrutinized marked for their role in metabolism, cytoskeleton protein and stress response.

Keywords: *anopheles vagus*, salivary gland, immunogenic, proteomics

PENDAHULUAN

Malaria telah menjadi prevalensi sejak lama yang menyebabkan kematian serta morbiditas yang tinggi. Menurut laporan yang dikeluarkan oleh WHO pada tahun 2013 diperkirakan sebanyak 3,4 miliar manusia beresiko terjangkit malaria dan 207 juta kasus diantaranya telah menjadi kasus global (WHO, 2013). Diantara beberapa vektor malaria yang ditemukan pada wilayah Indo-Pakistan, *Anopheles aconitus* menjadi vektor primer dalam penyebaran penyakit malaria di pulau Jawa, diikuti oleh vektor *Anopheles maculatus*, *An. sundaicus* dan *Anopheles vagus* (Kirnowardoyo *et al.*, 1985; Kirnowardoyo dan Supalin, 1986).

Saliva vektor *Arthropoda* mengandung bahan yang bersifat imunogenik yang dapat menghambat hemostatis, vasokonstriksi, menghambat inflamasi serta respon imun inang (Ribeiro, 1995; Billingsley *et al.*, 2006; Ribeiro dan Arca, 2009; Ribeiro dan Francischetti, 2003; Cornelie *et al.*, 2007; Remoue *et al.*, 2006; Londono-Renteria *et al.*, 2010; Orlandi

et al., 2007) sehingga dapat dimanfaatkan sebagai vaksin yang dapat menghambat transmisi (*Transmission Blocking Vaccine*) (Lavazec *et al.*, 2007).

Karakterisasi dan identifikasi substansi dalam kelenjar saliva *Arthropoda*, khususnya *Anopheles* telah banyak dilakukan baik secara *transcriptomic* (Francischetti *et al.*, 2002; Arca *et al.*, 2005), maupun secara *proteomic* (Peng *et al.*, 1998; Lawson *et al.*, 2007), namun sebagian besar hanya dilakukan pada vektor primer yang dianggap penting dalam proses transmisi parasit malaria, misalnya *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. albimanus*, *An. darlingi* (Fontaine *et al.*, 2012), *An. barbirostris* (Phattanawiboon *et al.*, 2014) dengan wilayah penyebaran meliputi benua Afrika, daerah Timur Tengah, subkontinen India, Amerika Selatan (VectorBase, 2015). Di wilayah Asia Tenggara seperti Indonesia, yang menjadi vektor primer adalah *An. aconitus* dan *An. maculatus*, diikuti oleh *An. sundaicus* dan *An. vagus* sebagai vektor sekunder (Elyazar *et al.*, 2013).

Sejauh ini, penelitian TBV (*Transmission Blocking Vaccine*) oleh tim riset FMIPA-Universitas Jember untuk penyakit malaria telah dilakukan pada tiga vektor yaitu *An. aconitus*, *An. maculatus*, dan *An. sudaicus* baik secara serologis, bionomik, transkriptomik, dan proteomik (Senjarini, 2013; Armiyanti, 2015), sedangkan untuk *dengue*, penelitian dilakukan pada vektor utama yaitu *Aedes aegypti* (Oktarianti, 2015). Sementara *An. vagus* yang tidak dianggap sebagai vektor penting pada penularan parasit malaria, belum banyak diungkap, padahal pada kondisi tertentu nyamuk ini diketahui menjadi salah satu vektor penyebar parasit Plasmodium, bahkan parasit *Wuchereria bancrofti* penyebab kaki gajah pada manusia (Manguin *et al.*, 2010).

Jika substansi dalam kelenjar saliva nyamuk yang bersifat imunogenik mampu berperan sebagai immunomodulator, maka isolasi dan karakterisasi komponen tersebut penting dilakukan sebagai informasi awal dan basis bagi pengembangan metode untuk mengendalikan atau bahkan menghambat transmisi dan perkembangan parasit yang dibawa oleh nyamuk. Karakterisasi dilakukan dengan analisis *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Mei 2016 di Laboratorium Bioteknologi FMIPA UNEJ dan *Core Facility Proteomics University Medical Center, Göttingen-Germany*.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan: seperangkat alat SDS-PAGE, seperangkat alat *Western Blot* (WB) *semi-dry*, eppendorf, mikropipet, mikrotip, *magnetic stirrer*, jarum serangga, mikroskop stereo, penangas air, kertas Whatman 70 mm, membran PVDF (*Polyvinylidene difluoride*).

Bahan-bahan yang digunakan: nyamuk *Anopheles vagus*, NaCl 0,5%, PMSF dalam PBS, akril/bis-akrilamid 30% (29,2 gr akrilamid; 0,8 gr bis akrilamid), buffer elektroda 1x (3 gr Trisma base; 14,4 gr Glycine; 1 gr SDS), buffer sampel 5x (0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 5 ml 50% Glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml 2-mercaptoethanol; 1 ml 1 % Bromo Phenol Blue; 0,9 ml H₂O), *Staining solution* (1 gr Coomassie Blue R-250; 450 ml Methanol; 450 ml H₂O; 100 ml *Glacial Acetic Acid*); *Destaining solution* (100 ml Methanol; 100 ml *Glacial Acetic Acid*; 800 ml H₂O), APS 10%, TEMED, TBS pH 7,4 (8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 3 gr Trisma base), Transfer Buffer (3,034 gr Trisma base; 1,44 gr Glycine; 200 ml methanol), NBT/BCIP

(ScyTek Laboratories Inc.), ladder protein pre-stain (INTRON), 5% skimmed milk dalam TBS (w/v), serum darah manusia (sehat endemik malaria).

Prosedur Penelitian

Koleksi nyamuk *An. vagus* dan Isolasi Kelenjar Saliva

Anopheles vagus yang digunakan merupakan hasil *landing collection* dari Kendal, Jawa Tengah. Nyamuk dewasa hasil tangkapan dimasukkan dalam *paper cup* dengan sumbat kain kassa di bagian atas. Isolasi kelenjar saliva nyamuk dilakukan berdasarkan metode dari Barber dan Rice (1936). Nyamuk betina dewasa dilemahkan dengan memasukkannya pada *freezer* selama 1 menit, kemudian diletakkan di atas gelas benda yang ditetesi larutan garam fisiologis (NaCl 0,5%) dengan bagian kepala berada di sisi kanan gelas benda. Selanjutnya kepala ditarik secara perlahan menggunakan jarum diseksi hingga terlepas dari bagian badan dengan posisi jarum diseksi di sebelah kiri menekan bagian thorax nyamuk. Kelenjar saliva yang melekat pada bagian kepala nyamuk dipisahkan dan dimasukkan dalam eppendorf berisi larutan PBS-PMSF. Kelenjar saliva yang telah diisolasi disimpan dalam suhu -20°C hingga diperlukan.

Analisis SDS-PAGE (1 dimensi) dan *Western Blot*

Metode SDS-PAGE dilaksanakan berdasarkan prosedur dari Laemmli (1970) dengan sedikit modifikasi. Sampel protein dianalisis pada gel akrilamid 12,5%. Elektrofesis dilakukan selama 2 jam pada tegangan konstan 120 V. Gel hasil elektrofesis kemudian diwarnai menggunakan larutan Commassie Brilliant Blue R-250.

Analisis *Western Blot* dilakukan berdasarkan metode dari Harlow dan Lane (1999) dengan beberapa modifikasi. Pita protein hasil SDS-PAGE ditransfer pada membran PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) selama 1 jam pada temperatur ruang dan tegangan konstan 100 mA. Analisis *Western Blot* yang digunakan adalah *semi-dry method*. Selanjutnya dilakukan proses imunoblotting dengan mereaksilangkan antigen pada membran dengan antibodi primer yang berasal dari serum orang sehat daerah endemik malaria (1:500). Sementara antibodi sekunder yang digunakan berupa *Goat-anti Human IgG alkaline phosphatase conjugate* (1:5000). Visualisasi dilakukan dengan menambahkan substrat *Nitro Blue Tetrazolium-(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase)* (NBT-BCIP). Reaksi dihentikan dengan mencelupkan membran dalam akuades dan dikering anginkan.

Identifikasi Protein Immunogenik menggunakan LC-MS/MS

a. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan berdasarkan metode dari Atanassov dan Urlaub (2013). Sampel berupa potongan gel SDS-PAGE yang diprediksi sebagai protein immunomodulator putatif direduksi dengan dithiothreitol (DTT), dialkili dengan 2-iodoacetamide dan di-*digest* dengan tripsin selama semalam. Campuran peptida yang dihasilkan

selanjutnya diekstrak dan dikeringkan pada SpeedVac, lalu dilarutkan pada 2% acetonitrile/0,1% formic acid (v/v). Tiga kali injeksi larutan peptida masing-masing sebanyak 5 μ L selanjutnya dianalisis menggunakan nano LC-MS/MS.

b. Analisis Mass Spectrometry dengan LC-MS/MS
Sampel peptida dimasukkan pada pre-kolom C18 fase terbalik (0,15 mm diameter internal x 20 mm, Reprosil-Pur 120 C18-AQ 5 μ m, Ammerbuch-Entringen, Germany) dan dipisahkan pada sebuah kolom C18 fase terbalik (0,075 mm diameter internal x 200 mm Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 3 μ m, Dr. Maisch) dengan 5-35% acetonitrile/0,1% formic acid (v/v) menggunakan gradien linear selama 30 menit pada kecepatan 300 nL/menit). Eluent selanjutnya dianalisis pada sebuah *Q Exactive hybrid quadrupole/orbitrap mass spectrometry* (ThermoFisher Scientific, Germany) yang dilengkapi dengan sumber nanoSpray FlexIon dan dioperasikan menggunakan *software* Excalibur 2.4.

c. Analisis Data Mass Spectrometry

Semua spektra hasil *mass spectrometry* diekstrak menggunakan *software* Raw2MSMS v1.17 (Max Planck Institute for Biochemistry, Germany). Identifikasi protein dilakukan menggunakan *software* MASCOT 2.4 (Matrixscience, London-UK). Spektra MS/MS selanjutnya diidentifikasi/dicocokkan dengan *database* protein *Anopheles* (sebanyak 599919 entri protein) pada UniProtKB v2015.12, serta protein-protein kontaminan yang sering ditemukan pada laboratorium tempat mengerjakan MS/MS (sebanyak 51 set kontaminan). Parameter pencarian yang digunakan adalah sebagai berikut: toleransi massa awal di set pada 10 ppm dan toleransi fragmen ion 0,05 Da dengan tripsin sebagai enzim dan iodoacetamide sebagai *cysteine blocking agent*. Maksimum sebanyak dua tempat pemutusan tripsin dan *metionin oxidation* diperbolehkan. *Software* Scaffold v 4.4.1.1 (Proteome Software Inc, Portland, OR) digunakan untuk memvalidasi MS/MS peptida dan identifikasi protein.

Identifikasi peptida diterima bila dapat mencapai atau probabilitas lebih dari 95% menggunakan algoritma *Protein Prophet* (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Identifikasi protein dapat diterima bila dapat mencapai atau lebih dari 99% dengan setidaknya terdapat 2 peptida yang diketahui. Protein yang memiliki susunan peptida yang serupa dan tidak dapat dibedakan hanya menggunakan analisis MS/MS akan dikelompokkan menjadi *cluster-cluster* dengan prinsip parsimoni (*Gene Ontology*) (Ashburner *et al.*, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

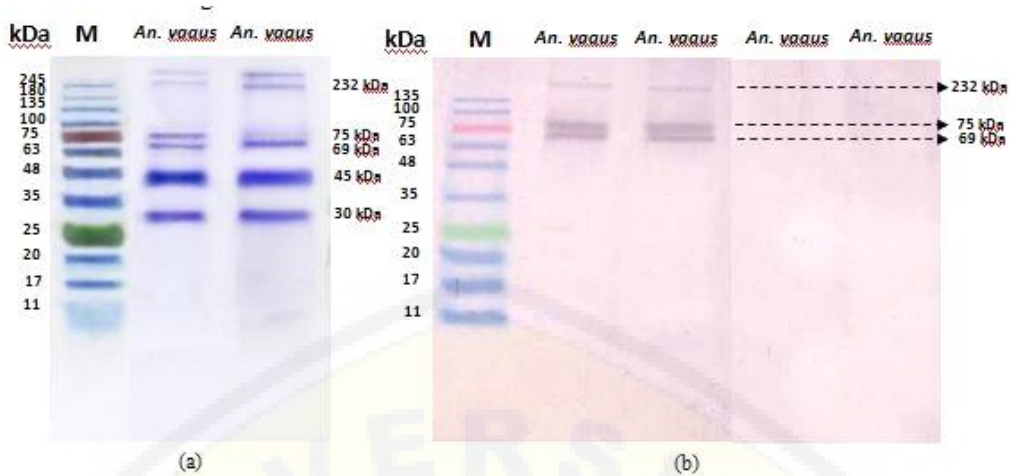
Analisis SDS-PAGE (1 dimensi) dan Western Blot

Hasil visualisasi gel SDS-PAGE kelenjar saliva *An. vagus* menggunakan larutan *staining* diperoleh setidaknya 6 pita protein mayor yang memiliki ukuran berkisar antara 25 kDa hingga lebih dari 245 kDa, serta beberapa pita protein minor, sementara hasil *western blotting* menunjukkan adanya tiga pita protein imunogenik yang memiliki kisaran berat molekul masing-masing yaitu 69, 75 dan 232 kDa. Pengukuran berat molekul dilakukan berdasarkan metode dari Neville (1971) yaitu dengan memetakan jarak migrasi protein dalam kurva persamaan regresi linier. Keberadaan protein imunogenik ini menunjukkan adanya antigen dalam kelenjar saliva *An. vagus* yang dikenali oleh antibodi dari serum manusia. Protein selanjutnya akan dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan analisis *mass spectrometry* untuk mengetahui protein-protein penyusun pita protein imunogenik *An. vagus* berdasarkan hasil *western blotting*.

Identifikasi Protein Imunogenik dengan Analisis LC-MS/MS

Sampel protein di-*digest* secara enzimatik selama semalam menggunakan enzim tripsin untuk memecah polimer protein menjadi peptida yang lebih sederhana (Kelleher *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 2002). Peptida hasil *digesti* selanjutnya dianalisis menggunakan nano LC-MS/MS dan data (spektra MS) diidentifikasi menggunakan *software* MASCOT. Penentuan identitas protein dilakukan dengan membandingkan (*blast*) hasil interpretasi MASCOT dengan *database* protein *Anopheles* pada UniProtKB v.2015.12. Analisis peptide untuk tiap sampel gel terindikasi imunogenik dilakukan sebanyak tiga kali (RO_1, RO_2 dan RO_3).

Berdasarkan Tabel 1, beberapa protein yang ditemukan memiliki nilai *total spectrum count peptide* yang tinggi (*highlight* abu-abu). Hal ini mengindikasikan protein tersebut merupakan protein yang paling banyak ditemukan pada pita protein 69 kDa.



Gambar 1. Elektroforegram protein kelenjar saliva *An. vagus* pada gel akrilamid 12,5% (a); *Western blot* dengan serum orang sehat endemik malaria (kiri) dan non endemik malaria (kanan) (b).

Tabel 1. Katalog protein kelenjar saliva pita 69kDa

Protein name	Accession Number/ Vector base Accession Number	RO_1	RO_2	RO_3
Cluster of AGAP002518-PA OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP002518 PE=3 SV=4	tr Q7QC97 Q7QC97_ANOGA	182	61	151
Cluster of Aconitate hydratase, mitochondrial (Fragment) OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP007852 PE=3 SV=4	tr Q7Q3F6 Q7Q3F6_ANOGA	123	115	139
Cluster of Putative myosin class I heavy chain (Fragment) OS= <i>Anopheles aquasalis</i> PE=2 SV=1	tr T1EB94 T1EB94_ANOAAQ	55	59	13
ATP-dependent 6-phosphofructokinase OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP007642 PE=3 SV=3	tr Q5TX32 Q5TX32_ANOGA	35	20	13
Cluster of Pyruvate carboxylase OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP004742 PE=4 SV=2	tr Q7PMT9 Q7PMT9_ANOGA	25	12	33
Cluster of Heat shock protein 82 OS= <i>Anopheles albimanus</i> GN=hsp82 PE=3 SV=1	tr Q27308 Q27308_ANOAL	23	18	19
AGAP004192-PA OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP004192 PE=3 SV=3	tr Q7PQK5 Q7PQK5_ANOGA	22	12	22
Cluster of AGAP009176-PA OS= <i>Anopheles gambiae</i> GN=AgaP_AGAP009176 PE=4 SV=4	tr Q7PVV2 Q7PVV2_ANOGA	21	9	19

Tabel 2. Katalog protein kelenjar saliva pita 75 kDa

Protein name	Accession Number/ Vector base Accession Number	RO_1	RO_2	RO_3
Cluster of Alpha-1,4 glucan phosphorylase OS=Anopheles gambiae GN=A _g Gp PE=2 SV=3	tr Q7Q3L6 Q7Q3L6_ANOGA [2]	117	101	51
Cluster of AGAP007123-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP007123 PE=3 SV=4	tr Q7QIX8 Q7QIX8_ANOGA [2]	35	30	11
Cluster of Putative myosin class I heavy chain (Fragment) OS=Anopheles aquasalis PE=2 SV=1	tr T1EB94 T1EB94_ANOAAQ [4]	35	12	40
AGAP001497-PB OS=Anopheles gambiae GN=ACTN_ANOGA PE=4 SV=1	tr F5HMN8 F5HMN8_ANOGA	30	29	24
Cluster of AGAP009176-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP009176 PE=4 SV=4	tr Q7PVV2 Q7PVV2_ANOGA [3]	28	20	9
Cluster of Pyruvate carboxylase OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP004742 PE=4 SV=2	tr Q7PMT9 Q7PMT9_ANOGA [2]	26	36	18
AGAP009441-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP009441 PE=4 SV=2	tr Q7PTN2 Q7PTN2_ANOGA	26	23	13
Cluster of AGAP002481-PA (Fragment) OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP002481 PE=4 SV=1	tr Q5TTS2 Q5TTS2_ANOGA [2]	19	22	11

Terdapat pula protein yang termasuk dalam kelompok *heat shock protein 82 family* (Hsp82) yang berperan utama dalam menyediakan pertahanan untuk melawan stress eksternal (Lund *et al.*, 2001; Parsell and Lindquist, 1993; Feder and Hofmann, 1999; Rinehart *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian oleh Benoit *et al.*, (2011), diketahui proses digesti nyamuk yang melakukan *blood feeding* pada hewan berdarah panas (*endoterm/homoitern*) menurun aktivitasnya oleh adanya supresi gen Hsp. Proses digesti protein yang lambat akan menyebabkan penurunan jumlah serapan nutrisi yang dibutuhkan oleh nyamuk, salah satunya untuk pembentukan telur (Denlinger, 2011).

Sementara pada pita protein 75 kDa dan 232 kDa, protein dominan yang ditemukan dengan nilai *total spectrum count peptide* tertinggi adalah protein *alpha-1,4 glucan phosphorylase* dan *putative myosin class I heavy chain*. Protein-protein tersebut merupakan protein struktural yang berperan sebagai protein sitoskeleton dan metabolisme.

Protein myosin (Tabel 2 dan Tabel 3) adalah protein sitoskeleton yang termasuk dalam *housekeeping protein* yang berperan penting pada kelenjar saliva *Anopheles* (Vijay *et al.*, 2014). Menurut Kappe *et al.* (2004), kompleks aktin-myosin berfungsi membantu pergerakan *sporozoite* plasmodium dari bagian korteks membran plasma ke membran luar IMC (*Inner Membrane Complex*).

Myosin terikat dengan bagian IMC dan aktin yang berlawanan dengan membran berinteraksi dengan sitoplasma TRAP (*Thrombospondin-Related Adhesive Protein*) melalui fructose 1,6-bifosfat aldolase (Bosch *et al.*, 2007).

Selain itu juga terdapat protein vitellogenin (Tabel 3). Gen vitellogenin (Vg) berfungsi sebagai prekursor protein telur nyamuk (*egg yolk*) saat perkembangan *ovary* yang diregulasi oleh hormon *juvenile*, dan diketahui nyamuk mensintesis vitellogenin pada badan lemak setelah *blood feeding* (Hagedorn, 1977). Keberadaan vitellogenin menandakan adanya kontaminasi badan lemak yang ikut terbawa saat isolasi kelenjar saliva (Das *et al.*, 2010).

Tabel 3. Katalog protein kelenjar saliva pita 232 kDa

Protein name	Accession Number/ Vector base Accession Number	RO_1	RO_2	RO_3
Cluster of Putative myosin class I heavy chain (Fragment) OS=Anopheles aquasalis PE=2 SV=1 (tr T1EB94 T1EB94_ANOAAQ)	tr T1EB94 T1EB94_ANOAAQ [4]	560	231	565
Cluster of AGAP009176-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP009176 PE=4 SV=4 (tr Q7PVV2 Q7PVV2_ANOGA)	tr Q7PVV2 Q7PVV2_ANOGA [3]	81	167	50
Cluster of AGAP005175-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP005175 PE=4 SV=4 (tr Q7PQ11 Q7PQ11_ANOGA)	tr Q7PQ11 Q7PQ11_ANOGA [3]	58	76	32
Cluster of AGAP007523-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP007523 PE=4 SV=1 (tr A7URB0 A7URB0_ANOGA)	tr A7URB0 A7URB0_ANOGA [3]	53	62	28
Cluster of Vitellogenin OS=Anopheles subpictus GN=Vg PE=4 SV=1 (tr W8S9N9 W8S9N9_9DIPT)	tr W8S9N9 W8S9N9_9DIPT [2]	49	65	31
Cluster of AGAP001826-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP001826 PE=4 SV=5 (tr Q7PUR8 Q7PUR8_ANOGA)	tr Q7PUR8 Q7PUR8_ANOGA [3]	19	11	11
AGAP006686-PA OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP006686 PE=4 SV=1	tr Q7Q515 Q7Q515_ANOGA	19	8	7
Cluster of Pyruvate carboxylase OS=Anopheles gambiae GN=AgaP_AGAP004742 PE=4 SV=2 (tr Q7PMT9 Q7PMT9_ANOGA)	tr Q7PMT9 Q7PMT9_ANOGA [2]	18	12	17

Berdasarkan hasil interpretasi MASCOT dengan database protein *Anopheles* pada UniProtKB v.2015.12 menunjukkan identitas protein-protein dominan tersebut diatas, yaitu *Cluster of AGAP002518-PA*, *Cluster of Aconitate hydratase*, *mitochondrial (Fragment)*, *alpha-1,4 glucan phosphorylase* dan *putative myosin class I heavy chain* bukan termasuk kedalam kelompok protein immunogenik. Nilai *total spectrum count peptide* yang tinggi belum dapat menentukan suatu protein yang ditemukan bersifat immunogenik. Salah satu faktor penting lain yang harus dimiliki protein agar bersifat immunogenik adalah adanya *signal peptide*, yaitu suatu prekursor protein yang mengandung residu asam amino (sekitar 15-30 residu) pada bagian N-terminalnya (Petersen *et. al.*, 2011).

Mayoritas protein dominan yang berhasil teridentifikasi merupakan *housekeeping* protein yang berperan sebagai protein protein struktural. Namun demikian, beberapa protein lain yang berhasil diidentifikasi, terindikasi memiliki potensi immunogenitas dengan ditemukannya *signal peptide* walaupun nilai *total spectrum count peptide*-nya tidak terlalu tinggi (data tidak dipublikasikan).

Dengan mengetahui karakter protein meliputi fungsi serta kelimpahan sekuens asam amino penyusun protein (*total spectrum count peptide*), diharapkan mampu memberikan informasi awal untuk analisis selanjutnya

mengenai potensi protein-protein tersebut sebagai kandidat immunogen yang kelak dapat dipergunakan untuk kepentingan berbagai intervensi immunologis sebelum dilakukan ekspresi protein tersebut.

KESIMPULAN

Tiga protein immunogenik teridentifikasi dari kelenjar saliva *An. vagus* menggunakan analisis *western blotting* dengan serum orang sehat endemik malaria yang memiliki berat molekul ~69, ~75 dan ~232 kDa. Berdasarkan analisis LC-MS/MS diketahui mayoritas protein immunogenik tersebut merupakan protein struktural yang berperan dalam metabolisme, protein sitoskeleton dan respon stress.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Tim Riset TBV & Bacteria yang telah membantu selama penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Arca, B., Lombardo, F., Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., Marinotti, O., Coluzzi, M., Ribeiro, J.M. 2005. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles*

- gambiae*. *Journal of Experimental Biology*. 208: 3971-3986.
- Armiyanti Y., Nuryady M.M., Arifianto R.P., Nurmariana E., Senjarini K., Fitri L.E., Sardjono T.W. 2015. Detection of immunogenic proteins from *Anopheles sudaicus* salivary glands. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(4):410-416.
- Ashburner, M., Catheine, A.B., Judith, A.B., David, B., Heather, B., Michael, C., Alan, P.D., Kara, D., Selina, S.D., Janan, T.E., Midori, A.H., David, P.H., Laurie, I.T., Andrew, K., Sezanne, L., John, C.M., Joel, E.R., Martin, R., Gerald, M.R., Gavin, S. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25: 25-29.
- Atanassov, I. dan Urlaub, H. 2013. Increased proteome coverage by combining PAGE and peptida isoelectric focusing: comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics*. 13: 2947-2955.
- Benoit, J., Lopez-Martinez, G., Patrick, K., Phillips, Z., Krause, T., and Denlinger, D. 2011. Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 108: 8026-8029.
- Billingsley, P.F., Baird, J.A., Mitchell, and Drakeley, C. 2006. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunology*. 28: 143-153.
- Bosch, J., Buscaglia, C.A., Krumm, B., Ingason, B.P., Lucas, R., Roach, C., Cardozo, T., Nussenzweig, V., Hol, W.G.J. 2007. Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Current Issue*. 104: 7015-7020.
- Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., Ndiaye, T., Sauvage, F.X., Boulanger, D., Simondon, F. 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malaria Journal*. 6:75.
- Das, S., Radtke, A., Choi, Y.J., Mendes, A., Valenzuela, J.G. 2010. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *BMC Genomics*. 11: 566.
- Denlinger, D. 2011. Study shows how mosquitoes handle the heat of a hot blood meal. (on line). <http://researchnews.osu.edu/archive/hotblood.htm>. [tanggal 19 Mei 2016].
- Elyazar, I.R.F., Marianne, E.S., Peter, W.G., Siti, N.T., Asik, S., Rita, K., Winarno., J. Kevin, B., Simon, I.H., Bangs, M.J. 2013. The Distribution and Bionomics of *Anopheles* Malaria Vector Mosquitoes in Indonesia: Chapter Three. *Advances in Parasitology*. 83: 173-266.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*. 61: 243-282.
- Fontaine, A., Fusai, T., Briolant, S., Buffet, S., Villard, C., Baudelet, E., Pophillat, M., Granjeaud, S., Rogier, C., Almeras, L. 2012. *Anopheles* salivary gland proteomes from major malaria vectors. *BMC Genomics*. 13: 614.
- Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K, Ribeiro, J.M. 2002. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*. 205: 2429-2451.
- Hagedorn, H.H. 1977. Vitellogenin synthesis in the mosquito: the role of juvenile hormone in the development of responsiveness to ecdysone. *Physiol Entomol*. 2:173-178.
- Harlow, E and Lane, D. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.
- Kappe, S.H.I., Buscaglia, C.A., Berqman, L.W., Coppens, I., Nussenzweig, V. 2004. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends in Parasitology*. 20: 13-16.
- Kelleher, N.L., Lin, H.Y., Valaskovich, G.A., Aaseruud, D.J., Fridriksson, E.K., McLafferty, F.W. 1999. Top down versus bottom up protein characterization by tandem high resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 806-812.
- Kirnowardoyo, S and Supalin. 1986. Zooprophylaxis as a useful tool for control of *Anopheles aconitus* transmitted malaria in Central Java, Indonesia. *J. Commun. Dis.* 18: 90-94.
- Kirnowardoyo, S., Situmeang, R., and Utomo, W.W. 1985. Malaria Transmission Studies in Jepara and Wonosobo regencies Central

- Java, Indonesia during 1981-1982. *J. Commun. Dis.* 17: 230-232.
- Laemmli. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- 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: 1635-1642.
- Lawson, D., Arensburger, P., Atkinson, P., Besansky, N.J., Bruggner, R.V., Butler, R., Campbell, K.S., Christophides, G.K., Christley, S., Dialynas, E., Emmert, D., Hammond, M., Hill, C.A., Kennedy, R.C., Lobo, N.F., MacCallum, M.R., Madey, G., Megy, K., Redmond, S., Russo, S., Severson, D.W., Stinson, E.O., Topalis, P., Zdobnov, E.M., Birney, E., Gelbart, W.M., Kafatos, F.C., Louis, C., Collins, F.H. 2007. VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. *Nucleic Acids Res.* 35: D503-505.
- Londono-Renteria, B.L., Eisele, T.P., Keating, J., James, M.A., Wesson, D.M. 2010. Antibody response against *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) salivary protein as a measure of mosquito bite exposure in Haiti. *J. Med. Entomol.* 47: 1156-1163.
- Lund, A.A., Rhoads, D.M., Lund, A.L., Cerny, R.L., Elthon, T.E. 2001. In Vivo Modifications of the Maize Mitochondrial Small Heat Stress Protein, HSP22. *Journal of Biological Chemistry.* 276: 29924-29929.
- Manguin, S., Bangs, M.J., Pothikasikorn, J. and Chareonviriyaphap, T. 2010. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution.* 10: 159-177.
- Meng, F., Cargile, B. J., Patrie, S.M., Johnson, J.R., McLoughlin, S.M., Kelleher, N.L. 2002. Processing complex mixtures of intact proteins for direct analysis by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 2923-2929.
- Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75: 4646-4658.
- Neville, D.M, Jr. 1971. Molecular Weight Determination of Protein Dodecyl Sulphate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System. *The Journal of Biological Chemistry.* 246: 6328-6334.
- Oktarianti, R., Senjarini, K. Hayano, T., Fatchiyah., Aulanni'am. 2015. Proteomics analysis of immunogenic proteins from salivary glands *Aedes aegypti*. *Journal of Infection and Public Health.* 428: 1-8.
- Orlandi-Pradines, E., Almeras, L., Denis De Senneville, L., Barbe, S., Remoue, F., Villard, C., Cornelie, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C. 2007. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect.* 9: 1454-1462.
- Parsell, D.A and Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics.* 27: 437-496.
- Peng, Z., Li, H., Simons, F.E. 1998. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101:498-505.
- Petersen, T.N., Brunak,S., VonHeijne, G., Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods.* 8: 785-786.
- Phattanawibon, b., Jariyapan, N., Roytrakul, S., Paemane, A., Sor-suwan, S., Chanmol, W., Siriyasatien, P., Saeung, A., Choocote, W. 2014. Morphological and protein analysis of adult female salivary glands of *Anopheles barbirostris* species A1 (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine.* 31: 813-827.
- Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, C., Herve, J.P., Boulanger, D., Simondon, F. 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 J.M.C dan Francischetti, I.M. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol.* 48:73-88.
- Ribeiro, J.M.C and Arcà, B. 2009. From sialomes to the sialoverse: An insight into

- the salivary portion of blood feeding insects. *Adv. Insect Physiol.* 37: 59–118.
- Ribeiro, J.M.C. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. *Infectious Agents and Disease.* 4: 143–152.
- Rinehart, J.P., Li, A., Yocum, G.D., Robich, R.M., Hayward, S.A.L., Denlinger, D.L. 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* 104: 11130–11137.
- Senjarini, K. 2013. Potential Use of Mosquito's Salivary Components as Novel Target for the Development of Transmission Blocking Vaccine (TBV). *Microbiology Indonesia.* 7: 186-191.
- VectorBase. 2015. Bioinformatic Resource for Invertebrate Vectors of Human Pathogens. (on line). <https://www.vectorbase.org/organisms/>. [diakses tanggal 2 April 2016].
- Vijay, S., Rawat, M., Sharma, A. 2014. Mass spectrometry based proteomic analysis of salivary glands of urban malaria vector *Anopheles stephensi*. *Biomed Research International.* 2014: 1-12.
- WHO. 2013. World Malaria Report 2013. (on line). <https://www.who.int/malaria>. [tanggal 3 November 2015].

