



**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c
PASCA INJEKSI DENGAN EKSTRAK PROTEIN IMUNOGENIK 56 kD
DARI KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L.**

SKRIPSI

Oleh

**Aisyah
NIM 131810401048**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c
PASCA INJEKSI DENGAN EKSTRAK PROTEIN IMUNOGENIK 56 kD
DARI KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L.**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar sarjana sains

Oleh

**Aisyah
NIM 131810401048**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Budhi Prihandana dan ibunda Yulyawati, atas seluruh dukungan, motivasi dan doa yang selalu dipanjatkan dalam setiap sujud;
2. Abang saya Hamzah Azzam dan adik-adik saya Inas Muthia, Shofia Safira, Nayla Arina, Naura Nazifah, dan Rania Khuria yang selalu mendukung, menghibur, dan mendoakan;
3. guru-guru sejak Sekolah Dasar (SD) sampai perguruan tinggi, atas bimbingan dan dukungannya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

Orang-orang itu telah melupakan bahwa belajar tidaklah melulu untuk mengejar dan membuktikan sesuatu, namun belajar itu sendiri, adalah perayaan dan penghargaan pada diri sendiri (Andrea Hirata) *)

Allah akan mengangkat (derajat) orang-rang yang beriman di antara kalian dan juga orang-orang yang diberikan ilmu beberapa derajat (QS. Al-Mujadalah :11) **)

*) Hirata, A. 2010. Padang Bulan. Jakarta : Bentang Pustaka

**) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsiran Al-Qur'an. 2009. Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya. Bogor: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Aisyah

NIM : 131810401048

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (*Mus musculus*) BALB/c Pasca Injeksi dengan Ekstrak Protein Immunogenik 56 kD dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L.” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 4 September 2017

Yang menyatakan,

Aisyah

131810401048

SKRIPSI

**RESPON IMUN HUMORAL (IgG) MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c
PASCA INJEKSI DENGAN EKSTRAK PROTEIN IMUNOGENIK 56 KD
DARI KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti* L.**

Oleh

Aisyah
NIM 131810401048

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (*Mus musculus*) BALB/c Pasca Injeksi dengan Ekstrak Protein Immunogenik 56 kD dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L.” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si, M.Si

NIP 196310261990022001

NIP 197509132000032001

Anggota I,

Anggota II,

Dra. Mahriani, M.Si

Syubbanul Wathon S.Si, M.Si

NIP 195703151987022001

NRP 760016783

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D

NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (*Mus musculus*) BALB/c Pasca Injeksi dengan Ekstrak Protein Immunogenik 56 kD dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L.; Aisyah, 131810401048, 2017: 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

DBD (Demam Berdarah *Dengue*) merupakan penyakit yang masih menjadi masalah kesehatan serius di dunia. Berbagai upaya pencegahan terhadap DBD terus dilakukan, salah satunya dengan cara mengembangkan vaksin DBD berbasis vektor yaitu TBV (*Transmission Blocking Vaccine*). Upaya pengembangan TBV salah satunya dengan memanfaatkan komponen saliva vektor Arthropoda. Saliva vektor dijadikan target pengembangan vaksin karena memiliki komponen antihemostasis, antiinflamasi dan imunomodulator yang mampu memfasilitasi transmisi patogen ke dalam tubuh inang.

Komponen imunomodulator pada saliva vektor menjadi komponen penting yang dijadikan target dalam pengembangan TBV. Komponen ini mengandung protein immunogenik yang dapat memicu produksi antibodi pada inang untuk melawan komponen saliva. Diketahui kelenjar saliva *Aedes aegypti* mengandung protein immunogenik 56 kD dan 31 kD yang diduga mampu memodulasi respon imun pada tubuh penduduk yang tinggal di area endemik DBD. Namun mekanisme respon imun humoral (IgG) inang terhadap protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* belum diketahui. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui respon imun humoral (IgG) terhadap protein immunogenik 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c.

Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *rearing* nyamuk *Aedes aegypti*, preparasi sampel kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan ekstraksi protein total kelenjar saliva *Aedes aegypti*, ekstraksi protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*, perlakuan pada hewan coba, dan pengukuran kadar IgG. Pada perlakuan hewan coba, hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok A yang diinjeksi Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8), Kelompok B yang diinjeksi adjuvant dan

kelompok C yang diinjeksi protein 56 kD (0,1 µg/µl) dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* + adjuvant. Injeksi tersebut dilakukan setiap dua minggu sekali selama enam minggu. Setiap dua minggu sekali dilakukan pengambilan darah pada bagian sinus orbitalis mata hewan coba. Darah yang telah diambil kemudian disentrifus untuk mendapatkan serum darah yang nantinya digunakan dalam pengukuran kadar IgG. Kadar IgG dianalisis menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah kelompok C (protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* + adjuvant) memiliki nilai IgG yang lebih tinggi dibandingkan kelompok A (Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8)) dan kelompok B (adjuvant). Kadar IgG kelompok C juga mengalami peningkatan seiring dengan semakin lama paparan dari ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang diberikan. Sedangkan kadar IgG pada kelompok A dan kelompok B memiliki kecenderungan nilai IgG yang sama pada saat sebelum diberi perlakuan dan sesudah diberi perlakuan. Kadar IgG pada kelompok C yang semakin meningkat tersebut menunjukkan bahwa adanya paparan berulang dari ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* terbukti mampu meningkatkan respon imun humoral (IgG) pada mencit (*Mus musculus*) BALB/c.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (*Mus musculus*) BALB/c Pasca Injeksi dengan Ekstrak Protein Imunogenik 56 kD dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* L.”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing, yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Mahriani, M.Si dan Syubbanul Wathon S.Si, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberi banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
3. Sri Mumpuni W. W., S.Pd., M.Si dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan.
4. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. Dina Fitriyah, S.Si, M.Si, selaku Teknisi Laboratorium Bioteknologi yang telah meluangkan waktunya untuk membantu kelancaran penulis dalam melakukan penelitian;
6. ayahanda Budhi Prihandana, ibunda Yulyawati, abang Hamzah Azzam serta adik-adik tercinta Inas Muthia, Shofia Safira, Nayla Arina, Naura Nazifah, dan

Rania Khuria yang telah mencurahkan segala perhatian, kasih sayang, dan doa tulus yang selalu mengiringi penulis;

7. sahabat-sahabat tercinta Talitha Zhafirah, Ghaisani Eka Safitri, Evi Triana Putri, Natasha Meydia Essiva, Lintang Pertiwi, dan Rahmatun Nazilah yang senantiasa memberi semangat, hiburan, dan doa tiada henti selama penulis mengerjakan skripsi;
8. rekan kerja seperjuangan Fitria Muti`ah Fauziah, Novita Amalia, dan Mochtar Gunawan Wibisono, terimakasih atas kerjasama dan dukungannya selama ini;
9. kakak-kakak seperjuangan mas Alfian, mas Febri, mbak Yatik, mbak Whenny, mbak Zakiya, mbak Bela, mbak Suci, dan mbak Dewi, yang selalu memberikan dukungan dan semangat selama penulis mengerjakan skripsi;
10. rekan perkuliahan Raodatul Jannah, Lidia Maziyatun Ni'mah, Desi Wahyuning Kartikasari, Shofiyawati Elok, Yenny Febriana, Fresha Aflahul Ula, Ratih Kumalararas, dan Talitha Azza Meydina Putri, yang selalu memberi doa, semangat, hiburan, dan warna semasa perkuliahan;
11. teman-teman Biologi angkatan 2013 yang tergabung dalam "BIOGAS", atas motivasi, dukungan serta bantuan dalam pengerjaan skripsi ini;
12. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Jember, 4 September 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
HALAMAN RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Vektor DBD dan Transmisi Virus <i>Dengue</i>	4
2.1.1 Vektor DBD	4
2.1.2 Transmisi Virus <i>Dengue</i>	5
2.2 DBD dan Penanggulangannya	6
2.3 Potensi Komponen Protein Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> sebagai Target Pengembangan Vaksin Berbasis Vektor	9
2.4 Mekanisme Respon Imun Inang terhadap Saliva Nyamuk	12
2.4.1 Respon Imun Humoral terhadap Saliva Nyamuk.....	14
2.5 Hipotesis	15
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16

3.2 Alat dan Bahan	16
3.3 Rancangan Penelitian	17
3.4 Prosedur Penelitian	18
3.4.1 Rearing nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	18
3.4.2 Preparasi Sampel Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i> dan Ekstrak Protein Total dari Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	18
3.4.4 Ekstraksi Protein 56 kD dari Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	20
3.4.6 Persiapan Hewan Coba	21
3.4.7 Perlakuan Hewan Coba	22
3.4.8 Preparasi Serum Darah.....	23
3.4.9 Pengukuran Kadar IgG.....	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Identifikasi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	25
4.2 Isolasi Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	26
4.3 Purifikasi Protein 56 kD dari Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	27
4.4 Analisis Respon Imun Humoral (IgG) Mencit (<i>Mus musculus</i>) BALB/c Pasca Injeksi dengan Ekstrak Protein Imunogenik 56 kD dari Kelenjar Saliva <i>Aedes aegypti</i>	28
BAB 5. PENUTUP	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Protein pada kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i> dan fungsinya.....	12

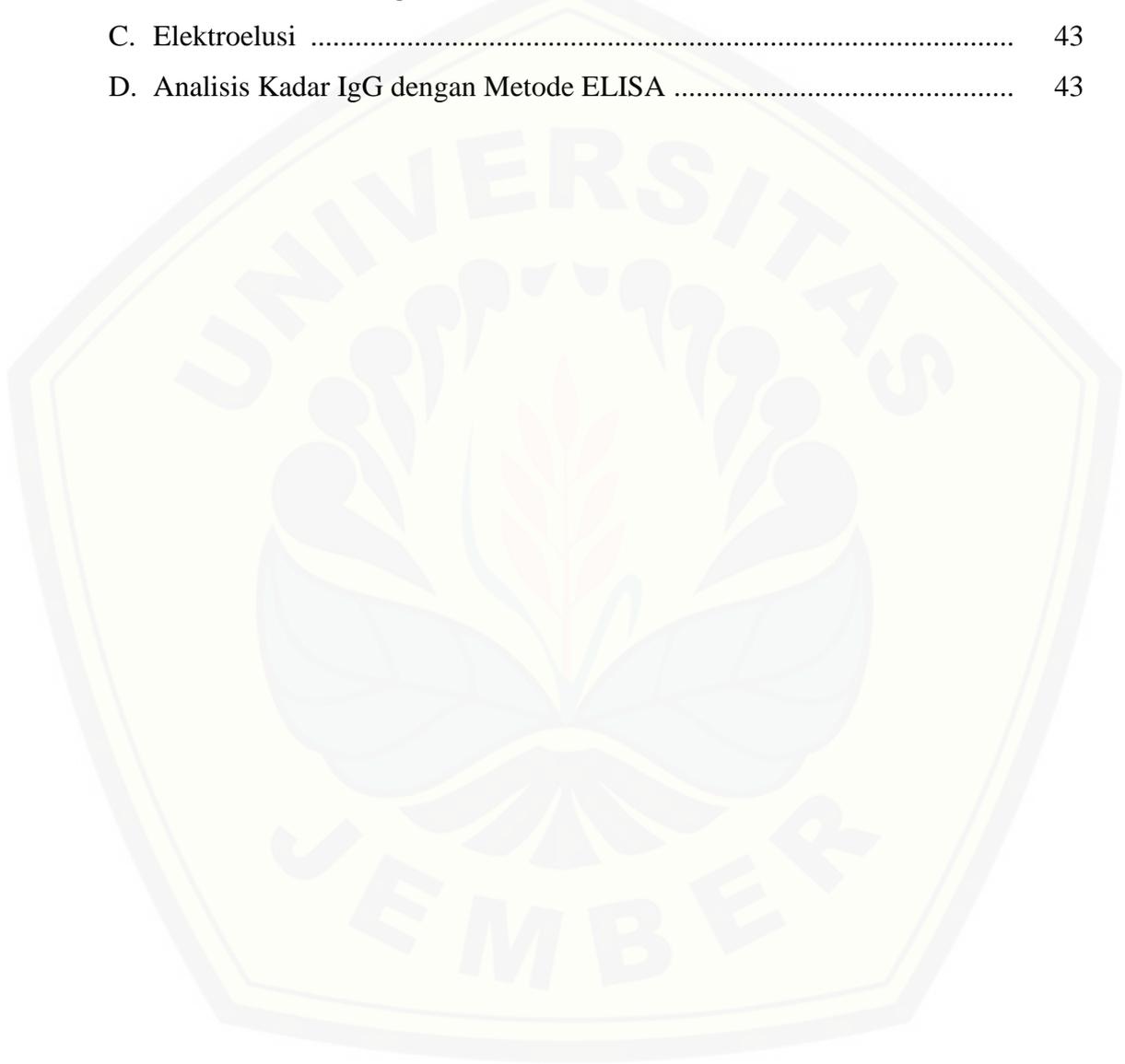


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Transmisi virus dalam tubuh vektor.....	6
2.2 Proses transmisi virus dengue ke tubuh inang	6
2.3 Skema respon imun terhadap protein pada kelenjar saliva nyamuk	15
3.1 Skema rancangan penelitian.....	17
4.1 Toraks nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i>	26
4.2 <i>Maxillary palp</i> nyamuk <i>Aedes aegypti</i> betina dan <i>Aedes aegypti</i> jantan.....	26
4.3 Kelenjar saliva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	27
4.4 Profil protein kelenjar saliva <i>Aedes aegypti</i>	28
4.5 Respon imun humoral (IgG) individu mencit (<i>Mus musculus</i>) BALB/c pada kelompok A (Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8)), kelompok B (Adjuvant), dan kelompok C (56 kD (0,1 µg/µl) + adjuvant)	29
4.6 Grafik rata-rata respon imun humoral (IgG) individu mencit (<i>Mus musculus</i>) BALB/c pada kelompok A (Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8)), kelompok B (Adjuvant), dan kelompok C (56 kD (0,1 µg/µl) + adjuvant)	30
4.7 Respon imun humoral (IgG) populasi mencit (<i>Mus musculus</i>) BALB/c pada kelompok A (Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8)), kelompok B (Adjuvant), dan kelompok C (56 kD (0,1 µg/µl) + adjuvant)	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	42
B. Analisis Protein dengan Metode SDS-PAGE	42
C. Elektroelusi	43
D. Analisis Kadar IgG dengan Metode ELISA	43



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

DBD (Demam Berdarah *Dengue*) merupakan penyakit infeksius dengan manifestasi klinis demam ringan sampai timbulnya syok yang berakibat pada kematian (Bhatt *et al.*, 2013). DBD kini telah menjadi masalah kesehatan serius di dunia. Diperkirakan 50-200 juta orang terinfeksi setiap tahunnya (Murray *et al.*, 2013). Di Indonesia, insidensi DBD di beberapa daerah seringkali digolongkan sebagai KLB (Kejadian Luar Biasa). Menurut data Kementerian Kesehatan RI, jumlah penderita DBD di Indonesia pada bulan Januari-Februari 2016 sebanyak 8.487 orang dengan jumlah kematian 108 orang (Kemenkes, 2016).

DBD disebabkan oleh infeksi virus *dengue* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes*. Virus *dengue* adalah jenis *Arbovirus* yang memiliki empat tipe serotip yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4 (Liu *et al.*, 2014; Londono-Renteria *et al.*, 2015). DBD disebut juga sebagai *mosquito-borne disease* karena penyebarannya diperantarai oleh vektor nyamuk (Schneider dan Higgs, 2008). Dua vektor dominan yang membantu penyebarannya yaitu *Aedes aegypti* yang berperan sebagai vektor primer dan *Aedes albopictus* yang berperan sebagai vektor sekunder (Murray *et al.*, 2013).

Keberhasilan transmisi virus *dengue* oleh vektor difasilitasi oleh saliva vektor. Saliva menjadi kunci penting dalam siklus transmisi virus *dengue* ke dalam tubuh inang karena memiliki substansi antihemostasis, antiinflamasi dan imunomodulator. Substansi antihemostasis seperti protein apyrase akan mampu mencegah agregasi platelet yang akhirnya akan mampu menghambat proses pembekuan darah, terjadinya penghambatan terhadap agregasi platelet dan pembekuan darah tersebut akan mampu mempermudah vektor dalam menghisap darah pada tubuh inang. Imunomodulator merupakan substansi yang dapat memodulasi respon imun pada inang (Fontaine *et al.*, 2011). Adanya komponen imunomodulator pada saliva *Aedes aegypti* dapat memodulasi respon imun inang menuju Th2. Hal ini ditandai dengan meningkatnya sitokin IL-4 dan IL-10.

Meningkatnya sitokin IL-4 dan IL-10 dapat menurunkan produksi sitokin IFN- γ dan aktivasi makrofag yang penting dalam menghambat invasi patogen dalam tubuh. Sehingga hal tersebut dapat mempermudah patogen dalam menginfeksi tubuh inang (Schneider dan Higgs, 2008)

Komponen imunomodulator pada saliva vektor menjadi komponen penting yang dijadikan target dalam pengembangan vaksin TBV (*Transmission Blocking Vaccine*). Komponen ini mengandung protein imunogenik yang dapat memunculkan respon imun adaptif, yang dapat menghasilkan antibodi untuk melawan komponen saliva (Almeras *et al.*, 2010). Kelenjar saliva *Aedes aegypti* diketahui mengandung protein imunogenik 56 kD dan 31 kD yang merupakan protein spesifik, yang diduga mampu memodulasi respon imun pada penduduk yang tinggal di daerah endemik DBD (Oktarianti *et al.*, 2014). Namun demikian, respon imun humoral (IgG) inang terhadap protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* belum diketahui. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui respon imun humoral (IgG) terhadap protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka permasalahan dalam penelitian ini adalah : Bagaimana respon imun humoral (IgG) hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c pasca diinjeksi dengan protein imunogenik 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imun humoral (IgG) pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c pasca diinjeksi protein imunogenik 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*.

1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi protein imunogenik 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* sebagai target pengembangan TBV untuk melawan DBD.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vektor DBD dan Transmisi Virus *Dengue*

2.1.1 Vektor DBD

DBD (Demam Berdarah *Dengue*) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus *dengue*. Virus *dengue* merupakan *Arbovirus (Arthropod Borne Virus)*, yaitu virus yang penyebarannya melalui transmisi vektor serangga. Virus *dengue* membutuhkan vektor untuk mentransmisikan virus dan membutuhkan inang sebagai tempat reproduksi virus. Vektor untuk virus ini adalah nyamuk golongan *Aedes*, sedangkan inang dari virus ini adalah vertebrata golongan mamalia, terutama manusia (Miyagi dan Toma, 2000).

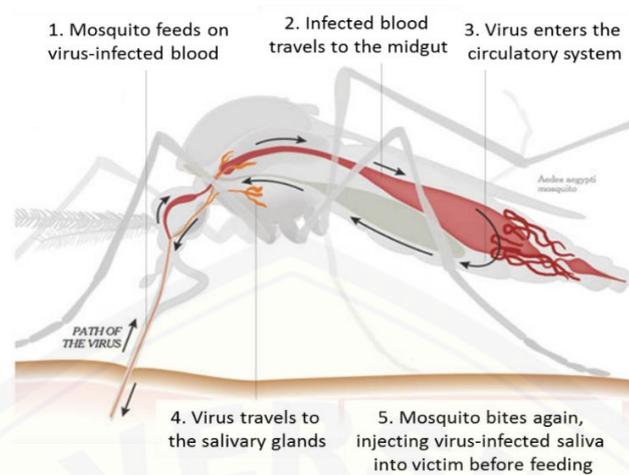
Aedes aegypti dan *Aedes albopictus* merupakan vektor yang memiliki peranan paling besar dalam penyebaran virus *dengue*. *Aedes aegypti* bertindak sebagai vektor primer penyebab DBD, sedangkan *Aedes albopictus* berperan sebagai vektor sekunder dalam penyebaran virus *dengue* (Higa, 2011). *Aedes aegypti* seringkali ditemukan di daerah perkotaan, kecuali di wilayah Asia nyamuk ini banyak ditemukan di pinggir perkotaan. Sedangkan *Aedes albopictus* seringkali ditemukan di daerah pedesaan dan pinggir perkotaan (de Melo *et al.*, 2012).

Aedes aegypti dan *Aedes albopictus* merupakan vektor yang efektif dalam penyebaran virus *dengue* ke manusia karena memiliki kemampuan untuk bertelur di bak-bak penampungan dekat rumah manusia (de Melo *et al.*, 2012). Selama siang hari, kedua spesies tersebut cenderung memilih tempat gelap dan jauh dari cahaya. *Aedes aegypti* akan memilih tempat berteduh di dalam rumah, seringkali mereka akan bersembunyi di daerah yang temporer, seperti baju yang digantung, perabotan, dan segala benda yang semipermanen dalam rumah. Sedangkan *Aedes albopictus* lebih memilih untuk berteduh di ruangan terbuka seperti daerah perkebunan atau daerah teduh di lapangan (Estrada-Franco dan Craig, 1995; Goma, 1996).

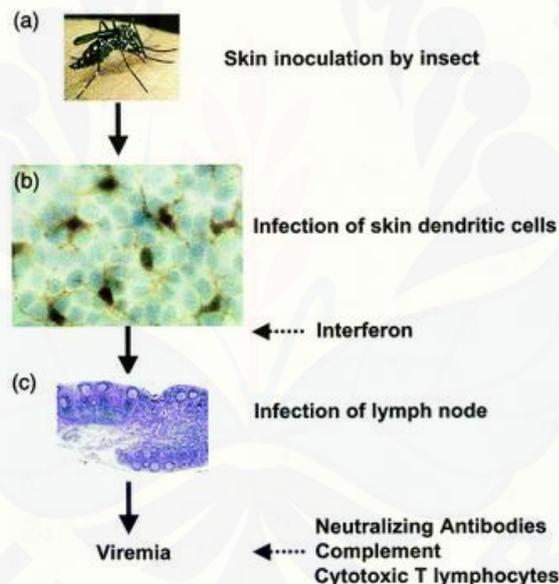
2.1.2 Transmisi Virus *Dengue*

Virus *dengue* ditransmisikan oleh nyamuk betina dewasa saat melakukan *blood feeding*. Nyamuk betina dapat menginfeksi inang karena sebelumnya telah menghisap darah manusia yang telah terinfeksi virus *dengue*. Virus *dengue* yang masuk dalam tubuh nyamuk kemudian bereplikasi di dalam epitelium *midgut* nyamuk. Virus *dengue* kemudian akan menyebar melalui hemolimfa kemudian berpindah ke organ lainnya secara berurutan seperti jaringan lemak (*fat body*) kemudian ke trakea dan pada akhirnya mencapai kelenjar saliva. Proses transmisi virus pada tubuh vektor dapat dilihat pada Gambar 2.1. Proses menyebarnya virus *dengue* dalam tubuh vektor membutuhkan waktu 10-14 hari setelah nyamuk menghisap darah yang terinfeksi. Saat virus *dengue* sampai ke kelenjar saliva, maka saat itulah virus dapat ditransmisikan ke tubuh inang saat proses *blood feeding* dilakukan (Salazar *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2012).

Virus *dengue* akan ditransmisikan nyamuk saat proses *blood feeding*. Pada proses tersebut saliva nyamuk memiliki peranan penting dalam proses transmisi virus ke tubuh inang. Transmisi virus dimulai saat nyamuk menginjeksikan saliva dalam tubuh inang. Saliva yang masuk ke dalam tubuh inang akan dapat memunculkan reaksi antikoagulasi, antiinflamasi dan vasodilatasi yang dapat mempermudah proses penghisapan darah pada inang. Selain itu saat saliva diinjeksikan, maka saliva akan dapat memicu respon imun tubuh inang sebagai pertanda infeksi dari *Arbovirus*. Infeksi dari *Arbovirus* tersebut terkadang menyebabkan veremia dan gejala lain yang menandakan infeksi virus yang semakin parah (Schneider dan Higgs, 2008; Luplertlop *et al.*, 2011; Sim *et al.*, 2012). Proses transmisi virus *dengue* dalam tubuh inang dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.1 Transmisi virus dalam tubuh vektor (Pannu, 2016).



Gambar 2.2 Proses transmisi virus dengue ke tubuh inang (Diamond, 2003).

2.2 DBD dan Penanggulangannya

DBD (Demam Berdarah *Dengue*) merupakan infeksi serius yang disebabkan oleh transmisi virus melalui gigitan nyamuk *Aedes* (Wu *et al.*, 2010). Virus *dengue* merupakan virus dengan materi genetik RNA rantai positif yang tergolong dalam family *Flavidae* dan genus *Flavivirus* dengan empat serotip berbeda (DENV-1, -2, -3,-4) (Sim *et al.*, 2012). Masing-masing serotip tersebut akan dapat menginduksi respon imun spesifik yang berbeda (Ferreira, 2012).

Artinya infeksi salah satu serotip dapat memicu pembentukan antibodi terhadap serotip yang bersangkutan, sehingga antibodi yang terbentuk tidak dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi dari serotip lain (Wati *et al.*, 2011). Infeksi virus *dengue* akan menyebabkan DF (*Dengue Fever*), DSS (*Dengue Shock Symptom*) dan DHF (*Dengue Hemorrhagic Fever*). Apabila infeksi virus tidak dapat ditangani dengan baik maka akan dapat menyebabkan infeksi yang lebih parah dan berujung pada kematian (Murray *et al.*, 2013; Londono-Renteria *et al.*, 2015).

DBD menjadi masalah kesehatan serius di dunia karena penularannya yang cepat dan luas. Menurut WHO (*World Health Organization*) lebih dari 125 negara telah dinyatakan sebagai daerah endemik DBD. WHO (2009) memperkirakan 50 juta orang terinfeksi DBD per tahunnya, 500.000 diantaranya mengalami gejala klinis yang parah dan membutuhkan perawatan intensif di rumah sakit. Lebih dari 20.000 kasus DBD berujung pada kematian, terutamanya di negara tropis (WHO, 2009; Ranjit dan Kissoon, 2011). Banyaknya kasus DBD di kawasan tropis tersebut dikarenakan vektor DBD banyak ditemukan pada daerah tersebut (Guzman dan Kouri, 2002).

Insidensi DBD di Indonesia seringkali digolongkan sebagai KLB pada beberapa daerah. Pada tahun 2005-2009, 5 provinsi dinyatakan sebagai daerah dengan angka insiden tertinggi DBD, diantaranya DKI Jakarta 313 kasus, Kalimantan Barat 228 kasus, Kalimantan Timur 184 kasus, Bali 167 kasus dan Riau 115 kasus. Pada tahun 1998 kasus DBD menyumbang 58% kasus KLB di Indonesia, sedangkan tahun 2004 kasus KLB hanya menyumbang 9,5% kejadian KLB. Namun setelah tahun 2004, kejadian DBD terus meningkat setiap tahunnya. Hal ini disebabkan adanya pengaruh kepadatan penduduk dan mobilisasi penduduk menggunakan sarana transportasi yang semakin tinggi, sehingga penyebaran virus menjadi lebih mudah dan luas (Kemenkes, 2010).

DBD ditularkan melalui transmisi virus oleh vektor, oleh sebab itu pemberantasan DBD akan sangat efektif dengan cara mengendalikan keberadaan vektor. Beberapa cara pengendalian vektor sudah dilakukan, seperti gerakan 3M (Menguras, Menutup, dan Mengubur), abatisasi, *fogging*, dan PSN (Pemberantasan

Sarang Nyamuk) (Fathi *et al.*, 2005). Namun usaha tersebut tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kejadian DBD, hal ini terbukti dari jumlah kasus DBD yang tidak pernah menurun setiap tahunnya, bahkan cenderung meningkat dan menimbulkan kematian pada anak, 90% diantaranya di bawah 15 tahun (Malavinge *et al.*, 2004). Oleh sebab itu dibutuhkan cara lain untuk dapat mengendalikan DBD, salah satunya dengan mengembangkan vaksin berbasis vektor, yang diharapkan mampu memutus transmisi patogen dari vektor ke dalam tubuh inang.

Pengembangan vaksin berbasis vektor dalam usaha menangani penyakit *arthropoda borne disease* dinilai sebagai langkah yang paling strategis untuk memutus transmisi patogen dari tubuh vektor ke dalam tubuh inang. Hal ini dikarenakan vaksin berbasis vektor tidak hanya mampu melindungi inang dari patogen yang telah dikenal seperti halnya *dengue* dan *Leishmaniasis* yang merupakan patogen yang transmisinya dibantu oleh serangga, tetapi juga vaksin ini akan mampu melindungi inang dari patogen-patogen lain yang belum diketahui, yang penularannya juga melibatkan vektor serangga. Vaksin berbasis vektor ini memiliki keunggulan dalam hal membangun kekebalan tubuh dibandingkan vaksin berbasis patogen. Vaksin berbasis vektor dinilai mampu memberikan respon imun yang stabil pada setiap individu, karena vaksin ini tidak berfungsi untuk melawan patogen yang dibawa vektor, namun berfungsi untuk menghambat kinerja protein dalam tubuh vektor yang memfasilitasi transmisi patogen. Sehingga dengan terhambatnya kinerja protein tersebut maka transmisi patogen ke dalam tubuh inang akan dapat dihambat pula. Sedangkan pada vaksin berbasis patogen seperti LATDV (*Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine*) dan CYD-TDV (*live recombinant tetravalent dengue vaccine*) masih memiliki kekurangan dalam hal kestabilan respon imun pada inang. Vaksin LATDV dalam pengembangannya mengalami kendala yaitu kesulitan dalam melemahkan keempat serotip DENV, sedangkan pada vaksin CYD-TDV memiliki kendala karena hanya efektif memberi kekebalan tubuh pada individu usia ≥ 9 tahun dan pada penderita yang telah mengalami infeksi sekunder (Chanthavanich *et al.*, 2006 ; Titus *et al.*, 2006; Vannice *et al.*, 2016).

2.3 Potensi Komponen Protein Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* sebagai Target Pengembangan Vaksin Berbasis Vektor

Salah satu upaya pencegahan terhadap DBD yang dilakukan adalah mengembangkan vaksin DBD. Vaksin yang telah dikembangkan saat ini adalah vaksin berbasis patogen, namun dalam pengembangannya vaksin ini masih memiliki kekurangan dalam hal kestabilan respon imun pada tubuh inang, sehingga belum mampu menghambat infeksi patogen secara maksimal. Berdasarkan hal tersebut dibutuhkan pengembangan vaksin terbaru yang dapat menghambat proses transmisi patogen dari vektor ke dalam tubuh inang. Untuk dapat menghambat proses transmisi tersebut diperlukan vaksin yang mampu melawan ataupun memblokir molekul yang berperan dalam proses transmisi patogen di dalam tubuh vektor. Vaksin tipe ini disebut TBV (*Transmission Blocking Vaccine*). Secara umum TBV dibuat untuk menghambat infeksi patogen berdasarkan pada respon imun mamalia terhadap protein patogen. TBV akan mampu menginduksi respon imun pada tubuh inang sehingga dapat menghambat infeksi virus dari vektor. Upaya pengembangan TBV salah satunya dengan memanfaatkan komponen saliva vektor Arthropoda. Saliva vektor dijadikan target pengembangan vaksin karena memiliki komponen imunomodulator yang penting dalam transmisi patogen ke dalam tubuh inang (Carter, 2001; Titus *et al.*, 2006).

Saliva menjadi kunci penting dalam siklus transmisi virus *dengue* ke dalam tubuh inang karena memiliki komponen antihemostasis, antiinflamasi dan imunomodulator yang dapat memudahkan transmisi patogen ke dalam tubuh inang. Komponen antihemostasis pada saliva nyamuk dapat mengganggu hemostasis pada tubuh inang, komponen ini mampu mencegah vasokonstriksi dan pembekuan darah pada pembuluh darah saat nyamuk melakukan *blood feeding*, sehingga nyamuk dapat menghisap darah dengan mudah (Fontaine *et al.*, 2011). Komponen antiinflamasi pada saliva nyamuk dapat menyebabkan respon inflamasi untuk melawan molekul saliva menjadi terhalang. Hal ini dapat menyebabkan vektor dengan mudah mentransmisikan patogen ke dalam tubuh inang (Kazimírová dan Štibrániová, 2013). Komponen imunomodulator pada saliva nyamuk dapat memodulasi respon imun pada inang. Imunomodulator pada saliva *Aedes aegypti*

dapat membantu kesuksesan transmisi patogen ke dalam tubuh inang karena mampu memodulasi respon imun inang menuju Th2. Adanya modulasi respon imun inang menuju Th2 tersebut ditandai dengan meningkatnya produksi sitokin IL-4 dan IL-10. Peningkatan sitokin IL-10 dapat menyebabkan terhambatnya presentasi antigen, serta menurunnya produksi IFN- γ dan aktivasi makrofag yang penting dalam menghambat invasi patogen dalam tubuh. Sehingga patogen dapat dengan mudah menginfeksi tubuh inang (Schneider dan Higgs, 2008)

Pengembangan saliva sebagai target TBV ini didasarkan pada penelitian kasus penyakit *Leishmaniasis*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa adanya injeksi berulang saliva yang terinfeksi *L. major* pada mencit (*Mus musculus*) BALB/c akan dapat memicu pergeseran respon imun yang memicu kekebalan tubuh terhadap patogen (Titus *et al.*, 2006). Selain itu, basis pengembangan vaksin DBD menggunakan saliva ini berkaitan dengan keberhasilan vaksin SPF 15 yang berhasil mengatasi kasus *Leishmaniasis*. Vaksin SPF 15 memanfaatkan komponen protein dengan berat molekul 15 kD dari *Plasmodium papatasi* yang dapat memberikan perlindungan pada hewan coba terhadap infeksi *Leishmaniasis* (Fontaine *et al.*, 2011).

Komponen imunomodulator pada saliva menjadi komponen penting yang dijadikan target dalam pengembangan vaksin TBV. Komponen ini mengandung protein imunogenik yang dapat memunculkan respon imun adaptif, yang menghasilkan antibodi melawan komponen saliva. Beberapa protein yang berperan dalam proses *blood feeding* dan dapat menginduksi respon imun diantaranya protein D7, adenosin deaminase, purin hidrosilase, apyrase, dan 30 kDa alergen (Almeras *et al.*, 2010). Sedangkan menurut analisis transkriptomik dan proteomik Ribeiro *et al.* (2007), protein yang ada dalam saliva nyamuk diantaranya apyrase, serpin 1 dan 2, protein D7, ADA (adenosine deaminase), amilase, lectin, purin dan protease. Protein yang terdapat pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan fungsinya tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Protein D7 merupakan protein yang paling banyak ditemukan dalam saliva nyamuk betina dewasa. Protein D7 ditemukan pada lobus bagian distal-lateral dan medial saliva nyamuk. Protein ini berperan sebagai antihemostasis dengan cara

menghambat aksi dari amina biogenik yang menyebabkan gagalnya proses vasokonstriksi dan agregasi platelet. Sehingga dapat mempermudah proses *blood feeding* dan transmisi patogen ke dalam tubuh inang (Calvo *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

Protein serpin pada saliva nyamuk berperan sebagai antikoagulan. Protein ini dapat menghambat aksi Xa dalam proses koagulasi darah. Protein 30 kDa alergen merupakan protein yang menimbulkan respon alergi pada inang. Protein ini termasuk dalam kelompok aegyptin, yang memiliki fungsi sebagai antihemostasis dengan cara menghambat aktivasi platelet dan agregasi trombosit sehingga dapat mempermudah proses *blood feeding* (Calvo *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Almeras *et al.*, 2010).

Protein apyrase adalah nukleosida trifosfat-difosfohidrolase yang banyak ditemukan pada organisme *haematophagous*. Apyrase pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* merupakan anggota dari kelompok gen pengkode *5'nucleotidase* (Champagne *et al.*, 1995). Apyrase ditemukan pada lobus saliva bagian distal-lateral (80%) dan medial (20%). Diketahui protein ini adalah komponen penyusun utama protein 56 kD dalam saliva *Aedes aegypti* (Oktarianti *et al.*, 2015). Apyrase dapat membantu proses *blood feeding* karena dapat menghambat agregasi platelet dengan cara mendegradasi ATP dan ADP menjadi AMP dan ortofosfat (Champagne *et al.*, 1995).

Saat nyamuk melakukan *blood feeding*, mereka akan menusukkan probosis hingga endotelium, sehingga menyebabkan pembuluh darah rusak. Pada keadaan normal rusaknya pembuluh darah akan memicu mekanisme agregasi platelet. Platelet dapat aktif karena adanya aktivitas dari kolagen, trombin, tromboxan A₂ dan ADP. ADP memiliki fungsi penting dalam menjaga hemostasis, karena dapat menginduksi aktifnya platelet untuk melakukan proses agregasi platelet sehingga terjadi proses pembekuan darah. Namun dengan adanya komponen antikoagulan seperti apyrase pada saliva nyamuk, menyebabkan proses agregasi platelet terhambat. Sehingga proses pembekuan darah terhambat dan darah tetap dapat mengalir hingga proses *blood feeding* berakhir (Ribeiro *et al.*, 1984).

Tabel 2.1 Protein pada kelenjar saliva *Aedes aegypti* dan fungsinya

Nama Protein	Aktivitas & fungsi biologis
<i>D7 salivary protein</i>	Menghambat aksi amina biogenik seperti serotonin, histamin, dan norepinefrin membantu dalam menghisap darah, dan bertindak sebagai alergen
Serpins	Protease inhibitor
Apyrase nukleotida, adenosine deaminase, purine nucleosidase, serine proteases sugar hydrolases amylase, β -glucosidase	Agregasi antiplatelet, fungsi anti-inflamasi, terkait dengan imunitas, aktivitas anti-inflamasi (seperti protein C), pemecahan gula.
Lectins lysozyme bacteolytic proteins	Opsonisasi, melanisasi - antimikrobia polypeptida – pengenalan sistem imun
Gambicin lysozyme defensins	Aktivitas antimikrobia
Factor Xa	Antikoagulan
Sialokins	Vasodillator
Aed a 3	Faktor Anti-tumour necrosis Reaksi alergi

(Luplertlop, 2014)

2.4 Mekanisme Respon Imun Inang terhadap Saliva Nyamuk

Nyamuk betina dewasa akan melakukan *blood feeding* pada tubuh inang untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan perkembangan telurnya. Proses *blood feeding* nyamuk pada inang dimulai dengan cara menusukkan probosisnya pada bagian kulit inang hingga bagian endotelium. Pada saat menusukkan probosisnya nyamuk akan menginjeksikan saliva ke dalam kulit inang untuk mempermudah proses *blood feeding*, masuknya saliva dalam tubuh inang kemudian akan memicu respon imun pada inang (Fontaine *et al.*, 2011). Munculnya respon imun tersebut disebabkan adanya substansi imunomodulator yang dapat memberikan suatu rangsangan imun terhadap inang (Andrade *et al.*, 2005).

Saat saliva masuk ke tubuh inang, komponen imunomodulator akan mampu memicu respon imun nonspesifik dan spesifik. Respon imun nonspesifik bertanggung jawab untuk melawan patogen saat pertama kali masuk dalam tubuh. Sedangkan respon imun spesifik bertanggung jawab untuk meningkatkan respon

imun terhadap paparan patogen selanjutnya dengan melibatkan sel limfosit T dan limfosit B (Harijanto *et al.*, 2010). Respon imun nonspesifik akan menimbulkan reaksi penetralkan pada saat penderita mengalami infeksi primer (paparan pertama virus *dengue*). Kemudian adanya paparan berulang akan mampu memicu pengaktifan sel T dan sel B pada penderita yang mengalami infeksi sekunder (paparan kedua dari virus *dengue*). Hal ini ditandai dengan meningkatnya kadar antibodi dalam tubuh (Thangamani dan Wikel, 2009).

Respon imun nonspesifik melibatkan sel imun seperti makrofag, monosit, neutrofil, NK *cell* (*Natural Killer Cell*) dan sitokin (Nugroho dan Tumewu, 2000). Makrofag berfungsi untuk membunuh patogen secara intraselular dengan cara fagositosis, mensekresikan bahan-bahan terlarut yang bersifat toksik, dan mensekresikan sitokin yang berperan pada sel efektor. Sitokin yang diproduksi makrofag seperti IL-12 akan mengaktifasi NK *cell* untuk memproduksi IFN- γ yang sangat penting peranannya dalam menghambat invansi patogen dalam tubuh (Tsakonas dan Riley, 2002).

Respon imun spesifik terdiri dari sistem imun humoral dan sistem imun seluler. Respon imun spesifik ini melibatkan sel T. Sel T terdiri dari Thelper (CD4⁺) dan T sitotoksik (CD 8⁺). Berdasarkan jenis sitokin yang dihasilkan, Thelper dibagi menjadi dua golongan yaitu Th1 yang akan mengaktifkan imunitas seluler dan Th2 yang akan mengaktifkan imunitas humoral. Th1 akan menghasilkan IFN γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 yang akan mengaktifkan makrofag dan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan TNF- β (*Tumor Necrosis Factor*) yang berfungsi mengaktifkan imunitas seluler dan nonspesifik (Harijanto *et al.*, 2010). Th2 akan menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang berperan dalam aktivasi sel B dalam pembentukan antibodi spesifik terhadap infeksi virus pada tubuh inang (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Komponen imunomodulator pada saliva akan dapat menyebabkan pergeseran imun dari Th1 menuju Th2. Hal ini ditandai dengan peningkatan produksi sitokin Th2 seperti IL-4 dan penurunan produksi sitokin Th1 seperti IFN- γ (Gomes dan Oliviera, 2012). Pada saat terkena paparan pertama saliva, pergeseran respon imun ke arah Th2 ini akan menguntungkan vektor dalam mentransmisikan

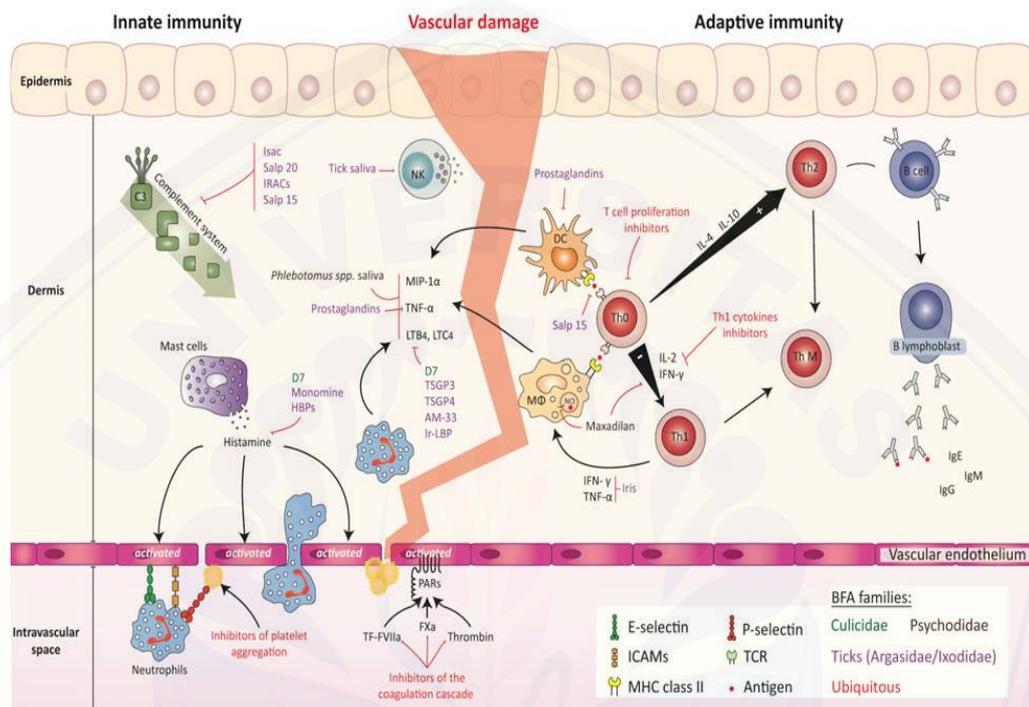
virus ke dalam tubuh inang, karena meningkatnya produksi IL-4 akan mampu menghambat produksi IFN- γ , sehingga produksi IFN- γ menurun. Menurunnya produksi IFN- γ akan menurunkan aktifitas makrofag dan sekresi Nitrat Oksidase (NO) dalam membunuh patogen. Sehingga patogen dapat menyerang tubuh inang dengan mudah (Donovan *et al.*, 2007). Adanya paparan berulang dari saliva akan menguntungkan inang, karena menyebabkan proses pengenalan antigen menjadi lebih cepat. Pengenalan antigen yang lebih cepat akan menyebabkan pengaktifan T helper (CD4⁺) yang lebih cepat pula. Adanya pengaktifan dari T helper tersebut menyebabkan inang akan memproduksi sejumlah sitokin, antibodi dan sel memori. Sitokin yang diproduksi pada umumnya adalah IFN- γ . Adanya IFN- γ kemudian akan mengaktifkan makrofag yang memicu terinduksinya respon Th1 yang dapat menghambat pertumbuhan patogen (Gomes dan Oliviera, 2012). Selain peningkatan aktivitas makrofag, adanya paparan berulang juga mampu memodulasi pembentukan antibodi pada tubuh inang (Titus *et al.*, 2006). Skema modulasi respon imun inang terhadap protein pada kelenjar saliva nyamuk dapat dilihat pada Gambar 2.2.

2.4.1 Respon Imun Humoral terhadap Saliva Nyamuk

Saat nyamuk melangsungkan *blood feeding*, nyamuk akan menginjeksikan saliva ke dalam tubuh inang untuk membantu kesuksesan *blood feeding* yang dilakukan. Saliva yang diinjeksikan tersebut, akan mampu memodulasi respon imun inang karena adanya molekul imunomodulator dalam saliva. Respon imun inang yang pertama kali muncul untuk melawan molekul saliva ini adalah sistem imun nonadaptif (*innate*) dan sistem komplemen. Aktivasi dari sistem komplemen akan mampu menimbulkan reaksi seperti inflamasi, opsonisasi dan lisis untuk menghalau antigen. Kemudian respon imun adaptif akan muncul ketika APC (*Antigen Presenting Cells*) bermigrasi ke jaringan limfoid dimana akan mengaktifkan sel T yang berperan sangat penting dalam respon imun seluler maupun sel B yang penting dalam sistem imun humoral (Janeway *et al.*, 2001).

Respon imun humoral ialah respon imun yang bertanggung jawab untuk melawan antigen pada bagian ekstraseluler sel. Respon imun humoral pada inang

akan terjadi apabila ada antigen yang mampu berikatan dengan sel Th2, sehingga sel Th2 ini akan mampu mengaktifkan sel B untuk berproliferasi dan memproduksi antibodi untuk melawan antigen tersebut. Antibodi akan mampu mengikat antigen tersebut sehingga dapat mencegah infeksi pada inang (Janeway *et al.*, 2001).



Gambar 2.3 Skema respon imun terhadap protein pada kelenjar saliva nyamuk (Fontaine *et al.*, 2011).

2.5 Hipotesis

Adanya injeksi protein imunogenik 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* pada mencit (*Mus musculus*) BALB/c secara berulang akan mampu mempengaruhi kadar IgG. Kadar IgG akan meningkat seiring dengan banyaknya paparan protein imunogenik.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2016 sampai dengan Agustus 2017 bertempat di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

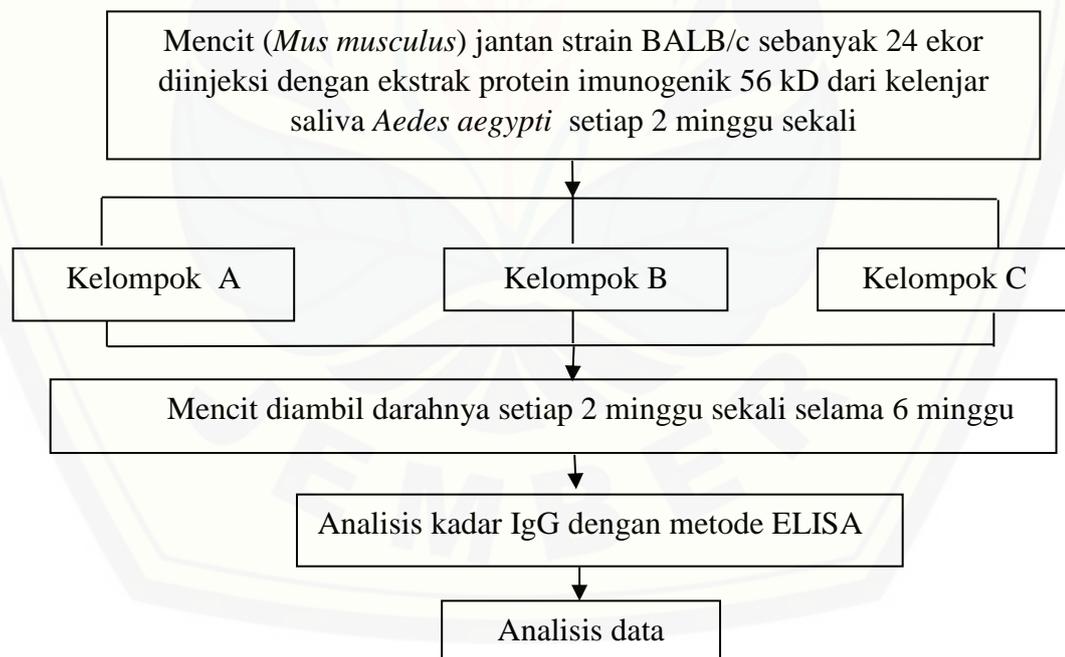
Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kandang nyamuk, tray, kertas pupasi, kapas, pipet plastik, cawan plastik, aspirator, pinset, *microtube* ukuran 1,5 ml, botol *schott*, gelas ukur, gelas beker, *magnetic stirrer*, pH meter, *autoclave*, aluminium foil, isolasi penunjuk sterilitas, wadah air, mikropipet dan mikrotip 1 set (ukuran 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, dan 100-1000 μ L), jarum diseksi, *ice bag* dan *ice pack*, falcon, kapas, *sterofom*, mikroskop stereo, *cover glass*, vortex, kompor, *refrigerated centrifuge*, lemari es (-20⁰ C, dan 4⁰ C), toples tertutup, pinset, kandang kasa, *pappercup*, kasa, *microtube stander*, microplate 96 well, ELISA reader, membran selofan (CAROLINA[®]), hot plate, pinset, tali kasur, gunting, penjepit, seperangkat alat elektroforesis.

Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*, Alkohol 70%, Sukrosa 10%, tikus wistar, mencit (*Mus musculus*) BALB/c, PMSF (*Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*), bicarbonate buffer (Lampiran D), buffer sample (Lampiran B), Acrilamide/Bisacrilamide rasio 37:1 (Sigma), buffer elektroda (Lampiran B), *Coomassie Brilliant Blue R-250*, TEMED (Nacalai Tesque), 40% (v/v) methanol (EMSURE[®]), PBS (*Phosphat Buffer Saline*) (Lampiran C), Buffer rebus (Lampiran C), PBST (*Phosphate Buffer Saline Tween*) (Lampiran D), BSA (*Bovine Serum Albumine*), blocking buffer (Lampiran D), marker protein (Promega V8491), H₂SO₄, HCl, NaOH, TMB Substrate (Biolegend), aquades, antibodi sekunder (antimouse IgG (whole molecule) - peroxidase conjugate (Sigma)), antibodi primer (serum mencit (*Mus musculus*) BALB/c),

ddH₂O, CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) (Sigma), IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) (Sigma).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah pola RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktorial *Posttest Only Control Group Design*. Tujuannya adalah untuk membandingkan pengaruh perlakuan pada kelompok uji dengan perlakuan pada kelompok kontrol. Objek penelitian menggunakan 24 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) strain BALB/c umur 3-4 bulan dengan rata-rata berat badan 30 gram. 24 ekor mencit (*Mus musculus*) BALB/c tersebut dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit (*Mus musculus*) BALB/c. Pada masing-masing perlakuan dilakukan analisis respon imun humoral (IgG) dengan menggunakan metode ELISA. Secara garis besar, rancangan penelitian tersebut dapat dilihat pada gambar skema berikut ini :



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian; Kelompok A (Tris-Cl 0,05 M (ph 6,8)); Kelompok B (Adjuvant); Kelompok C (Protein 56 kD (0,1 µg/µl) + Adjuvant).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Rearing nyamuk *Aedes aegypti*

Rearing nyamuk *Aedes* dilakukan skala laboratorium di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA. *Rearing* dimulai dari stadium larva yang diperoleh dari hasil *landing collection* larva nyamuk *Aedes aegypti* diambil dari penampungan air bersih, bak mandi, tangki penampungan air. Sebelum proses *rearing* dimulai maka dipersiapkan terlebih dahulu kandang nyamuk dewasa dan makanan nyamuk yaitu tikus wistar untuk *blood feeding* dan sukrosa 10%. Proses *rearing* diawali dengan pemeliharaan nyamuk dewasa. Nyamuk jantan dewasa dipelihara dalam skala laboratorium serta diberi makan sukrosa 10% dan nyamuk dewasa betina diberi makan darah hewan dengan cara *blood feeding* menggunakan tikus wistar yang diletakkan di dalam kandang. Setelah nyamuk dewasa bertelur maka telur dipindahkan ke *tray* yang telah diisi cukup air. Kemudian setelah telur menetas sekitar 1-2 hari maka larva dipindahkan ke *tray* yang lain sampai akhirnya menjadi pupa. Larva-larva yang telah berubah menjadi pupa dipindahkan lagi ke tempat pupa dan dimasukkan ke dalam kandang nyamuk dewasa supaya ketika menetas, nyamuk akan mendapatkan asupan nutrisi yang cukup yaitu darah hewan bagi nyamuk *Aedes aegypti* betina dan sukrosa 10% bagi nyamuk *Aedes aegypti* jantan.

3.4.2 Preparasi Sampel Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dan Ekstrak Protein Total dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Preparasi sampel kelenjar saliva dilakukan untuk mendapatkan kelenjar saliva dari *Aedes aegypti*. Nyamuk berasal dari hasil *rearing*. Setelah diambil dari kandang, nyamuk dimasukkan dalam gelas plastik dan dimasukkan ke dalam lemari es pada suhu 4°C selama 20 detik untuk melemahkan pergerakannya (Coleman *et al.*, 2007). Sebelum dibedah, nyamuk diidentifikasi jenis kelamin dan spesiesnya. Identifikasi jenis kelamin dapat dibedakan dari struktur antenanya. Nyamuk jantan memiliki antena yang memiliki banyak rambut, sedangkan antena nyamuk betina memiliki antena dengan rambut sedikit. Untuk membedakan spesies nyamuk *Aedes* dapat diketahui melalui pola sisik garis pada tubuh bagian dorsal toraks nyamuk.

Aedes aegypti akan memiliki dua garis sejajar yang diapit dengan garis melengkung pada kedua sisinya. Isolasi kelenjar saliva menggunakan nyamuk betina yang dipilih 7-10 hari setelah pertama kali *blood feed* (Almeras *et al.*, 2010). Isolasi kelenjar saliva dari nyamuk betina dilakukan dengan metode diseksi. Langkah pertama melakukan isolasi kelenjar saliva ialah meneteskan gelas benda dengan 50 μ l NaCl 0,5% (Lampiran A) kemudian gelas benda diletakkan di bawah mikroskop stereo dan dibedah menggunakan jarum diseksi. Setelah itu, nyamuk diambil dengan cara menusuk toraks menggunakan jarum diseksi, kemudian dibuang kaki nyamuk dengan cara ditarik menggunakan tangan secara hati-hati. Kemudian nyamuk diletakkan di atas gelas benda. Jarum diseksi di tangan kiri menekan dengan lembut pada bagian toraks dan jarum diseksi di tangan kanan menarik bagian kepala dengan perlahan-lahan. Letak kelenjar saliva berada di daerah sekitar toraks, apabila tarikan benar, maka akan tampak sepasang kelenjar saliva berwarna bening, masing-masing bagiannya terdiri dari 3 lobus yang terdiri dari dua lobus lateral dan satu lobus medial (Coleman *et al.*, 2007). Kelenjar saliva yang didapat kemudian dimasukkan pada *microtube* berisi larutan PMSF (*Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*) dengan perbandingan 1:1. Artinya 1 tabung *microtube* berisi 10 μ l PMSF 1 mM dalam PBS (Lampiran A) untuk 10 pasang kelenjar saliva. Kelenjar saliva yang telah diisolasi dan dikumpulkan dalam *microtube* berisi PMSF kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Kelenjar saliva yang telah diisolasi kemudian diekstraksi agar didapatkan ekstrak protein total dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Ekstraksi protein total ini dilakukan dengan menggunakan sepuluh pasang kelenjar saliva hasil isolasi yang disimpan dalam *microtube* berisi 10 μ L PMSF 1 mM dalam PBS (Beynon dan Bond, 2001). Hasil isolasi tersebut kemudian ditambahkan dengan 10 μ L loading buffer protein/*Laemmli sample buffer* dan dipanaskan menggunakan air mendidih selama 3 menit. Hasil ekstraksi protein total tersebut nantinya akan digunakan dalam prosedur *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), yang bertujuan untuk mengetahui profil protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*.

3.4.4 Ekstraksi Protein 56 kD dari Kelenjar Saliva *Aedes aegypti*

Prosedur untuk melakukan ekstraksi protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* diawali dengan *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) untuk mendapatkan profil protein 56 kD, yang merupakan protein target dalam penelitian ini. Kemudian tahapan dilanjutkan dengan prosedur elektroelusi dan dialisis untuk mendapatkan ekstrak murni protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*.

SDS-PAGE merupakan tehnik elektroforesis gel yang menggunakan poliakrilamida untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Gel poliakrilamida dibuat menggunakan cetakan gel membentuk lembaran segiempat dengan ketebalan tertentu. Setelah sampel dimasukkan dalam sumur gel, gel dialiri arus listrik sehingga komponen yang terdapat dalam sampel akan terpisah melewati matriks gel berdasarkan berat molekulnya. Untuk melihat pita komponen yang terbentuk, gel perlu diwarnai dengan pewarna khusus. Beberapa pewarna yang dapat digunakan dalam *SDS-PAGE*, salah satunya adalah *Commassie Brilliant Blue*.

Prosedur melakukan *SDS-PAGE* diawali dengan menganalisa ekstrak protein total dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang telah diekstrak dengan *Separating Gel 12%* dan *Stacking Gel 4% SDS-PAGE*, kemudian distaining dengan *Commassie Brilliant Blue* (CBB) R-25 untuk memvisualisasikan protein. Pada sumuran gel dimasukkan 20 μ L sampel protein dan 5 μ L marker protein Promega V8491 untuk dielektroforesis. Marker protein tersebut digunakan sebagai standar untuk menentukan berat molekul pada sampel. Elektroforesis dilakukan selama 90 menit, 100 V, pada suhu ruang dalam buffer elektroda 1x pH 8,3. Gel hasil elektroforesis diwarnai menggunakan larutan pewarna *staining* CBB selama 60 menit dan dilanjutkan *destaining 1*, *destaining 2*, dan *destaining 3* masing-masing 30 menit.

Setelah mengetahui profil protein 56 kD melalui prosedur *SDS-PAGE*, kemudian dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak protein 56 kD dengan metode elektroelusi. Elektroelusi merupakan tehnik untuk mengesktrak protein dari sebuah gel hasil elektroforesis menggunakan muatan listrik. Langkah pertama

melakukan elektroelusi adalah memotong pita protein 56 kD pada gel hasil *SDS-PAGE*, pita protein yang telah dipotong tersebut dapat disimpan dalam buffer elektroda 1x pH 8,3 yang disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. Pita protein yang telah dipotong kemudian dimasukkan ke dalam membran selofan yang sudah dijepit salah satu sisinya. Setelah itu dimasukkan buffer *running* (Buffer elektroda 1x pH 8,3). Setelah elektroelusi selesai, kemudian dilanjutkan dengan proses dialisis untuk menghilangkan bahan kimia yang tidak diperlukan. Hasil dari elektroelusi didialisis dalam *beaker glass* yang diisi dengan PBS pH 7,4 selama 24 jam pada suhu 4 °C. Cairan PBS diganti setiap 8 jam sekali. Setelah proses dialisis selesai, dilakukan presipitasi menggunakan etanol absolut dingin 1:1 pada suhu 4°C selama *overnight*. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit dan dikering anginkan. Protein hasil presipitasi dilarutkan dalam Tris HCl 0.05 M pH 6.8, kemudian konsentrasi protein diukur dengan nano drop.

3.4.6 Persiapan Hewan Coba

Langkah pertama ialah menyiapkan kandang. Kandang disiapkan dalam keadaan bersih dan diisi sekam. Kemudian disiapkan tempat makan dan tempat minum yang harus dicek setiap harinya. Mencit (*Mus musculus*) jantan BALB/c yang dipelihara berumur sekitar 2-3 bulan dengan berat 30 gram. Mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan digunakan dalam penelitian ini karena memiliki respon imun lebih stabil dibandingkan mencit betina. Ketidakstabilan respon imun pada mencit betina dikarenakan adanya siklus estrus pada mencit betina (Xiong *et al.*, 2015). Sebelum hewan coba diberi perlakuan maka hewan coba diaklimatisasi terlebih dahulu selama 2 minggu. Hewan coba yang akan digunakan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok A yang diinjeksi dengan Tris-Cl 0,05 M (pH 6,8), kelompok B yang diinjeksi dengan adjuvant, dan kelompok C yang diinjeksi ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang dicampur adjuvant dengan perbandingan 1:1. Berdasarkan hasil optimasi yang telah dilakukan, ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* dengan konsentrasi 0,1 µg/µl telah mampu memicu modulasi respon imun pada inang.

3.4.7 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba diinjeksi ekstrak protein 56 kD yang telah dipurifikasi dari protein total kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Konsentrasi ekstrak protein 56 kD yang diinjeksikan adalah 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Protein tersebut diinjeksikan secara intradermal menggunakan jarum suntik. Tujuan penyuntikan secara intradermal ini adalah untuk mendapatkan respon imun yang sama dengan respon imun yang muncul saat nyamuk menginjeksikan saliva ke dalam dermis kulit inang, selain itu injeksi intradermal memiliki keunggulan yaitu dapat melepaskan antigen secara lambat diantara lapisan kulit dan diserap sangat lambat ke dalam tubuh sehingga dapat mempertinggi pengenalan antigen terhadap APC (*Antigen Presenting Cells*) pada dermis dan epidermis, sehingga mampu menginduksi respon imun pada tubuh inang (Roukens *et al.* 2008).

Pemberian ekstrak dengan volume 100 μl dilakukan dengan interval waktu dua minggu sekali selama enam minggu. Pada injeksi pertama, ekstrak protein 56 kD dicampur dengan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*), sedangkan untuk injeksi selanjutnya menggunakan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*). CFA merupakan adjuvant yang mengandung Mycobacteria, sedangkan IFA merupakan adjuvant tanpa Mycobacteria. CFA digunakan pada injeksi pertama karena adanya Mycobacteria yang mampu meningkatkan aktivitas makrofag dan sel imun lain menuju daerah injeksi sehingga meningkatkan sensitifitas sel imun dalam mengenali antigen. Kemudian untuk tetap dapat meningkatkan respon imun antigen maka digunakanlah IFA untuk injeksi selanjutnya (Dvorak dan Dvorak, 1974). Penggunaan CFA akan dapat menimbulkan efek negatif pada hewan coba seperti timbulnya inflamasi kronis yang dapat menyebabkan ulserasi kulit. Oleh sebab itu penggunaan CFA hanya digunakan dalam injeksi pertama, lalu untuk meminimalisir efek negatif dari penggunaan CFA, maka penggunaan CFA harus diganti dengan IFA pada injeksi berikutnya (IACUC, 1997). Setiap dua minggu sekali dilakukan pengambilan sampel darah pada sebagian sinus orbitalis mata hewan coba. Tujuan pengambilan sampel darah pada bagian sinus orbitalis adalah untuk mendapatkan sampel serum darah dengan jumlah yang cukup banyak tanpa membunuh hewan coba, sehingga pengambilan darah pada hewan coba dapat

dilakukan hingga perlakuan selesai. Selain itu, metode pengambilan darah ini tidak membutuhkan anestesi yang rumit. Namun terdapat resiko mengalami kebutaan permanen pada hewan coba (Hoff, 2000). Pengambilan sampel darah hewan coba dilakukan setiap 2 minggu sekali dengan tujuan agar IgG dalam plasma darah dapat terdeteksi. Hal ini disebabkan pada 5-7 hari setelah penyuntikan, antibodi IgM akan memiliki kadar yang tinggi, setelah hari ke-7 penyuntikan kadar IgM akan terus menurun dan akan terjadi peningkatan kadar IgG (Vaughn *et al.*, 1998).

3.4.8 Preparasi Serum Darah

Sampel darah yang telah diambil disimpan pada *microtube*. Untuk mendapatkan serum darah, sampel darah yang telah diambil harus dipisahkan dari faktor penggumpalan dan sel darah merah, hal ini dilakukan dengan cara mendiamkan sampel pada suhu ruang $\pm 15-30$ menit sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan bening yang mengandung serum darah akan tampak di bagian permukaan dan lapisan berwarna merah terdapat di dasar *microtube*. Waktu yang direkomendasikan untuk memisahkan serum darah adalah kurang dari 30 menit, karena setelah 30 menit akan menyebabkan sel darah merah pada dasar *microtube* lisis sehingga akan mengganggu hasil analisis serum (Tuck *et al.*, 2009). Lapisan bening yang terbentuk dipindahkan dalam *microtube* steril lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang diperoleh setelah sentrifus dipindahkan pada *microtube* baru dan disimpan pada suhu -20°C sebagai stok serum darah.

3.4.9 Pengukuran Kadar IgG

Pengukuran kadar IgG menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antigen dan antibodi. Teknik ELISA yang digunakan pada penelitian ini adalah *indirect* ELISA. *Indirect* ELISA menggunakan dua antibodi yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder. Antibodi primer berfungsi sebagai penangkap antigen yang diinginkan dan antibodi sekunder berfungsi sebagai antibodi yang berikatan dengan enzim untuk mendeteksi keberadaan adanya ikatan

antara antigen dan antibodi primer (Lequin, 2005). Pada penelitian ini respon imun yang diamati adalah kadar IgG pada hewan coba terhadap ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*.

Prosedur *indirect* ELISA diawali dengan *coating* antigen pada *well microplate 96 well*, tiap *well* dicoating dengan 50 μ l antigen (ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*) dan diinkubasi *overnight* (12 jam). Kemudian dicuci dengan 250 μ l PBST (*Phosphate Buffer Saline Tween*). Setelah itu ditambahkan 200 μ l blocking buffer (1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) dalam PBST) pada masing-masing *well* dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu tiap *well* kembali dicuci dengan 250 μ l PBST dan ditambahkan 50 μ l antibodi primer (serum darah mencit (*Mus musculus*) BALB/c ditambah blocking buffer) dengan perbandingan 1: 100 dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian *well* dicuci kembali dengan 250 μ l PBST dan ditambahkan 50 μ l antibodi sekunder (Antimouse IgG ditambah blocking buffer) dengan perbandingan 1:1000 dan diinkubasi selama 1 jam. Setelah itu dicuci kembali *well* dengan 250 μ l PBST, lalu ditambahkan 50 μ l substrat TMB yang dilakukan pada ruang gelap dengan suhu ruang selama 30 menit hingga larutan berwarna biru. Setelah larutan berubah warna maka reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μ l Asam Sulfat 1 M. Kemudian diukur densitas warna hasil ELISA menggunakan ELISA *reader* dengan OD 450 nm.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Perlakuan paparan berulang dengan protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* + adjuvant mampu meningkatkan respon imun humoral (IgG) pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c. Respon imun humoral (IgG) individu dan populasi mencit (*Mus musculus*) BALB/c terhadap ekstrak protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* + adjuvant diketahui memiliki kadar IgG tertinggi pada minggu ke-6. Hal ini menunjukkan bahwa kadar IgG semakin meningkat seiring dengan semakin lama paparan protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* yang diberikan.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan analisis lebih lanjut terhadap kadar sitokin Th2 dan Th1, untuk memperkuat dugaan adanya modulasi respon imun menuju Th2 akibat adanya paparan berulang protein 56 kD dari kelenjar saliva *Aedes aegypti* + adjuvant.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras, L., A. Fontaine, M. Belghazi, dan S. Bourdon. 2010. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(4): 391- 402.
- Andrade, B. B., C. R Teixeira, A. Barral, M. Barral-Netto. 2005. Haematophagous Arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc.* 77(4): 665-693.
- Andrew, J. dan B. Ananya. 2013. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. *Annual Review & Research in Biology.* 3(1): 52-69.
- Beynon, R. dan J. S. Bond. 2001. *Proteolytic Enzymes Second Edition.* USA : Oxford University Press.
- Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. W. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar, dan S. I. Hay. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496 : 504-507.
- Bratawidjaja, K.G., dan I. Rengganis, 2014. *Imunologi Dasar.* Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Calvo, E., B. J. Mans, J. F. Andersen, J. M. Ribeiro. 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem.* 281(4):1935-1942.
- Carter, R. 2001. Transmission blocking malaria vaccine. *Vaccine.* 19: 2309-2314
- Champagne, D. E., C. T. Smartt, J. M. C. Ribeiro, dan A. A. James. 1995. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 694-698.

- Chanthavanich, P., C. Luxemburger, C. Sirivichayakul, K. Lapphra, K. Pengsaa, S. Yoksan, A. Sabchareon, dan J. Lang. 2006. Short report: immune response and occurrence of dengue infection in Thai children three to eight years after vaccination with live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (1): 26-28.
- Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2): 3–23.
- Coleman, J., J. Juhn, dan A.A. James. 2007. Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* Mosquitoes. *J. Vis. Exp.* 5: e228.
- De Melo, D. P. O., L. R. Scherrer, A. Eduardo. 2012. *Dengue* fever occurrence and vector detection by larval survey, ovitrap and mosquitrap: a space-time clusters analysis. *Plos One.* 7: e42125.
- Diamond, M. S. 2003. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunology and Cell Biology* 81, 196–206.
- Donovan, J. M., A. S. Messmore, D. A. Scrafford, D. L. Sacks, S. Kamhawi, dan M. A. McDowell. 2007. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *J. of Infection and Immunity.* 75:2523-2530.
- Dörner, T., dan A. Radbruch. 2007. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity.* 27 : 384-392.
- Doucoure, S., F. Mouchet, A. Cournil, G. Le Goff, S. Cornelié, Y. Roca, M. G. Giraldez, Z. B. Simon, R. Loayza, D. Misse, J. V. Flores, A. Walter, C. Rogier, J. P. Herve, dan F. Remoue. 2012. Human antibody response to *Aedes aegypti* saliva in an urban population in bolivia: a new biomarker of exposure to dengue vector bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87(3) : 504–510.
- Dvorak, A. M. dan H. F. Dvorak. 1974. Structure of freund's complete and incomplete adjuvants relation of adjuvanticity to structure. *Immunology.* 27 : 99.

- Estrada-Franco, J. G., dan G. B. Craig. 1995. Biology, disease relationship, and control of *Aedes albopictus*. *Technical Paper*. 42:1-49.
- Fathi, K. Soedjajadi, dan U. W. Chatarin. 2005. Peran faktor lingkungan dan perilaku terhadap penularan demam berdarah *Dengue* di kota mataram. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. Vol. 2: 1 – 10.
- Ferreira, G. L. C. 2012. Global dengue epidemiology trends. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paul*. 54(18):S5-S6.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, dan W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol*. 8:303–333.
- Fontaine, A., I. Diouf, N. Bakkali, D. Misse, F. Pages, T. Fusai, C. Rogier, dan L. Almeras. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit & Vector*. 4 : 187.
- Goma, L. K. 1996. *The Mosquito*. London: Hutchion & Co.
- Gomes, R. dan F. Oliveira. 2012. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. *Front Immunol*. 11(3):110.
- Guzman, M. G., dan G. Kouri. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2(1): 33-42.
- Harijanto, P. N., Agung, dan Gunawan. 2010. *Malaria dari Molekuler ke Klinis Edisi 2*. Jakarta: EGC.
- Harris, N. dan W. C. Gause. 2011. B cell function in the immune response to helminths. *Trends Immunol*. 32(2): 80–88.
- Higa, Y. 2011. *Dengue* vectors and their spatial distribution. *Tropical Medicine and Health*. 39(4) : 17-27.

- Hoff, J. 2000. Methods of blood collection in the mouse. *Technique*. Medical Center Dr., 018 ARF, Ann Arbor, MI48109-0614.
- Huang, Y. 1979. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Oriental region with keys to the species (Diptera: Culicidae). *Medical entomology studies e XI*. Contribution to the American Entomological Institute 15, 1e79.
- IACUC (Institutional Animal Care and Use Comitte). 1997. *Administering Complete Freund's Adjuvant (CFA) and other Adjuvants*. USA: Emory University.
- Janeway, C. A. Jr., P. Travers, M. Walport, *et al.* 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 5th Edition*. New York: Garland Science.
- Juhn, J. U. Naeem-Ullah, B. A. M. Guedes, A. Majid, J. Coleman, P. Filemon P. Pimenta, Wa. Akram, A. A. James, dan O. Marinotti. 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 4(1): 1-13.
- Kazimírová, M. dan I. Štibrániová. 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(43): 1-19.
- Kemenkes. 2010. Demam Berdarah Dengue. *Buletin Jendela Epidemiologi*. 2:1-43.
- Kemenkes. 2016. <http://www.depkes.go.id/article/print/16030700001/wilayah-klb-dbd-ada-di-11-provinsi.html> [Diakses pada 2 Oktober 2016].
- Lequin, R.M. 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 51 (12): 2415–2418.
- Liu, Y. F. Zhang, J. Liu, X. Xiao, S. Zhang, C. Qin, Y. Xiang, P. Wang, G. Cheng. 2014. Transmission-blocking antibodies against mosquito c-type lectins for dengue prevention. *PLOS Phatogens*. 10 : e1003931.

- Londono-Renteria, B., A. Troupin, M. J. Conway, D. Vesely, M. Ledizet, C. M. Roundy, E. Cloherty, S. Jameson, D. Vanlandingham, S. Higgs, E. Fikrig, dan T. M. Colpitts. 2015. Dengue virus infection of *Aedes aegypti* requires a putative cysteine rich venom protein. *PLoS Pathogens*. 11(10): 1-23.
- Luplertlop, N., P. Surasombattana, S. Patramool, E. Dumas, L. Wasinpiyamongkol, L. Saune, R. Hamel, E. Bernard, D. Sereno, F. Thomas, D. Piquemal, H. Yssel, L. Briant, dan D. Misse. 2011. Induction of peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland following infection with dengue virus. *PloS Pathogens*. 7 : 1-15.
- Luplertlop, N. 2014. *Aedes* mosquito salivary immune peptides: boost or block dengue viral infections. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(2): 163-168.
- Malavinge, G., S. Fernando, dan S. Senevirante, 2004. Dengue viral infection. *Postgraduate Medical Journal*. 80: 588-601.
- Miyagi, I., dan T. Toma. 2000. *The Mosquitoes of Southeast Asia. In: Mosquitoes and Mosquito-Borne Diseases*. Kuala Lumpur: Akademi Sains Malaysia.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, dan R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol*. 136:2348-2357.
- Murray, N. E. A., M. B. Quam, dan A. Wilder-Smith. 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*. 5:299-309.
- Nugroho A., dan W. Tumewu. 2000. *Siklus Hidup Plasmodium Malaria: Epidemiologi, Pathogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*. Jakarta: EGC.
- Oktarianti, R., K. Senjarini, F. Fatchiyah, dan Aulanni`am. 2014. Immunogenic protein from salivary gland of *Aedes aegypti* against to human sera. *Advances Natural & Applied Science (ANAS)*. 8 (8): 101-107.

- Oktarianti, R., K. Senjarini, T. Hayano, F. Fatchiyah, dan Aulanni`am. 2015. Proteomic analysis of immunogenic protein from salivary gland of *Aedes aegypti*. *J. of Infec. & Pub. Health*. In press.
- Pannu, K. 2016. Zika Virus Highlights Flaws in Public Health Approaches in The Americas Part 1. <http://impakter.com/zika-virus-highlights-flaws-in-public-health-approaches-in-the-americas-part-1/> [Diakses pada 18 November 2016].
- Rahayu, D. F. dan A. Ustiawan. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes Albopictus*. *BALABA*. 9(1): 7-10.
- Ranjit, S., dan N. Kissoon. 2011. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatr Crit Care Med*. 12: 90–100.
- Ribeiro, J. M., J. J. Sarkis, P. A. Rossignol, dan A. Spielman. 1984. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B*. 79:81-86.
- Ribeiro, J. M. C., A. Bruno, L. Fabrizio, C. Eric, M. P., Van, K. C. Phafulla, dan K. W. Stephen. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomic*. 8(6): 1-23.
- Roukens, A. H., A. C. Vossen, P. J. Bredenbeek, J. T. Van Dissel, dan L. G. Visser. 2008. Intradermally administrated yellow fever vaccine at reduce dose induces a protective immune response : a randomized controlled noninferiority trial. *PloS ONE*. 3 (4): e19993.
- Salazar, M. I., J. H. Richardson, I. Sa´nchez-Vargas, K. E. Olson, dan B. J. Beaty. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*. 7: 1-13.
- Schneider, B. S., L. Soong, N. S. Zeidner, dan S. Higgs. 2004. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and th1/th2 cytokine responses to sindbis virus infection. *VIRAL IMMUNOLOGY*. 17(4) : 565–57.

- Schneider, B. S., dan S. Higgs. 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 Hy.* 102: 400–408.
- Sim, S., J. L. Ramirez, G. Dimopoulos, 2012. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathogens.* 8 : e1002631.
- Suman, D. S., A. R. Shrivastava, S.C. Pant, B. D. Parashar. 2011. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. *Arthropod Structure & Development.* 40 : 479e483.
- Thangamani, S., dan S. K. Wikel. 2009. Differential expression of *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. *Parasit Vectors.* 2(1):34.
- Titus, R. G., J. V. Bishop, dan J. S. Mejia. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology.* 28:131-141.
- Tsakonas, K. A dan E. M. Riley. 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human nk cell by live plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *The Journal of Immunology,* 169: 2956-2963.
- Tuck, M. K., D. W. Chan, D. Chia, A. K. Godwin, W. E. Grizzle, K. E. Krueger, W. Rom, M. Sanda, L. Sorbara, S. Stass, W. Wang, dan D. E. Brenner. 2009. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res.* 8(1): 113–117.
- Vannice, K. S., A. Durbin, dan J. Hombacha. 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine.* 34 : 2934–2938.
- Vaughn, D. W., A. Nisalak, S. Kalayanarooj, T. Solomon, N. M. Dung, A. Cuzzubbo, dan P. L. Devine. 1998. Evaluation of a rapid

immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 234–238.

Wahala, M. P. B. dan A. M. de Silva. 2011. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 3:2374-2395.

Wati, W. E., A. Dwi, dan D. Sri. 2011. Beberapa faktor yang berhubungan dengan kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Kelurahan Ploso Kecamatan Pacitan tahun 2009. *Jurnal Vektoral*. 3(1).

WHO. 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva : World Health Organization.

Wu, J.Y., Z. R. Lun, A. A. James, dan X. G. Chen. 2010. Dengue fever in mainland China. *Am J Trop Med Hyg*. 83: 664–671.

Xiong, X., L. Xu, L. Wei, R. E. White, Y. Ouyang, dan R. G. Giffard. 2015. IL-4 is required for sex differences in vulnerability to focal ischemia in mice. *Stroke*. 46(8): 2271–2276.

LAMPIRAN**A. Isolasi Kelenjar Saliva Nyamuk *Aedes aegypti***

1. PMSF dalam PBS : 0,08 gr NaCl; 0,0144 gr Na₂HPO₄; 0,0024 gr KH₂PO₄; 0,002 gr KCl dilarutkan dalam 10 mL aquades kemudian ditambahkan 0,00174 gr PMSF
2. NaCl 0,5% : 0,5 gram NaCl dilarutkan dalam 100 mL aquades

B. Analisis Protein dengan Metode SDS-PAGE

1. 100 mL Lower Gel Buffer (LGB) : 18,17 gram 1,5 M tris HCl pH 8,8; 0,4 gram SDS 0,4%; 100 mL dH₂O
2. 50 mL Upper Gel Buffer (UGB) : 3,02 gram 0,5 M Tris pH 6,8; 0,2 gram SDS 0,4%; 50 mL dH₂O
3. 100 mL 30% Acril/Bis-Acril : 29,2 gram Acrilamid; 0,8 gram Bis-Acrilamid; ditambah dH₂O hingga 100 mL
4. 100 mL SDS 10% : 10 gram SDS; dH₂O hingga 100 mL
5. 100 mL Tris HCl 1,5 M pH 8,8 : 18, 2025 gram Trisma base; dH₂O hingga 100 mL
6. 100 mL Tris HCl 1 M pH 6,8 : 12, 135 gram Trisma Base; dH₂O hingga 100 mL
7. APS 10 % : 0,01 gram APS dilarutkan dalam 100 µL dH₂O
8. 10 mL Buffer Sampel : 0,6 mL UGB; 2 mL Gliserol 50%; 500 µL Bromofenol Blue 1%; 2 mL SDS 10%; dH₂O sampai 10 mL

9. 1000 mL Staining : 1 gram *Commassie Brilliant Blue R-250*;
450 mL Metanol; 100 mL Asetat Glisial
Asam; 450 mL dH₂O
10. 1000 mL Destaining : 400 mL Metanol; 100 mL Asam Asetat
Glasial; 500 mL dH₂O
11. 1000 mL Buffer Elektroda 1x
(pH 8,3) : 3 gram Tris base; 14,4 gram Glisn; 1
gram SDS 0,1%; dH₂O hingga 1000 mL

C. Elektroelusi

1. Buffer Rebus : NaHCO₃ 0,1 M (8,4 gr NaHCO₃ dilarutkan
dalam dH₂O 1 L); Na-EDTA (18,612 gr
Na-EDTA dilarutkan dalam dH₂O 1 L)
2. PBS : 8 gr NaCl; 1,44 gr Na₂HPO₄; 0,24 gr
KH₂PO₄; 0,2 gr KCl dilarutkan dalam
1000 mL Aquades

D. Analisis Kadar IgG dengan Metode ELISA

3. Bicarbonate Buffer : 0,039 gr Na₂CO₃; 0,073 gr NaHCO₃;
NaN₃ 0,01 gr dilarutkan dalam 25 mL *DI
Water* (pH 9,6)
4. PBST : 8 gr NaCl; 1,44 gr Na₂HPO₄; 0,24 gr
KH₂PO₄; 0,2 gr KCl dilarutkan dalam
1000 mL Aquades, kemudian
ditambahkan Tween 20 sebanyak 500 µL
(pH 7,4)
5. Blocking Buffer : 1 gram BSA (*Bovine Serum Albumine*)
dilarutkan dalam 1000 mL PBS