



PURIFIKASI PROTEIN IMUNOGENIK 31 DAN 56 kDa DARI KELENJAR SALIVA *Aedes aegypti*

Purification of 31 and 56 kDa Immunogenic Proteins from the Salivary Glands of *Aedes aegypti*

Syubbanul Wathon, Fitria Muti'ah, Rike Oktarianti, Kartika Senjarini*

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember
Jln. Kalimantan No.37, Kampus Tegalboto, Sumbersari, Jember 68121

*Email: senjarini@unej.ac.id

ABSTRACT

*The salivary gland of arthropod vector contains various bioactive compounds and plays a role in the transmission of pathogens to the host. The host develops anti-salivary antibodies against vector saliva exposure. Our previous research has identified two immunogenic proteins with molecular weights of 31 and 56 kDa from the *Aedes aegypti* salivary gland protein extract. However, the role of the 31 and 56 kDa immunogenic proteins from saliva *Ae. aegypti* is not fully known, so it is necessary to purify two immunogenic protein fractions to better specify the target of developing a dengue vaccine. This study aimed to purify the 31 and 56 kDa immunogenic protein fractions by electroelution and dialysis methods. The purification of the two protein fractions has been successful which were confirmed by the SDS-PAGE by the existence of single-band parallel to the positive control. These results were further supported by the dot blot analysis which showed a positive reaction in the form of dark spots in the two protein fractions which were reacted with dengue patients' serum, endemic healthy people, and neonates. These results indicated that the purified 31 and 56 kDa immunogenic protein fraction can be identified by specific antibodies.*

Keywords: dialysis, electroelution, immunogenic, purification, saliva

ABSTRAK

Kelenjar saliva vektor arthropoda mengandung berbagai senyawa bioaktif dan berperan dalam transmisi patogen ke tubuh inang. Tubuh inang mengembangkan antibodi anti-saliva terhadap paparan saliva vektor. Penelitian kami sebelumnya telah mengidentifikasi dua protein imunogenik dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dari ekstrak protein kelenjar saliva *Aedes aegypti*. Namun demikian, peranan protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari saliva *Ae. aegypti* belum diketahui sepenuhnya sehingga perlu dilakukan purifikasi dua fraksi protein imunogenik untuk lebih menspesifikasikan target pengembangan vaksin dengue. Tujuan penelitian ini untuk melakukan purifikasi fraksi protein imunogenik 31 dan 56 kDa melalui metode elektroelusi dan dialisis. Keberhasilan purifikasi dua fraksi protein 31 dan 56 kDa terbukti dari hasil konfirmasi SDS-PAGE dengan terbentuknya pita tunggal sejajar dengan kontrol positif. Hasil tersebut diperkuat dengan analisis *dot blot* yang menunjukkan reaksi positif dengan munculnya noktah gelap pada dua fraksi protein tersebut ketika direaksikan dengan serum pasien DBD, penduduk sehat endemik dan neonatus. Hasil ini mengindikasikan bahwa fraksi protein imunogenik 31 dan 56 kDa hasil purifikasi dapat dikenali oleh antibodi spesifik.

Kata Kunci: dialisis, elektroelusi, imunogenik, purifikasi, saliva

PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) masih menjadi permasalahan kesehatan dunia yang menyebabkan kematian serta morbiditas tinggi. Wabah DBD umumnya terjadi pada beberapa wilayah endemik di negara tropis dan sebagian di wilayah subtropis, terutama di benua Asia dan Amerika (Bhatt et al. 2013). Penyebab penyakit DBD adalah infeksi virus dengue yang memiliki empat serotipe (DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) (Murrell et al. 2011; Sasmono et al. 2018). Serotipe yang ditemukan sering menginfeksi manusia yaitu DENV-2 (Yung et al. 2015). Orang yang berada di wilayah endemik dengue dapat terinfeksi oleh tiga atau bahkan empat serotipe lainnya selama masa hidupnya (Guzman et al. 2010).

Virus dengue menginfeksi tubuh manusia melalui transmisi yang diperantarai oleh vektor nyamuk *Aedes aegypti* dan *Ae. albopictus*. *Ae. aegypti* merupakan vektor primer dari virus dengue karena memiliki habitat di sekitar pemukiman sehingga sering kontak dengan manusia. Sedangkan *Ae. albopictus* berperan sebagai vektor sekunder virus dengue karena memiliki habitat di lingkungan luar seperti kebun atau hutan yang jauh dari pemukiman manusia (Sim dan Dimopoulos 2010; Wan et al. 2013). Nyamuk tersebut membawa virus dengue setelah mengisap darah dari orang yang terinfeksi kemudian mentransmisikannya ke orang sehat (Almeras et al. 2010). Virus dengue akan masuk dan bereplikasi di dalam sel epitel *midgut*. Selanjutnya, virus dengue menyebar dari usus ke *hemocoel* lalu ke bagian tubuh nyamuk yang lain dan akhirnya menuju pada kelenjar saliva (Luplertlop 2014).

Saliva vektor penyakit arthropoda telah diketahui mengandung substansi penting sebagai antihemostasis, antiinflamasi, dan imunomodulator yang berperan dalam proses pengambilan darah pada tubuh inang serta menentukan keberhasilan transmisi patogen ke tubuh inang (Almeras et al. 2010; Vogt et al. 2018). Substansi antihemostasis seperti *apyrase* mampu mencegah agregasi platelet sehingga dapat menghambat proses pembekuan darah. Substansi vasodilator dapat menyebabkan pelebaran

pembuluh darah melalui mekanisme vasodilatasi kapiler darah. Substansi-substansi tersebut dapat mempermudah nyamuk dalam menghisap darah manusia. Komponen antiinflamasi pada saliva nyamuk dapat menyebabkan respon inflamasi untuk melawan molekul saliva menjadi terhalang (Kazimírová dan Štibrániová 2013). Berbeda halnya dengan faktor imunomodulator yang dapat meningkatkan transmisi patogen dengan cara memodulasi respon imun inang sehingga patogen mudah masuk ke dalam tubuh inang (Fontaine et al. 2011). Kemampuan kelenjar saliva vektor dalam mencegah respon hemostasis dan memodulasi respon imun inang menjadi target dalam pengembangan vaksin dengue berbasis vektor. Vaksin berbasis vektor tidak hanya melindungi terhadap patogen yang ditularkan oleh vektor tetapi juga memberikan proteksi terhadap orang lain yang belum terinfeksi (Miller 2010).

Hasil penelitian kami sebelumnya menunjukkan bahwa terdapat dua protein imunogenik dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan berat molekul 31 dan 56 kDa (Oktarianti et al. 2014). Namun demikian, karakterisasi terkait identitas protein serta aktivitas biologis dari kedua protein imunogenik tersebut belum diketahui sepenuhnya. Untuk lebih menspesifikasikan target pengembangan vaksin dengue maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kedua protein imunogenik tersebut. Penelitian mengenai identitas protein dan aktivitasnya membutuhkan protein murni sehingga perlu dilakukan purifikasi untuk memperoleh ekstrak murni protein imunogenik 31 dan 56 kDa. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan purifikasi protein dengan metode elektroelusi dan dialisis untuk memperoleh ekstrak murni protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember pada bulan Januari sampai dengan Juni 2019.

Pemeliharaan *Ae. aegypti*

Pemeliharaan *Ae. aegypti* dilakukan di ruang insektarium pada suhu 28°C dan kelembaban relatif 60% yang bertempat di *Animal Care Unit*, Jurusan Biologi, FMIPA, UNEJ. Nyamuk *Ae. aegypti* dibiakkan dari larva yang dikoleksi dari wadah/kontainer air di lapangan. Larva dipindahkan ke dalam nampan plastik berisi air untuk dikembangkan menjadi pupa. Selanjutnya, pupa dipindahkan ke cawan pupa dan dimasukkan ke dalam kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa. Di dalam kandang koloni disediakan larutan sukrosa 10% sebagai sumber nutrisi nyamuk dan seekor tikus wistar yang diletakkan pada kandang kecil untuk kebutuhan darah yang dihisap nyamuk betina. Selain itu, juga disediakan cawan yang diberi kertas saring pada bibir cawan untuk tempat bertelur nyamuk dewasa.

Identifikasi morfologi *Ae. aegypti*

Nyamuk dewasa diambil dari dalam kandang koloni menggunakan aspirator dan diimobilisasi di dalam lemari pendingin pada suhu -20°C selama 1–2 menit. Proses identifikasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo (Olympus, Jepang). Identifikasi morfologi dilakukan untuk membedakan antara spesies nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang sering ditemukan bersamaan ketika koleksi di lapangan. Pengamatan ciri morfologi dilakukan pada bagian *mesonotum*, *mesezipimeron*, dan *femur anterior*. Bagian *mesonotum* pada *Ae. aegypti* memiliki pola dua garis putih sejajar yang diapit oleh dua garis putih melengkung seperti *lyre*, sedangkan bagian *mesonotum* pada *Ae. albopictus* hanya terdapat satu garis putih saja. Pengamatan bagian *mesezipimeron* pada *Ae. aegypti* dilakukan untuk melihat adanya kumpulan sisik berwarna putih membentuk dua tambalan yang terpisah, sedangkan bagian *mesezipimeron* pada *Ae. albopictus* nampak sisik putih yang bergabung menjadi satu. Pengamatan bagian *femur anterior* pada *Ae. aegypti* dilakukan untuk melihat adanya pola garis putih, sedangkan bagian *femur anterior* pada *Ae. albopictus* tidak terdapat pola garis putih (Rahayu dan Ustiawan 2013).

Isolasi dan analisis

Larutan NaCl 0,5% sebanyak ±50 µL diteteskan di atas *object glass* steril sebagai

media isotonis untuk menjaga jaringan kelenjar saliva agar tidak lisis selama proses pembedahan. Nyamuk *Ae. aegypti* betina dibedah dibawah mikroskop stereo (Olympus, Jepang) dengan menggunakan jarum diseksi. Kemudian kelenjar saliva disimpan di dalam larutan 1 mM *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (PMSF) dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA) dan disimpan pada suhu -20°C.

Profil protein penyusun kelenjar saliva *Ae. aegypti* dianalisis dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Sampel kelenjar saliva ditambahkan dengan *laemmly buffer* (1:1 (v/v)) kemudian dipanaskan selama 3–5 menit untuk mendapatkan ekstrak protein kelenjar saliva. Kemudian ekstrak protein dimasukkan dalam sumuran gel poliakrilamid yang terdiri dari gel *separating* 12% dan gel *stacking* 4%. Elektroforesis protein dilakukan dengan tegangan listrik 100 V (*constant volt*) selama 100 menit pada suhu ruang dan menggunakan buffer elektroda pH 8,3.

Selanjutnya, dilakukan pewarnaan gel poliakrilamid menggunakan larutan pewarna (*staining*) *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Sigma-Aldrich, USA) selama 60 menit dan dilanjutkan dengan proses pelunturan pewarna sebanyak 3 kali setiap 30 menit dengan menggunakan larutan peluntur warna (*destaining*) untuk menghilangkan pewarna CBB pada gel poliakrilamid yang tidak berikatan dengan protein. Bagian gel poliakrilamid yang terdapat pita protein target 31 dan 56 kDa dipotong secara aseptis dan disimpan dalam buffer elektroda pH 8,3 pada suhu 4°C sebagai sampel untuk proses purifikasi protein.

Purifikasi

Potongan gel yang berisi pita protein 31 dan 56 kDa hasil analisis SDS-PAGE dipurifikasi menggunakan metode elektroelusi untuk mengeluarkan protein dari dalam gel poliakrilamid (Vázquez-Iglesias et al. 2017). Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan gel yang berisi protein target ke dalam membran selofan (Merck, USA) yang telah berisi buffer elektroda pH 8,3. Kemudian membran selofan ditutup rapat dan dimasukkan dalam tangki elektroforesis horizontal (Bio-Rad,

USA) yang berisi buffer elektroda pH 8,3. Proses elektroelusi dilakukan dengan tegangan listrik 25 V (*constant volt*) pada suhu ruang selama 150 menit hingga potongan gel nampak bening. Larutan di dalam membran selofan kemudian dipindahkan ke membran selofan yang baru untuk dilanjutkan ke tahapan dialisis. Dialisis bertujuan untuk menghilangkan kontaminan dan senyawa-senyawa lain yang tidak diperlukan selama proses purifikasi protein (Sattayasai 2012). Membran selofan yang telah berisi larutan hasil elektroelusi kemudian ditutup rapat dan dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan PBS pH 7,4. Proses dialisis dilakukan pada suhu 4°C di atas alat pengaduk (*magnetic stirrer*) selama 24 jam dan larutan PBS diganti setiap 12 jam sekali. Selanjutnya, larutan hasil dialisis dipekatkan dengan menggunakan *microcentrifuge tube* dengan *Molecular Weigh Cut-Off* (MWCO) 10 kDa (Corning, USA). Konsentrasi protein diukur dengan metode Bradford (Sigma-Aldrich, USA) pada panjang gelombang 595 nm. Konfirmasi keberhasilan purifikasi dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Sampel protein murni 31 dan 56 kDa ditambahkan dengan *laemmli buffer* (1:1 (v/v)). Elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 100 V (*constant volt*) selama 100 menit pada suhu ruang dan menggunakan buffer elektroda pH 8,3. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan gel poliakrilamid menggunakan larutan pewarna CBB selama 60 menit dan dilanjutkan dengan proses pelunturan pewarna sebanyak 3 kali setiap 30 menit.

Analisis imunogenisitas

Analisis *dot blot* dilakukan untuk mengetahui adanya reaksi antara antigen dan antibodi yang ditandai dengan munculnya noktah gelap pada membran *polyvinylidene fluoride* (PVDF) (Merck, USA) (Berger et al. 2015). Potongan membran PVDF direndam di dalam metanol selama 1 menit kemudian direndam di dalam larutan *Tris Buffered Saline* (TBS) selama 3 menit lalu dikeringanginkan. Sampel protein total sebagai kontrol positif, protein 31 dan 56 kDa hasil purifikasi masing-masing sebanyak 2,5 µL diteteskan tepat di bagian tengah membran dan dibiarkan hingga mengering. Kontrol negatif berupa membran PVDF yang ditetesi dengan larutan PMSF dalam PBS

tanpa sampel protein. Membran PVDF kemudian direndam dalam larutan 5% *skim milk* dalam TBS pH 7,4 selama 1 jam. Kemudian, membran PVDF dicuci dengan larutan TBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit. Selanjutnya, membran PVDF direndam kembali di dalam larutan 5% *skim milk* dalam TBS pH 7,4 yang ditambahkan dengan antibodi primer (perbandingan 1 : 500 (v/v)) selama 2 jam. Antibodi primer yang digunakan yaitu serum darah manusia yang berasal dari pasien DBD, serum orang sehat endemik, dan neonatus. Protokol koleksi serum darah manusia telah disetujui oleh Komite Etik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember (No. 148/UN25.8/KEPK/DL2018). Masing-masing membran PVDF dicuci dengan larutan TBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit. Kemudian membran PVDF direndam di dalam larutan 5% *skim milk* dalam TBS pH 7,4 yang telah ditambahkan antibodi sekunder (Anti-Human IgG) (Rockland, USA) dengan perbandingan 1 : 5000 (v/v) selama 2 jam. Kemudian masing-masing membran PVDF dicuci dengan larutan TBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit lalu dikeringanginkan dan diwarnai dengan *Nitroblue Tetrazolium Chloride* (NBT) / *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate* (BCIP) (Rockland, USA) untuk visualisasi adanya ikatan antara sampel protein murni dengan antibodi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

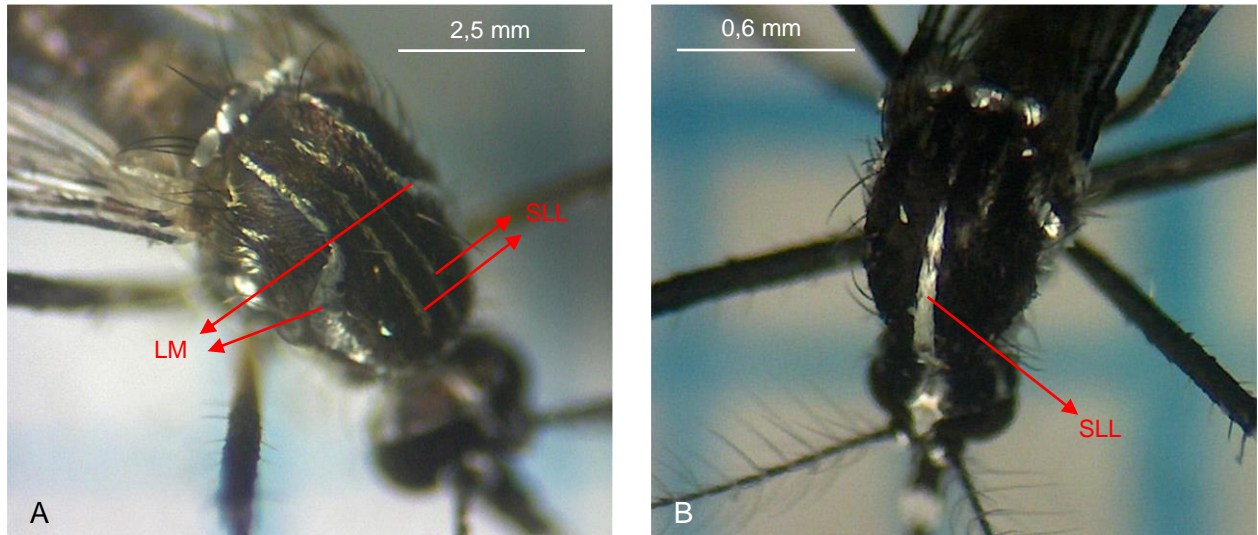
Identifikasi morfologi *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* hidup dan berkembang di lingkungan yang dekat dengan pemukiman penduduk, seperti tempat penampungan air bersih di dalam atau di luar rumah (Hodijah et al. 2015). Hal ini yang menyebabkan *Ae. aegypti* mudah dalam menjangkau manusia untuk menghisap darah dan menjadi vektor primer dalam penyebaran virus dengue (Farnesi et al. 2012). Berbeda halnya dengan vektor sekunder penyebaran virus dengue yaitu *Ae. albopictus* yang lebih menyukai hidup di lingkungan luar rumah atau bangunan misalnya di perkebunan yang rimbun dengan pepohonan (Boesri 2011). Adanya perilaku *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dalam menghisap darah berulang pada manusia, maka hal ini juga semakin meningkatkan

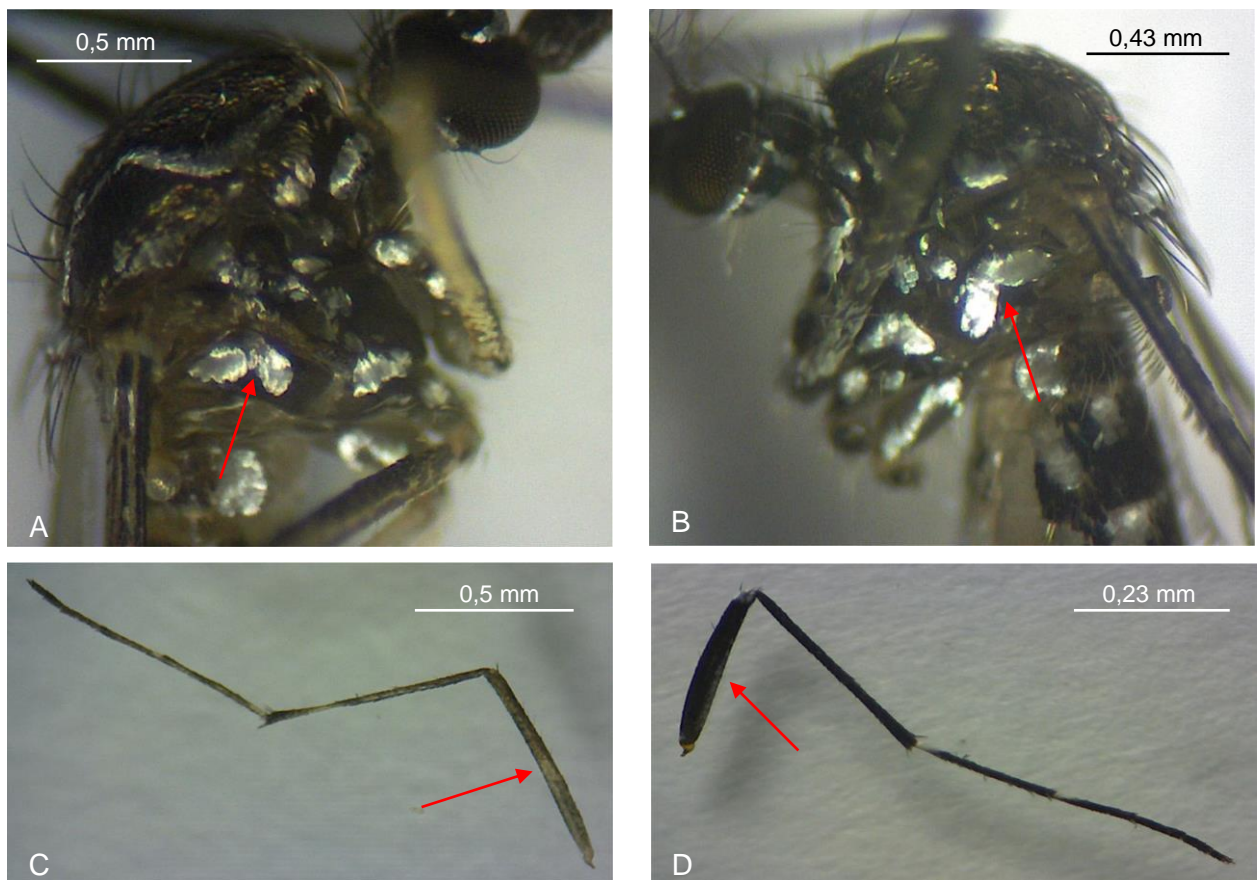
peluang transmisi virus dengue (Farjana dan Tuno 2013).

Karakteristik bagian tubuh *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yaitu berwarna gelap atau hitam dengan bintik-bintik sisik berwarna putih pada beberapa bagian tubuh, kaki dan

sayap (Sucipto 2011). Namun demikian, terdapat perbedaan yang terlihat jelas pada ciri morfologi antara nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Beberapa perbedaan tersebut dapat dilihat pada bagian *mesonotum*, *meseplimeron*, dan *femur anterior*. Bagian



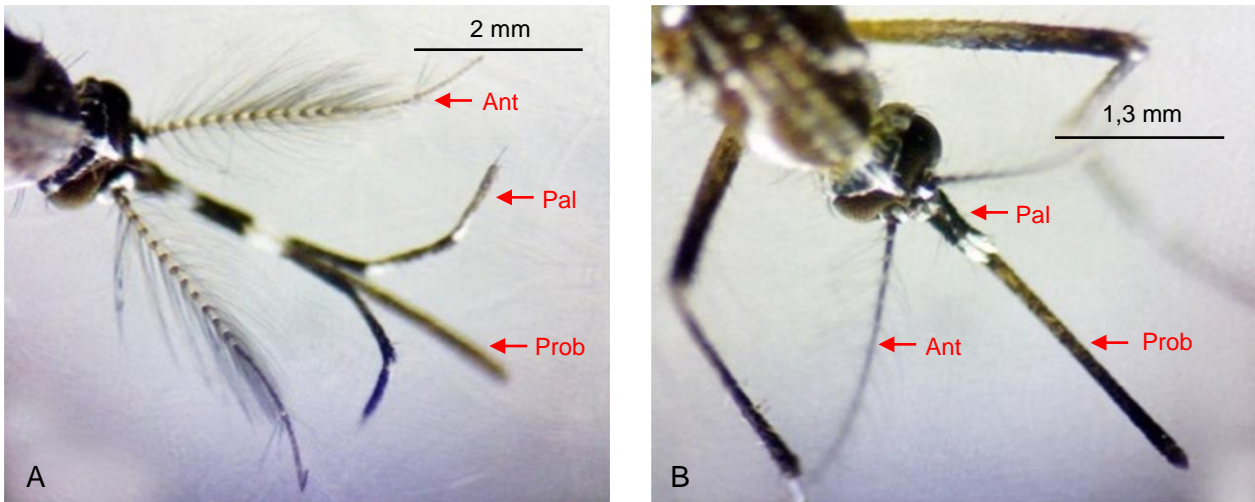
Gambar 1. Perbedaan *mesonotum* pada *Ae. aegypti* (A) dan *Ae. albopictus* (B), *Lyre Marking* (LM), *SSL* (*Submedian Longitudinal Line*) (Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 20x, kamera: OptiLab)



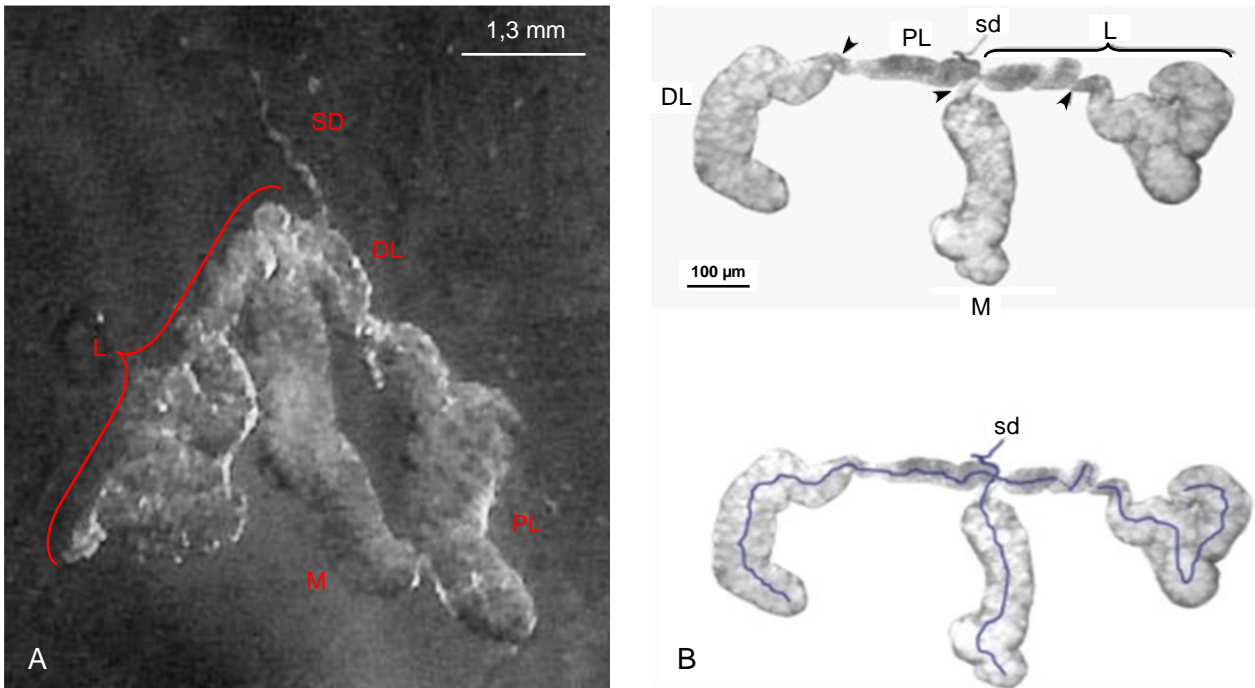
Gambar 2. Perbedaan *meseplimeron* pada *Ae. aegypti* (A) dan *Ae. albopictus* (B); *femur anterior* pada *Ae. aegypti* (C) dan *Ae. albopictus* (D) (Olympus stereo mikroskopi perbesaran 20x, Kamera: Optilab)

mesonotum pada *Ae. aegypti* memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola sepasang garis putih lurus yang sejajar dan diapit oleh sepasang garis melengkung, sedangkan bagian *mesonotum* pada *Ae. albopictus* hanya memiliki satu pola garis putih lurus (Zettel dan Kaufman 2013). Perbedaan bagian *mesonotum* pada *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 1. Bagian *mesepleuron* pada *Ae. aegypti* memiliki dua tambalan sisik putih yang terpisah, sedangkan *mesepleuron*

pada *Ae. albopictus* memiliki dua tambalan putih yang menyatu. Bagian *femur anterior* pada *Ae. aegypti* memiliki deretan rambut putih yang membentuk pola garis putih lurus, sedangkan pada seluruh bagian *femur anterior* *Ae. albopictus* hanya memiliki rambut hitam (Andrew dan Bar 2013; Rahayu dan Ustiawan 2013). Perbedaan bagian *mesepleuron* dan *femur anterior* pada *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 3. Perbedaan antena (Ant), proboscis (Prob), dan maxillary palpus (Pal) pada *Ae. aegypti* jantan (A) dan *Ae. aegypti* betina (B) (Olympus stereo mikroskopi, perbesaran 40x, kamera: OptiLab)



Gambar 4. Struktur morfologi kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina. (A) Tersusun atas salivary duct (sd), lobus Medial (M), lobus Lateral (L), lobus Proximal-Lateral (PL), dan lobus Distal-Lateral (DL) (Mikroskop LW Scientific, perbesaran 400x, kamera: OptiLab). (B) Struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina (Juhn et al. 2011)

Ae. aegypti jantan dan betina memakan nektar tanaman sebagai sumber nutrisi. Selain itu, *Ae. aegypti* betina juga membutuhkan darah manusia sebagai nutrisi untuk pematangan telurnya, sehingga hal ini memainkan peran penting dalam transmisi patogen dan mengontrol salivasi nyamuk terhadap inang (Juhn et al. 2011). *Ae. aegypti* betina memiliki perbedaan ciri morfologi dengan *Ae. aegypti* jantan (dimorfisme seksual) yaitu pada bagian antena, *proboscis* dan *maxillary palpus*. *Ae. aegypti* memiliki antena dengan 13 segmen dan di antara segmen terdapat rambut-rambut yang tersusun melingkar. Ukuran pada antena *Ae. aegypti* jantan lebih panjang dan memiliki rambut antena lebih banyak (tipe *plumose*). Sedangkan antena *Ae. aegypti* betina lebih pendek dan memiliki rambut antena yang lebih sedikit (tipe *pilose*). Selain itu, perbedaan diantara keduanya terletak pada *proboscis* dan *maxillary palpus*. Bagian *proboscis* pada *Ae. aegypti* betina berbentuk silindris, berwarna hitam dan ukurannya lebih panjang dibanding dengan *maxillary palpus*. Sedangkan, ukuran *proboscis* pada *Ae. aegypti* jantan memiliki panjang yang relatif sama dengan *maxillary palpus*. Terdapat 5 segmen pada *maxillary palpus* *Ae. aegypti* jantan dengan bercak warna putih pada setiap segmen. Ukuran *maxillary palpus* pada *Ae. aegypti* betina lebih pendek dibandingkan dengan *Ae. aegypti* jantan. Selain itu, terdapat bercak putih pada bagian ujung *maxillary palpus* *Ae. aegypti* betina (Andrew dan Bar 2013). Perbedaan bagian antena, *proboscis* dan *maxillary palpus* dapat dilihat pada Gambar 3.

Isolasi dan analisis

Isolasi kelenjar saliva *Ae. aegypti* dilakukan dengan teknik mikrodiseksi yaitu metode pembedahan tubuh nyamuk yang dilakukan dibawah mikroskop untuk memisahkan kelenjar saliva *Ae. aegypti* dari bagian tubuh nyamuk lainnya (Schmid et al. 2017). Pada proses mikrodiseksi, tubuh nyamuk diletakkan di atas tetesan larutan 0,5% NaCl. Hal ini dilakukan untuk menjaga agar sel dan jaringan pada kelenjar saliva yang telah diisolasi tidak mengalami lisis karena larutan 0,5% NaCl bersifat isotonis dengan cairan di dalam tubuh serangga

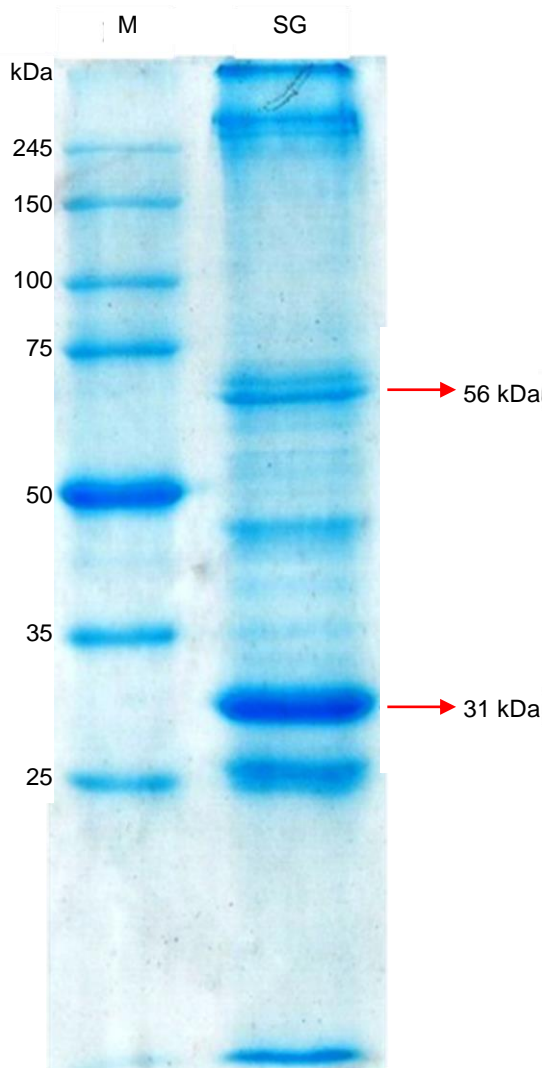
(Barbosa et al. 2015). Penyimpanan jaringan kelenjar saliva pada larutan PMSF dalam PBS yang berfungsi sebagai penghambat aktivitas beberapa protease, sehingga diharapkan protein kelenjar saliva tidak terdegradasi oleh adanya protease (Bano et al. 2014).

Kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina memiliki beberapa fungsi penting untuk kelangsungan hidupnya (Luplertlop 2014), karena mensekresikan molekul bioaktif untuk efisiensi selama proses mengisap darah manusia (de Melo et al. 2015). Berdasarkan struktur dan fisiologisnya, kelenjar saliva nyamuk menjadi organ penting untuk mengatasi ketahanan fisik dan hemostatik pada tubuh inang (manusia). Peran penting lainnya yaitu menghalangi respon imun atau inflamasi inang untuk keberhasilan menentukan lokasi injeksi pada saat pengambilan darah dan transmisi patogen (Urdaneta-Marquez dan Failloux 2011).

Struktur morfologi kelenjar saliva *Ae. aegypti* bertipe *acinus* (Ribeiro et al. 2016) terdiri atas enam lobus yang tersusun sepasang dan terhubung oleh saluran utama yang disebut *Salivary Duct* (SD) (Raquin dan Lambrechts 2017). Lobus tersebut terdiri dari tiga bagian yang sama yaitu dua lobus lateral (*Lateral lobes* (L)) dengan ukuran yang identik dan terletak dipinggir serta satu lobus di tengah (*Medial* (M)) dengan bentuk lebih pendek dan lebar. Lobus lateral tersusun atas dua bagian yaitu *Proximal-Lateral* (PL) dan *Distal-Lateral* (DL) (Juhn et al. 2011). Struktur kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Gambar 4.

Secara histologi, bagian-bagian dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* mensekresikan protein yang berbeda (Wasinpiyamongkol et al. 2010). Pada bagian lobus proksimal (*Proximal-Lateral*) memproduksi protein yaitu *alpha-glucosidase*, lisozim, amilase 1, *salivary chymotrypsin-like*, V-ATPase, *carbonic anhydrase*, *gambicin*, dan *serine protease*. Pada bagian lobus distal (*Distal-Lateral*) memproduksi protein D7, 30 kDa *allergen-like protein*, dan *aegyptin*. Sedangkan pada lobus medial memproduksi protein sialokinin, *angiopoietin-like*, dan *putative C-type lectin*. Lobus medial dan lobus distal juga memproduksi protein yang sama yaitu serpin, *salivary apyrase*, D7, *salivary purine nucleosidase* (Juhn et al. 2011).

Hasil analisis profil protein dari ekstrak protein total kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan metode SDS-PAGE menunjukkan adanya dua pita protein target dengan berat molekul 31 dan 56 kDa (Gambar 5). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Oktarianti et al. (2014), diketahui bahwa protein dengan berat molekul 31 dan 56 kDa terdeteksi bersifat imunogenik yang berarti dapat memodulasi respon imun manusia yang tinggal di daerah endemik DBD. Oleh karena protein 31 dan 56 kDa diduga berperan penting dalam modulasi respon imun inang terhadap paparan saliva *Ae. aegypti*, maka selanjutnya dilakukan purifikasi protein untuk menspesifikasikan pengujian imunogenesitas dari kedua protein tersebut.



Gambar 5. Profil protein total kelenjar saliva/ *salivary gland* (SG) *Ae. aegypti*, marker protein (Promega V8491) (M) (Scanner Canon MP287)

Purifikasi

Purifikasi protein merupakan proses pemurnian protein untuk mendapatkan protein murni dalam jumlah yang banyak dari suatu sampel. Protein murni didapatkan dengan cara menghilangkan komponen non target atau kontaminan sehingga didapatkan protein murni untuk dianalisis lebih lanjut (Hedhammar et al. 2010). Purifikasi protein dapat menggunakan teknik kromatografi maupun non-kromatografi. Teknik pemurnian protein non-kromatografi yang umum digunakan adalah metode elektroelusi karena teknik tersebut tidak membutuhkan peralatan yang rumit, proses pemurnian protein yang lebih cepat serta relatif mudah dilakukan (Sa-Pereira et al. 2000).

Purifikasi protein imunogenik 31 dan 56 kDa dilakukan dengan metode elektroelusi dan dialisis. Metode elektroelusi bertujuan untuk mengeluarkan protein target dari dalam gel poliakrilamid sehingga didapatkan protein murni yang diinginkan (Vázquez-Iglesias et al. 2017). Potongan gel poliakrilamid yang didalamnya terdapat protein target ditempatkan ke dalam membran selofan yang berisi buffer elektroda. Protein target tetap berada pada membran selofan karena ukuran pori membran (14 kDa) lebih kecil dari pada ukuran protein target 31 dan 56 kDa. Pergerakan protein keluar dari gel poliakrilamid dibantu dengan tegangan listrik selama proses elektroelusi. Tegangan listrik dan waktu yang diperlukan selama proses elektroelusi bergantung pada ukuran protein target dan konsentrasi gel poliakrilamid (Burgess 2009). Berdasarkan hasil optimasi, proses elektroelusi protein target 31 dan 56 kDa berhasil dilakukan dengan menggunakan tegangan listrik 25 V selama 150 menit. Purifikasi protein kemudian dilanjutkan dengan proses dialisis untuk menghilangkan kontaminan yang masih bercampur dengan protein target (Bhaskar et al. 2008). Prinsip kerja dialisis adalah pergerakan acak molekul atau partikel di dalam zat pelarut dari larutan dengan konsentrasi tinggi ke larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah melalui membran semipermeabel (Haney et al. 2013).

Hasil dari proses dialisis kemudian dipekatkan menggunakan *microcentrifuge tube* MWCO 10 kDa untuk menghilangkan molekul-molekul seperti garam penyusun

buffer dengan berat molekul dibawah 10 kDa sehingga diperoleh protein murni dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Konsentrasi protein 31 kDa adalah 0,47 µg/µL dan protein 56 kDa yaitu 0,44 µg/µL yang kemudian dikonfirmasi secara visual dengan metode SDS-PAGE untuk memastikan bahwa protein 31 dan 56 kDa telah berhasil dimurnikan.

Berdasarkan hasil konfirmasi purifikasi protein dengan metode SDS-PAGE, terlihat bahwa fraksi protein 31 dan 56 kDa telah berhasil dimurnikan (Gambar 6). Terlihat pita tunggal protein 31 dan 56 kDa yang sejajar dengan kontrol positif yaitu protein 31 kDa dan 56 kDa dari ekstrak total kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Salah satu kriteria protein yang berhasil dimurnikan akan terbentuk pita tunggal setelah dikonfirmasi melalui analisis SDS-PAGE (Ahmad 2012).

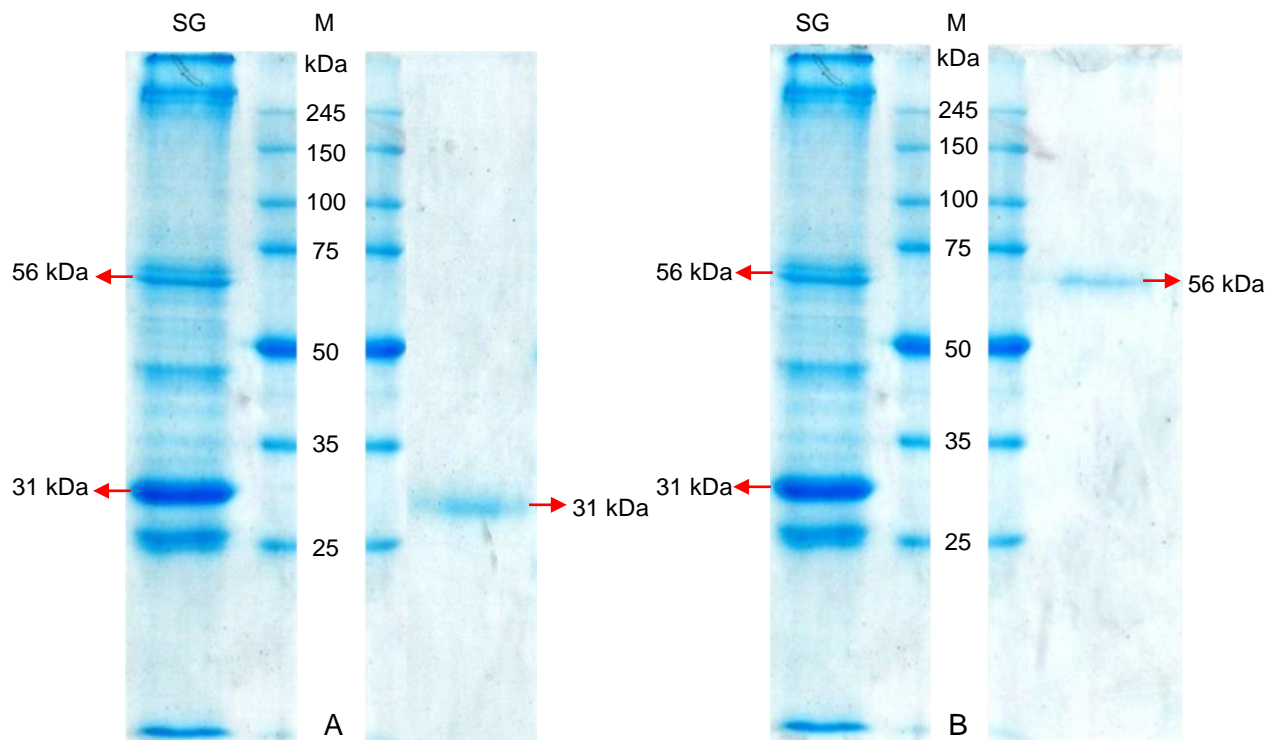
Analisis imunogenisitas

Fraksi protein 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang telah berhasil dimurnikan perlu dikonfirmasi lebih lanjut untuk menguji aktivitas imunogenisitasnya dengan metode *dot blot*. Analisis *dot blot* pada protein total, protein imunogenik 31 dan 56 kDa menggunakan tiga macam sampel serum manusia sebagai antibodi primer yaitu sampel serum pasien DBD, serum orang

sehat di daerah endemik, dan serum neonatus yang diambil dari tali pusar bayi yang baru lahir. Hasil penelitian Oktarianti et al. (2014), menunjukkan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik DBD memiliki respon antibodi spesifik terhadap protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang tidak dimiliki oleh orang yang tinggal di daerah non-endemik DBD dan neonatus.

Hasil analisis *dot blot* menunjukkan terbentuknya noktah gelap pada membran yang menandakan adanya ikatan antara antigen dan antibodi (Gambar 7). Hal ini menunjukkan bahwa protein total, fraksi protein 31 kDa dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat terdeteksi oleh sampel serum pasien DBD, serum orang sehat endemik, dan serum neonatus walaupun lebih tipis. Hasil positif pada serum neonatus disebabkan oleh antibodi (IgG) yang dimiliki bayi baru lahir diperoleh secara pasif dari sang ibu (*maternal antibody*) yang pernah terpapar nyamuk *Ae. aegypti* walaupun dalam kadar yang rendah (Chau et al. 2009).

Ketebalan warna pada hasil analisis menunjukkan adanya ikatan yang kuat antara antigen dan antibodi. Noktah gelap yang terbentuk pada sampel protein total kelenjar saliva *Ae. aegypti* (kontrol positif) yang

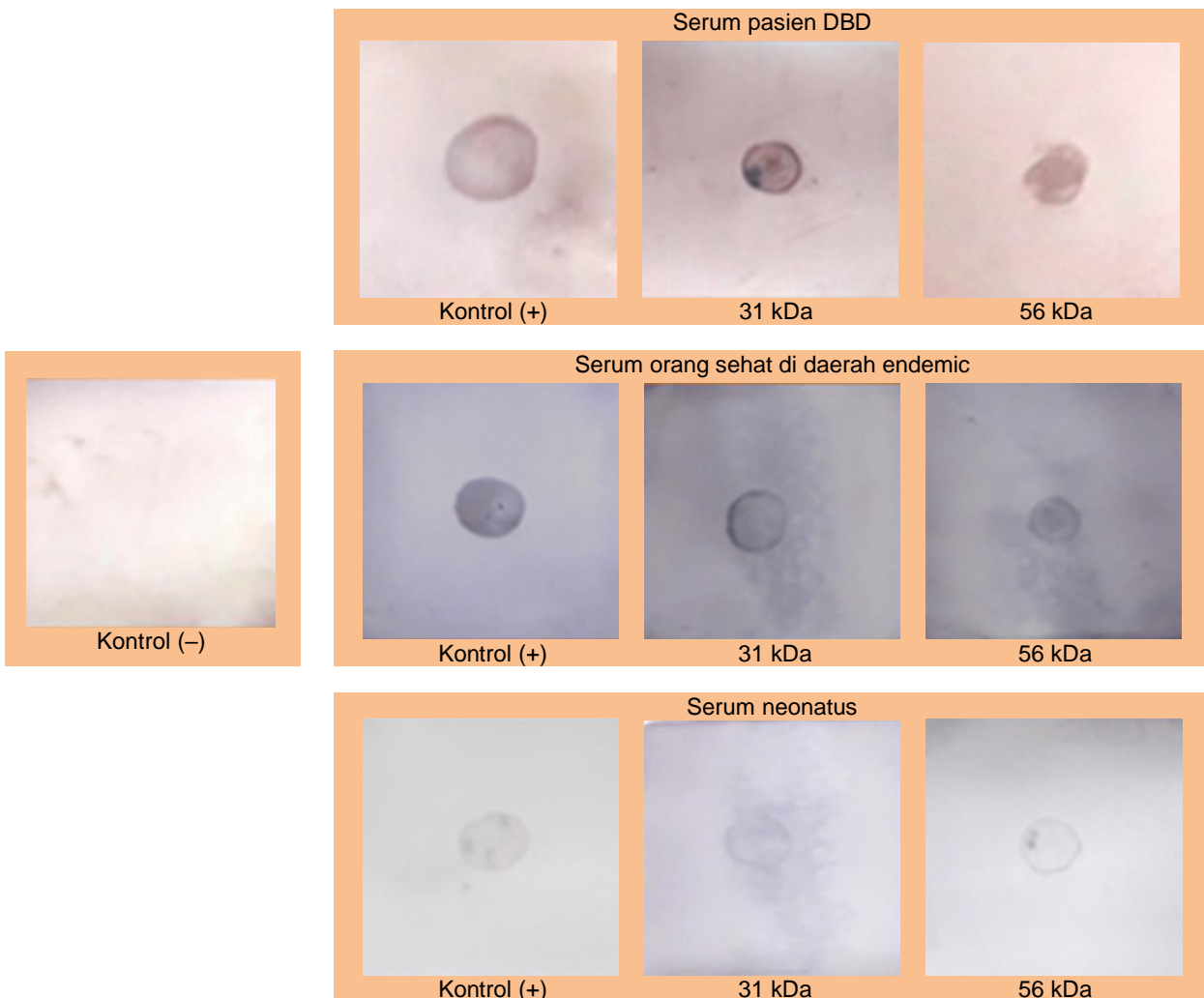


direaksikan dengan sampel serum pasien DBD dan sampel serum orang sehat yang tinggal di daerah endemik nampak dengan ketebalan yang relatif sama. Londono-Renteria et al. (2013) menyatakan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik memiliki respon imun yang membentuk antibodi spesifik karena kemungkinan seringnya terkena paparan saliva vektor.

Noktah gelap yang juga terbentuk pada sampel fraksi protein 31 dan 56 kDa hasil purifikasi yang terdeteksi oleh ketiga sampel serum menunjukkan adanya reaksi positif antara antigen dan antibodi. Protein 31 kDa memiliki komponen utama D7 (Oktarianti et al. 2014) yaitu protein yang paling banyak disekresikan pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* betina. Hal ini memungkinkan inisiasi respon antibodi spesifik pada orang yang tinggal di daerah endemik (Oktarianti et al. 2015). Protein D7 merupakan protein yang mampu

berikatan dengan amina biogenik seperti serotonin, histamin, dan norepinefrin pada inang. Ikatan tersebut bersifat antagonis terhadap aktivitas hemostasis inang yaitu vasokonstriksi dan agregrasi platelet sehingga dapat memfasilitasi nyamuk untuk menghisap darah manusia dan transmisi patogen (Oktarianti et al. 2015). Sedangkan protein 56 kDa memiliki komponen utama *apyrase* yang disekresikan pada saat nyamuk menghisap darah yang juga memodulasi respon imun inang (Oktarianti et al. 2015). *Apyrase* atau *ATP-diphosphohydrolase* merupakan enzim yang dapat mengubah ATP atau ADP menjadi AMP dan ortofosfat. Penurunan ADP dapat menghalangi agrerasi platelet sehingga memudahkan nyamuk untuk memperoleh darah saat menghisap darah manusia (Dong et al. 2012).

Reaksi positif dari kedua fraksi protein 31 da 56 kDa hasil purifikasi terhadap ketiga



Gambar 7. Hasil analisis Dot Blot terhadap protein total, fraksi protein 31 dan 56 kDa hasil purifikasi dari kelenjar saliva *Ae. aegypti*. (Scanner Canon MP287)

sampel serum membuktikan bahwa orang yang tinggal di daerah endemik memiliki respon imun dengan membentuk antibodi spesifik untuk bereaksi dengan antigen. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Oktarianti et al. (2014) bahwa protein dengan berat molekul 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* bersifat imunogenik dan dapat memodulasi respon imun orang yang tinggal di daerah endemik.

KESIMPULAN

Purifikasi protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* dapat dilakukan dengan metode elektroelusi dan dialisis. Hasil purifikasi telah berhasil dikonfirmasi melalui analisis SDS-PAGE yang menunjukkan adanya pita tunggal protein 31 dan 56 kDa yang sejajar dengan kontrol positif protein total kelenjar saliva *Ae. aegypti*. Hasil purifikasi tersebut diperkuat dengan data analisis imunogenisitas protein imunogenik 31 dan 56 kDa melalui analisis *dot blot* yang menunjukkan adanya reaksi positif antara antigen dan antibodi dengan terbentuknya noktah gelap pada membran PVDF.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LP2M) Universitas Jember yang telah memberikan dukungan dana penelitian dan publikasi melalui Surat Keputusan Rektor No. 18382/UN25/LT/2019 dengan Surat Penugasan No. 4301/UN25.3.1/LT/2019 Hibah Reworking Skripsi/Thesis 2019.

DAFTAR PUSTAKA

Ahmad R (2012) Protein purification. InTech, Janeza Trdine 9 51000 Rijeka, Croatia. doi: 10.5772/1287

Almeras L, Fontaine A, Belghazi M, Bourdon S, Boucomont-Chapeaublanc E, Orlandi-Pradines E, Baragatti M, Corre-Catelin N, Reiter P, Pradines B, Fusai T, Rogier C (2010) Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. Vector Borne Zoonotic Dis 10:391–402. doi: 10.1089/vbz.2009.0042

Andrew J, Bar A (2013) Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. Ann Rev Res Biol 3:52–69

Bano S, Lateef M, Iqbal S, Naqvi B, Iqbal L (2014) Role of protein denaturing agents and EDTA on α -amylase activity from *Bacillus subtilis* Kibge Has. Int J Pharm Chem Biol Sci 4:411–415

Barbosa P, Berry DL, Kary CS (2015) Insect histology: Practical laboratory techniques, 1st edn. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK. doi: 10.1002/9781118876114

Berger ST, Ahmed S, Muntel J, Polo NC, Bachur R, Kentsis A, Steen J, Steen H (2015) MStern blotting—high throughput polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane-based proteomic sample preparation for 96-well plates. Mol Cell Proteomics 14:2814–2823. doi: 10.1074/mcp.O115.049650

Bhaskar S, Dutt S, Mukherjee R (2008) A simple method of electroelution of individual protein bands from SDS polyacrylamide gels for direct study in cellular assays. J Immunoassay 21:355–375. doi: 10.1080/01971520009349542

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farra JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. Nature 496:504–507. doi: 10.1038/nature12060

Boesri H (2011) Biologi dan peranan *Aedes albopictus* (Skuse) 1894 sebagai penular penyakit. Aspirator 3:117–125. doi: 10.22435/aspirator.v3i2.2966

Burgess RR (2009) Elution of protein from gels. Methods Enzymol 463:565–572. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63032-9

Chau TNB, Hieu NT, Anders KL, Wolbers M, Lien le B, Hieu LT, Hien TT, Hung NT, Farrar J, Whitehead S, Simmons CP (2009) Dengue virus Infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese Infants. J Infect Dis 200:1893–1900. doi: 10.1086/648407

de Melo BMS, da Silva NLL, Gomez RS, Navegantes KC, Oliveira ALB, Almeida L, Azevedo CHM, Monteiro MC (2015) Bioactive compounds of the salivary glands from *Aedes aegypti* with anti-hemostatic action. Ann Res Rev Biol 8:1–17. doi: 10.9734/ARRB/2015/20322

Dong F, Fu Y, Li X, Jiang J, Sun J, Cheng X

- (2012) Cloning, expression, and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus*. *Parasitol Res* 110:931–937. doi: 10.1007/s00436-011-2579-x
- Farjana T, Tuno N (2013) Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 50:838–846. doi: 10.1603/ME12146
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, Rezende GL (2012) Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: Effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLoS One* 7:e30363. doi: 10.1371/journal.pone.0030363
- Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras L (2011) Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites Vectors* 4:187. doi: 10.1186/1756-3305-4-187
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW (2010) Dengue: A continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8:S7–16. doi: 10.1038/nrmicro2460
- Haney P, Herting K, Smith S (2013) Molecular weight cut-off (MWCO) specifications and rates of buffer exchange with Slide-A-Lyzer dialysis devices and snakeskin dialysis tubing. *Protein Biology Resource Library*, ThermoFisher Scientific, Waltam
- Hedhammar M, Karlström AE, Hober S (2010) Chromatographic methods for protein purification. *Royal Institute of Technology, Stockholm*
- Hodijah DN, Prasetyowati H, Marina R (2015) Tempat perkembangbiakan *Aedes* spp. sebagai penular virus *dengue* pada berbagai tempat di Kota Sukabumi. *J Ekologi Kesehat* 14:1–7. doi: 10.22435/jek.v14i1.4651.1-7
- Juhn J, Naeem-Ullah U, Guedes BAM, Majid A, Coleman J, Pimenta PFP, Akram W, James AA, Marinotti O (2011) Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors* 4:1. doi: 10.1186/1756-3305-4-1
- Kazimírová M, Štibrániová I (2013) Tick salivary compounds: Their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3:43. doi: 10.3389/fcimb.2013.00043
- Londono-Renteria B, Cardenas JC, Cardenas LD, Christofferson RC, Chisenhall DM, Wesson DM, McCracken MK, Carvajal D, Mores CN (2013) Use of anti-*Aedes aegypti* salivary extract antibody concentration to correlate risk of vector exposure and dengue transmission risk in Colombia. *PLoS One* 8:e81211. doi: 10.1371/journal.pone.0081211
- Luplertlop N (2014) *Aedes* mosquito salivary immune peptides: Boost or block dengue viral infections. *J Coastal Life Med* 2:163–168. doi: 10.12980/JCLM.2.2014C1219
- Miller N (2010) Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther* 12:31–38
- Murrell S, Wu SC, Butler M (2011) Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv* 29:239–247. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.11.008
- Oktarianti R, Senjarini K, Fatchiyah F, Aulanni'am (2014) Immunogenic protein from salivary gland of *Aedes aegypti* against to human sera. *Adv Nat Appl Sci* 8:101–107
- Oktarianti R, Senjarini K, Hayano T, Fatchiyah F, Aulanni'am (2015) Proteomic analysis of immunogenic protein from salivary glands of *Aedes aegypti*. *J Infect Public Health* 8:575–582. doi: 10.1016/j.jiph.2015.04.022
- Rahayu DF, Ustiawan A (2013) Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Balaba* 9:7–10
- Raquin V, Lambrechts L (2017) Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology* 507:75–81. doi: 10.1016/j.virol.2017.04.009
- Ribeiro JMC, Martin-Martin I, Arcà B, Calvo E (2016) A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS One* 11:e0151400. doi: 10.1371/journal.pone.0151400
- Sa-Pereira P, Duarte J, Costa-Ferreira M (2000) Electroelution as a simple and fast protein purification method: Isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCM1 966. *Enzyme Microb Technol* 27:95–99. doi:

- 10.1016/s0141-0229(00)00185-x
- Sasmono RT, Taurel AF, Prayitno A, Sitompul H, Yohan B, Hayati RF, Bouckenoghe A, Hadinegoro SR, Nealon J (2018) Dengue virus serotype distribution based on serological evidence in pediatric urban population in Indonesia. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006616. doi: 10.1371/journal.pntd.0006616
- Sattayasai N (2012) Protein purification. Intech, Rijeka, Croatia. doi: 10.5772/35425
- Schmid MA, Kauffman E, Payne A, Harris E, Kramer LD (2017) Preparation of mosquito salivary gland extract and intradermal inoculation of mice. *Bio-Protoc* 7:e2407. doi: 10.21769/BioProtoc.2407
- Sim S, Dimopoulos G (2010) Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One* 5:e10678. doi: 10.1371/journal.pone.0010678
- Sucipto CD (2011) Vektor penyakit tropis. Gosyen Publishing, Yogyakarta
- Urdaneta-Marquez L, Failloux AB (2011) Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol* 11:253–261. doi: 10.1016/j.meegid.2010.11.020
- Vázquez-Iglesias L, Estefanell-Ucha B, Barcia-Castro L, de la Cadena MP, Alvarez-Chaver P, Ayude-Varquez D, Rodriguez-Berrocal FJ (2017) A simple electroelution method for rapid protein purification: isolation and antibody production of alpha toxin from *Clostridium septicum*. *PeerJ* 5:e3407. doi: 10.7717/peerj.3407
- Vogt MB, Lahon A, Arya RP, Kneubehi AR, Spencer Clinton JL, Paust S, Ricco-Hesse R (2018) Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006439. doi: 10.1371/journal.pntd.0006439
- Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS (2013) Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci* 20:37. doi: 10.1186/1423-0127-20-37
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, Seveno M, Remoue F, Demette E, Brizard JP, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Misse´ D (2010) Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 10:1906–1916. doi: 10.1002/pmic.200900626
- Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JGX, Lye DC, Ng LC, Leo YS (2015) Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg* 92:999–1005. doi: 10.4269/ajtmh.14-0628
- Zettel C, Kaufman P (2013) Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insect: Diptera: Culicidae). EENY-434. Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, Florida