

PURIFIKASI FRAKSI PROTEIN IMUNOGENIK 47 kDa DARI KELENJAR SALIVA *Aedes albopictus* SEBAGAI TARGET PENGEMBANGAN VAKSIN DENGUE BERBASIS VEKTOR

[*Purification of the 47 kDa Immunogenic Protein Fraction from Salivary Gland Aedes albopictus as a Target for Vector-Based Dengue Vaccine Development*]

Syubbanul Wathon¹, Itsna Rahmawati¹, Rike Oktarianti¹, Asmoro Lelono¹, dan Kartika Senjarini^{1✉*}

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Universitas Jember Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto, Sumbersari, Jember 68121

*Email: senjarini@unej.ac.id

ABSTRACT

The vectorial capacity of *Ae. albopictus* has been known as a potential vector of dengue virus that causes Dengue Hemorrhagic Fever. Transmission of dengue virus occurs during the blood-feeding process of *Ae. albopictus* to humans that is facilitated by the biological activity of proteins in the vector salivary glands. Previous studies showed the 47 kDa protein fraction from the salivary glands of *Ae. albopictus* is immunogenic. The 47 kDa protein is a family of serpins which is thought to be an anticoagulant and acts as a protease inhibitor to facilitate the transmission of dengue virus. The role of these proteins indicates potential in the development of vaccines inhibiting the transmission of pathogens through vaccination against these proteins to inhibit dengue transmission. The study of the potential of these proteins requires pure extracts, therefore purification of the target protein is a critical step. This research was conducted by landing collection and rearing of *Ae. albopictus*, isolation and protein extraction of salivary gland, isolation of 47 kDa protein fraction by SDS-PAGE analysis, protein purification, dot blot, and western blot analysis. SDS-PAGE analysis showed a single band of 47 kDa target protein from the salivary gland of *Ae. albopictus*, which was successfully purified by using Electroeluter. Dot blot analysis showed that 47 kDa protein was detected as immunogenic and confirmed by western blot analysis that the purified target protein had a molecular weight of 47 kDa.

Keywords: *Ae. albopictus*, electroelution, immunogenic, protein, saliva

ABSTRAK

Kapasitas vektorial *Ae. albopictus* telah diketahui sebagai vektor potensial virus dengue yang mengakibatkan DBD. Transmisi virus dengue terjadi ketika *Ae. albopictus* melakukan *blood feeding* ke manusia yang difasilitasi oleh aktivitas biologis protein pada kelenjar saliva vektor. Penelitian kami sebelumnya menunjukkan fraksi protein 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* bersifat imunogenik. Protein 47 kDa merupakan *serpins family* yang diduga sebagai antikoagulan dan berperan sebagai protease inhibitor sehingga mempermudah transmisi virus dengue. Peran protein tersebut mengindikasikan adanya potensi dalam pengembangan vaksin penghambat transmisi patogen melalui vaksinasi melawan protein tersebut sehingga dapat menghambat transmisi dengue. Studi potensi protein tersebut memerlukan ekstrak murni, maka purifikasi protein target merupakan langkah yang sangat penting. Penelitian ini dimulai dengan *landing collection* dan *rearing Ae. albopictus*, isolasi dan ekstraksi protein kelenjar saliva, isolasi fraksi protein 47 kDa melalui SDS-PAGE, purifikasi protein, analisis *dot blot* dan *western blot*. Analisis SDS-PAGE menunjukkan pita tunggal protein target 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* yang berhasil dipurifikasi menggunakan *Electroeluter*. Analisis *dot blot* menunjukkan protein 47 kDa terdeteksi bersifat imunogenik dan dikonfirmasi melalui analisis *western blot* bahwa protein target hasil purifikasi memiliki berat molekul 47 kDa.

Kata Kunci: *Ae. albopictus*, elektroelusi, imunogenik, protein, saliva

PENDAHULUAN

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) disebabkan infeksi virus dengue telah menjadi kasus endemik di beberapa negara tropis dunia (Ferreira-de-Lima dan Lima-Camara, 2018). Endemisitas DBD meluas lebih dari 100 negara Asia, Eropa, Afrika dan Amerika (World Health Organization, 2022). Sekitar 500.000 kasus DBD dari 50–100 juta orang yang terinfeksi berakibat fatal hingga kematian (Irma dan Swaidatul, 2021). Kasus DBD di Indonesia tergolong tinggi, salah satunya di Jawa Timur tercatat 5.948 kasus. Kabupaten Jember menjadi wilayah endemik DBD di Jawa Timur dengan kasus DBD pada tahun 2018 tercatat 389 kasus (Kemenkes RI, 2018). Tingginya kasus DBD di dunia maupun di Indonesia tidak

terlepas dari keberadaan vektor nyamuk sebagai penularan virus dengue (Kinansi *et al.*, 2019).

Nyamuk *Ae. aegypti* menjadi vektor primer virus dengue sedangkan *Ae. albopictus* sebagai vektor sekundernya (Ekwudu *et al.*, 2020). *Ae. aegypti* bersifat antropofilik (menyukai darah manusia) sedangkan *Ae. albopictus* bersifat zoofilik (menyukai darah hewan). Sifat tersebut dapat berubah karena *Ae. albopictus* yang pada awalnya adalah spesies hutan namun dapat beradaptasi dengan permukiman penduduk karena banyak habitat aslinya yang hilang (Medley *et al.*, 2019). *Ae. albopictus* memiliki toleransi tinggi terhadap suhu rendah (Heriawati *et al.*, 2020). *Ae. albopictus* juga memiliki daya tahan tubuh di alam lebih kuat dari pada *Ae. aegypti*, sehingga potensial

*Kontributor Utama

*Diterima: 15 September 2022 - Diperbaiki: 13 Januari 2023 - Disetujui: 13 Januari 2023

vektornya menyebarkan virus semakin tinggi (Lwande *et al.*, 2020). Kemampuan adaptasi tersebut berpengaruh pada persebarannya yang luas di wilayah tropis dan subtropis (Ding *et al.*, 2018). Hal ini memberikan peluang kontak yang besar dengan manusia ketika *blood-feeding* menyebarkan virus dengue (Medley *et al.*, 2019).

Proses *blood-feeding* dibantu oleh komponen protein kelenjar saliva vektor (Heriawati *et al.*, 2020). Protein kelenjar saliva nyamuk berfungsi mencegah vasokonstriksi, menghambat agregasi platelet, antikoagulasi, antiinflamasi dan antihemostatik sehingga mempermudah *blood-feeding*. Protein kelenjar saliva dapat memodulasi sistem imun inang sehingga dikategorikan sebagai protein imunogenik (Lwande *et al.*, 2020). Penelitian kami telah mengidentifikasi protein imunogenik kelenjar saliva *Ae. albopictus* yaitu 31 kDa, 47 kDa dan 67 kDa (Oktarianti *et al.*, 2021). Protein saliva *Ae. albopictus* 47 kDa merupakan *serpins family* diketahui sebagai antikoagulan pada proses *blood feeding* (Doucoure *et al.*, 2013). Protein serpin juga berperan sebagai protease inhibitor dari proteinase serin yang berfungsi memecah ikatan polipeptida yang diproduksi patogen, sehingga transmisi virus dengue dari vektor ke inang berjalan lancar (Doucoure *et al.*, 2013). Adanya peran protein tersebut memunculkan hipotesis bahwa vaksinasi pada inang dengan anti protein imunogenik tersebut berpeluang melindungi inang terhadap patogen yang dibawa vektor bahkan dapat memotong transmisinya (Titus *et al.*, 2006). Berdasarkan peran penting protein 47 kDa, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas biologisnya. Penelitian aktivitas biologis protein memerlukan protein murni, sehingga penting dilakukan purifikasi protein.

Penelitian kami telah melakukan purifikasi protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Ae. aegypti* (Wathon *et al.*, 2020) dan 31 dan 67 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* (Wathon *et al.*, 2021) yang dilakukan dengan metode elektroelusi menggunakan membran selofan. Namun konsentrasi protein hasil purifikasi tersebut masih belum cukup tinggi. Oleh karena itu, purifikasi protein pada penelitian ini dilakukan dengan metode elektroelusi menggunakan alat *Electroeluter Model 422* (Bio-Rad) untuk memperoleh protein murni dengan konsentrasi tinggi serta waktu purifikasi yang singkat. Dengan demikian, purifikasi protein imunogenik 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* penting dilakukan untuk menspesifikasikan target dalam pengembangan vaksin dengue berbasis vektor.

BAHAN DAN CARA KERJA

Landing Collection dan Rearing *Ae. albopictus*

Penelitian dimulai dengan kegiatan *landing collection* yaitu pengumpulan sampel nyamuk dewasa di sekitar habitat *Ae. albopictus* dengan menggunakan alat aspirator dan jaring serangga. Selanjutnya, dilakukan *rearing* yaitu kegiatan pemeliharaan sampel nyamuk *Ae. albopictus* jantan dan betina hingga bertelur. Selanjutnya telur menetas menjadi larva dan berkembang menjadi pupa. Pupa kemudian dipindahkan ke kandang koloni hingga menjadi nyamuk dewasa. Kegiatan *rearing* dilakukan di insektarium pada suhu 28°C dan kelembaban relatif 60% yang bertempat di *Animal Care Unit*, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember.

Identifikasi Spesies *Ae. albopictus* Berdasarkan Karakter Morfologi

Identifikasi morfologi nyamuk *Ae. albopictus* pada penelitian ini dilakukan menggunakan buku *Zootaxa 598* (Rueda, 2004). Pengamatan morfologi spesies dilakukan dengan mikroskop stereo (NIKON SMZ745, Jepang). *Ae. Albopictus* memiliki deretan sisik putih memanjang pada bagian mesonotum. Terdapat dua deret sisik menyatu seperti membentuk huruf V pada mesepimeron. Bagian *anterior mid-femur* berwarna gelap tanpa sisik putih (Rahayu dan Ustiawan, 2013). Identifikasi *Ae. albopictus* jantan dan betina dilakukan melalui pengamatan pada antena, *proboscis*, *palpus*, serta ukuran tubuh. Antena *Ae. albopictus* jantan memiliki rambut lebat (*plumose*), sedangkan rambut antena pada betina jarang (*pilose*). Ukuran *palpus* jantan hampir atau sama panjang dengan *proboscis*, sedangkan *palpus* betina berukuran $\frac{1}{4}$ dari panjang *proboscis* (Montero, 2020). Ukuran tubuh nyamuk betina lebih besar dari pada jantan (Biswas dan Banerjee, 2016).

Isolasi dan Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva *Ae. albopictus*

Isolasi kelenjar saliva dilakukan dengan penambahan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA) di atas kaca objek. Sebanyak 100 nyamuk *Ae. albopictus* betina dewasa disiapkan untuk diisolasi kelenjar salivanya. Proses isolasi kelenjar saliva nyamuk dilakukan secara *microdissection* dengan mikroskop stereo (Schmid *et al.*, 2017). Kelenjar saliva dimasukkan pada larutan 1 mM *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (PMSF) dalam PBS pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA) dan disimpan pada suhu -20°C. Ekstraksi protein dilakukan dengan penambahan 10 μ L *loading buffer* ke dalam *tube* yang berisi sampel kelenjar saliva. Sampel tersebut kemudian dipanaskan menggunakan *thermoshaker* pada suhu 95°C

selama 3 menit.

Isolasi Fraksi Protein 47 kDa

Analisis *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dimulai dengan *loading* sampel protein dan marker protein (GeneDirex, Taiwan) ke dalam gel *polyacrylamide* yang terdiri atas *separating gel* 12% dan *stacking gel* 4%. SDS-PAGE dilakukan pada tegangan 150 V (*constant volt*) selama 60 menit di dalam *buffer* elektroda pH 8,3. Pewarnaan gel dilakukan pada larutan *staining* dengan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R250 (Sigma-Aldrich, USA) dan dilanjutkan proses *destaining*. Protein target 47 kDa kemudian dipotong secara aseptis dan disimpan pada *buffer* elektroda pH 8,3 pada suhu 4°C.

Purifikasi Fraksi Protein 47 kDa

Potongan gel pita fraksi protein 47 kDa dimasukkan ke *glass tube Electroeluter* Model 422 (Bio-Rad). Elektroelusi dilakukan selama 3–5 jam dengan arus 100 V (*constant volt*). Konsentrasi protein hasil purifikasi dianalisis dengan metode Bradford (Sigma-Aldrich, USA). Absorbansi sampel diukur menggunakan *microplate reader* (Bio-Rad, USA) pada panjang gelombang 595 nm. Keberhasilan purifikasi protein target dikonfirmasi melalui analisis SDS-PAGE dengan munculnya pita tunggal fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi yang sejajar dengan pita protein 47 kDa dari sampel kontrol (+) yaitu ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus*.

Preparasi Serum Darah Manusia

Sebanyak 30 serum dikoleksi dari probandus penduduk sehat, pasien DBD dan neonates di Kabupaten Jember yang merupakan wilayah endemik DBD. Masing-masing kelompok terdiri dari 10 sampel serum. Probandus mengisi *Inform Consent* dan pengambilan sampel darah dilakukan berdasarkan protokol *Ethical Clearance* dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (No. 1034/UN25.8/KEPK/DL/2020). Sampel darah diletakkan pada *vacutainer* tanpa antikoagulan dan diinkubasi selama 30 menit. Cairan darah bebas sel yang terbentuk kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dikoleksi kemudian disimpan pada suhu -20°C sebagai sampel serum manusia.

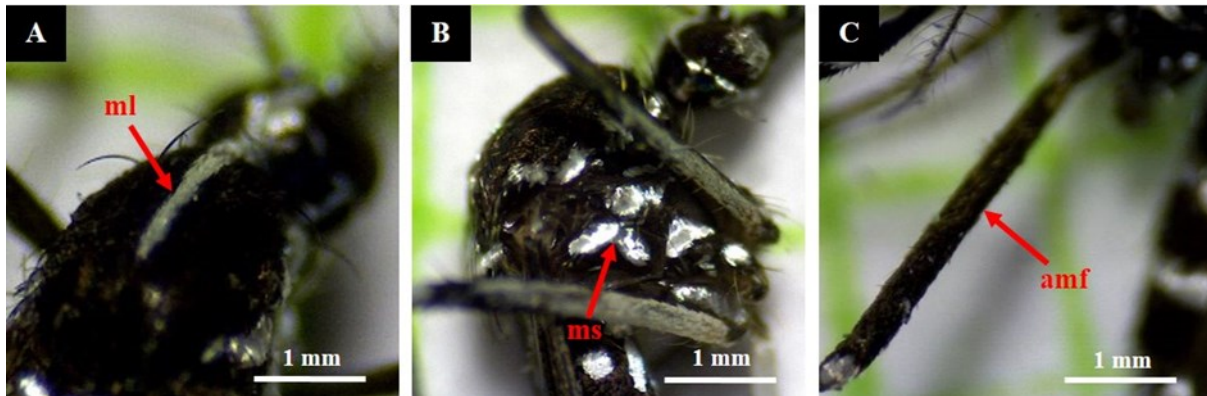
Deteksi Immunogenitas Fraksi Protein 47 kDa Hasil Purifikasi

Sampel fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi diteteskan pada membran *Polyvinylidene Fluoride* (PVDF) (Merck, USA) dan diinkubasi hingga permukaan membran kering. Kemudian dilakukan *blocking* membran dengan larutan 5% *skim milk* dalam *Tris Buffer Saline* (TBS) selama 1 jam pada *shaker* dengan kecepatan 20 rpm. Membran dicuci dengan larutan TBS. Selanjutnya membran direndam pada larutan *skim milk* 5% dalam TBS (Sigma-Aldrich, USA) yang ditambahkan dengan antibodi primer berupa *pool* serum darah manusia (masing-masing perlakuan menggunakan serum dari penduduk sehat, pasien DBD, dan neonatus) dengan perbandingan 1:500 (v/v) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 2 jam. Pencucian membran dilakukan dengan larutan TBS. Kemudian membran direndam pada larutan 5% *skim milk* dalam TBS yang ditambahkan antibodi sekunder berupa Anti-Human IgG (Rockland, USA) (perbandingan 1:5000 (v/v)) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Membran dicuci dengan TBS dan dikeringanginkan. Kemudian membran direaksikan dengan *Nitroblue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate* (NBT-BCIP) (Rockland, USA) dan diinkubasi pada ruang gelap hingga muncul noktah gelap pada membran PVDF.

HASIL

Identifikasi Morfologi *Ae. albopictus*

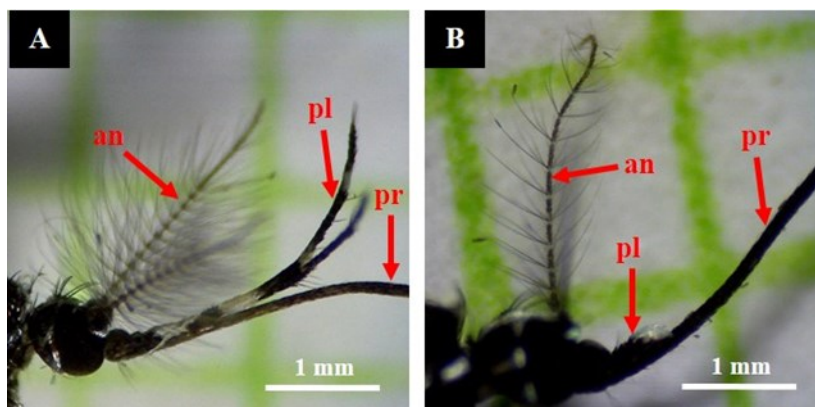
Identifikasi spesies *Ae. albopictus* dilakukan berdasarkan ciri morfologi pada beberapa bagian tubuh sebagai kunci identifikasi spesies. Ciri morfologi pada spesies *Ae. albopictus* yaitu dapat dilihat dengan adanya sisik-sisik berwarna putih yang berjajar membentuk pola satu garis lurus pada bagian tengah *mesonotum* seperti yang terlihat pada Gambar 1.A. Karakter morfologi berikutnya yang dijadikan kunci identifikasi yaitu pada bagian *mesepimeron* *Ae. albopictus* yang memiliki dua sisik berwarna putih yang berlekatan menyerupai huruf V terbalik seperti yang terlihat pada Gambar 1.B. Bagian tubuh lainnya yang dijadikan sebagai kunci identifikasi yaitu pada *anterior mid-femur* pada *Ae. albopictus* yang nampak berwarna hitam gelap tanpa adanya sisik putih seperti yang terlihat pada Gambar 1.C.



Gambar 1. Karakter morfologi *Ae. albopictus* (Mikroskop Olympus Stereo NIKON SMZ745, perbesaran 50x). (A) median longitudinal (ml); (B) mesepimeron (ms); (C) anterior mid-femur (amf). (Morphological characteristic of *Ae. albopictus* (Olympus Stereo NIKON SMZ745 Microscope, 50x magnification). (A) median longitudinal (ml); (B) mesepimerone (ms); (C) anterior mid-femur (amf)).

Identifikasi morfologi juga dilakukan untuk mengetahui jenis kelamin nyamuk karena pada penelitian ini hanya menggunakan sampel nyamuk *Ae. albopictus* betina saja. Karakter morfologi yang dijadikan dasar untuk mengetahui jenis kelamin nyamuk yaitu melalui perbandingan pada bentuk, ukuran serta ornamen pada bagian *palpus*, *proboscis* dan antena. Nyamuk *Ae. albopictus* betina memiliki ukuran *palpus* yang lebih pendek dibandingkan ukuran pada bagian *proboscis*.

Nyamuk *Ae. albopictus* betina memiliki bagian antena dengan rambut yang jarang dan pendek. Sedangkan pada bagian antena nyamuk *Ae. albopictus* jantan memiliki jumlah rambut yang banyak dan panjang. Perbandingan pada bentuk, ukuran serta ornamen pada bagian *palpus*, *proboscis* dan antena nyamuk *Ae. albopictus* jantan dan betina seperti yang terlihat pada Gambar 2.

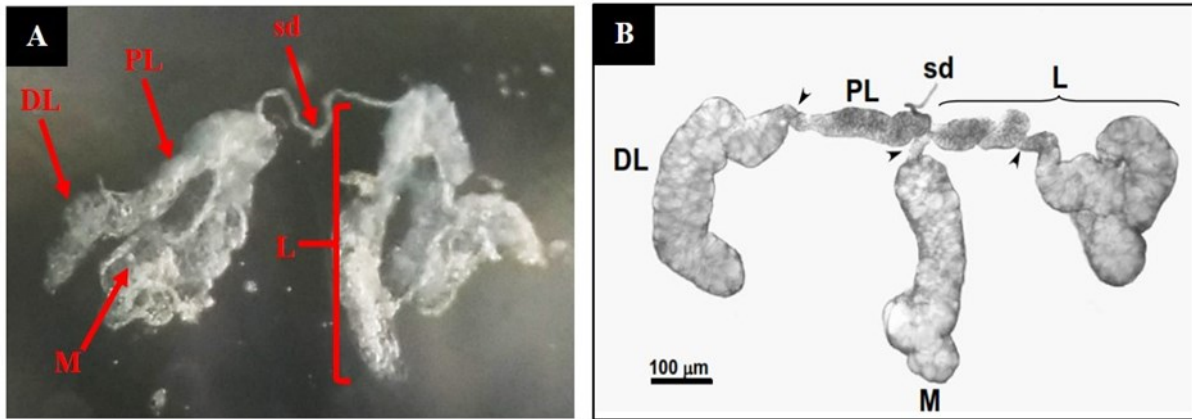


Gambar 2. Karakter morfologi *Ae. albopictus* jantan dan betina (Mikroskop Olympus Stereo NIKON SMZ745, perbesaran 50x). (A) *Ae. albopictus* jantan; (B) *Ae. albopictus* betina. (an) antena; (pl) palpus; (pr) proboscis. (Morphological characteristic of *Ae. albopictus* male and female (Olympus Stereo NIKON SMZ745 Microscope, magnification 50x). *Ae. albopictus* male; (B) *Ae. albopictus* female. (an) antenna; (pl) palps; (pr) proboscis).

Struktur Kelenjar Saliva *Ae. albopictus*

Kelenjar saliva *Ae. albopictus* tersusun atas sepasang kelenjar yang terhubung melalui saluran *salivary duct* (sd). Pada tiap pasang kelenjar saliva terdiri dari tiga lobus, yaitu dua lobus lateral (L)

dan satu lobus median (M). Lobus lateral terbagi menjadi dua bagian yang disebut *Proximal Lateral* (PL) dan *Distal Lateral* (DL). Struktur kelenjar saliva *Ae. albopictus* betina dapat dilihat pada Gambar 3.

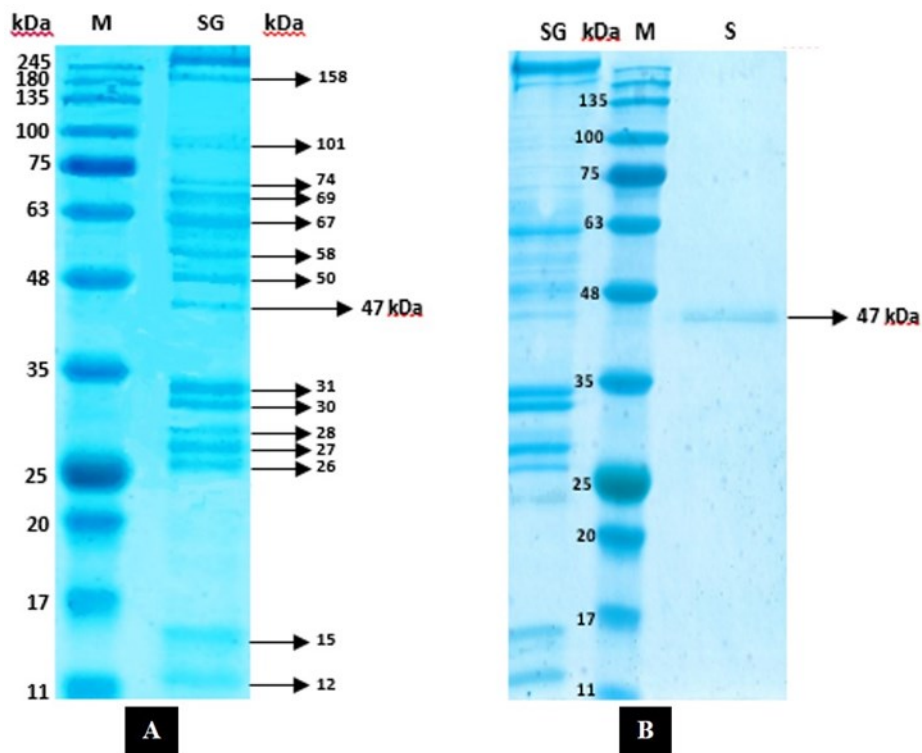


Gambar 3. Struktur kelenjar saliva *Ae. albopictus* betina (Mikroskop Olympus Stereo NIKON SMZ745, perbesaran 50x). (A) Kelenjar saliva *Ae. albopictus* betina yang diisolasi secara *microdissection*. (B) Kelenjar saliva nyamuk *Aedes* betina (Juhn *et al.*, 2011). (sd) *salivary duct*; (PL) *proximal lateral*; (DL) *distal lateral*; (M) lobus median; (L) lobus lateral. (*The structure of the salivary glands Ae. albopictus female (Olympus Stereo NIKON SMZ745 Microscope, 50x magnification)*). (A) *Salivary glands of Ae. albopictus female isolated by microdissection*; (B) *Salivary glands of female Aedes mosquitoes (Juhn et al., 2011)*. (sd) *salivary ducts*; (PL) *proximal lateral*; (DL) *distal lateral*; (M) *median lobe*; (L) *lateral lobe*).

Profil Protein Kelenjar Saliva *Ae. albopictus* dan Fraksi Protein 47 kDa Hasil Purifikasi

Profil ekstrak total dari sampel protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dianalisis dengan metode SDS-PAGE. Berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE telah diketahui bahwa terdapat 16 pita protein dengan berat molekul berturut-turut yaitu ~158, 101, 74, 69, 67, 58, 50, 47, 31, 30, 28, 27, 26, 15 dan 12 kDa. Adanya hasil SDS-PAGE tersebut telah menunjukkan munculnya pita protein target dengan berat molekul 47 kDa seperti yang terlihat pada Gambar 4.A. Konfirmasi hasil purifikasi

protein fraksi 47 kDa melalui analisis SDS-PAGE juga telah menunjukkan kemunculan pita protein tunggal dengan berat molekul 47 kDa yang sejajar dengan pita protein 47 kDa pada sampel kontrol (+) yaitu berupa ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* seperti yang terlihat pada Gambar 4.B. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi protein target dengan metode elektroelusi menggunakan elektroeluter berhasil dilakukan.




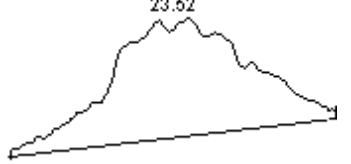
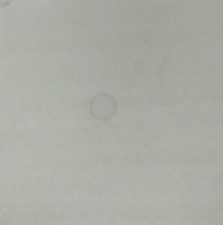
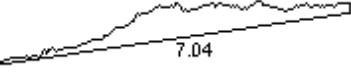



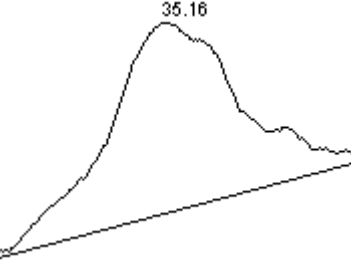

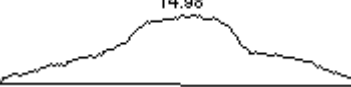
Gambar 4. Visualisasi analisis SDS-PAGE. (A) Profil ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus*. (B) Perbandingan profil protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dan protein murni 47 kDa hasil elektroelusi (Nikon Coolpix B500). (SG) Ekstrak total kelenjar saliva *Ae. albopictus*; (S) Fraksi protein 47 kDa; (M) Marker protein *BlueEye Prestained Protein Ladder* (GeneDirex, Taiwan). (Visualization of SDS-PAGE analysis. (A) Protein profile of *Ae. albopictus* salivary gland crude extract. (B) Comparison in protein profile of *Ae. albopictus* salivary gland crude extract and pure protein 47 kDa electroeluted (Nikon Coolpix B500). (SG) *Ae. albopictus* salivary gland crude extract; (S) Pure protein fraction 47 kDa; (M) *BlueEye Prestained Protein Ladder* protein marker (GeneDirex, Taiwan)).

Deteksi Immunogenitas Fraksi Protein 47 kDa Hasil Purifikasi

Analisis *dot blot* menunjukkan hasil positif dengan munculnya noktah gelap diatas membran PVDF yang ditetaskan sampel ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dan sampel uji yaitu protein hasil purifikasi fraksi 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* yang telah direaksikan dengan sampel serum penduduk sehat, pasien DBD dan

neonatus dengan densitas warna yang berbeda seperti yang terlihat pada Tabel 1. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dan protein hasil purifikasi fraksi 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* bersifat imunogenik karena dapat dikenali oleh antibodi yang terdapat pada serum penduduk sehat, pasien DBD dan neonatus.

Tabel 1. Visualisasi analisis *dot blot* protein imunogenik hasil purifikasi protein fraksi 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus*. (*Visualization of dot blot analysis of immunogenic protein purified from 47 kDa fraction of Ae. Albopictus*).

Sampel	Visualisasi <i>dot blot</i> *	Peak Area ImageJ
Ekstrak total protein kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i> direaksikan dengan serum penduduk sehat (Kontrol (+))		
PMSF dalam PBS pH 7,4 direaksikan dengan serum penduduk sehat (Kontrol (-))		
Protein 47 kDa dari kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i> direaksikan dengan serum pasien DBD		
Protein 47 kDa dari kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i> direaksikan dengan serum penduduk sehat		
Protein 47 kDa dari kelenjar saliva <i>Ae. albopictus</i> direaksikan dengan serum neonatus		

PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan proses identifikasi spesies berdasarkan karakteristik morfologi nyamuk *Ae. albopictus* yang diperoleh dari kegiatan *landing collection* dan *rearing*. Hal ini penting dilakukan untuk memastikan bahwa sampel nyamuk yang digunakan adalah spesies *Ae. albopictus*. Setiap spesies nyamuk memiliki ciri morfologi berbeda yang dapat menjadi kunci identifikasi, meliputi karakter warna dan bentuk tubuh, pola sisik pada tubuh dan sayap, bulu pada antenna, serta panjang palpus (Becker *et al.*, 2020). Habitat *Ae. albopictus* umumnya ditemukan di daerah luar ruangan, misalnya di area kebun (Ifka *et al.*, 2021). Pada daerah yang sama juga dapat ditemukan *Culex* sp. dengan karakteristik habitat yang mirip (McClure *et al.*, 2018). Nyamuk dari genus *Aedes* spp. memiliki bentuk ujung *abdomen* yang lebih runcing dibandingkan dengan *Culex* spp. (Becker *et al.*, 2020).

Ciri morfologi *Ae. albopictus* memiliki kemiripan dengan *Ae. aegypti* yang juga sering berinteraksi dengan manusia (Patsoula *et al.*, 2006; Borah dan Bora, 2022). Secara umum bagian tubuh spesies *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti* berwarna hitam gelap dengan adanya sisik-sisik berwarna putih pada permukaan tubuhnya (Sucipto, 2011). Karakteristik unik pada *Ae. albopictus* yang dapat membedakan dengan *Ae. aegypti* yaitu pada tubuh bagian tengah *mesonotum* terdapat deretan sisik putih membentuk satu garis lurus. Pada bagian *mesepimeron* dari *Ae. albopictus* terdapat dua lempengan sisik putih yang saling berlekatan membentuk seperti huruf V terbalik. Selain itu, bagian tubuh *anterior-mid femur* pada *Ae. albopictus* berwarna hitam gelap tanpa adanya sisik putih (Becker *et al.*, 2020). Berdasarkan pada Gambar 1 mengenai ciri karakteristik morfologi maka diketahui bahwa ketiga bagian tubuh tersebut dapat menjadi kunci identifikasi spesies *Ae. albopictus*.

Sampel nyamuk dewasa *Ae. albopictus* yang didapatkan dari hasil *landing collection* yaitu diperoleh sekitar 50 nyamuk jantan dan 100 nyamuk betina. Pada penelitian ini menggunakan protein dari jaringan kelenjar saliva nyamuk *Ae. albopictus* betina saja. Nyamuk *Ae. albopictus* betina berperan penting dalam proses transmisi virus dengue secara horizontal kepada manusia melalui proses *blood-feeding* (Garcia-Rejon *et al.*, 2021). Aktivitas *blood-feeding* nyamuk betina kepada manusia dilakukan untuk mendapatkan mikronutrisi yang diperlukan dalam perkembangan dan pematangan telur (Nikbakhtzadeh *et al.*, 2016; Rivera-Perez *et al.*, 2017). Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi jenis kelamin pada sampel nyamuk. Berdasarkan pada Gambar 2 diketahui bahwa bagian tubuh nyamuk yang menjadi

pembeda (dimorfisme seksual) antara nyamuk jantan dan betina yaitu pada bagian *palpus*, *proboscis*, antenna dan ukuran tubuh. Nyamuk *Ae. albopictus* betina memiliki ukuran *palpus* yang lebih pendek dibandingkan bagian *proboscis*. Selain itu, *Ae. albopictus* betina memiliki antenna dengan rambut yang jarang dan pendek atau disebut tipe *pilose*, sedangkan antenna nyamuk jantan memiliki rambut yang banyak dan panjang atau disebut tipe *plumose*. (Becker *et al.*, 2020). Secara umum, ukuran tubuh nyamuk betina yang lebih besar dibandingkan nyamuk jantan (Andrew dan Bar, 2013).

Sampel nyamuk yang telah teridentifikasi sebagai *Ae. albopictus* betina selanjutnya diisolasi kelenjar salivanya secara *microdissection* menggunakan jarum diseksi melalui pengamatan dengan mikroskop stereo (Schmid *et al.*, 2017). Proses *microdissection* dilakukan dengan meletakkan sampel nyamuk diatas cairan media NaCl 0,5% pada gelas obyek. Larutan NaCl 0,5% digunakan sebagai media isolasi kelenjar saliva karena bersifat isotonis terhadap cairan pada tubuh insekta, sehingga dapat mencegah terjadinya lisis sel pada jaringan kelenjar saliva (Barbosa *et al.*, 2015). Kelenjar saliva yang telah berhasil diisolasi kemudian disimpan pada larutan preservasi yaitu 1 mM PMSF dalam PBS pH 7,4. Kandungan PMSF di dalam larutan PBS dapat menghambat aktivitas protease yang menyebabkan degradasi protein dari sampel sel atau jaringan (Bano *et al.*, 2014).

Kelenjar saliva nyamuk merupakan sepasang organ yang berada di bagian *thorax* dan terdiri atas tiga lobus pada tiap pasangannya. Lobus pada tiap pasang kelenjar saliva tersusun atas dua lobus lateral (L) yang mengapit satu lobus median (M) yang lebih lebar dan pendek (Franz *et al.*, 2015). Lobus lateral selanjutnya terbagi menjadi dua bagian, yaitu *proximal lateral* (PL) dan *distal lateral* (DL). Masing-masing lobus penyusun kelenjar saliva terhubung pada *salivary duct* (SD) (Kojin dan Adelman, 2019). *Salivary duct* pada kelenjar saliva nyamuk memiliki beberapa bagian seperti *common duct*, *main duct* dan *internal duct* yang merupakan cabang lanjutan dari *main duct* (Kelly *et al.*, 2012). Bagian-bagian pada kelenjar saliva *Ae. albopictus* berhasil diamati seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Setiap lobus pada kelenjar saliva nyamuk mensekresikan jenis protein yang berbeda. Lobus *proximal lateral* memproduksi enzim yang terlibat dalam *sugar feeding*, sedangkan lobus median dan *distal lateral* memproduksi *lectin* dan protein yang membantu proses *blood-feeding* dengan aktivitas degradasi *adenosine diphosphate* dan antihemostasis pada respon imun inang (Franz *et al.*, 2015). Kelenjar saliva *Ae. albopictus* diketahui mensekresikan beberapa protein diantaranya

Calreticulin, *Serpin*, α -*Tubulin*, *ATPase*, *ATP synthase*, *34K-2*, *Actin*, *62k-2*, *62k-3*, *Ebna2 binding-protein*, *Myo-inositol-1-phosphate synthase*. Protein-protein tersebut berperan dalam berbagai proses fisiologis seperti respon imun dan metabolisme energi (Zhang *et al.*, 2013).

Sampel jaringan kelenjar saliva yang telah berhasil diisolasi kemudian dilakukan ekstraksi protein untuk mengetahui profil protein pada kelenjar saliva *Ae. albopictus*. Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE, telah diperoleh pita protein target dengan berat molekul 47 kDa (Gambar 4.A). Isolasi potongan gel pita protein target 47 kDa dari lembaran gel *polyacrylamide* dilakukan secara aseptis agar tidak terjadi kontaminasi selama proses purifikasi protein. Purifikasi protein 47 kDa dilakukan melalui metode elektroelusi yaitu teknik pemurnian protein dengan prinsip mengeluarkan protein dari gel *polyacrylamide* dengan bantuan arus listrik (Wathon *et al.*, 2020). Metode elektroelusi lebih efisien dan mudah dilakukan untuk purifikasi potongan pita protein dalam jumlah yang banyak secara bersamaan sehingga waktu purifikasi lebih efisien (Kurien *et al.*, 2019). Keunggulan elektroelusi menggunakan alat elektroeluter adalah konsentrasi *protein recovery* lebih tinggi dibanding metode elektroelusi konvensional menggunakan membran selofan biasa. Proses purifikasi lebih praktis dan mudah dilakukan karena hanya memerlukan satu rangkaian alat, serta waktu purifikasi menjadi lebih singkat (Chen *et al.*, 2017).

Purifikasi fraksi protein 47 kDa dilakukan pada suhu ruang dengan tegangan listrik 100 V (*constant volt*) selama 3 jam. Protein hasil elektroelusi kemudian dipisahkan menggunakan *Microcentrifuge Tube Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 10 kDa untuk memisahkan kontaminan yang tersisa dari proses elektroelusi. Kontaminan dengan berat molekul di bawah 10 kDa akan terpisah dari sampel dan hanya menyisakan protein target di dalam membran (Gangopadhyay *et al.*, 2016). Konsentrasi protein 47 kDa hasil purifikasi diukur menggunakan metode *Bradford* dan diperoleh hasil konsentrasi sebesar 2,33 mg/mL. Metode elektroelusi menggunakan elektroeluter pada penelitian ini memperoleh hasil yang lebih baik dari segi waktu purifikasi dan konsentrasi protein target dibandingkan metode elektroelusi konvensional. Waktu purifikasi pada penelitian ini adalah 3 jam, sedangkan purifikasi dengan metode elektroelusi konvensional pada protein 31 kDa dan 67 kDa kelenjar saliva *Ae. albopictus* membutuhkan waktu 25 jam (Wathon *et al.*, 2021). Sedangkan purifikasi protein 31 kDa dan 56 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan metode elektroelusi konvensional membutuhkan waktu selama 26,5 jam dengan hasil konsentrasi protein

31 kDa sebesar 0,47 mg/mL dan protein 56 kDa sebesar 0,44 mg/mL (Wathon *et al.*, 2020). Konfirmasi hasil purifikasi protein fraksi 47 kDa melalui analisis SDS-PAGE menunjukkan kemunculan pita protein tunggal dengan berat molekul 47 kDa yang sejajar dengan pita protein 47 kDa pada sampel ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* (Gambar 4.B). Keberhasilan purifikasi protein dengan metode elektroelusi dikonfirmasi oleh munculnya pita protein tunggal pada analisis SDS-PAGE (Wathon *et al.*, 2021).

Fraksi protein 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* diduga merupakan protein dari *family serpin* (Doucoure *et al.*, 2013) yang memiliki aktivitas sebagai *inhibitor* dari *serine protease* yang terlibat dalam regulasi proses fisiologis seperti koagulasi darah, *fibrinolysis*, transduksi sinyal seluler, dan respon imun (An *et al.*, 2012). *Serpin* bertindak sebagai regulator antihemostasis dalam proses *blood-feeding* nyamuk, sehingga dapat meningkatkan keberhasilan proses transmisi patogen dari vektor ke inang (Oktarianti *et al.*, 2021). Penghambatan aktivitas *serine protease* didukung dengan adanya bagian *Reactive Center Loop* (RCL) di dekat *C-terminus* pada struktur 3D protein *serpin*. Ikatan antara RCL dengan sisi aktif protease menghasilkan kompleks kovalen inaktif yang menyebabkan protease tidak dapat berfungsi sehingga *serpin* disebut sebagai “*suicide inhibitors*” (Jmel *et al.*, 2021).

Sampel fraksi protein 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* yang telah melalui proses purifikasi kemudian dideteksi karakter imunogenitasnya melalui analisis *dot blot*. Prinsip kerja *dot blot* ialah mendeteksi pengenalan molekul melalui ikatan antara antibodi dan antigen yang direaksikan diatas media membran (Piazza *et al.*, 2020). Reaksi ikatan antara antigen dan antibodi divisualisasikan dengan kemunculan noktah gelap pada permukaan membran PVDF. Semakin tinggi densitas warna maka semakin besar intensitas ikatan antara antigen dan antibodi (Dahril *et al.*, 2019). Fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi digunakan sebagai antigen yang direaksikan dengan antibodi pada *pool* serum darah penduduk sehat, pasien DBD dan bayi baru lahir (neonatus) yang tinggal di wilayah endemik DBD. Pada data Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dan protein hasil purifikasi fraksi 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* terbukti bersifat imunogenik karena dapat dikenali oleh antibodi yang terdapat pada *pool* serum penduduk sehat, pasien DBD dan neonatus. Noktah gelap pada membran PVDF menunjukkan adanya ikatan antara antibodi IgG dalam serum darah dengan antigen (Dahril *et al.*, 2019). Noktah gelap yang muncul diatas permukaan membran PVDF yang direaksikan dengan masing-masing

pool serum menunjukkan densitas warna yang berbeda.

Perbedaan densitas warna noktah yang muncul pada membran PVDF dianalisis lebih lanjut menggunakan *ImageJ*. *Software ImageJ* merupakan peranti lunak untuk menganalisis densitas warna pada gambar atau foto menjadi data semi-kuantitatif (Gallo-Oller *et al.*, 2018). *Software* tersebut mentransformasikan densitas warna noktah pada membran PVDF menjadi nilai *peak area*. Hasil nilai *peak area* kemudian dikonversi menjadi *relative optical density* sebagai nilai yang mewakili densitas warna noktah *dot blot* (Kusumaningrum *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil analisis *ImageJ* diketahui bahwa sampel kontrol (+) memiliki persentase densitas noktah yang cukup tinggi 23,52% sedangkan kontrol (-) menunjukkan persentase densitas yang paling rendah yaitu 7,04%. Hasil ini menunjukkan bahwa deteksi imunogenesitas protein dengan metode *dot blot* dapat divalidasi dengan adanya hasil positif pada sampel kontrol (+) yang berupa ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* dan hasil negatif pada sampel kontrol (-) yang berupa sampel non-protein (larutan PBS). Ekstrak total protein kelenjar saliva *Ae. albopictus* digunakan sebagai kontrol (+) karena pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa ekstrak protein tersebut bersifat imunogenik (Oktarianti *et al.*, 2021).

Densitas noktah pada sampel protein fraksi 47 kDa hasil purifikasi yang direaksikan dengan *pool* serum penduduk sehat endemik memiliki persentase tertinggi yaitu 35,16%. Hasil ini diduga karena penduduk yang tinggal di wilayah endemik diindikasikan telah mengalami paparan berulang oleh protein saliva *Ae. albopictus*. Paparan berulang terhadap antigen yang sama dapat meningkatkan produksi antibodi IgG pada inang (Abbas *et al.*, 2019). Densitas noktah pada sampel protein fraksi 47 kDa hasil purifikasi yang direaksikan dengan *pool* serum pasien DBD memiliki persentase densitas cukup tinggi yaitu 19,29%. Hal tersebut dikarenakan pasien DBD juga terpapar oleh protein saliva *Ae. albopictus* di wilayah endemik. Paparan saliva vektor akan mempengaruhi sistem imun inang untuk memproduksi antibodi IgG terhadap antigen tersebut (Manning *et al.*, 2018). Densitas noktah pada sampel protein fraksi 47 kDa hasil purifikasi yang direaksikan dengan *pool* serum neonatus menunjukkan persentase yang lebih rendah yaitu 14,98% jika dibandingkan dengan *pool* serum penduduk sehat dan pasien DBD. Reaksi positif pada sampel *pool* serum neonatus dimungkinkan karena adanya transfer antibodi IgG dari ibu yang sebelumnya pernah terpapar oleh protein saliva *Ae. albopictus* ke janin melalui plasenta di dalam kandungan. Antibodi IgG dapat menembus jaringan plasenta dan masuk ke dalam

peredaran darah janin selama di dalam kandungan (Charisma *et al.*, 2020).

Adanya reaksi positif antara fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi dengan sampel *pool* serum manusia dari wilayah endemik DBD menunjukkan bahwa penduduk yang tinggal di wilayah endemik telah mengembangkan respon imun dengan membentuk antibodi spesifik (IgG) terhadap paparan berulang antigen dari protein saliva vektor. Produksi antibodi IgG pada inang dapat digunakan sebagai penanda adanya protein imunogenik pada saliva vektor nyamuk (Doucoure *et al.*, 2013). Paparan saliva vektor mampu menginduksi respon imun adaptif pada inang melalui jalur aktivasi sel B yang akan berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel plasma untuk menghasilkan IgG. Jumlah IgG yang diproduksi pada paparan saliva yang pertama kali masih cukup rendah namun pada kondisi paparan berulang dapat meningkatkan produksi antibodi IgG spesifik pada inang (Abbas *et al.*, 2019). Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Oktarianti *et al.* (2021) yang menunjukkan bahwa fraksi protein 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* bersifat imunogenik yang dapat memodulasi respon imun penduduk di wilayah endemik DBD. Protein saliva *Ae. albopictus* dengan berat molekul 47 kDa telah diketahui merupakan kelompok *serpins family* yang bersifat imunogenik dan berperan sebagai protease inhibitor dan antikoagulan pada proses *blood feeding* (Doucoure *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Purifikasi fraksi protein 47 kDa dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* telah berhasil dilakukan dengan metode elektroelusi menggunakan alat elektroeluter yang dibuktikan dengan munculnya pita protein tunggal melalui analisis SDS-PAGE. Uji imunogenisitas protein dengan metode *dot blot* menunjukkan bahwa fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi dari kelenjar saliva *Ae. albopictus* terdeteksi bersifat imunogenik dengan munculnya noktah gelap pada membran PVDF. Analisis data *ImageJ* menunjukkan bahwa tingkat imunogenisitas tertinggi fraksi protein 47 kDa hasil purifikasi bereaksi dengan sampel serum penduduk sehat di wilayah endemik DBD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui skema Hibah Penelitian Pemula tahun 2022 dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Jember dengan Surat Keputusan Rektor Nomor 14970/UN25/KP/2022 dan Surat Perjanjian Penerima Hibah Nomor: 4258/UN25.3.1/LT/2022).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H and Pillai, S., 2019. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 6th ed. Elsevier Health Sciences. Philadelphia.
- Andrew, J and A. Bar., 2013. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* adult mosquito. *Annual Review and Research in Biology*, 3(1), pp.52–69.
- An, C., Hiromasa, Y., Zhang, X., Lovell, S., Zolkiewski, M., Tomich, J.M and Michel, K., 2012. Biochemical characterization of *Anopheles gambiae* SRPN6, a malaria parasite invasion marker in mosquitoes. *PLoS One*, 7(11), pp.1–9.
- Bano, S., Lateef, M., Iqbal, S., Naqvi, B and Iqbal, L., 2014. Role of protein denaturing agents and edta on α -amylase activity from *Bacillus subtilis* kibge has. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(2), pp.411–415.
- Barbosa, P., Berry, D and Kary, C.K., 2015. *Insect Histology: Practical Laboratory Techniques*. Willy Blackwell. New Jersey.
- Becker, N., Petric D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C and Kaiser, A., 2020. *Mosquitoes and Their Control*. 2nd ed. Springer. Berlin.
- Borah, H and Bora, D.S., 2022. Ecological and social determinants of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larval habitat in Northeastern India. *International Journal of Mosquito Research*, 9(1), pp.47–55.
- Bio-Rad., 2020. *Model 422 Electro-Eluter Module #1652977*. <https://www.bio-rad.com/en-id/sku/1652977-model-422-electro-eluter-module?ID=1652977> (diakses pada 15 Desember 2021).
- Bio-Rad Laboratories. *Model 422 Electro-Eluter Instruction Manual*. USA.
- Bio-Rad Laboratories. *Protein Blotting Guide. Bulletin 2895 Ver C*. USA.
- Biswas, M and Banerjee, P.K., 2016. Studies on morphological variations of *Aedes albopictus* in some areas of South 24 Parganas, West Bengal. *International Journal of Mosquito Research*, 3(6), pp.6–10.
- Charisma, A.M., Farida, E dan A., Anwari, F., 2020. Diagnosis dengue melalui deteksi antibodi imunoglobulin G spesifik dalam sampel urine dengan teknik ELISA. *ASPIRATOR-Journal of Vector-borne Disease Studies*, 12(1), pp.11–18.
- Chen, J.J., Li, G.Q., Pratush, A., Jahan, S., Kong, F.Z., Xiao, H., Fan, L.Y and Cao, C.X., 2017. An innovative ring-shaped electroeluter for high concentration preparative isolation of protein from polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 523, pp.39–43.
- Dahril, Aulanni'am, Keumala, V and Mustafa, A., 2019. Human spermatozoa anti-proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 synthesis using New Zealand rabbit for novel immunocontraception in males. *Investigative and Clinical Urology*, 60(4), pp.303–311.
- Ding, F., Fu, J., Jiang, D., Hao, M and Lin, G., 2018. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Tropica*, 178, pp.155–162.
- Doucoure, S., Cornelie, S., Patramool, S., Mouchet, F., Demette, E., Seveno, M., Dehecq, J.S., Rutee, H., Herve, J.P., Favier, F., Misse, D., Gasque, P and Remoue, F., 2013. First screening of *Aedes albopictus* immunogenic salivary proteins. *Insect Molecular Biology*, 22(4), pp.1–13.
- Ekwudu, O., Marquart, L., Webb, L., Lowry, K.S., Devine, G.J., Hugo, L.E and Frentiu, F.D., 2020. Effect of serotype and strain diversity on dengue virus replication in Australian mosquito vectors. *Pathogens*, 9(668), pp.1–14.
- Ferreira-de-Lima, V.H and Lima-Camara, T.N., 2018. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites and Vector*, 11(1), pp.1–8.
- Franz, A.W., Kantor, A.M., Passarelli, A.L and Clem, R.J., 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*, 7(7), pp.3741–3767.
- Gallo-Oller, G., Ordonez, R and Dotor, J., 2018. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. *Journal of Immunological Methods*, 457, pp.1–5.
- Gangopadhyay, N., Wynne, K., O'Connor, P., Gallagher, E., Brunton, N.P., Rai, D.K and Hayes, M., 2016. In silico and in vitro analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 203, pp.367–374.
- Garcia-Rejon, J.E., Navarro, J.C., Cigarroa-Toledo, N and Baak-Baak, C.M., 2021. An updated review of the invasive *Aedes albopictus* in the Americas; geographical distribution, host feeding patterns, arbovirus infection and the potential for vertical transmission of dengue virus. *Insects*, 12(11), pp.1–13.
- Heriawati, D., Supardan, D., Suhirman and Umami, S.S., 2020. Distribution of *Aedes albopictus* mosquitoes in Indonesia. *Proceedings of the 2nd International Conference on Islam, Science and Technology (ICONIST 2019)*. Lombok, Indonesia. pp.194–199.

- Ifka, W., Wulandhani, S dan Hasyim, A., 2021. Analisis kepadatan jentik nyamuk *Aedes spp.* di pasar tradisional Kecamatan Tallo Kota Makassar. *Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains*, 2(2), pp.58–62.
- Irma dan Swaidatul, M.A.F., 2021. *Trend* penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) di Sulawesi Tenggara berbasis ukuran epidemiologi. *Jurnal Ilmiah Penelitian Kesehatan*, 6(1), pp.70–78.
- Jmel, M.A., Aounallah, H., Bensaoud, C., Mekki, I., Chmelař, J., Faria, F., M'ghribi, Y and Kotsyfakis, M., 2021. Insights into the role of tick salivary protease inhibitors during ectoparasite–host crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), pp.892.
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Maciel Guedes, B.A., Majid, A., Coleman, J., Paolucci Pimenta, P.F., Akram, W., James, A and Marinotti, O., 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites and vectors*, 4(1), pp.1–13.
- Kelly, E.M., Moon, D.C and Bowers, D.F., 2012. Apoptosis in mosquito salivary glands: Sindbis virus-associated and tissue homeostasis. *The Journal of general virology*, 93(11), pp.2419.
- Kementerian Kesehatan RI., 2018. *INFODATIN: Pusat Data dan Informasi Kemeterian Kesehatan RI Situasi Demam Berdarah*. Kemenkes RI. Jakarta.
- Kinansi, R.R., Garjito, T.A., Prihatin, M.T., Hidajat, M.C., Anggraeni, Y.M dan Widjajanti, W., 2019. Keberadaan jentik *Aedes* sp. pada *Controllable Sites* dan *Disposable Sites* di Indonesia (Studi kasus di 15 P rovinsi). *Aspirator*, 11(1), pp.1–12.
- Kojin, B.B and Adelman, Z.N., 2019. The sporozoite's journey through the mosquito: a critical examination of host and parasite factors required for salivary gland invasion. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, pp.284.
- Kurien, B.T., Aggarwal, R and Scofield, R.H., 2019. Protein extraction from gels: a brief review. *Electrophoretic Separation of Proteins*, 1855, pp.479–482.
- Kusumaningrum, P.E dan Munawir, A., 2017. Efektivitas chlorhexidine sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam proses dermonekrosis akibat racun kumbang tomcat (*Paederus* sp.). *Pustaka Kesehatan*, 5(1), pp.12–19.
- Lwande, O.W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J and Bucht, G., 2020. Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2), pp.71–81.
- Manning, J.E., Morens, D.M., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G and Memoli, M., 2018. mosquito saliva: the hope for a universal arbovirus vaccine?. *The Journal of infectious diseases*, 218(1), pp.7–15.
- McClure, K.M., Lawrence C and Kilpatrick A.M., 2018. Land use and larval habitat increase *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) abundance in lowland Hawaii. *Journal of Medical Entomology*, 55(6), pp.1509–1516.
- Medley, K.A., Westby, K.M and Jenkins, D.G., 2019. Rapid local adaptation to northern winters in the invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: A moving target. *Journal of Applied Ecology*, 56(11), pp.2518–2527.
- Montero, S.B., 2020. *Aedes albopictus* 34k2 Salivary protein as epidemiological tool for the assessment of human exposure to the tiger mosquito. *Thesis*. University of Rome. Rome. Italy.
- Nikbakhtzadeh, M.R., Buss, G.K and Leal, W.S., 2016. Toxic effect of blood feeding in male mosquitoes. *Frontiers in physiology*, 7(4), pp.1–7.
- Oktarianti, R., Khasanah, R.N., Wathon, S and Senjarini, K., 2021. Detection of immunogenic protein from salivary glands of *Aedes albopictus*. *Universa Medicina*, 4(3), pp.234–242.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G and Vakalis, N.C., 2006. Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in Northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*, 43(1), pp.40–54.
- Piazza, R.M., Caetano, B.A., Henrique, C.P., Luz, D., Munhoz, D.D., Polatto, J.M and Mitsunari, T., 2020. Immunological tests for diarrhoea caused by diarrhoeagenic *Escherichia coli* targeting their main virulence factors. In *Methods in Microbiology*, 47, pp.151–207.
- Rahayu, D.F dan Ustiawan, A., 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Jurnal Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara*, 9(1), pp.7–10.
- Rivera-Perez, Clifton, M.E and Noriega, F.G., 2017. How micronutrients influence the physiology of mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science*, 23, pp.112–117.
- Rueda, L.M., 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa*, 589, pp.1–60.
- Schmid, M.A., Kauffman, E., Payne, A., Harris, E and Kramer, L.D., 2017. Preparation of mosquito salivary gland extract and intradermal

- inoculation of Mice. *Bio-Protocol*, 7(14), pp.13–16.
- Sucipto, C.D., 2011. *Vektor Penyakit Tropis*. Goyen Publishing. Yogyakarta.
- Titus, R.G., Bishop, J.V and Mejia, J.S., 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 28, pp.131–141.
- Wathon, S., Muti'ah, F., Oktarianti, R dan Senjarini, K., 2020. Purifikasi protein imunogenik 31 dan 56 kDa dari kelenjar saliva *Aedes aegypti*. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 7(1), pp.59–71.
- Wathon, S., Oktarianti, R., Azizah, N., Mubarak, Y., Listiani, R.A and Senjarini, K., 2021. Purification of 31 and 67 kDa protein fraction from salivary gland of *Aedes albopictus* (skuse) (Diptera: Culicidae). *Bioedukasi: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*, 19(1), pp.1–8.
- World Health Organization., 2022. *Dengue and Severe Dengue. WHO Fact Sheet*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (diakses pada 4 Juli 2022).
- Zhang, M., Zheng, X., Wu, Y., Gan, M., He, A., Li, Z and Zhan, X., 2013. Differential proteomics of *Aedes albopictus* salivary gland, midgut and C6/36 cell induced by dengue virus infection. *Virology*, 444(1-2), pp.109–118.