

Imunogenitas Ekstrak Protein Kelenjar Saliva dari *Anopheles aconitus* di Daerah Endemik Malaria

Immunogenicity of Protein Extract from Salivary Gland of Anopheles aconitus in Malaria Endemic Area

Mahful Septiawan, Budayatin, Hidayat Teguh Wiyono dan Kartika Senjarini^{*)}
 Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Jember University, Jember
^{*)}Email: kartika_senjarini@yahoo.com

ABSTRACT

Although malaria had ever been virtually eradicated from Indonesia but currently malaria is recognized as a serious re-emerging threat to public health. This disease is caused by malaria parasite which is transmitted to human host by *Anopheles* mosquitoes as main vector. It has been widely observed that saliva of mosquito that transmits disease contains several factors that could enhance pathogen infection. Therefore, it should be possible to control pathogen transmission by vaccinating the host against the molecule(s) in saliva that potentiate the infection. However, immunogenic specific component in mosquitoes vectors of Malaria has not yet been identified so far. The objective of this study are to analyze protein profile of SDS-PAGE and to know the immunogenicity the protein extract of salivary gland from potential vector of Malaria i.e. *An. Aconitus*. We used immunogenic reaction between salivary gland extract of these vectors against pool of human sera which were collected from endemic area. The reaction conducted by the dot-blot analyze. SDS-PAGE studies showed 15 major polypeptide bands of 284, 100, 84, 75, 66, 57, 53, 48, 45, 38, 33, 29, 15, 14, and 11 kDa. The dot-blot studies showed that the protein extract of salivary gland from *An. aconitus* are immunogenic.

Keywords : salivary gland, *anopheles aconitus*, immunogenic protein

PENDAHULUAN

WHO memperkirakan sekitar 198 juta kasus malaria terjadi di seluruh dunia pada tahun 2013. Sekitar 584 000 orang telah meninggal akibat malaria (WHO, 2013). Prevalensi malaria tahun 2013 adalah 6,0 persen. Lima provinsi dengan insiden dan prevalensi tertinggi adalah Papua (9,8% dan 28,6%), Nusa Tenggara Timur (6,8% dan 23,3%), Papua Barat (6,7% dan 19,4%), Sulawesi Tengah (5,1% dan 12,5%), dan Maluku (3,8% dan 10,7%). Dari 33 provinsi di Indonesia, 15 provinsi mempunyai prevalensi malaria di atas angka nasional, sebagian besar berada di Indonesia Timur (Riskesdas, 2013).

Permasalahan utama malaria sampai saat ini adalah terjadinya peningkatan resistensi *P. falciparum* dan *P. vivax* terhadap obat-obat anti malaria. Sementara itu pengembangan vaksin malaria mengalami hambatan karena kompleksnya siklus hidup *P.falciparum*, sehingga perlu usaha pengembangan multi-stage vaccine. Vaksin yang diharapkan adalah vaksin yang mampu menginduksi respons imun yang protektif terhadap setiap tahapan siklus hidup *P. falciparum*.

Pengembangan vaksin untuk pencegahan malaria meliputi 3 tipe yaitu: Pre-erithrocytic stage vaccine, Blood stage vaccine, dan Transmission Blocking Vaccine (TBV). Vaksin pre-eritrositik (hepatik) dibuat berdasarkan konsep penghambatan pelepasan trophozoit dari skizon hati. Vaksin stadium eritrositik dibedakan menjadi anti-komplikasi dan anti-invasi. TBV merupakan vaksin yang bertujuan menghambat transmisi patogen dari vektor ke dalam tubuh manusia (Carter *et al.*, 2000).

TBV merupakan vaksin yang mencegah dan menghentikan transmisi patogen dari vektor ke hospes dengan menggunakan bagian organ vektor dan atau bagian dari patogen ketika dalam siklus hidupnya di tubuh vektor (Carter *et al.*, 2000). Kelenjar saliva memiliki substansi protein imunomodulator antihemostatik, dan antiinflamasi yang memudahkan nyamuk dalam proses blood feeding.

Infeksi malaria pada individu yang imunokompeten dapat meningkatkan kadar berbagai macam antibodi atau imunoglobulin dalam serum. Hal ini menunjukkan adanya keadaan hiperaktif dari sel limfosit B. Diantara berbagai antibodi tersebut hanya sebagian kecil

saja yang spesifik terhadap antigen malaria tertentu, sedangkan sebagian besar sisanya merupakan imunoglobulin yang tidak spesifik. Sebagai daerah endemik vektor malaria *An. aconitus*, di duga penduduk desa Campurejo telah terpapar gigitan nyamuk *An. aconitus*. Selain itu, di desa Campurejo juga ditemukan vektor malaria *An. vagus*. Oleh karena itu, perlu adanya studi imunogenitas dan identifikasi protein imunogenik dari kelenjar saliva *An. aconitus* dan *An. vagus* sebagai salah satu vektor penting malaria di Indonesia. Informasi mengenai profil protein kelenjar saliva *An. aconitus* dan imunogenitasnya merupakan informasi awal dalam pengembangan transmission blocking vaccine (TBV).

Penelitian ini selanjutnya dapat digunakan dalam pengembangan Transmission Blocking Vaccines (TBV) malaria di Indonesia.

METODE

Metode penelitian yang digunakan merupakan penelitian kualitatif. Rancangan penelitian terdiri atas 8 tahap yaitu landing collection *An. Aconitus*, preparasi alat, isolasi kelenjar saliva *An. Aconitus*, ekstraksi protein kelenjar saliva *An. Aconitus*, preparasi serum darah, analisis SDS PAGE, dan analisis dot blot.

Landing Collection nyamuk dilakukan pengambilan nyamuk dewasa dengan alat aspirator. Pengambilan nyamuk dewasa dilakukan di persawahan Desa Campurejo, Kecamatan Boja, Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. Nyamuk yang telah tertangkap diletakkan dalam cup tertutup kasa yang di dalamnya terdapat sukrosa 10%.

Isolasi kelenjar saliva nyamuk memerlukan identifikasi jenis kelamin dan spesies terhadap nyamuk yang akan di isolasi. Terdapat perbedaan rambut pada antena nyamuk jantan dan betina. Nyamuk yang akan diisolasi kelenjar salivanya adalah nyamuk betina. Identifikasi spesies dilakukan dengan melihat pola sisik garis pada tubuh bagian dorsal toraks nyamuk. Nyamuk betina yang didapatkan dibedah secara microdissection menggunakan jarum diseksi. Nyamuk diletakkan diatas gelas benda steril, kemudian diteteskan 50 μ L NaCl 0,5%. Kelenjar saliva nyamuk terdapat diantara toraks dan kepala nyamuk. Jarum diseksi diletakkan pada bagian toraks dan kepala, kemudian bagian kepala ditarik hingga terpisah dari bagian toraks. Akan tampak lobus – lobus kelenjar saliva berwarna bening. Kelenjar saliva dikumpulkan dalam eppendorf steril yang telah diisi 100 μ L PMSF dalam PBS steril dan disimpan pada suhu -80°C.

Ekstraksi Protein Kelenjar Saliva Nyamuk dilakukan dengan menambahkan buffer lisis pada

kelenjar saliva dengan perbandingan 1:1. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan micropistille. Sampel di vortex dan di sentrifuse sebanyak 3 kali. Kemudian sampel di sonifikasi menggunakan water sonicator selama 30 menit. Sampel disentrifuse 9000 x g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan disimpan pada suhu -80°C dan ditambahkan buffer sample dengan perbandingan 1:1. Sampel dipanaskan selama 5 menit sebelum dilakukan analisis dot blot, SDS PAGE dan Western Blotting. Preparasi serum darah diawali dengan pengambilan sampel darah di desa Campurejo, Kecamatan Boja, Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. Pengambilan sampel menggunakan inform consent yang diberikan kepada 30 warga yang akan diambil sampel darahnya. Pengambilan sampel dilakukan dari pembuluh darah vena brachial di lengan. Darah yang diambil sebanyak 5 mL. Darah ditampung dalam vakutainer dan didiamkan selama 15 menit. Lapisan bening disentrifuse dengan kecepatan 3200 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang dihasilkan merupakan serum darah. Serum darah yang didapatkan disimpan pada suhu -80°C.

Analisis SDS-PAGE menggunakan Separating Gel 12% (Akril/bis akril 40%, 1,5 M Tris HCl Ph 8,8, 10% sds, H₂O steril, 10% APS dan TEMED) (b/v). Sampel protein diambil sebanyak 10 μ l dan ditambah dengan buffer sampel. Dengan perbandingan 1:1. kemudian dipanaskan pada air dengan suhu 100°C selama 5 menit. Sampel protein dimasukkan ke dalam sumuran gel. Kemudian di running selama 60 menit, 125 V, pada suhu ruang dalam buffer elektroda 1x pH 8,3. Kemudian dilakukan staining pada gel hasil SDS-PAGE selama \pm 2 jam dan dilanjutkan dengan destaining 3 x 30 menit dan difotoforesis.

Analisa dot-blot digunakan untuk menganalisis dan mendeteksi suatu protein melalui adanya suatu ikatan antara antigen dan antibodi. Analisis dot-blot dilakukan dengan memotong membran PVDF kemudian membran direndam dalam methanol selama 1 menit. Membran kemudian direndam dalam TBS selama 3 menit. Selanjutnya membran PVDF dikeringkan. Membran PVDF yang telah kering, ditambahkan 10 pasang kelenjar saliva nyamuk dalam 10 μ l PBSF + PSMF. Membran PVDF dibiarkan kering dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dengan 5% skimm milk dalam TBS. Membran PVDF dibersihkan dengan TBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.

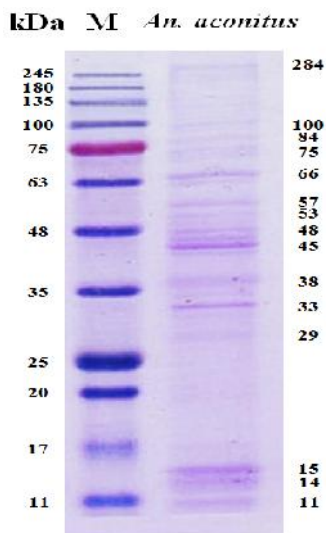
Selanjutnya ditambahkan antibodi primer (ekstrak kelenjar saliva) dengan perbandingan larutan 1:1000 dengan 10 ml 5% skimm milk TBS. Selanjutnya membran PVDF diinkubasi selama 2 jam, pada suhu 27°C. Membran PVDF dibersihkan dengan TBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Tahap selanjutnya yaitu menambahkan antibodi sekunder (goat anti human IgG) dengan perbandingan larutan 1:5000 dalam 10 ml 5% skimm milk TBS. Antibodi sekunder yang digunakan adalah goat anti human IgG. Membran kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 27°C. Membran dicuci menggunakan

TBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Membran PVDF kemudian dikeringkan. Selanjutnya ditambahkan 250 µl NBT/BCIP sehingga cukup menutupi membran. Membran diinkubasi selama 5 menit dan dihindarkan dari cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Protein Total Kelenjar Saliva *An aconitus* Betina

Analisis sds-page dilakukan untuk mengetahui profil protein dan berat molekul protein kelenjar saliva nyamuk. Pita protein yang muncul diukur secara manual menggunakan kertas milimeter. Ukuran Pita protein yang muncul pada *An. aconitus* antara lain ~284, 100, 84, 75, 66, 57, 53, 48, 45, 38, 33, 29, 15, 14, dan 11 kDa. Beberapa penelitian terdahulu misalnya penelitian Almeras *et al.*, (2010); Calvo *et al.*, (2009); Champagne *et al.*, (1995); Fontaine *et al.*, 2010; James *et al.*, (1994); King *et al.*, (2011); Orlandi-Pradines *et al.*, (2007); Sor-Suwan *et al.*, (2014); Valenzuela *et al.*, (2002); Vijai *et al.*, (2014); Wasinpiyamongkol *et al.*, (2010); menunjukkan ukuran pita – pita protein yang mirip dengan pita protein hasil analisis sds-page pada penelitian ini. Pebandingan hasil penelitian transkriptomik dan proteomik terdahulu dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Hasil analisa sds-page, (SG) protein 10 pasang kelenjar saliva *An. aconitus* betina; (M) marker (Pre-stain Intron) (Kamera: Samsung Tab 4).

Tabel 1. Komparasi profil protein berdasarkan berat molekul (BM) kelenjar saliva *An. aconitus* dalam penelitian dengan penelitian terdahulu

| BM protein yang teridentifikasi dalam penelitian ini | Nama dan berat molekul tentatif protein dari identifikasi terdahulu | Fungsi tentatif protein yang sudah teridentifikasi |
|--|---|--|
| ~ 284 kDa | SGS (f) ~ 220 kDa | Spesifik protein imunogenik |
| ~ 75, 84, 100 kDa | <i>Saglin</i> (f) ~ 72 dan 100 kDa | Spesifik protein imunogenik |
| ~ 66 kDa | <i>Putative 5' nucleotidase/Apyrase</i> (a, c, h, j) 62-68 kDa | Antikoagulan, antihemostatik dan antiplatelet |
| ~ 48, 53, 57 kDa | <i>Salivary serpin putative antikoagulant</i> (a, g) 47-50 kDa | Antikoagulan |
| ~ 45, 48 kDa | <i>the SGI family</i> (b, i) 40,9 – 47,5 kDa | Belum diketahui |
| ~ 33 kDa | <i>30 kDa antigen</i> (h, i) 30-34 kDa | Anti-platelet |
| ~ 15, 29, 33, 38 kDa | <i>D7 family</i> (a, d, e, i) 15-20 kDa 35-40kDa | Vasodilator, Antikoagulan, Imunomodulator |
| ~ 14 kDa | <i>Mucin</i> (b, i) 13,5 kDa | Memodulasi makrofag |

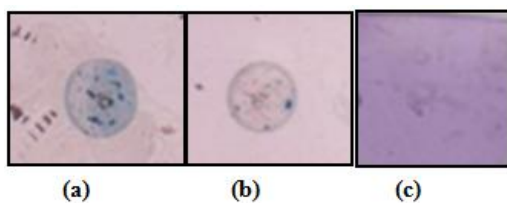
(*) Keterangan referensi tabel: (a) Almeras *et al.*, 2010; (b) Calvo *et al.*, 2009; (c) Champagne *et al.*, 1995; (d) Fontaine *et al.*, 2010; (e) James *et al.*, 1994; (f) King *et al.*, 2011 (g) Orlandi-Pradines *et al.*, 2007; (h) Sor-Suwan *et al.*, 2014 (i) Valenzuela *et al.*, 2002; (j) Vijai *et al.*, 2014 (k) Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010.

Berdasarkan data nama dan berat molekul protein pada Tabel 1, protein D7 family merupakan protein yang memiliki fungsi sebagai vasodilator, antikoagulan dan immunomodulator. Protein D7 family menurunkan permeabilitas kapiler darah sehingga mengurangi jumlah sel darah putih dan protein – protein sistem imun yang dikeluarkan. Dengan demikian, sistem imun inang dapat dimodulasi sehingga parasit dapat masuk ke dalam darah dengan mudah. Protein SGS (Salivary Gland Surface) berperan sebagai reseptor plasmodium pada permukaan basal kelenjar saliva. Protein ini dihasilkan hanya pada kelenjar saliva nyamuk betina. Protein SGS adalah protein yang paling imunogenik diantara protein lainnya dalam kelenjar saliva. Protein ini memiliki kisaran berat molekul 300 kDa dan berperan penting dalam proses blood feeding (King *et al.*, 2011). Sedangkan protein Saglin berperan memfasilitasi sporozoit dengan mudah masuk ke dalam darah (Jiuling, 2013). Protein Saglin dalam penelitian ini memiliki berat molekul ~ 75, 84, 100 kDa. Protein dengan berat molekul ~66 kDa merupakan

protein Putative 5' nucleotidase/ Apyrase yang merupakan protein antikoagulan, antihemostatik dan antiplatelet. Protein dengan berat molekul ~48, 53, dan 57 kDa merupakan protein Salivary serpin putative antikoagulant merupakan protein yang berperan sebagai antikoagulan. Protein dengan berat molekul ~45, 48 kDa merupakan protein the SGI family yang belum diketahui fungsinya. Protein dengan berat molekul ~33 kDa merupakan protein 30 kDa antigen merupakan protein antiplatelet. Protein dengan berat molekul ~15, 29, 33, 38 kDa merupakan protein D7 family yang berperan sebagai vasodilator, antikoagulan dan immunomodulator. Sedangkan protein dengan berat molekul ~14 kDa merupakan protein Mucin yang berfungsi untuk memodulasi makrofag.

Analisis dot blot Total Protein Kelenjar Saliva *An. aconitus*

Kelenjar saliva nyamuk yang telah diekstrak kemudian dianalisis menggunakan analisis dot blot. Analisis dilakukan untuk mengetahui adanya reaksi antigen dan antibodi. Analisis dot blot dilakukan juga sebagai langkah awal pemeriksaan adanya protein kelenjar saliva nyamuk yang dapat berikatan dengan beberapa protein sampel darah manusia. Analisis dot blot dilakukan untuk analisis keberadaan protein imunogenik. Analisis ini menunjukkan adanya ikatan protein kelenjar saliva dengan serum darah manusia. Reaksi ekstrak kelenjar saliva nyamuk dengan serum darah manusia endemik, dan neonatus menunjukkan adanya lingkaran abu – abu, maka protein kelenjar saliva *An. aconitus* bersifat imunogenik terhadap antibodi manusia. Hasil analisis dot blot dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Hasil analisis dot blot, membran PVDF diinkubasi dengan serum darah (a) orang sehat endemik (b) neonatus (c) kontrol negatif (kamera: Samsung Tab 4).

KESIMPULAN

Pita protein hasil analisis sds-page memiliki berat molekul antara lain ~284, 100, 84, 75, 66, 57, 53, 48, 45, 38, 33, 29, 15, 14, dan 11 kDa. Hasil dot blot menunjukkan bahwa antibodi dalam serum darah manusia yang tinggal di daerah endemik mengenali protein kelenjar saliva *An. aconitus* ditunjukkan dengan munculnya lingkaran abu – abu pada membran PVDF. Perlu adanya analisis dot blot terhadap serum darah orang sehat non-endemik dan neonatus sehingga terdapat perbedaan jelas reaksi antigen dan antibodi malaria.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek Penelitian Hibah Pascasarjana sesuai SPK Dikti Nomor 230/UN25.3.1/LT/2015 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S. 2010. *Salivary Gland Protein Repertoire from Aedes aegypti Mosquitos*. Vector Borne and Zoonotic Diseases. Vol. 10 (4):391-402
- Carter, Mendis, Miller, Molineaux, Saul. 2000. *Malaria Transmission Blocking Vaccine: How Can Their Development be Supported*. Amerika: Nature America Inc.
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M. 2006. *Function and Evolution of a Mosquito Salivary Protein Family*. J Biol Chem. Vol. 281 (4): 1935-1942.
- Champagne D. E., Smartt C. T., Ribeiro J. M., James A. A. 1995. *The salivary glandspecific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.92: 694-698
- Data Kesehatan Republik Indonesia. *Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar Indonesia* (Riskesdas). 2013
- Fontaine, A., Diouf., Ibrahima, Bakkali., Misse D., Pages F., Fusai, Thiery; Rogier, Christophe; and Almeras, Lionel. 2011. *Implication of Haematophagous Arthropod Salivary Proteins in Host-Vector Interaction*. J Parasite & Vectors. 4: 187.

- James, A.A. 1994. *Molecular and biochemical analysis of the salivary gland of vector mosquitoes*. Bull Inst Pateur. Vol. 92: 113-150
- Jiuling Wang¹, Yue Zhang, Yang O. Zhao, Michelle W. M. Li, Lili Zhang, Srdjan Dragovic, Nabil M. Abraham and Erol Fikrig. 2013. *Anopheles gambiae Circumsporozoite Protein–Binding Protein Facilitates Plasmodium Infection of Mosquito Salivary Glands*. Department of Applied Genomics, Bristol-Myers Squibb, Pennington, New Jersey.
- King, J. G., K. Vernic, J. F. Hilyer. 2001. *Members of The Salivary Gland Surface Protein Family (SGS) are Major Immunogenic Components of Mosquito Saliva*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. JBC Papers in Press.
- Orlandi, P.E., Almeras, L., Senneville, D. L., Barbe, S., Remoue, F., Villard, C., Cornelié, S., Penhoat, K., Pascual, A., Bourgouin, C., Fontenille, D., Bonnet, J., Corre-Catelin, N., Reiter, P., Page's, P., Laffite, D., Boulanger, D., Simondon, F.O., Pradines, B., Fusa, T., Rogier., C. 2007. *Antibody Response Against Saliva Antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in Travellers in Tropical Africa*. Microbes and Infection. Vol. 9: 1454-1462.
- Sor-suwan S, Jariyapan N, Roytrakul S, Paemane A, Phume A, Phattanawiboon B, Intakhan N, Chanmol W, Bates PA, Saeung A, Choochote W. 2014. *Identification of salivary gland proteins depleted after blood feeding in the malaria vector Anopheles campestris-like mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. PloS One. Vol 9(3)
- Valenzuela J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., Miranda-Santos, I.K.F., Marinotti, O., Francischetti, I. M., Ribeiro, J. M. C. 2002. *The D7 family of salivary proteins in blood sucking Diptera*. Insect Mol Biol. Vol. 11 (2): 149-155.
- Vijay S, Rawal R, Kadian K, Raghavendra K, Sharma A. 2015. *Annotated differentially expressed salivary proteins of susceptible and insecticide-resistant mosquitoes of Anopheles stephensi*. PloS One. Vol 10(3)
- Wasinpiyamongkol, L., Patramol, S., Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Doucourse, S., Mouchet, F., Seveno, M., Remoue, F., Demette, E., Blizard, J.P., Jouin, P., Biron, D. G., Thomas, F., F., Misse, D. 2010. *Blood-Feeding and Immunogenic Aedes aegypti Saliva Proteins*. Proteomic. Vol. 10: 1906-1916.

