

## Isolasi Gen Pengkode Arthropod Odorant Binding Protein D7 dari Kelenjar Saliva Vektor Malaria *Anopheles sundaicus*

### *Isolation of Genes Encoding Arthropod Odorant Binding Proteins (OBP), D7 from Salivary Gland Vectors of Malaria: Anopheles sundaicus*

Nuryatmaja Gora Pawana<sup>1</sup>, Kahar Muzakar<sup>2</sup> dan Kartika Senjarini<sup>3\*</sup>)

*Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Jember University, Jember*

<sup>\*)</sup>*E-mail : Kartika\_senjarini@yahoo.com*

#### ABSTRACT

The isolation of Arthropod Odorant Binding, D7 protein, encoding genes from *Anopheles sundaicus* and *An. maculatus* mosquitoes as the malaria vectors in Indonesia is necessary to recognize their characteristic. The isolated genes can be used to develop the Transmission Blocking Vaccine (TBV). This research aims to characterize the D7 protein encoding genes from *An. sundaicus* and *An. maculatus* through the synthesis of complementary DNA (cDNA) of D7 protein by using D7 protein primer that has been used for the other species of *Anopheles*. The mosquitoes were taken from Dusun Parasputih, Bangsring, Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur. Isolation of the salivary gland was done by performing microdissection method and the isolation of the total RNA was done by performing High Pure RNA Isolation Kit (Roche-Germany). Synthesis of cDNA D7 encoding gene and its amplification were performed by using Maxime RT-PCR Premix Kit (iNtRon Biotechnology). The result of the total RNA and RT-PCR were run in agarose gel and visualized under the UV transilluminator. Based on the visualization, we found that the salivary gland total RNA of female *An. sundaicus* was 500-750 base pair (bp). The RT-PCR visualization showed a band sized below 100 bp and it was concluded not to be the size of the D7 protein encoding gene. An incompatibility of D7 primer from *An. gambiae* with cDNA template from *An. sundaicus* was suspected to be the reason of the gene isolation failure.

Keywords: gene isolation, D7 protein, salivary gland, *Anopheles sundaicus*

#### PENDAHULUAN

Teknologi transkriptomik adalah teknologi yang menganalisa dan mengidentifikasi sekuen nuklotida RNA yang mengkode gen (DNA) fungsional tertentu secara kuantitatif maupun kualitatif berkaitan dengan fungsinya secara seluler (Valenzuela *et al.*, 2003). Salah satu contoh hasil teknologi transkriptomik yaitu penelitian pada kelenjar saliva *Anopheles gambiae* sebagai vektor malaria di Afrika. Penelitian ini memberikan informasi tentang sejumlah protein yang mampu mendukung patogenesis parasit dan dapat memicu sistem imun pada inang (antigen) serta sekuen asam amino penyusunnya (Calvo *et al.*, 2005; Choumet, 2010).

Kelenjar saliva *An. gambiae* mengandung protein D7 yang terdiri atas lima kelompok (D7r1, D7r2, D7r3, D7r4 dan D7r5) yang mengganggu pelbagai aspek fisiologi inang. D7r1 – D7r4 dapat mengikat serotonin, norepinefrin, dan histamin yang berperan dalam respon imun lokal sehingga mendukung kesuksesan transmisi parasit ke tubuh inang. Kelompok protein ini telah terbukti berperan sebagai imunomodulator, immunosupresor dan vasodilator yang menurunkan kepekaan imun inang dan membantu proses makan darah (*blood feeding*) (Calvo *et al.*, 2005).

Spesies nyamuk yang telah dikonfirmasi menjadi vektor penularan malaria di Indonesia antara lain *An. aconitus* Donitz, *An. supictus* Grassi, *An. sundaicus* Rodenwaldt (Soekirno, *et al.*, 2006). *An. sundaicus* dipilih sebagai obyek dalam penelitian ini karena berperan sebagai vektor malaria di Jawa. Nyamuk jenis ini dapat diperoleh salah satunya di daerah Bangsring, Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur sebagai daerah endemik malaria (Mardiana *et al.*, 2003). Habitat spesifiknya di daerah pesisir pantai dengan tingkat salinitas mulai dari rendah, genangan air payau terlantar, bahkan beberapa adaptif terhadap air tawar. Kolam penduduk sekitar pantai, rawa, lagun, bakau terbuka, tambak udang dan ikan di pesisir menjadi habitat perindukannya. Vektor ini dikonfirmasi juga memberi kontribusi penyebaran malaria di Sumatera bahkan di Malaysia dan Thailand serta beberapa daerah Indo-cina (Sinka *et al.*, 2011).

Karena *An. sundaicus* telah diketahui sebagai vektor penting malaria, maka perlu dilakukan karakterisasi gen pengkode D7 dari kelenjar saliva vektor tersebut. Gen pengkode tersebut didapatkan dari sintesis cDNA menggunakan primer D7 hasil konservasi dan RNA total hasil isolasi dari kelenjar saliva nyamuk yang digunakan sebagai *template*. Hasil

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

## METODE

Metode penelitian terdiri atas empat tahap, tahap pertama yaitu koleksi nyamuk *An. sudaicus* dengan *landing collection* ke daerah endemik, tahap kedua melakukan isolasi kelenjar saliva nyamuk betina, tahap ketiga adalah isolasi RNA total, tahap keempat yaitu isolasi gen pengkode D7. Nyamuk diambil dari Desa Bangsring, Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur sebagai daerah endemik malaria. Jenis kelamin betina dipilih karena kompetensinya dalam penyebaran parasit malaria melalui aktivitas *blood feeding*.

Isolasi kelenjar ludah dilakukan dengan metode *microdissection* dan tahap ketiga adalah isolasi RNA total dilakukan dengan *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche-Germany). Tahap keempat yaitu menyusun *complementary DNA* (cDNA) dan diamplifikasi dengan primer D7 dari *An. gambiae* (hasil konservasi) dengan fragmen sebagai berikut: D7rp1 *forward* 5'

AACACGGTAAAGAAGTGTGA GAAG 3' dan *reverse* 5' TTAGTTGCAAATCTT

GTCATCGATTT 3'; D7rp2 *forward* 5'

CGAAAGG AGTCAACGGTGGAGG 3' dan *reverse* 5' CTAGC

ACAAACCATCATCGATTTC; 3' D7rp3 *forward* 5'

AGACAAGAGGAAACGGTTGAAGAATGC 3' dan *reverse* 5'

TCAGTTACACAGCCCATCATCA A 3'; D7rp4 *forward* 5' GAGACTGTGCAAGATT

GTGAGAAT 3' dan *reverse* 5' TCAGCAGTTTA

ATGCCTTATCATAATC 3'; D7rp5 *forward* 5' GT GAGTGATTGTGTGAGGCATG 3' dan

*reverse* 5' TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC 3' (Calvo *et al.*, 2005).

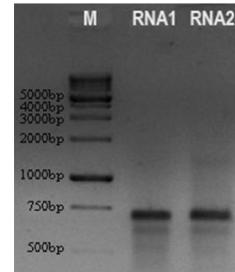
Sintesis cDNA dan amplifikasinya dilakukan dengan menggunakan *Maxime RT-PCR Premix Kit* (*iNtRon Biotechnology*). Hasil isolasi RNA total dan RT-PCR di-*running* dalam gel agarose dan divisualisasi di bawah *transiluminator UV*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### RNA Total Kelenjar Saliva *An. sudaicus* Betina

Visualisasi hasil isolasi RNA total dari kelenjar saliva *An. sudaicus* menggunakan *High Pure RNA Isolation KIT* (Roche-Germany) menunjukkan kemunculan dua pita tipis yang menandakan sub unit ribosomal 28S dan 18S antara 500 – 750 bp pada marker DNA 1 kb (Gambar 1). Pita 28S rRNA pada hasil isolasi RNA kelenjar ludah *An. sudaicus* tampak lebih

tebal dibandingkan pita 18S, kira-kira dua kali lebih kuat (rasio 2 : 1). Penggunaan *heat block* dan tanpa *heat block* tidak mempengaruhi ketebalan *band* RNA total hasil isolasi. Data ini mengindikasikan bahwa RNA dapat diisolasi dari jaringan secara utuh dan dapat digunakan untuk tahap sintesis cDNA dengan menggunakan primer tertentu (White, 2004).

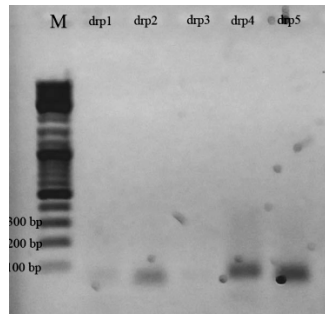


Gambar 1. Visualisasi Isolasi RNA Total Kelenjar Saliva *An. sudaicus*; M : marker 1 kb, RNA 1: RNA kelenjar saliva dengan *heat block*, RNA 2 : RNA kelenjar saliva tanpa *heat block*; menggunakan *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche - Germany); n = 13 (kelenjar saliva yang digunakan); agarose 1,5%, 90 menit, 80 Volt.

### Gen Pengkode Protein D7 dari Kelenjar Saliva *An. sudaicus* Betina

*Maxime Reverse Transcription-Poly Chain Reaction (RT-PCR) PreMix Kit* (*iNtRon Biotechnology*) digunakan untuk mengisolasi DNA pengkode protein D7 menggunakan primer d7rp1 – d7rp5 dari sampel RNA total. Langkah RT-PCR dapat dilakukan baik dalam tabung yang sama dengan PCR (*one step PCR*) atau dengan memisahkan satu tabung dilanjutkan ke tabung berikutnya (*two step PCR*) menggunakan suhu antara 40 °C dan 50 °C, tergantung pada sifat-sifat *reverse transcriptase* (enzim yang dapat menyusun DNA dari RNA) yang digunakan. Langkah yang digunakan dalam penelitian ini adalah *two step* RT-PCR karena mempunyai beberapa kelebihan daripada *one step* RT-PCR yaitu lebih sensitif dan penggunaan cDNA sebagai cetakan dalam PCR bersifat lebih stabil daripada RNA karena kandungan ikatan CH (stabil pada kondisi basa) (O'Connell, 2002).

Band cDNA hasil tahap RT tidak muncul pada visualisasi hasil *running gel agarose*. Diduga ketidakhadiran cDNA karena konsentrasinya yang sangat kecil. Tahap PCR dilakukan untuk meng-amplifikasi cDNA dan ternyata tampak beberapa *band* pada gel agarosa, yaitu pada sumuran drp2 (D7rp2), drp 4 (D7rp4) dan drp5 (D7rp5), sedangkan *Band* D7rp1 dan D7rp3 pada sumuran drp1 dan drp3 tidak tampak pada visualisasi (Gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi cDNA Gen D7 (D7rp1 – 5) dari Kelenjar Saliva *An. sudaicus*; agarose 1,5%, 30 menit, 100 volt; M : marker 10 kb, sumur drp1 : sampel dengan primer D7rp1, sumur drp2 : sampel dengan primer D7rp2, drp3 : sampel dengan primer D7rp3, sumur drp4 : sampel dengan primer D7rp4 dan sumur drp5 : sampel dengan primer D7rp5.

Perbedaan urutan nukleotida pada cDNA bisa menyebabkan kegagalan primer melekat pada sekuen targetnya, seperti halnya yang terjadi pada D7rp1 dan D7rp3. Primer D7rp3 *An. gambiae* mempunyai urutan nukleotida *forward* 5'AGACAAGAGGAA ACGGTTGAAGAATGC 3' dan *reverse* 5' TCAGT TACACAGCCCATCATCAA 3' (Calvo *et al.*, 2005). Pada saat *annealing* PCR, *forward* menempel pada sekuen DNA dengan urutan 3' TCTGTTCTC .... 5' selanjutnya *reverse* menempel pada 3' AGTCAATGT ... 5', cDNA *double-strand* terbentuk dari hasil penempelan tersebut. Hasil ini dapat dicek ukurannya dalam satuan *base pair* dengan cara elektroforesis. Apabila primer tidak menemukan nukleotida target/residu pada ujung 3' yang komplementer dengan dirinya maka DNA tidak akan terbentuk dan tidak terlihat *band* pada gel agarose (*non-amplicon*)(Han & Kim, 2006; Barlet & Stirling, 2010).

Berdasarkan marker, *band* drp2, drp4 dan drp5 berukuran kurang dari 100 bp. Apabila dibandingkan dengan ukuran protein pelbagai Diptera, ukuran gen pengkode protein ini sangat berbeda (Tabel 1).

Tabel 1. Ukuran Gen Pengkode Protein D7 Diptera

No	Jenis Diptera	Ukuran D7 (bp)	Referensi
1	<i>An. gambiae</i>	D7rp1 = 400	Arca <i>et al.</i> , 1999
		D7rp2 = 479	
		D7rp3 = 500	
2	<i>An. stephensi</i>	179 - 538	Dixit <i>et al.</i> , 2009
3	<i>Ae. aegypti</i>	1000	Peng, <i>et al.</i> , 1999
4	<i>Plhebotomus thobbi</i>	684 – 732*	Rohousova <i>et al.</i> , 2012
5	<i>P. sergenti</i>	722 – 724 *	

\* : konversi dari kDa ke *base pair* (*DNA size to Protein Size Tool*)

Protein D7 terdapat pada Diptera dan menempatkannya pada kelompok super famili D7. Kelompok ini terbagi menjadi dua *sub-family* protein D7 dengan berat protein berbeda, yaitu protein pendek (*D7 short family*) dan protein panjang (*D7 long family*). Protein D7 pendek mempunyai berat antara 15 – 20 kDa dan protein panjang beratnya 27 – 30 kDa (Dixit, *et al.*, 2009; Drame *et al.*, 2013). Berat dalam kDa dapat dikonversi dengan *DNA size to Protein Size Conversion Tool* ([http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01\\_06.html](http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01_06.html)) menjadi *base pair* dengan acuan umum 37 kDa mengandung 1000 bp/1 kb, sehingga ukuran protein pendek D7 berkisar 405 – 541 bp, sedangkan protein panjang 730 – 811 bp.

Berdasarkan tabel 1 dapat disimpulkan bahwa *band* yang muncul pada visualisasi hasil RT-PCR bukan gen pengkode protein D7. *Band* yang terbentuk diduga sebagai hasil amplifikasi dari primer D7rp2, D7rp4 dan D7rp5 yang berpasangan dengan sisa-sisa dNTPs pada saat PCR. Primer D7rp1 hingga D7rp5 kemungkinan tidak sesuai dengan urutan nukleotida cDNA yang disintesis dari RNA total, hal ini karena primer yang digunakan dalam penelitian ini dikreasi dari *An. gambiae* sebagai vektor malaria di Afrika (*afrotropical*) (Calvo *et al.*, 2005; Garros & Dujardin, 2013), sedangkan mRNA total dan cDNA dengan kode nukleotidanya berasal dari kelenjar saliva *An. sudaicus* sebagai vektor malaria di Asia (*oriental*). Perbedaan jenis Anopheles diduga menjadi penyebab ketidaksesuaian primer dan tidak terisolasinya gen pengkode D7 pada *An. sudaicus*.

*Self-annealing* bisa terjadi pula pada saat PCR karena ketidaksesuaian primer dengan *template* sehingga terbentuk *band* kurang dari 100 bp pada D7rp2, D7rp4 dan D7rp5. Primer D7 tidak menemukan cetaknya sehingga terjadi penempelan dengan dirinya sendiri dan hasil penempelan itu teramplifikasi. *Olygo Analyzer software* dapat digunakan untuk mengetahui kemungkinan pasangan nukleotida dalam satu pimer dapat terjadi. Di bawah ini adalah salah satu model keluaran *Self-annealing* yang kemungkinan terjadi pada primer forward D7rp5 dengan urutan nukleotida 5' GTGAGTGAT TGTGTGAGGCATG 3'.

Hasil analisis Program Oligo Analyzer - 1.0.2

Primer D7rp5 forward

Name : Primer 1 (forward)  
 Primer : 5'-  
 GTGAGTGATTGTGTGAGGCATG-  
 3'  
 Reverse : 3'-  
 GTACGGAGTGTGTTAGTGAGTG-  
 5'  
 Length : 22 nt

Tm (basic) : 66.0 °C  
 GC % : 50.0 %  
 dG : -38.1 kCal/mol  
 Molecular weight : 6963.5 g/mol

**Primer 1 self annealing:**

5'-GTGAGTGATTGTGTGAGGCATG-3'  
 ||||  
 3'-GTACGGAGTGTGTTAGTGA  
 GTG-5'  
 dG: -2.17 kcal/mol

**Primer 1 loops:**

None!

Data analisis menunjukkan bahwa primer D7rp5 tersusun atas 22 basa nukleotida dan mempunyai *melting Temperature* 66°C (*Tm basic*). *Tm* merupakan temperatur yang diperlukan oleh separoh primer dupleks mengalami disosiasi/lepas ikatan. Primer dengan *Tm* berkisar antara 52 – 58 °C sangat ideal, sedangkan *Tm* di atas 65°C akan mengurangi efektifitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan dengan baik. *Tm* ini sangat ditentukan oleh jumlah basa GC (*GC contains*). Persentase kandungan basa Guanin dan Cytosin sebesar 50% (GC%) dengan nilai energi pengikatan delta G (dG) sebesar -38,1 kCal/mol. Berat molekul D7rp5 sebesar 6963,5 g/mol. *Self-annealing (self dimer)* terjadi karena urutan nukleotida 5' GTGA .... CATG-3' (*primer forward*) berpasangan dengan urutan nukleotida kebalikannya 3' GTAC .... AGTG 5', dengan dG sebesar -2,17 kCal/mol. Hasil analisis menunjukkan tidak ada kemungkinan pembentukan *loops* pada primer D7rp5.

Primer *reverse* pun dapat mengalami *self-annealing* dengan dirinya sendiri, dengan model keluaran *Olygo Analyzer* sebagai berikut:

**Hasil analisis Program Oligo Analyzer - 1.0.2**

**Primer D7rp5 reverse**

Name : Primer 2 (reverse)  
 Primer : 5'-  
 TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 Reverse : 3'-  
 CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 Length : 25 nt

Tm (basic) : 72.0 °C  
 GC % : 44.0 %  
 dG : -43.4 kCal/mol  
 Molecular weight : 7663.0 g/mol

**Primer 2 self annealing:**

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| : : :  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| : : : : :  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'

3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: -0.07 kcal/mol

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| : : :  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: -0.07 kcal/mol

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| : : :  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: 0.31 kcal/mol

**Primer D7rp5 reverse loops:**

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| )  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: -0.20 kcal/mol

5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| A  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: 0.04 kcal/mol

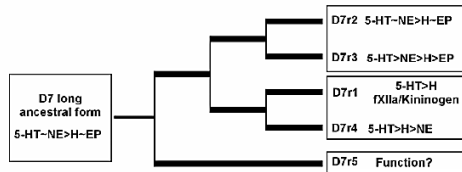
5'-TTAGCACCGTAACTGACTGTTCAAC-3'  
 ||| )  
 3'-CAACTTGTCAGTCAATGCCACGATT-5'  
 dG: 0.43 kcal/mol

Primer *reverse* D7rp5 dengan urutan 5' TTAG .... CAAC 3' dapat berpasangan dengan 3' CAAC .... GATT 5' sebagai kebalikan urutan nukleotida primer *reverse* itu sendiri. Analisa menunjukkan bahwa ada empat kemungkinan *self-annealing* yang bisa terjadi pada primer D7rp5 *reverse* dan terbentuk tiga kemungkinan pembentukan *loops*.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa perbedaan urutan beberapa sekuen asam amino penyusun protein D7/OBP pada beberapa genus *Anopheles* yang berbeda spesies (*An. stephensi*, *An. darlingi*, *An. funetus*, *An. gambiae*) dan *Ae. aegypti*, dapat saja terjadi karena evolusi protein (Gambar 3) dan adaptasi isolasi geografi suatu populasi. Teknologi proteomik dan transkriptomik dapat menganalisa perubahan sekuen asam amino (*Amino Acid Sequencing*) dan urutan nukleotida gen pengkodennya. Perbedaan urutan asam amino ini menimbulkan konsekuensi fisiologis perbedaan kemampuan D7 sebagai protein imunomodulator dalam mengikat komponen asam amino biogenik dan anti-platelet *cysteinyl leukotrienes* (CysLTs) dan *thromboxane A2* (TXA2)) dalam respon imun, khususnya antara kelompok *Anopheles sp* dan *Aedes aegypti* (Alvarenga *et al.*, 2010). Hal ini tentu saja berkaitan dengan perubahan beberapa struktur asam amino pada protein D7.

Protein panjang D7 pada *ancestral* mengalami duplikasi yang menurunkan protein-protein pendek D7 dengan kemampuan lebih spesifik sebagai imunomodulator dalam mengikat amino biogenik. Protein D7rp1 dan D7rp2 memiliki kemampuan mirip seperti nenek

moyangnya yaitu kompeten dalam pengikatan serotonin, norepinefrin dan epinefrin, sedangkan D7rp3 dan D7rp4 lebih spesifik dalam pengikatan serotonin dan histamin. D7rp5 mengalami kehilangan kemampuan mengikat asam amino biogenik dan sampai sekarang belum diketahui fungsinya (pseudogen). Kehilangan kemampuan D7rp5 tidak terjadi pada *Ae. aegypti* dalam mengikat serotonin, histamin, norepinefrin dan epinefrin (Calvo *et al.*, 2005).



Gambar 3. Model Evolusi Fungsi Protein D7 dari *An. gambiae* dalam Kemampuannya Mengikat Amino Biogenik; 5-HT : serotonin, EP : epinefrin, NE : norepinefrin, H : histamine (Calvo *et al.*, 2005).

Vektor malaria yang berbeda wilayah geografi diduga pula menjadi pemicu perbedaan urutan nukleotida penyusun substansi genetiknya. Delesi suatu atau beberapa basa nukleotida menyebabkan jumlah basa penyusun suatu gen berubah dan menyebabkan suatu spesies mengalami spesiasi divergensi menjadi dua sub spesies (*sublink*) yang berbeda. Penelitian pada *An. sundaicus* di India (Andaman dan Nicobar) yang hidup di air payau dan air tawar menunjukkan perbedaan sekuen ribosomal DNA (rDNA) *internal transcribed spacer 2* (ITS 2) antara *An. sundaicus A* dari Vietnam dan *An. sundaicus s. s.* dari Malaysia. Basa nukleotida nomor 431 dan 490 mengalami substitusi dari C (Cytosin) menjadi T (Tymin) dan G (Guanin) menjadi T, sedangkan delesi basa C terjadi pada basa nomor 555. Tidak disebutkan konsekuensi fisiologis yang terjadi dari perbedaan sekuen tersebut, hanya diprediksi pemicu perbedaan adalah isolasi geografis antara *An. sundaicus* Andaman dan Nicobar dengan Vietnam dan Malaysia menjadi sub spesies berbeda dari kelompok *Anopheles* kompleks. Perbedaan ini semakin nyata pada perbandingan sekuen domain-D3 28S rRNA pada *An. sundaicus* Andaman dan Nicobar dengan *Anopheles* sp MYJ-1, *An. minimus* yang berbeda spesies dengan kesamaan sekuen 95% dan tingkat divergensi 3%. Perbandingan dengan *An. dirus D* dari Cina dan *An. dirus A* dari Kamboja dengan penurunan kesamaan sekuen sebesar 63,7% dan 60,8% (Alam *et al.*, 2006).

Perubahan urutan nukleotida kemungkinan terjadi pula pada gen pengkode D7 *An. sundaicus*. Perbedaan jenis asam amino penyusun D7 protein pada beberapa region dapat membawa konsekuensi perbedaan beberapa urutan basa nukleotida DNA pengkode protein, sesuai konsep

dogma biologi transkripsi dan translasi. Kemungkinan hal inilah yang mengakibatkan primer D7 dari *An. gambiae* tidak menemukan *template* dari cDNA kelenjar saliva *An. sundaicus* pada saat PCR dan menyebabkan gen pengkode D7 dari kelenjar saliva *An. sundaicus* betina tidak terisolasi.

### KESIMPULAN

Ukuran RNA total yang telah berhasil diisolasi dari kelenjar saliva *An. sundaicus* betina sebagai vektor malaria di Desa Bangsring, Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur kurang lebih 500 – 750 bp. Gen pengkode protein D7 dari kelenjar saliva *An. sundaicus* belum berhasil diisolasi, visualisasi hasil RT-PCR menunjukkan adanya band berukuran di bawah 100 bp dan disimpulkan bukan merupakan ukuran gen pengkode protein D7.

Untuk penelitian selanjutnya, primer D7 yang digunakan sebaiknya hasil eksplorasi dari *Anopheles* yang berperan sebagai vektor malaria di daerah *oriental* sehingga meminimalkan resiko perbedaan urutan nukleotida yang terlalu besar dan kemungkinan menyebabkan primer tidak menemukan *template* yang komplementer. Untuk memastikan bahwa hasil RT-PCR adalah gen pengkode protein D7, perlu dilakukan *sequencing* DNA dan dikonfirmasi dengan data *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Apabila sesuai dengan data acuan dan diketahui bahwa sekuen tersebut adalah pengkode protein D7, tahap kloning dan produksi protein dapat dilakukan untuk keperluan tahap penelitian selanjutnya.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek Penelitian Hibah Pascasarjana sesuai SPK Dikti Nomor 358/UN25.3.1/LT.6/2013 yang telah membiayai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M. T., M. K. Das, M. A. Ansari, Y. D. Sharma. 2006. Molecular identification of *Anopheles (Cellia) sundaicus* from the Andaman and Nicobar islands of India. *Acta Tropica* Vol. 97 : 10 – 18.
- Alvarenga, P. H., I. M. B. Franchiscetti, E. Calvo, A. Sa-Nunes, J. M. C. Ribeiro, J. F. Andersen. 2010. *PLos Biology* Vol. 8 (11) : 1 – 15.
- Arca, Lombardo, Cappuro, Torre, Dimopoulos, James & Coluzzi. 1999. Trapping cDNA Encoding Secreted Proteins from The Salivary Glands of The Malaria Vector

- Anopheles gambiae*. *PNAS* Vol. 96: 1516 – 1521.
- Barlet, J. M. S., D. Stirling. 2010. *Method in Molecular biology : PCR Protocol Second Edition*. Totowa, NJ : Humana Press, inc.
- Calvo E., Mans B. J., Andersen J. F., Ribeiro J. M. 2005. Function and Evolution of a Mosquito Salivary Protein Family. *J Biol Chem*. Vol. 281:1935–1942.
- Choumet, V. 2010. Proteomics of *Anopheles gambiae*. *Malariae Parasites Journal* Vol. 1 : 40 – 49.
- Dixit, R., A. Sharma, D. T. Mourya, R. Kamaraju, m. S. Patole, Y. S. Shouche. 2009. Salivary gland transcriptome analysis during Plasmodium infection in malaria vector *Anopheles stephensi*. *International Journal of Infectious Diseases* Vol. 13 : 636 – 646.
- Drame, P. M., A. Poinignon, A. Marie, H. Noukpo, S. Doucoure, S. Cornelié, F. Remoue. 2013. *New Salivary Biomarkers of Human Exposure to Malaria Vector Bites*. InTech : Croasia.
- Han S., D. Kim. 2006. AtRTPrimer: database for Arabidopsis genome-wide homogeneous and specific RT-PCR primer-pairs. *BioMed Central* Vol. 7 : 1 - 9
- Mardiana, Wigati, T. Suwaryono. 2003. Aktivitas Menggigit *Anopheles sudaicus* di Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. *Media Litbang Kesehatan* Vol. 13 (2) : 26 – 30.
- O'Connell, J. 2002. *Methods in Molecular Biology: RT-PCR Protocols* Vol. 193. New Jersey : Humana Press, Inc.
- Peng Z, Yang J, Wang H, Simons FE. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies to two new mosquito *Aedes aegypti* salivary proteins. *Insect Biochem Mol Biol* Vol. 29(10): 909-914.
- Rohousova, I., S. Subhrahmanyam, V. Volfova, J. Mu, P. Volf, J. G. Valenzuela, R. C. Jochim. 2012. Salivary Gland Transcriptomes and Proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, Vectors of Leishmaniasis. *PIOs Neglected topical Disease* Vol. 6 (5) : 1 – 27.
- Sinka, M. E., M. J. Bangs, S. Manguin, T. Chareonviriyaphap, A. P. Patil, W. H. Temperley, P. W. Getting, I. R. Elyazar, C. W. Kabaria, R. E. Harbach, S. I. Hay. 2011. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vector* Vol 4 : 1 – 46.
- Soekirno, M. M. Sudomo, A. Munif. 2006. Ketahanan Hidup di Alam Tiga Spesies Nyamuk *Anopheles* di Indonesia. *Jurnal Ekologi Kesehatan* Vol. 5 (2): 404 – 408.
- Valenzuela, J. G., I. M. B. Francischetti, V. M. Pham, M. K. Garfield, J. M. C. Riebeiro. 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 33: 717 – 732.
- White, P. 2004. *Evaluating Concentration and Purity of RNA Functional Genomic Core*. University of Pennsylvania.

**Sumber online :**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> [diakses 5 Mei 2014]