

Karakterisasi *In Silico* Peptida Nterm-34 kDa Saliva Nyamuk *Aedes aegypti* sebagai Kandidat Antigen Biomarker Risiko Transmisi Virus Dengue

Yunita Armiyanti^{1*}, Nizar Fiska Bayu Agustian¹, Sheilla Rachmania¹

ABSTRACT

Recently, a new biomarker of mosquito bite has been developed using human antibody response to mosquito salivary protein. One of the proteins that has been tested is salivary protein 34-kDa which has been refined to Nterm-34 kDa peptide. This study aimed to characterize Nterm-34 kDa salivary peptide as a potential antigen biomarker to assess Dengue virus transmission risk. The sequence Nterm-34 kDa was analyzed using several software to predict the characteristic of the peptide. BLASTP from Vectorbase and NCBI was used to check the specificity of the peptide. IBIVU Praline was used to do multiple sequence alignment. IEDB (Bepipred and Kolaskar & Tongaonkar antigenicity prediction) was used to predict epitopes and antigenic properties, and lastly, ProtParam was used to predict physicochemical properties. The result showed that Nterm-34 kDa salivary peptide is specific to the *Aedes aegypti* mosquito at the species level and has low conservation compared to other proteins in *Aedes aegypti* 34-kDa salivary protein family. Nterm-34 kDa is predicted to be antigenic and one of the epitopes. Nterm-34 kDa salivary peptide is predicted to have a molecular weight of 2,092 kDa, unstable, and hydrophilic. In conclusion, Nterm-34 kDa salivary peptide is predicted to have potential as an antigen biomarker for Dengue virus transmission.

Keywords: *Aedes aegypti*, antigen, biomarker, *in silico*, Nterm-34 kDa, salivary protein.

Demam Dengue merupakan penyakit yang masih menjadi masalah di dunia. Penelitian yang dilakukan Brady *et al.*, (2012) memperkirakan 3,9 miliar orang berisiko terjangkit demam dengue, dan diperkirakan 390 juta kasus tiap tahunnya dan lebih dari 20 ribu kasus meninggal dunia.¹ Penyakit ini disebabkan oleh virus yang disebarkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes*, yaitu *Aedes aegypti* sebagai vektor utama dan *Aedes albopictus* sebagai vektor potensial.² Di Indonesia sendiri penyakit ini juga masih menjadi salah satu masalah kesehatan yang serius dan selalu muncul tiap tahun utamanya setiap musim penghujan. Menurut data Kementerian Kesehatan Indonesia, hingga bulan Februari 2022 didapatkan 13.776 kasus demam Dengue yang menyebabkan 145 kematian di Indonesia.

Tidak adanya obat untuk penyakit ini dan vaksin untuk mencegah penularan virus Dengue

menyebabkan pengontrolan vektor menjadi cara utama untuk mengendalikan penularan penyakit demam Dengue. Dalam hal ini diperlukan strategi untuk mengendalikan populasi nyamuk di suatu area untuk memperkirakan risiko transmisi, merencanakan tindakan, dan mengevaluasi hasil tindakan pengendalian vektor. Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan untuk mengevaluasi pengendalian populasi nyamuk *Aedes*, diantaranya penggunaan perangkap untuk menangkap nyamuk dewasa, ovitrap untuk memerangkap telur nyamuk, identifikasi tempat berkembang biak nyamuk dan larva, penyemprotan dalam rumah, dan metode *human landing catches* (HLC).³

Metode-metode survei entomologi tersebut dalam pelaksanaannya memiliki masalah dan batasan. Estimasi jumlah larva nyamuk sulit dilakukan tanpa adanya akses ke semua tempat perkembangbiakan nyamuk. Jumlah larva dan pupa nyamuk terkadang juga tidak bisa menggambarkan kondisi populasi nyamuk dewasa.³ Estimasi populasi nyamuk betina dewasa menggunakan metode HLC merupakan

* *Corresponding Author:* yunita.fk@unej.ac.id

¹ Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Kabupaten Jember, Jawa Timur, Indonesia

metode paling akurat dalam memperkirakan risiko transmisi penyakit yang disebarkan oleh gigitan nyamuk, hanya saja metode ini mempunyai masalah etik karena menggunakan relawan yang berisiko terjangkit penyakit yang disebarkan oleh nyamuk. Selain kelemahan-kelemahan tersebut, pada metode ini sulit untuk dilakukan evaluasi perbedaan paparan nyamuk pada manusia dalam skala individu.⁴

Saat ini telah dikembangkan biomarker paparan gigitan nyamuk *Aedes* melalui deteksi antibodi manusia terhadap protein saliva nyamuk. Ketika nyamuk menggigit manusia, nyamuk juga memasukkan berbagai macam senyawa aktif untuk membantu proses menghisap darah melalui probosis. Senyawa senyawa ini bersifat antikoagulan, antiplatelet, imunomodulator dan vasomodulator.⁵ Salah satu protein saliva pada nyamuk *Aedes* yang telah diteliti spesifitasnya adalah protein 34 kDa yang lalu dikembangkan menjadi peptida yang lebih spesifik lagi, yaitu N-terminal (N-term) 34 kDa yang telah diuji di beberapa negara dan menunjukkan hasil yang menjanjikan untuk digunakan sebagai biomarker spesifik gigitan nyamuk *Aedes*.^{6,7}

Penelitian yang dilakukan oleh Ndille *et al.*, pada tahun 2016 di kepulauan La Reunion menunjukkan bahwa respon antibodi manusia terhadap peptida Nterm-34 kDa nyamuk *Ae. aegypti* dapat digunakan sebagai indikator risiko transmisi Dengue dan evaluasi keberhasilan upaya pengendalian vektor.⁸ Penelitian lain juga telah dilakukan di Thailand pada tahun 2021 dan menunjukkan hasil yang serupa.⁹

Sebagai langkah awal perancangan antigen biomarker, perlu dilakukan karakterisasi peptida Nterm-34 kDa menggunakan studi in silico. Metode *in silico* banyak digunakan sebagai tahap penelitian awal untuk mengidentifikasi target penelitian, sebelum dilanjutkan dengan penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*.⁹ Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis spesifitas, antigenitas, dan sifat fisikokimia peptida Nterm-34 kDa protein saliva nyamuk *Aedes aegypti* sebagai peptida yang berpotensi sebagai antigen biomarker risiko transmisi virus Dengue.

METODE

Peptida Nterm-34 kDa

Subjek dalam penelitian ini dipilih sekuens protein saliva 34 kDa dari nyamuk *Aedes aegypti* strain Liverpool/*Black eye* yang didapat dari Proteinbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) dengan nomor akses ABF18017.1. (Gambar 1).

```
MSPSNKILVLLLPILLVSSHPIPAEDPAKQC�NLSDDLL  
TKLKAASGASSAKAANEDILPNTTLAACPMKKNFTE  
MLKTVATDMEVLKTQGVSNMEVQLLRESFEELKND  
LAKNKDIFERQANQDTSKAEGEMVEKINKLQLEMAK  
LQEEIEEQTKQMYVDMIEYIFERLKMNDTEAIDSYAQ  
IVMKTMMHELIMKLTDRLLVWEMVKYVEGKKNK  
WVGRKVLNTILDQVNKLKLYKPEEVEIGKNSLVVVW  
CWKFNSSETVYGTDEEDQKSFHLAKLFFPKEKGCKEC  
ANVKSRTMCNNDYPKVMVKAFG
```

Gambar 1. Protein Saliva 34-kDa nyamuk *Aedes aegypti*, peptida Nterm-34 kDa ditandai dengan warna merah

Uji spesifitas dan sequence alignment peptida Nterm-34 kDa

Sekuens Nterm-34 kDa yang sudah ditetapkan melalui pencarian melalui *database* dilakukan uji spesifitas dengan menggunakan BLASTP Vectorbase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app/workspace/blast/new>), lalu dilakukan uji penyejajaran sekuens protein saliva 34 kDa nyamuk *Aedes aegypti* dengan famili protein saliva 34 kDa menggunakan server IBIVU PRALINE (<https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>).

Uji prediksi epitop peptida Nterm-34 kDa

Sekuens protein saliva 34 kDa nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan prediksi epitop linear sel B menggunakan IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Metode yang digunakan adalah BepiPred 1.0 linear yang memprediksi epitop sel B dengan nilai ambang diatur sebesar 0,35.

Uji antigenitas peptida Nterm-34 kDa

Sekuens Nterm-34 kDa kemudian diuji antigenitasnya menggunakan IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Sekuens protein diinputkan dalam bentuk fasta dan nilai ambang diatur sebesar 1,020.

Uji Fisikokimia peptida Nterm-34 kDa

Peptida Nterm-34 kDa kemudian dilakukan uji karakteristik Fisikokimia menggunakan ExPASy ProtParam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Uji Fisikokimia digunakan untuk mengetahui karakteristik imunogenitas epitop yang diprediksi. Sifat fisikokimia yang dicari adalah *molecular instability index*, dan *GRAVY score*.

HASIL

Spesifisitas peptida Nterm-34 kDa

Hasil uji spesifisitas menggunakan BLASTP Vectorbase menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa bersifat spesifik pada protein yang ada pada nyamuk *Aedes aegypti*. Hal ini ditunjukkan dengan *identity* 100% dan *query coverage* sebesar 100% pada protein yang dikode oleh gen AAEL003600-PA pada nyamuk *Aedes aegypti*. Gen-gen lain yang muncul mengkode protein-protein dari *Aedes albopictus*, namun protein-protein tersebut mempunyai nilai *identity* yang rendah, yaitu 50% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil BLASTP Vectorbase

No	Nama gen	Organisme	Query Coverage (%)	Identity (%)	e-value
1.	AAEL003600-PA	<i>Aedes aegypti</i>	100	100	1x10 ⁻⁶
2.	AALF004421-PA	<i>Aedes albopictus</i>	68	50	3,7
3.	AALFPA_060952.P28070	<i>Aedes albopictus</i>	64	50	7,2
4.	AALF017483-PA	<i>Aedes albopictus</i>	64	50	7,2
5.	AALF004424-PA	<i>Aedes albopictus</i>	64	50	8,4

Peptida Nterm-34 kDa selanjutnya dilakukan uji BLAST menggunakan server NCBI. Berdasarkan uji ini, terdapat 3 protein yaitu; XP_001657054.2, ABF18017.1, dan ABF18170.1 yang memiliki nilai *identity* dan *query coverage* sebesar 100%. Ketiga protein ini memiliki urutan asam amino yang sama satu dengan lainnya. Hasil penelusuran gen AAEL003600-PA yang didapat dari hasil BLAST

Vectorbase di NCBI mendapatkan protein yang sama dengan protein XP_001657054.2. Tiga protein dengan nilai *query coverage* dan *identity* sebesar 100% merupakan protein yang diidentifikasi pada *Aedes aegypti*. Tiga protein lainnya berasal dari *Aedes albopictus* yang mempunyai *identity* yang rendah(54,55%). Hasil uji BLAST NCBI dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil BLASTP NCBI

No	Accession	Organisme	Query Coverage (%)	Identity (%)	e-value
1.	XP_001657054.2	<i>Aedes aegypti</i>	100	100	1x10 ⁻¹³
2.	ABF18017.1	<i>Aedes aegypti</i>	100	100	1x10 ⁻¹³
3.	ABF18170.1	<i>Aedes aegypti</i>	100	100	1x10 ⁻¹³
4.	KXJ72660.1	<i>Aedes albopictus</i>	100	54,55	0,092
5.	AAV90689.1	<i>Aedes albopictus</i>	100	54,55	0,093
6.	XP_029733216.1	<i>Aedes albopictus</i>	100	54,55	0,093

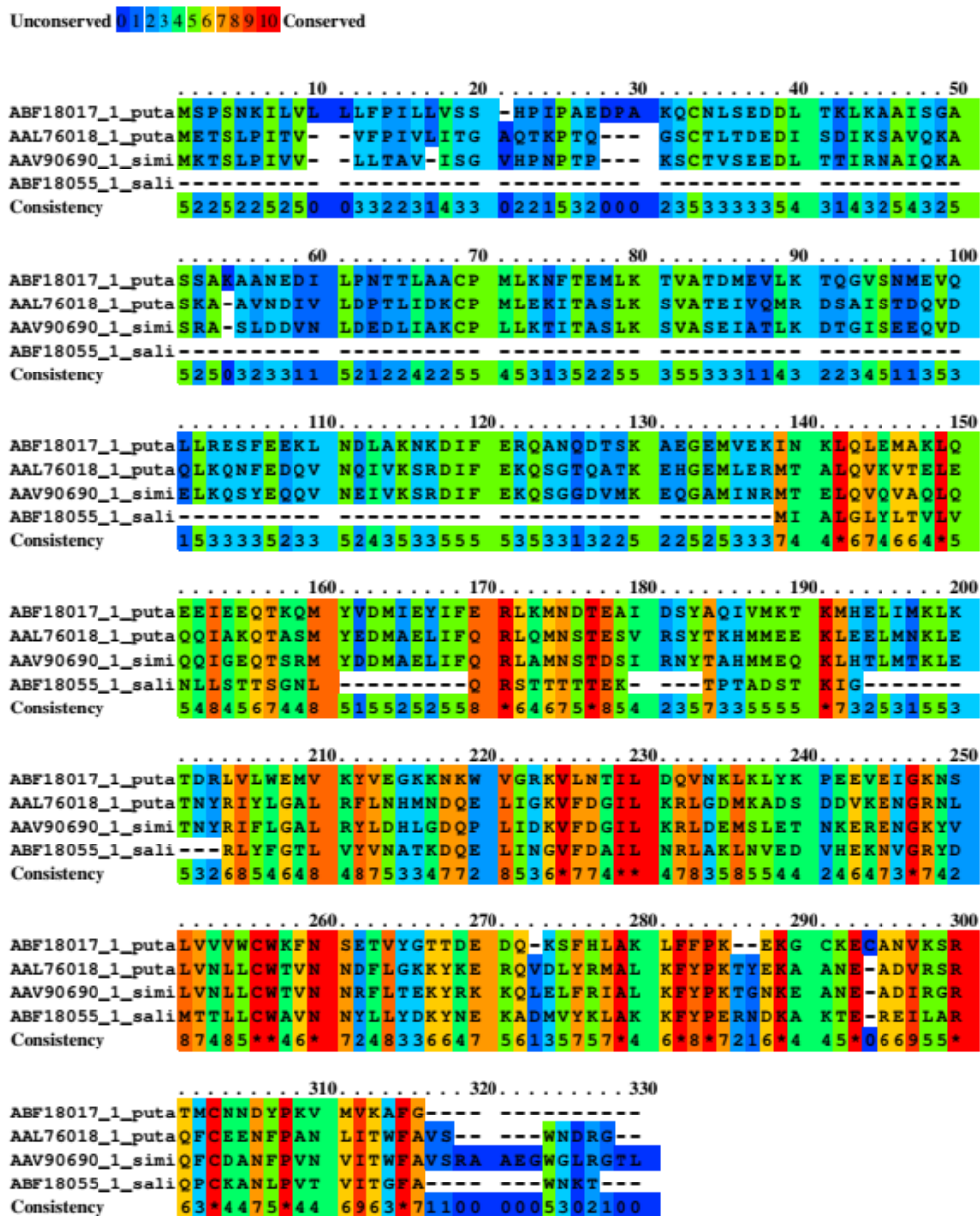
Hasil uji penyejajaran peptida Nterm-34 kDa seperti pada Gambar 2. menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa bersifat spesifik karena

hanya terdapat pada protein saliva 34 kDa *Aedes aegypti* dengan *accession number* ABF18170.1. Hal ini ditunjukkan oleh peptida Nterm-34 kDa yang

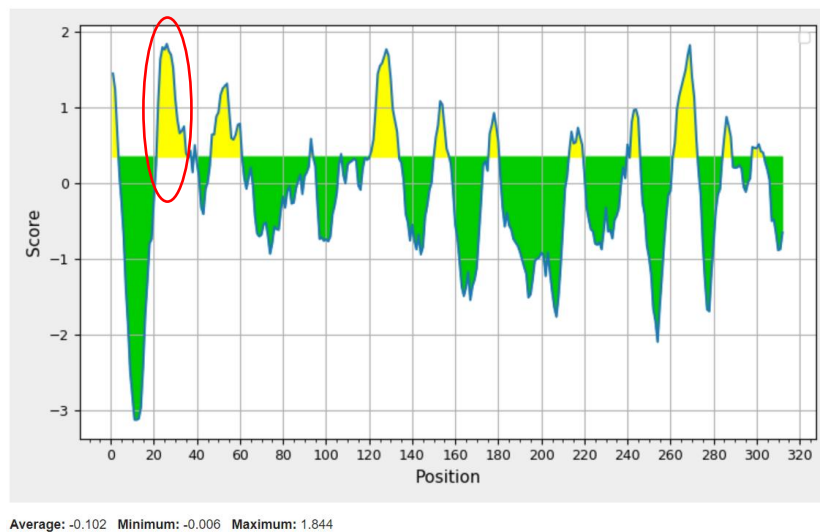
berada pada urutan asam amino mulai 22 sampai dengan 40 merupakan daerah yang konservasinya sangat rendah dengan protein famili 34 kDa lainnya (didominasi warna biru). Tingkat konservasi bisa dilihat dari warna pada penyejajaran, yaitu semakin biru semakin tidak terkonservasi dan semakin merah semakin terkonservasi.

Prediksi epitop peptida Nterm-34 kDa

Hasil prediksi epitop linier menunjukkan terdapat 16 daerah epitop yang diprediksi terdapat pada sekuens protein saliva 34 kDa nyamuk *Aedes aegypti*. Pada Gambar 3. Peptide yang merupakan daerah epitope ditunjukkan dengan warna kuning dan yang dilingkari merah merupakan peptide Nterm-34 kDa. Salah satu daerah epitop yang diprediksi adalah sekuens PIPAEDPAKQCMLS yang merupakan bagian dari peptida Nterm-34 kDa dan memiliki nilai paling tinggi sebesar 1,844 seperti ditunjukkan pada Tabel 3.



Gambar 2. Hasil uji penyejajaran peptida Nterm-34 kDa



Gambar 3. Hasil uji prediksi epitop, peptida Nterm 34-kDa ditandai lingkaran merah

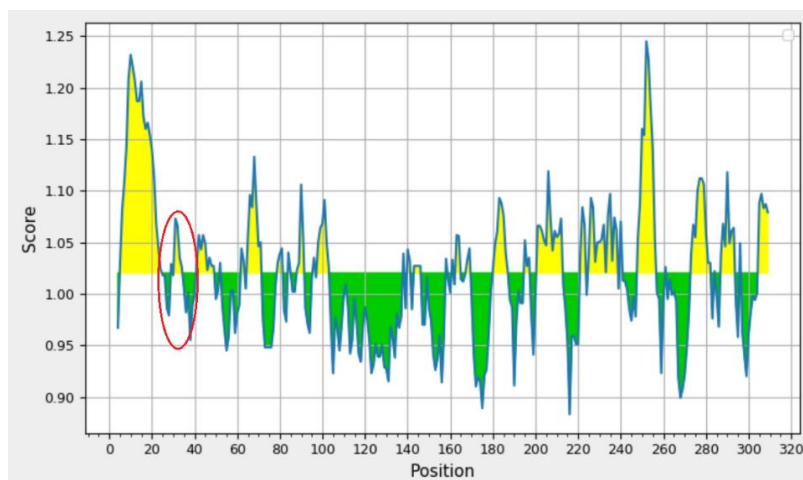
Tabel 3. Hasil prediksi epitop

No	Start	End	Peptida	Length
1.	1	3	MSP	3
2.	22	35	PIPAEDPAKQCMLS	14
3.	37	37	D	1
4.	39	39	L	1
5.	47	60	SGASSAKAANEDIL	14
6.	93	93	V	1
7.	107	107	E	1
8.	121	133	RQANQDTSKAEGE	13
9.	150	157	EEIEEQTK	8
10.	176	180	TEAID	5
11.	213	219	EGKKNKW	7
12.	240	240	P	1
13.	242	245	EVEI	4
14.	262	272	TVYGTDEDQK	11
15.	285	288	KGCK	4
16.	298	303	MCNNDY	6

Prediksi antigenitas peptida Nterm-34 kDa

Hasil uji antigenitas menunjukkan sekuens peptida Nterm-34 kDa nyamuk *Aedes aegypti* bersifat antigenik. Pada Gambar 4 bagian yang berwarna kuning bersifat antigenic dan bagian

yang dilingkari merupakan peptida Nterm-34 kDa. Sekuens asam amino peptida Nterm-34 kDa yang diuji menunjukkan sebagian sekuens asam amino berada di atas nilai ambang, yaitu sekuens asam amino pada posisi 25 hingga 35 dengan sekuens AEDPAKQCMLS (Tabel 4).



Gambar 4. Hasil uji prediksi antigenitas, peptida Nterm 34-kDa ditandai lingkaran merah

Tabel 4. Hasil prediksi antigenitas

No	Start	End	Peptida	Score
1.	18	24	VSSHPIP	1,113
2.	19	25	SSHPIPA	1,068
3.	20	26	SHPIPAE	1,045
4.	21	27	HPIPAED	1,024
5.	22	28	PIPAEDP	1,018
6.	23	29	IPAEDPA	1,018
7.	24	30	PAEDPAK	0,979
8.	25	31	AEDPAKQ	1,029
9.	26	32	EDPAKQC	1,018
10.	27	33	DPAKQCN	1,073
11.	28	34	PAKQCNL	1,066
12.	29	35	AKQCMLS	1,066
13.	30	36	KQCMLS	1,035
14.	31	37	QCMLSED	1,026
15.	32	38	CMLSEDD	1,005
16.	33	39	NLSEDDL	0,982
17.	34	30	LSEDDL	1,001
18.	35	41	SEDDLTK	0,955
19.	36	42	EDDLTKL	0,989

Karakter fisikokimia peptida Nterm-34 kDa

Hasil uji fisikokimia menunjukkan karakteristik fisikokimia peptida Nterm -34 kDa yang diuji meliputi *molecular weight* yaitu 2092,26 Da,

instability index dengan skor 65,62, dan *GRAVY score* sebesar -1,000. Hasil tersebut menunjukkan peptida tersebut bersifat tidak stabil dan hidrofilik (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil prediksi sifat fisikokimia

Nama	No	Start	End	Molecular weight (Da)	Instability Index		GRAVY score	
					Score	Interpretasi	Score	Interpretasi
Nterm-34 kDa	1	21	39	2092,26 Da	65,62	Tidak stabil	-1,000	Hidrofilik

PEMBAHASAN

Hasil uji spesifitas menggunakan BLAST Vectorbase dan BLAST NCBI menunjukkan peptida Nterm-34 kDa spesifik untuk spesies *Aedes aegypti*. Hasil uji penyejajaran (*multiple alignment*) juga mendukung hasil tersebut, bahkan peptide ini spesifik hanya terdapat pada protein saliva 34 kDa *Aedes aegypti* dengan *accession number* ABF18170.1. Hasil uji spesifitas ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Ndille *et al* menggunakan metode bioinformatika berhasil mengidentifikasi peptida Nterm-34 kDa sebagai peptida yang sangat spesifik pada tingkat spesies dan berpotensi sebagai antigen biomarker gigitan nyamuk *Aedes aegypti*.⁸

Spesifitas peptida Nterm-34 kDa penting diuji untuk memastikan tidak ada risiko terjadinya *cross reactivity* dengan spesies serangga dan nyamuk lain pada sekuens antigen yang akan digunakan sebagai biomarker karena dapat menimbulkan risiko biomarker menjadi tidak spesifik dalam mendeteksi gigitan nyamuk *Aedes aegypti*.⁵ Spesifitas antigen terhadap antibodi sangat bergantung pada susunan asam amino penyusun antigen dan risiko terjadinya *cross reactivity* meningkat apabila sekuens protein memiliki kemiripan sekuens yang tinggi. Risiko terjadinya *cross reactivity* sangat tinggi apabila sekuens antigen yang diuji memiliki kemiripan lebih dari 70%.^{10,11}

Hasil prediksi epitop linier menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa merupakan daerah epitope. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa merupakan salah satu area epitop yang dikenali oleh sel B.¹⁰ Identifikasi epitop antigen sangat penting sebagai dasar pengembangan terapi antibodi, vaksin yang berdasar pada peptida, dan alat imunodiagnostik, dan pengembangan terbaru pada bidang bioinformatika telah memungkinkan

prediksi epitop ini dilakukan secara *in silico*. Penggunaan metode *in silico* dalam memprediksi epitop sudah banyak dilakukan sebelumnya. Dama *et al.*, menggunakan program NETSurfP, ABCpred, Bcepred, dan BCIPEP untuk mengidentifikasi epitop kandidat protein yang dapat digunakan sebagai biomarker paparan lalat tsetse pada manusia di Afrika barat.¹² Penelitian lain yang dilakukan oleh Li *et al.*, (2014) menggunakan program DNASTar *protean system*, BPAP, dan server BepiPred 1.0 berhasil mengidentifikasi epitop antigen pada *Dermatophagoides farinae* yang kemudian digunakan untuk melakukan perancangan imunoterapi alergen guna mengurangi reaksi alergi pada tungau.¹³ Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan pentingnya memprediksi epitop dalam pengembangan suatu biomarker.

Peptida Nterm-34 kDa bersifat antigenik berdasarkan hasil uji antigenisitas. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ndille *et al.*, yang melakukan prediksi antigenitas peptida Nterm-34 kDa menggunakan BcePred dan *database* FIMM yang menunjukkan bahwa peptida ini bersifat antigenik.⁸ Sifat antigenik berarti peptida Nterm-34 kDa mampu memicu respon sistem imun manusia dengan memproduksi antibodi yang spesifik. Validasi terhadap peptida Nterm-34 kDa protein saliva sebagai biomarker paparan gigitan nyamuk *Aedes aegypti* telah dilakukan di berbagai negara, diantaranya di Laos¹⁴, Thailand⁸, Bolivia, dan Kepulauan Reunion, Perancis¹⁵.

Penelitian yang dilakukan oleh Ndille *et al.*, menunjukkan hubungan yang positif antara respon antibodi IgG spesifik terhadap Nterm-34 kDa dengan musim hujan. Respon antibodi IgG terhadap peptida Nterm-34 kDa protein saliva meningkat secara signifikan pada musim hujan (pada saat paparan nyamuk *Aedes aegypti* tinggi) dibandingkan pada musim kemarau (pada saat paparan nyamuk *Aedes aegypti* rendah).¹⁴ Hasil penelitian ini menunjukkan

bahwa antibodi IgG terhadap peptida Nterm-34 kDa dapat berperan sebagai biomarker yang akurat untuk mendeteksi perbedaan, heterogenitas, dan perubahan paparan gigitan nyamuk *A. aegypti* pada manusia serta untuk mengevaluasi risiko transmisi arbovirus, termasuk virus Dengue.

Hasi uji ini mendapatkan berat molekul peptida Nterm 34 kDa protein saliva nyamuk *Aedes aegypti* sebesar 2,092 kDa. Secara umum, molekul yang memiliki berat molekul kurang dari 10 kDa hanya bersifat imunogenik lemah atau tidak imunogenik. Sedangkan molekul besar yang mempunyai berat molekul lebih dari 100 kDa merupakan imunogen yang kuat.⁹ Penelitian sebelumnya menunjukkan penggunaan *linker* dapat menghasilkan berat molekul di atas 10 kDa dan dapat meningkatkan sensitivitas pada uji ELISA.¹⁶ Penggunaan multi epitop yang dihubungkan dengan menggunakan *linker* yang fleksibel dapat menghasilkan ekspresi dengan dengan densitas tinggi sehingga dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifitas biomarker diagnostik.¹⁶

Karakteristik fisikokimia lain yang diuji adalah *instability index* peptida Nterm-34 kDa. Hasil uji menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa diprediksi bersifat tidak stabil. Stabilitas merupakan karakter yang penting dari antigen untuk menimbulkan respon imun.¹⁷ Protein yang terlalu stabil akan kehilangan kapasitasnya untuk menginduksi sel T CD4+ dan/atau antibodi karena penyajian yang tidak efisien, demikian pula sebaliknya, protein memiliki stabilitas yang rendah akan membuat protein kurang imunogenik karena pembentukan struktur tersier menyebabkan hilangnya epitop sel B.¹⁸

Karakteristik fisikokimia terakhir yang diuji adalah sifat *hydropathicity* yang digambarkan melalui *GRAVY score*. Hasil uji menunjukkan peptida Nterm-34 kDa diprediksi bersifat hidrofilik. Daerah hidrofilik sebagian besar akan terekspos di permukaan protein dan mempunyai peran penting dalam mengaktifkan respon imun. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan molekul yang terdapat pada permukaan dapat mudah dikenali oleh sistem imun manusia.⁹ Oleh karena itu, peptida Nterm-34 kDa akan mudah dikenali oleh antibodi spesifik yang diproduksi akibat paparan gigitan nyamuk *Aedes aegypti*, sehingga

terbentuk ikatan antigen-antibodi yang dapat dideteksi. Keberadaan antibodi spesifik terhadap peptida Nterm-34 kDa tersebut menunjukkan adanya paparan gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan risiko terjadi transmisi virus Dengue. Berdasarkan karakteristik hasil uji *in silico* ini, peptida Nterm-34 kDa mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai kandidat antigen untuk biomarker risiko transmisi virus Dengue dan bisa digunakan untuk mengevaluasi keberhasilan pengendalian vektor *Aedes aegypti*.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peptida Nterm-34 kDa protein saliva nyamuk *Aedes aegypti* spesifik pada tingkat spesies, merupakan epitop, bersifat antigenik serta memiliki karakteristik fisikokimia yang berpotensi digunakan sebagai antigen biomarker risiko transmisi virus Dengue. Penelitian karakterisasi peptida Nterm-34 kDa protein saliva nyamuk *Aedes aegypti* ini perlu divalidasi dengan penelitian lebih lanjut secara *in vitro* dan *in vivo* terutama dengan strain nyamuk *Aedes aegypti* yang ada di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brady, O. J., P. W. Gething, S. Bhatt, J. P. Messina, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, *et al.* Refining the global spatial limits of Dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(8): 1-15.
2. Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504–507.
3. Kenea, O., M. Balkew, H. Tekie, T. Gebre-Michael, W. Deressa, E. Loha, *et al.* Comparison of Two Adult Mosquito Sampling Methods with Human Landing Catches in South-Central Ethiopia. *Malaria Journal*. 2017; 16(1): 1–15.
4. Garjito, T. A., L. Susanti, Mujiyono, M. T. Prihatin, D. Susilo, S. S. Nugroho, Mujiyanto, R. A. Wigati, *et al.* Assessment of Mosquito Collection Methods for Dengue Surveillance. *Frontiers in Medicine*. 2021; 8(6859926): 1-8.

5. Sagna, A. B., M. C. Yobo, E. E. Ndille, F. Remoue. New immuno-epidemiological biomarker of human exposure to *Aedes* vector bites: From concept to applications †. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2018; 3(3): 1-14
6. Montero, S. B., Gabrieli, P., Montarsi, F., Borean, A., Capelli, S., de Silvestro, G., Forneris, F., Pombi, *et al.* IgG nntibody responses to the *Aedes albopictus* 34k2 salivary protein as novel candidate marker of human exposure to the tiger mosquito. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020; 10(July): 1–12
7. Yobo, C. M., C. A. M. Sadia-Kacou, M. A. Adja, E. Elanga-Ndille, A. B. Sagna, N. Guindo-Coulibaly, A. *et al.* Evaluation of Human Exposure to *Aedes* Bites in Rubber and Palm Cultivations Using an Immunoepidemiological Biomarker. *BioMed Research International*: 2018; 1-9.
8. Ndille, E. E., S. Decoure, G. Damien, F. Mouchet, P. M. Drame, S. Cornелиe, H. Noukpo, *et al.* First Attempt to Validate Human IgG Antibody Response to Nterm-34 kDa Salivary Peptide as Biomarker for Evaluating Exposure to *Aedes aegypti* Bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(11): 1-7.
9. Fustec, B., T. Phanitchat, S. Aromseree, C. Pientong, K. Thaewngiew, T. Ekalaksananan, *et al.* Serological biomarker for assessing human exposure to *Aedes* mosquito bites during a randomized vector control intervention trial in northeastern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2021; 15(5): 1-22.
10. Issaq, H. J., dan T. D. Veenstra. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. 2nd Ed. San Diego. Elsevier. 2020.
11. Bublin, M., H. Breiteneder. Cross-reactivities of Non-Homologous Allergens. *Allergy*. 2019; 75: 1019-1022.
12. Dama, E., S. Cornелиe, M. Camara, M. B. Somda, A. Poinignon, H. Ilboudo, *et al.* In Silico Identification of a Candidate Synthetic Peptide (Tsgf118-43) to Monitor Human Exposure to Tsetse Flies in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7(9): 1-8..
13. Li, X., H. W. Yang, H. Chen, J. Wu, Y. Liu, J. F. Wei. In Silico Prediction of T and B Cell Epitopes of Der f 25 in *Dermatophagoides Farinae*. *International Journal of Genomics*. 2014; (483905): 1-10.
14. Ndille, E. E., S. Doucoure, A. Poinignon, F. O. Mouchet, S. Cornелиe, E. D’ortenzio, J. S. B. Dehecq, F. Remoue. Human IgG antibody response to *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide as an indicator to identify areas at high risk for dengue transmission: A retrospective study in urban settings of Vientiane city, Lao PDR. *Tropical Medicine and International Health*. 2014; 19(5), 576–580.
15. Doucoure, S., S. Cornелиe, S. Patramool, F. Mouchet, E. Demette, M. Seveno, J. S. Dehecq, *et al.* 2013; First Screening of *Aedes Albopictus* Immunogenic Salivary Proteins. *Insect Molecular Biology* 22(4): 411–23 Bublin, M., dan H. Breiteneder. 2019. Cross-reactivities of Non-Homologous Allergens. *Allergy*. 75: 1019-1022
16. Hajissa, K., R. Zakaria, R. Suppian, Z. Mohamed. Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of toxoplasma gondii infection in humans. *Parasites and Vectors*. 2015; 8(1):1–5
17. Scheiblhofer, S., J. Laimer, Y. Machado, R. Weiss, J. Thalhamer, Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. *Expert Review of Vaccines*. 2017; 16(5): 479–489
18. MacHado, Y., R. Freier, S. Scheiblhofer, T. Thalhamer, M. Mayr, P. Briza, S. Grutsch, *et al.* Fold stability during endolysosomal acidification is a key factor for allergenicity and immunogenicity of the major birch pollen allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137(5): 1525–1534