

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN HEMAGLUTININ (HA)
DAN NEURAMINIDASE (NA) ISOLAT VIRUS
AVIAN INFLUENZA (AI) DARI BEBERAPA
DAERAH DI JAWA TIMUR**



MAMIK WAHYU AFRIYANTI
NIM 060112918

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**KARAKTERISASI PROTEIN HEMAGLUTININ (HA) DAN
NEURAMINIDASE (NA) ISOLAT VIRUS *AVIAN
INFLUENZA (AI)* DARI BEBERAPA
DAERAH DI JAWA TIMUR**

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

MAMIK WAHYU AFRIYANTI
060112918

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

(Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh)

Pembimbing Pertama

(Maslichah Mafruchati, M.Si., drh)

Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**Karakterisasi Protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) Isolat
Virus *Avian Influenza* (AI) dari Beberapa Daerah di Jawa Timur**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 18 Maret 2008

Mamik Wahyu Afriyanti
NIM. 060112918

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 27 Maret 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

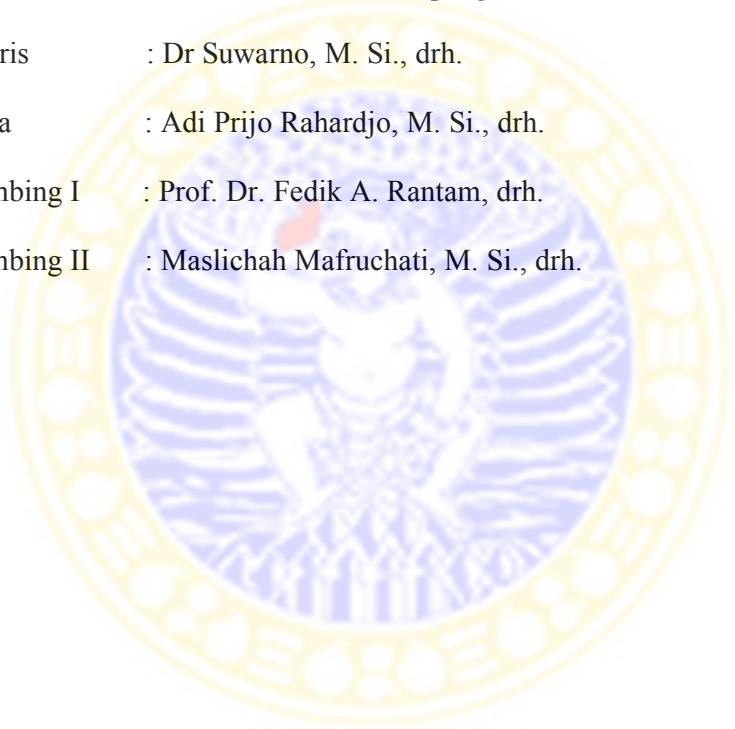
Ketua : Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.

Sekretaris : Dr Suwarno, M. Si., drh.

Anggota : Adi Prijo Rahardjo, M. Si., drh.

Pembimbing I : Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.

Pembimbing II : Maslichah Mafruchati, M. Si., drh.



Telah diuji pada

Tanggal :23 April 2008

KOMISI PENGUJI SJRIPSI

Ketua : Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh.

Anggota : Dr Suwarno, M. Si., drh.

Adi Prijo Rahardjo, M. Si., drh.

Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.

Maslichah Mafruchati, M. Si., drh.

Surabaya, 15 September 2008

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 130 687 305

**CHARACTERIZATION OF HAEMAGLUTININ (HA) AND
NEURAMINIDASE (NA) OF AVIAN INFLUENZA (AI)
VIRUS ISOLATED FROM MANY PLACES
AT EAST JAVA**

Mamik Wahyu Afriyanti

ABSTRACT

This research due to investigate protein molecular weight (mw) of Hemagglutinin (HA) Neuraminidase (NA) of Avian Influenza virus from many places at East Java. The samples of Avian Influenza virus were isolated from Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang, and Surabaya. The first step, the samples were identified by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). The second step, the samples were analyzed by western blot which was detected about protein reactivity toward AI polyklonal antibody. The result of the research showed that molecular weight of HA of the samples were 62,4 kDa and NA were 56,1 kDa. That proteins were antigenic proteins because it's showed reactivity when were reacted with AI poliklonal antibody.

Keywords : Avian Influenza, SDS-PAGE, western blot

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya atas terwujudnya skripsi ini.

Dengan rasa hormat penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya:

1. Ibu Prof. Hj, Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, beserta staf pimpinan atas kesempatan yang telah diberikan.
2. Bapak Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh selaku pembimbing pertama dan Ibu Maslichah Mafruchati, M.S., drh selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Adi Prijo R., M.Si, drh atas dukungan dan bantuan selama penelitian berlangsung.
4. Kedua orang tua penulis Bapak Matisno dan Ibu Sih Masniati tercinta serta mas Zen, mbak Ana dan adikku Akhsin dan Naim. Yang telah banyak memberi dorongan moril, materi dan doa dalam penulisan ini.
5. Mas Gatot Suseno tercinta yang selalu memberi perhatian serta bapak ibu mertua dan adik iparku Sigit yang banyak membantu anakku Erlina dan Aisyah tercinta yang selalu memberi inspirasi dalam penulisan skripsi ini.

6. Sahabatku Dian Ayu dan bang Dedi Dwi Wibowo ST yang selalu memberi semangat dukungan dan masukan kepada penulis.
7. Seluruh teman angkatan 2001 dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penyempurnaan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik guna penyempurnaan tulisan ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pengembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Maret 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Landasan Teori.....	5
1.4. Tujuan Penelitian.....	7
1.5. Manfaat Penelitian.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Tinjauan Tentang Avian Influenza.....	8
2.1.1. Etiologi dan Morfologi Penyakit Avian Influenza.....	8
2.1.2. Sifat Virus AI.....	10
2.1.3. Variasi Antigenik Virus AI.....	11
2.1.4. Patogenesis Penyakit AI.....	13
2.1.5. Patogenitas Penyakit AI.....	13
2.1.6. Sumber dan Cara Penularan Penyakit AI.....	14
2.1.7. Gejala Klinik dan Perubahan Patologi Penyakit AI.....	15
2.1.8. Diagnosa dan Diagnosa Banding Penyakit AI....	16
2.1.9. Pengendalian dan Pencegahan Penyakit AI.....	17
2.1.10. Protein Hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) Virus AI.....	18
2.2. Tinjauan Tentang SDS-PAGE.....	19
2.3. Tinjauan Tentang <i>Western Blotting</i>	20
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	21
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.2. Materi Penelitian.....	21
III.2.1. Bahan Penelitian.....	21
III.2.2. Alat Penelitian.....	22
3.3. Metode Penelitian.....	22
3.3.1. Sampel Virus.....	22

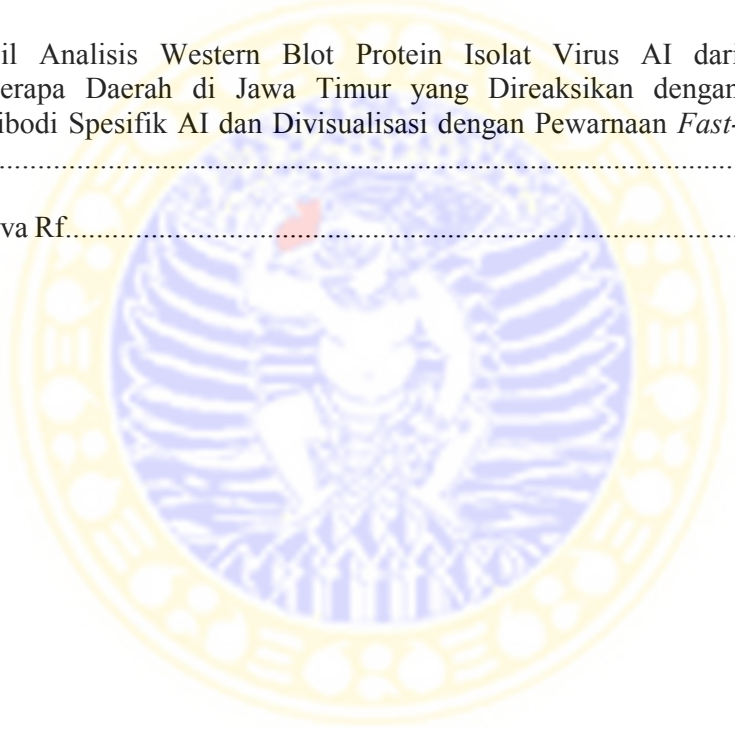
3.3.2. Analisis Protein HA dan NA Virus AI dengan SDS PAGE 12,5 %.....	22
3.3.3. Analisis Protein HA dan NA Virus AI dengan <i>Western Blot</i>	25
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	27
4.1. Hasil Analisis Protein Virus AI dengan SDS-PAGE 12,5%.....	27
4.2. Hasil Analisis Reaktivitas Virus AI dengan <i>Western Blot</i>	30
BAB 5 PEMBAHASAN.....	32
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1. Kesimpulan.....	38
6.2. Saran.....	38
RINGKASAN.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. <i>Retardation factor (Rf) Marker</i>	44
2. <i>Case Summary</i>	45
3. Anova.....	45
4. <i>Coefficients</i>	45
5. Berat Molekul Protein Virus AI dari Daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang.....	45
6. Berat Molekul Protein Virus AI dari Daerah Mojokerto dan Surabaya.....	47

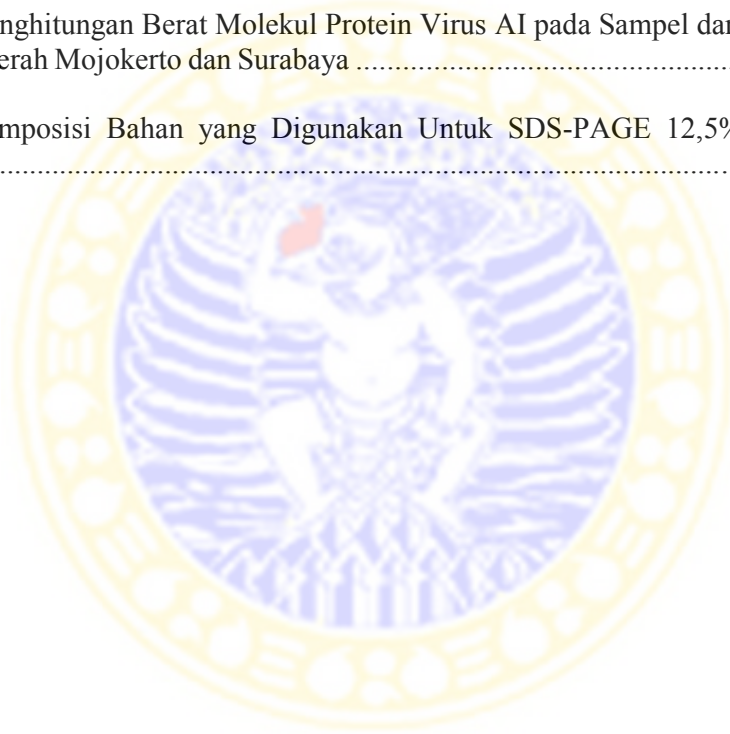
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Virus Avian Influenza.....	8
2. Hasil Analisis SDS-PAGE 12,5% Protein Isolat Virus AI dari Beberapa Daerah di Jawa Timur yang Divisualisasikan dengan Pewarnaan <i>Commassie Brilliant Blue</i>	29
3. Hasil Analisis Western Blot Protein Isolat Virus AI dari Beberapa Daerah di Jawa Timur yang Direaksikan dengan Antibodi Spesifik AI dan Divisualisasi dengan Pewarnaan <i>Fast-Red</i>	31
4. Kurva Rf.....	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Regresi	44
2. Penghitungan Berat Molekul Protein Virus AI pada Sampel dari Daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang	46
3. Penghitungan Berat Molekul Protein Virus AI pada Sampel dari Daerah Mojokerto dan Surabaya	47
4. Komposisi Bahan yang Digunakan Untuk SDS-PAGE 12,5%	48



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah.

Unggas merupakan salah satu sumber protein hewani yang mengandung gizi baik, murah dan mudah didapat serta sangat digemari masyarakat. Baik daging maupun telurnya selama ini menjadi konsumsi sehari-hari bagi berbagai lapisan masyarakat (Estoepestie, 2005).

Perkembangan industri perunggasan di Indonesia tampak sudah maju demikian pesat, namun senantiasa dihadapkan pada berbagai kendala yang ikut berkembang dan kompleks. Penyakit ayam, merupakan kendala utama pada peternakan ayam intensif di lingkungan tropis seperti di Indonesia. Kerugian yang ditimbulkan penyakit ayam dapat berbentuk kematian, pertumbuhan terhambat, produksi telur terhambat atau berhenti sama sekali, selain itu ayam yang pernah terserang penyakit dapat menjadi sumber penyakit (Murtidjo, 1992).

Masyarakat kini ramai membicarakan flu burung yang telah nyata-nyata menyerang unggas di Indonesia (Aditama, 2004). Pertengahan tahun 2003 Avian Influenza mewabah di sentra peternakan layer di Jawa dengan ciri kematian tinggi yang tidak dapat dibendung dengan vaksin ND dan antibiotik (Kiswandi, 2004). Sebelumnya di Indonesia diidentifikasi pada burung nuri pada 1982 juga pada pelikan dan itik di berbagai daerah Indonesia namun tidak virulen, semuanya tergolong LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*) dengan subtype H4N2 dan H4N6 dan tidak menyebabkan penyakit pada ayam hingga sampai terjadi wabah

pada Agustus 2003- awal 2004 Indonesia masih dinyatakan bebas HPAI (Rahardjo, 2004). Virus avian influenza (AI) atau dikenal dengan sebutan Flu Burung merupakan penyakit zoonosis yang dapat menular dari hewan (unggas) ke manusia atau sebaliknya. Penyakit ini mulai masuk Indonesia pada pertengahan tahun 2003 dan sampai saat ini banyak menimbulkan korban, baik pada unggas maupun manusia (Rantam, dkk, 2003). Pada tanggal 29 Januari 2004 pemerintah menetapkan bahwa Indonesia terjangkit wabah penyakit Avian Influenza subtype H5N1 (Moerad, 2004).

Penyebaran penyakit ini makin meluas, pada awal tahun 2004 terjadi wabah di 8 propinsi, akhir tahun 2005 telah merambah 25 propinsi sedang pada saat ini telah menyebar pada 31 propinsi. Dampak penyakit berupa kerugian ekonomi juga sangat tinggi khususnya pada industri perunggasan. Kasus pada manusia pertama kali terjadi pada bulan Juni 2005 dan berdasarkan data terakhir tercatat korban manusia mencapai 81 orang dari 102 kasus (Tjiptardjo, 2007). Angka kematian pasien penderita flu burung sudah sampai tahap mengkhawatirkan. Data yang diperoleh Departemen Kesehatan dari 132 kasus yang disebabkan virus H5N1 107 kasus diantaranya meninggal dunia atau jika dihitung mencapai 80 - 81 % (Sinambea, 2008).

Avian Influenza merupakan penyakit yang tergolong daftar A OIE (Organization International des Epizooties) dimana penyakit daftar A merupakan penyakit-penyakit menular hewan yang berpotensi menyebar secara cepat dan serius, tidak memperdulikan batas negara, yang memiliki konsekuensi kesehatan masyarakat dan sosial ekonomi serius dan yang mempunyai nilai penting utama

dalam perdagangan hewan dan produk hewan internasional, serta secara teknis Avian Influenza dapat bermutasi dan menyerang kepada manusia yang kita kenal sebagai flu burung. Subtipe/strain dari virus AI bervariasi, namun demikian subtype yang perlu diwaspadai adalah H5 dan H7 karena subtype inilah yang bersifat patogen dan dapat menular ke manusia (Rahardjo⁶, 2004). Avian Influenza atau yang lebih dikenal dengan istilah Flu Burung adalah penyakit infeksius yang menyerang unggas dengan mortalitas dapat mencapai 100 %. Pada perkembangannya penyakit ini juga menyerang manusia dan menimbulkan korban yang tidak sedikit (Beard, 2003; Rantam dkk., 2005). Pada bulan Mei 1998, di Hongkong ditemukan seorang pasien didiagnosis terserang flu burung. Sampai bulan Desember 1999 sembilan kasus dikonfirmasi sebagai flu burung, empat orang telah meninggal dunia akibat serangan virus tersebut (Soeharsono, 2002).

Avian Influenza yang menyebabkan kematian sangat tinggi pada unggas dilaporkan pertama kali pada tahun 1878 dan dikenal dengan nama *Fowl Plaque*. Pada tahun 1955, para ahli membuktikan bahwa penyebab *Fowl Plaque* adalah virus Avian Influenza A. Pada simposium tentang Avian Influenza tahun 1981, diusulkan agar nama *Fowl Plaque* diganti dengan istilah *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang menyebabkan mortalitas tinggi pada unggas (Tabbu, 2000). Sejak wabah AI meletup di Hong Kong pada tahun 1997, sampai dengan tahun 2004 terdapat 9 negara di Asia Tenggara (Kamboja, China, Indonesia, Jepang, Laos, Malaysia, Korea Selatan, Thailand dan Vietnam) melaporkan adanya *outbreak* pada unggas. Kejadian ini juga dilaporkan pada mamalia, termasuk manusia (WHO, 2005). Spesifikasi virus AI subtype H5N1 yang

mewabah di Asia adalah termasuk virus Influenza tipe A, yang tergolong famili *Orthomyxoviridae*. Terdapat tiga tipe virus Influenza, yaitu tipe A, B dan C. Hanya tipe A yang diketahui dapat menginfeksi unggas dan manusia, sedangkan dua tipe yang lain menginfeksi mamalia dan manusia. Saat ini telah diketahui adanya 16 jenis sub tipe virus AI tipe A berdasarkan antigen hemagglutinin (HI-H16) dan 9 sub tipe berdasar antigen neuraminidase (NI-9), umumnya penyebutan sub tipe ditunjukkan dengan H_xN_y (Fouchier et al., 2005; Tabbu, 2005; Rahardjo_b, 2004).

Virus AI merupakan virus *single stranded-ribonucleid acid* (ss-RNA) dengan diameter 80-120 nm dan panjang 200-300 nm. Virus ini memiliki amplop dengan *lipid bilayer* dan dikelilingi sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemagglutinasi (HA) dan enzim neuraminidase (NA). Genom virus AI memiliki panjang nukleotida sekitar 13.588 bp, yang tersusun atas 8 segmen, yaitu : PB2 (*polymerase basic-2*), PB1 (*polymerase basic-1*), PA (*polymerase acidic*), HA (*haemagglutinin*), NP(*nucleoprotein*), NA (*neuraminidase*), M (*matrix*), NS (*non-struktural*). Masing-masing segmen menyandi satu macam protein sesuai dengan nama gen, kecuali segmen 7 (menyandi protein M-1 dan M-2) dan segmen 8 (menyandi protein NS-1 dan NS-2) (Horimoto and Kawaoka, 2001). Diantara kesepuluh jenis protein tersebut, protein HA, NA dan M2 merupakan protein terpenting di bidang medis. Protein HA dan NA digunakan untuk penentu sub tipe dan protein M2 merupakan target dari obat-obat antiviral. Protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) terdapat pada selubung virus yang berfungsi pada saat pengikatan dan penetrasi

virus ke dalam tubuh. Protein M2 adalah suatu protein transmembran berbentuk saluran ion yang diperlukan untuk proses pelepasan selubung virus pada awal ekspresi gen (Rahardjo^b,2004; WHO, 2005). Sementara itu protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M2 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan penelitian ini adalah :

1. Apakah terdapat perbedaan berat molekul protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus Avian Influenza isolat beberapa daerah di Jawa Timur?
2. Apakah protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus Avian Influenza isolat beberapa daerah di Jawa Timur merupakan protein antigenik?

1.3 Landasan Teori

Penyakit flu burung disebabkan oleh virus Avian Influenza (AI). Virus ini termasuk virus Influenza A yang merupakan famili *Orthomyxoviridae*. Dengan elektron mikroskop virus Avian Influenza mempunyai delapan segmen yang terdiri dari rangkaian RNA. Kedelapan segmen ini terdiri dari gen Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matriks (M), Polimerase A

(PA), Polimerase B1 (PB1), dan Polimerase B2 (PB2) Nonstruktural (NS). Glikoprotein HA dan NA merupakan protein permukaan yang sangat berperan dalam penempelan dan pelepasan virus dari sel inang. Protein HA merupakan bagian terbesar dari spike yaitu 80% dan NA sebesar 20% (Rahardjo_b, 2004). Antigen HA virus influenza A dapat mengaglutinasi eritrosit, sedangkan NA melepaskan ikatan antara HA dengan permukaan eritrosit sehingga ikatan antara virus dengan eritrosit bersifat sementara (Ernawati dkk, 1996). Protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) terdapat pada selubung virus yang berfungsi pada saat pengikatan dan penetrasi virus ke dalam tubuh. Glikoprotein HA berbentuk seperti paku (*spike*) pada permukaan virus yang memerantari perlekatan antara reseptor sialosid pada sel inang dan juga berperan sebagai membran fusi. Protein NA berbentuk seperti tombol yang terletak pada permukaan virus dan mengkatalisasi pelepasan virus dari sel terinfeksi, yang selanjutnya berfungsi untuk penyebaran virus (WHO, 2005).

Protein HA dan NA digunakan untuk penentu sub tipe dan protein M2 merupakan target dari obat-obat antiviral. Protein HA dan NA merupakan target awal dalam pembentukan antibodi inang. Pada awal infeksi protein ini akan berikatan dengan reseptor sel inang dan melepaskan ribonukleoprotein. Akibat aktivasi precursor HA (HA0) oleh protease inang, protein HA akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respon imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membran endosomal inang (Suzuki *ands* Nei, 2002; Rahardjo_b, 2004).

Menurut Madrow dan Folke (1997), berat molekul Hemagglutinin (HA) adalah 77 kDa, Neuraminidase (NA) adalah 56 kDa, Matriks (M) 28 kDa, Nukleoprotein (NP) 55 kDa, Polimerase A (PA) 83 kDa, Polimerase B (PB) 90 kDa, Nonstruktural 1 (NS1) 26 kDa, Nonstruktural 2 (NS2) adalah 11 kDa. Untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul sering digunakan metode elektroforesis, salah satu metode elektroforesis adalah SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphat Poly Acrylamid Gel Electrophoresis*) (Rantam, 2003).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui berat molekul protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus Avian Influenza isolat beberapa daerah di Jawa Timur.
2. Mengetahui sifat antigenisitas protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) virus Avian Influenza isolat beberapa daerah di Jawa Timur.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang karakteristik protein virus Avian Influenza dari beberapa daerah di Jawa Timur sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk memproduksi vaksin subunit.

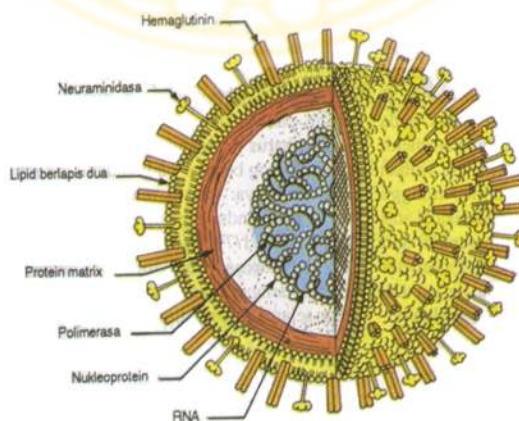
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Avian Influenza

2.1.1 Etiologi dan morfologi penyakit Avian Influenza

Avian Influenza disebabkan oleh virus Influenza yang tergolong famili *Orthomyxoviridae*, yang merupakan virus RNA dan mempunyai aktivitas hemaglutinin dan neuraminidase (Tabbu, 2000). Anggota *Orthomyxoviridae* mempunyai virion dengan kapsid yang memperlihatkan suatu simetri helikal dan berselubung. Virion mempunyai diameter berkisar antara 80-100 nm dan mengandung RNA berserat tunggal yang terdapat dalam gulungan benang nukleokapsid yang berdiameter 9 nm dengan tanda- tanda silang pada tiap 4 nm (Sardjito dkk, 1994). Virus dapat berbentuk bundar atau lonjong (Ressang, 1986). Menurut Smith (2003), bentuk virus avian influenza adalah pleomorfik, ovoid atau sferik dengan ukuran diameter 80 – 120 nm dan ada beberapa bentuk filament.



Gambar 1. Virus Avian Influenza

Berdasarkan antigenitas nukleoprotein dan matriks protein, virus Influenza dibagi menjadi tiga tipe yaitu tipe A, B, dan C (Soeharsono, 2002). Virus Influenza tipe A dapat menginfeksi unggas termasuk ayam, itik, angsa, kalkun, berbagai jenis burung, seperti burung dara, burung camar, burung elang, manusia, babi, kuda, anjing laut. Virus Influenza tipe B dapat menginfeksi manusia dan virus influenza tipe C dapat menginfeksi manusia dan babi (Rahardjo^a, 2004; Rantam, 2004).

Penyakit flu burung disebabkan oleh virus Avian Influenza yang termasuk virus Influenza tipe A. Virus Influenza tipe A ini dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia, termasuk manusia. Virus AI mempunyai 8 segmen gen yang menyandi 10 macam protein, yaitu Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matriks (M), Polimerase A (PA), Polimerase B1 (PB1), dan Polimerase B2 (PB2), serta Nonstruktural (NS). Protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) terdapat pada selubung virus yang berfungsi pada saat pengikatan dan penetrasi virus ke dalam tubuh. Subtipe virus AI ditentukan oleh kombinasi protein HA dan NA yang berada pada permukaan virus. Sampai sekarang telah diketahui adanya 16 subtipe HA yaitu H1-H16 dan 9 subtipe NA yaitu N1-N9. Pandemi influenza pada manusia yang terjadi pada abad 19 disebabkan oleh virus influenza tipe A, yaitu subtipe H1, H2, H3 dan subtipe N1 dan N2. Pada abad 20 telah diketahui virus influenza yang menyerang manusia adalah dari subtipe H5, H7 dan H9, yang ketiganya dapat ditemukan pada unggas dan sebagai reservoirnya adalah burung laut. Selain burung laut, virus AI dapat

ditularkan oleh unggas air seperti itik, entok, angsa putih dan *web-footed birds* (Fouchier *et al.*, 2005).

2.1.2 Sifat Virus AI

Lapisan lemak ganda pada selubung virus menjadikan virus influenza sensitif terhadap pelarut lemak, misalnya deterjen. Infektivitas ini juga dirusak dengan cepat oleh formalin, beta-propiolakton, agen yang bersifat oksidan, asam encer, eter, Na-desoksikolat, hidroksilamin, Na-dedosisulfat, ion-ion amonium dan senyawa iodium.

Virus ini akan mati jika berada pada temperatur 56°C selama 3 jam atau pada temperatur 60°C selama 30 menit atau lebih. Virus ini akan tetap hidup dalam air dengan suhu 22°C selama 4 hari dan lebih dari 30 hari jika berada pada suhu 0°C . Virus influenza juga akan mati pada kondisi pH yang asam atau berada pada kondisi non isotonik selain itu kondisi lingkungan yang kering dapat menjadikan virus avian influenza menjadi tidak infeksi lagi (Rahardjo, 2004).

Virus influenza masih tetap infeksi dalam feces selama 30-35 hari pada temperatur 4°C dan selama 7 hari pada temperatur 20°C . Virus ini dapat diisolasi setelah unggas air meninggalkan daerah tersebut. Virus influenza dapat bertahan di lingkungan, tetapi mungkin tidak dalam waktu yang lama. Virus influenza tumbuh di dalam TAB umur 9-11 hari. Virus ini juga tumbuh pada kultur jaringan *Chicken Embryo Fibroblast* (CEF) dan uji in vivo dapat dilakukan pada ayam, kalkun dan itik (Tabbu, 2000).

Virus AI bersifat labil, sehingga mudah sekali terjadi perubahan susunan gen pada 8 genomnya. Penggabungan kembali gen HA dan NA menghasilkan antigenik shift. Mutasi itu menyebabkan terjadinya hanyutan antigen atau antigenik drift. Kedua proses tersebut terjadi secara alami dan menghasilkan keberagaman strain dari virus AI yang diduga bertanggung jawab atas timbulnya epidemi (Fenner *et al.*, 1995).

2.1.3 Variasi Antigenik Virus AI

Virus AI dikenal sebagai virus yang mudah mengalami mutasi, yaitu perubahan yang menyangkut nukleotida atau asam amino di dalam gen. Pengaruh perjalanan waktu dan perbedaan inang telah menyebabkan perubahan tersebut terjadi. Sebagai contoh, subtipe H5N1 yang menginfeksi manusia di Hong Kong pada 1997 mengandung 8 segmen gen virus AI yang berasal dari unggas di Eurasia. Meskipun virus ini berhasil dimusnahkan dengan jalan membakar semua unggas yang ada di Hong Kong, tetapi gen HA muncul sebagai donor pada H5N1 angsa di China Tenggara. Munculnya genotipe baru ini sangat mematikan pada ayam tetapi tidak pada itik. Selama 5 tahun berikutnya tidak ada variasi genetik dan baru pada akhir 2002 terjadi mutasi. Tampaknya mutasi H5N1 ini menjadi cikal bakal flu burung di Asia, terbukti menimbulkan kematian pada ayam dan korban jiwa manusia (Lipatov *et al.*, 2004). Variasi antigenik pada virus influenza dapat ditemukan dengan frekuensi yang tinggi dan terjadi melalui dua cara, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift* (Tabbu, 2000).

Peristiwa mutasi pada virus AI sering terjadi karena *enzym polymerase* RNA yang berperan dalam replikasi genom virus tidak memiliki mekanisme *proof reading*. Pada virus AI, mutasi titik terjadi pada *antigenic sites* yang dikenali oleh antibodi netralisasi, berakibat pada *antigenic drift*. *Antigenic drift* merupakan mekanisme mutasi virus secara perlahan akibat mutasi titik. Tekanan imunologis pada HA dan NA akan mengakibatkan *antigenic drift* ini, dan hal ini tidak hanya terjadi pada manusia tetapi juga pada unggas. Melalui mutasi titik virus dapat melakukan *antigenic drift* untuk menghindarkan diri dari proses netralisasi oleh antibodi yang diinduksi oleh antigen virus sebelumnya (Rantam, 2006). *Antigenic shift* merupakan suatu mekanisme yang menyebabkan perubahan struktur virus secara drastic yang diakibatkan oleh *genetic reassortment*. Genom virus AI yang berupa ss-RNA bersegmen ini memberi peluang besar terjadinya pertukaran informasi genetik diantara virus influenza A apabila dua atau lebih strain virus menginfeksi satu sel secara bersama-sama. Proses ini dapat terjadi pada gen HA, NA maupun gen internal yang berakibat pada meningkatnya diversitas virus, baik dalam sifat antigenic maupun virulensinya. Proses *genetic reassortment* ini pula yang diduga menyebabkan virus mampu menembus spesies barrier (Lin *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 2000; Rantam, 2005). Virus Influenza memiliki angka mutasi (*mutation-rate*) 10.000 sampai 100.000 kali dibanding dengan virus yang lain (Rahardjo_a, 2004).

2.1.4 Patogenesis Penyakit AI

Proses infeksi tahap pertama terjadi secara inhalasi (menghirup) atau ingesti (memakan) virus AI (Anonimus, 2004). Tahap kedua, virion masuk ke sub mukosa melalui kapiler. Virus mengalami replikasi dalam sel endotel dan menyebar melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik untuk menginfeksi dan replikasi dalam bermacam-macam tipe sel organ visceral, otak dan kulit, gejala klinik dan kematian disebabkan karena kegagalan multiplikasi organ. Tahap ketiga dari patogenesis penyakit AI yaitu replikasi virus biasanya terbatas pada saluran pernafasan atau pencernaan. Kesakitan dan kematian terjadi akibat kerusakan pada saluran pernafasan khususnya jika terjadi komplikasi dengan infeksi sekunder oleh bakteri. Kadang-kadang virus AI menyebar secara sistemik, memperbanyak diri dan menimbulkan kerusakan pada ginjal dan sel-sel organ yang lain (Anonimus, 2004).

2.1.5 Patogenitas Penyakit AI

Patogenitas virus AI dikategorikan berdasarkan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit yang ringan atau ganas pada ayam dan unggas air. Secara umum, virus ini dibedakan menjadi dua yaitu LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*) dan HPAI (*High Pathogenic Avian Influenza*) (Anonimus_a, 2004).

Virus golongan LPAI biasanya berkembang biak pada saluran pernafasan dan pada saluran pencernaan ayam. Ayam yang terinfeksi virus ini dapat sembuh dalam waktu 1 minggu dengan gejala pernafasan ringan akan tetapi masih dapat menularkan virus melalui fecesnya. LPAI perlu diwaspadai karena dapat

mengalami mutasi menjadi virus HPAI (Anonimus_d, 2001). Virus golongan HPAI juga berkembang biak pada saluran pernafasan dan saluran pencernaan ayam, selain itu virus golongan HPAI ini juga menyerang dan merusak hampir seluruh organ tubuh, termasuk sistem saraf pusat dan peredaran darah inang (Anonimus_a, 2004).

2.1.6 Sumber dan Cara Penularan Penyakit AI

Virus Influenza A dikeluarkan melalui hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka unggas yang terinfeksi. Virus Influenza A bereplikasi pada saluran pencernaan, selain itu AI juga dapat berkembang biak dengan baik pada saluran pernafasan, ginjal dan atau sistem reproduksi dan bahkan dapat mencapai ke sistem saraf pusat (Anonimus_a, 2004). Unggas (ayam, burung, dan itik) merupakan sumber penular virus Influenza (Soeharsono, 2002).

Penularan flu burung (H5N1) pada unggas terjadi secara cepat dengan kematian tinggi. Penyebaran penyakit ini terjadi diantara populasi unggas satu peternakan, bahkan dapat menyebar dari satu peternakan ke peternakan daerah lain. Sedangkan penularan penyakit kepada manusia dapat melalui udara yang tercemar virus tersebut, baik yang berasal dari tinja atau sekreta unggas yang terserang flu burung. Belum ada bukti terjadi penularan dari manusia melalui daging unggas yang dikonsumsi (Santoso, 2005).

2.1.7 Gejala Klinik dan Perubahan Patologi Penyakit AI

Masa inkubasi berkisar antara beberapa jam sampai 3 hari. Gejala penyakit sangat bervariasi dan tergantung pada spesies unggas yang terinfeksi, galur virus dan faktor lingkungan. Gejala yang terlihat dapat berbentuk gangguan pada saluran pernafasan, pencernaan, reproduksi atau sistem syaraf. Avian Influenza dapat ditemukan dalam 2 bentuk, yaitu bentuk akut (bentuk HPAI) dan bentuk ringan. Bentuk akut (bentuk HPAI) ditandai oleh adanya proses penyakit yang cepat disertai mortalitas yang tinggi, gangguan produksi telur (berhenti atau menurun secara drastis), gangguan pernafasan (batuk, bersin, ngorok), lakrimasi yang berlebihan, sinusitis, edema di daerah kepala dan muka, perdarahan jaringan subkutan yang diikuti oleh sianosis pada kulit, terutama daerah kaki, kepala dan pial; diare dan gangguan syaraf (Tabbu, 2000). Virus yang kurang virulen dapat menyebabkan penurunan berat badan terutama pada itik, karena anoreksia, penurunan produksi telur, gangguan pernafasan dan sinusitis. Gejala klinis pada ayam dan itik ini dapat diperburuk bila terjadi infeksi bersama-sama (misalnya *Newcastle disease*, penyakit bakteri dan infeksi mikoplasma), penggunaan vaksin aktif atau stress lingkungan (misalnya kurangnya ventilasi dan kepadatan kandang) (Fenner *et al.*, 1995).

Perubahan patologi pada bentuk ringan terjadi radang nekrotik proventrikulus. Daerah pankreas kerap berwarna merah tua dan kuning muda. Pada sinus mungkin ada salah satu atau campuran eksudat kataralis, fibrinus, serofibrinus, mukopurulent atau kaseus. Trakea mungkin edema disertai pembentukan eksudat bervariasi dari serus sampai kaseus, kantong udara mungkin

menebal, mengandung eksudat fibrinus atau kaseus. Pada peritoneum mungkin ditemukan peritonitis fibrinus dan egg peritonitis. Pada sekum dan atau usus mungkin ditemukan enteritis kataralis sampai fibrinus. Pada petelur mungkin ditemukan eksudat dalam oviduk (Rahardjo_b, 2004).

Pada bentuk akut (HPAI) jika unggas mati dalam waktu singkat, biasanya tidak ditemukan adanya perubahan mikroskopik tertentu karena lesi jaringan belum sempat berkembang. Pada sejumlah kasus dapat ditemukan adanya kongesti, hemoragik, transudasi dan nekrosis. Virus Avian Influenza tertentu dapat menimbulkan lesi pada stadium awal, yang meliputi edema pada kepala yang disertai pembengkakan sinus, sianosis, kongesti dan hemoragik pada pial dan balung. Kongesti dan hemoragik mungkin ditemukan juga pada kaki, jika penyakit ini melanjut maka kerap kali akan ditemukan adanya foci nekrotik pada hati, limpa, ginjal dan paru-paru (Tabbu,2000).

2.1.8 Diagnosa dan Diagnosa Banding Penyakit AI

Diagnosa penyakit AI dilakukan dengan melihat tanda klinis dan perubahan pasca mati, selain itu perlu pemeriksaan laboratorium untuk isolasi dan identifikasi virus penyebabnya. Pengambilan sampel pada hewan hidup dari feces, usapan kloaka dan usapan hidung, sedangkan dari hewan mati sampel bisa berasal dari trachea, paru, limpa, ginjal, hati, usus. Dilakukan pada SPF (*Specific Pathogen Free*) TAB (Telur Ayam Berembrio) umur 4-11 hari hingga embrio mati dalam 48-72 jam (Rahardjo_a,2004 ; Rahardjo_b,2004).

Identifikasi virus dan penentuan subtype HA dan NA dengan beberapa cara yaitu AGID yang paling banyak digunakan di AS, ELISA, HI *Antigen Capture Elisa* dan PCR *Genetic Sequencing*. Pemeriksaan serologik untuk mengetahui adanya pembentukan antibodi yang sering dipakai adalah uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) dan Agar Gel Presipitasi (AGP). Uji serologik lain yang sering dipakai adalah netralisasi virus (VN), *Neuramidase Inhibition* (NI), ELISA, antibodi monoklonal, dan hibridisasi in situ, atau juga dengan teknik *Imunofluorescence* langsung (Rahadjo_b, 2004).

Penyakit yang mirip dengan avian influenza adalah *Newcastle Disease* (ND), *Pigeon paramyxovirus*, *Infectious Bronchitis* (IB), *Swollen Head Syndrome* (SHS) dan Avian mikoplasmosis (Tabbu, 2000). *High Pathogenic Avian Influenza* mirip dengan *Vilogenic Viscerotropic Newcastle Disease* karena gejala klinis dan perubahan patologi anatominya sama (Beard, 2004).

2.1.9 Pengendalian dan pencegahan penyakit AI

Pengawasan yang efektif terhadap penyakit Avian Influenza adalah menghindari adanya itik, angsa, kalkun, dan burung peliharaan lainnya dilokasi peternakan ayam, sehingga sumber penyakit Avian Influenza dapat diperkecil kemungkinannya menjadi wabah yang membahayakan (Murtidjo, 1992). Pencegahan utama adalah vaksinasi, tapi belum ada vaksinasi yang khusus untuk penyakit flu burung. Vaksinasi yang biasanya dilakukan, umumnya jenis vaksin yang dibuat di daerah kejadian, sehingga bila ada daerah lain yang terserang dan

memiliki perbedaan antigenik, kemampuan hasil vaksinasi untuk pencegahan penyakit ini kurang efektif (Irawan, 1996).

Hal lain yang juga membantu pencegahan adalah karantina hewan, kontrol dan pengawasan yang efektif. Prosedur diagnosa dan program yang tepat serta biosekuriti yang tepat. Vaksinasi dapat menjadi alat kontrol karena dapat mencegah kematian dan sakit, tetapi tidak mencegah infeksi dan penyebaran virus. Vaksin hidup tidak dianjurkan untuk digunakan dalam kegiatan vaksinasi karena potensial menjadi sangat patogen. Eradikasi dengan cara pemusnahan dan pembinasaaan sebaiknya dilakukan pada saat terjadi *out break*. Pengisian kembali dilakukan paling cepat 21 hari kemudian (Anonimus, 2004).

2.1.10 Protein Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) Virus AI

Virus Influenza A digolongkan menjadi beberapa subtipe atas dasar dua macam protein pada selubungnya, yaitu protein Hemagglutinin (HA) dan protein Neuraminidase (NA). Sampai kini dikenal adanya 16 macam protein HA dan 9 macam protein NA yang berbeda (Rahardjo^a, 2005). Pada bagian luar virus ini terdapat tonjolan-tonjolan yang berkaitan dengan karakter virus. Tonjolan hemagglutinin(HA) menyebabkan virus dapat mengaglutinasi eritrosit (sel darah merah) (Soeharsono, 2002).

Hemagglutinin adalah molekul glikoprotein selubung virus yang berfungsi untuk mengikatkan virus ke reseptor sel target dan mengawali terjadinya infeksi. Sedangkan neuraminidase adalah enzim yang dibutuhkan virus untuk melepas keturunan virus dari sel yang terinfeksi (Anonimus, 2004).

2.2 Tinjauan Tentang SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*)

SDS-PAGE merupakan salah satu metode elektroforesis yang sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul. SDS-PAGE mempunyai beberapa kegunaan antara lain menentukan ukuran protein, identifikasi protein, menentukan kemurnian sampel, mengenali ikatan disulfida, menentukan berat molekul protein dan untuk aplikasi blotting. SDS merupakan suatu detergen anionik yang mengikat banyak protein dan terpisah berdasarkan ukuran. SDS mempunyai bagian yang menarik kuat rantai protein (polipeptida) (Rantam, 2003; Anonimus_b, 2005).

Pada elektroforesis, arus listrik digunakan untuk memindahkan protein molekul melalui *gel polyacrylamid*. *Gel polyacrylamid* merupakan matriks saling-silang yang berfungsi menangkap molekul yang diangkut oleh arus listrik. Pori-pori pada matriks dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrylamid* dengan *bisacrylamid*. Molekul protein yang lebih kecil mampu melewati pori-pori gel lebih cepat daripada molekul protein yang lebih besar (Rantam,2003; Anonimus_b, 2005).

Ada dua sistem pada SDS, salah satunya adalah sistem diskontinyu (laemmlli) dimana pada sistem ini protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau band yang tipis (Rantam, 2003).

2.3 Tinjauan Tentang *Western Blotting*

Analisis *western blot* dapat digunakan untuk mendeteksi satu protein dalam campuran beberapa jumlah protein selain juga informasi tentang ukuran / berat molekul protein. Metode ini juga digunakan untuk membedakan reaksi silang diantara protein dan digunakan studi untuk modifikasi protein selama protein disintesis dalam sel. Keuntungan metode ini adalah membran nitroselulosa setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan. Selain itu juga, dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein, *autoradiography*, *calorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay* (Anonimus_c, 2005; Rantam, 2003).

Metode ini sangat efektif digunakan untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan dalam teknik ini harus mempunyai spesifikasi tinggi dan memiliki daya ikat yang stabil, misalnya berupa antibodi poliklonal. Membran nitroselulosa yang digunakan dalam metode ini mempunyai keunggulan dari membran yang lain yaitu mudah digunakan dan mempunyai kapasitas ikatan yang tinggi. Membran nitroselulosa yang baru tahan terhadap aliran yang tinggi dan tidak mudah rapuh (Rantam, 2003).

BAB 3

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni hingga bulan Oktober 2005 di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2. Materi penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat virus AI dari daerah Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang dan Surabaya, koleksi Bapak Adi Prijo Rahardjo, M.Si., Drh. di Laboratorium Virologi dan Imunologi FKH UNAIR Surabaya. Bahan-bahan untuk SDS PAGE adalah *Acrylamid*, Tris HCl pH 6,8 dan 8,8, SDS 0,5 %, aquadest, TEMED, APS 10 %, Elektroforesis buffer, butanol, laemmli buffer, *methanol* 5 % dan 50 %, asam asetat 7,5 %, glutanaldehid 5 %, *Commassie Brilliant Blue*, *Marker Rainbow*. Bahan-bahan untuk western blot adalah membran nitroselulosa, kertas Whatman, transfer *buffer*, BSA, TBS tween 0,5 %, antibody primer, antibody sekunder (*conjugate*), buffer inkubasi, substrat, *aquadest non deionized*.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah gelas ukur, *Erlenmeyer*, pipet hisap, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, *glass plate* bersekat, *comb*, *eppendorf tube*, penangas air, *freezer*, lemari es, Chamber model biometra, *power supply*, cawan petri, *shaker*, timbangan digital, pinset, sarung tangan, aluminium foil, *fast blot*.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Sampel Virus

Sampel isolat virus yang digunakan merupakan koleksi Bapak Adi Prijo Rahardjo, M.Si., Drh. di Laboratorium Virologi dan Imunologi FKH UNAIR yang diambil dari beberapa daerah di Jawa Timur yaitu Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang dan Surabaya.

3.3.2. Analisis Protein HA dan NA Virus AI dengan SDS PAGE 12,5 %

SDS PAGE 12,5 % dilakukan terhadap isolat virus AI untuk mengetahui berat molekul protein Hemaglutinin dan Neuramidase yang selanjutnya protein ditransfer ke membran nitroselulosa kemudian dilakukan blotting.

Prosedur SDS PAGE diawali dengan mempersiapkan *glass plate* bersekat untuk mencetak *Running gel* yang terdiri dari *separating gel* dan *stacking gel*. Pembuatan *Running gel* diawali dengan pembuatan *separating gel* dengan cara mencampurkan 30 % *Acrylamid* sebanyak 2,5 ml, Tris HCl pH 8,8 1,2 ml, 0,5 %

SDS 1,2 ml, aquadest 1,1 ml, TEMED 5 μ l, APS 10 % 30 μ l. campuran bahan-bahan ini harus homogen kemudian dengan perlahan dimasukkan ke dalam *glass plate* bersekat melalui dinding *plate* untuk menghindari adanya gelembung udara. Selanjutnya ditambahkan butanol diatas permukaan *separating gel* untuk meratakan permukaan atas dari *separating gel* kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 25 menit agar *separating gel* memadat. Langkah selanjutnya adalah membuang butanol dan mencuci permukaan *separating gel* dengan elektroforesis *buffer* yang telah diencerkan 10 kali.

Pembuatan *stacking gel* adalah dengan mencampurkan sebanyak 0,87 ml 0,625M Tris HCl pH 6,8 0,4 ml, 30 % *Acrylamid* 0,33 ml, 0,5 % SDS 0,4 ml, TEMED 2 μ l, APS 10 % 10 μ l. Campuran bahan-bahan ini dimasukkan diatas *separating gel* hingga memenuhi *glass plate* kemudian *comb* dimasukkan ke dalam *stacking gel* dan diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar. Selanjutnya *comb* diambil dan permukaan *stacking gel* dibersihkan dengan elektroforesis *buffer*.

Persiapan sampel dilakukan dengan menyiapkan tabung eppendorf sebanyak jumlah sampel dan dimasukkan ke dalamnya masing-masing 15 μ l laemml buffer kemudian ditambahkan sampel sebanyak 15 μ l. Tutup tabung eppendorf dilubangi dengan jarum untuk menghindari letupan-letupan saat proses denaturasi pada pemanasan 100 °C selama \pm lima menit.

Tahap berikutnya adalah proses elektroforesis yaitu dengan cara memasukkan *glass plate* bersekat yang berisi *Running gel* ke dalam *chamber* model biometra kemudian dituangi elektroforesis buffer hingga *Running gel*

terendam. Selanjutnya sampel dan marker dimasukkan ke dalam sumuran-sumuran *stacking gel*. Langkah berikutnya adalah menyalakan *power supply* dengan tegangan 125 Volt, 40 mA sampai marker dan sampel turun. Setelah seluruh sampel dan marker turun, *power supply* dimatikan dan *glass plate* diambil kemudian gel dilepas perlahan dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi larutan pewarna.

Pewarnaan yang dilakukan adalah pewarnaan *Commassie Blue*, dimana larutan pewarna ini terdiri dari 0,025 gr *Commassie Blue*, 40 ml *methanol*, 10 μ l *acetic acid* dan aquadest ad 100 ml. Prosedur pewarnaan ini adalah setelah gel dirunning langsung dimasukkan cawan petri yang berisi *acetic acid* 10 % hingga gel tampak jernih.

Hasil SDS PAGE berupa band (pita) diukur untuk menghitung berat molekul (BM sampel). Berat molekul (BM) atau massa molekul relatif (MR) ditentukan berdasarkan log BM atau log MR dari protein standar dan nilai *Retardation factor* (Rf). Nilai Rf merupakan perbandingan antara jarak migrasi molekul protein dengan jarak migrasi zat warna, kemudian mencari persamaan dengan menentukan kurva standart dari Rf dan log BM atau log MR. Sampel yang diketahui dibaca sebagai log MR dari sampel setelah menghitung Rf pada agar yang sama (Rybicki dan Purves, 1996).

Menurut Rantam (2005), menentukan BM antigen atau antibody dilakukan dengan menghitung Rf dari masing-masing pita (*band*) dengan rumus

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Massa molekul relatif protein ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai Rf dan masa molekul relatif dari persamaan standart. Nilai Rf dinyatakan sebagai nilai χ , sedang nilai logaritma molekul relatif protein standart dinyatakan sebagai nilai γ , yang kemudian dicari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai χ (Rf) dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan regresi untuk mendapatkan nilai BM protein sampel.

3.3.3. Analisis Protein HA dan NA Virus AI dengan *Western Blot*

Western blot dilakukan dengan mempersiapkan membran nitroselulosa dan kertas whatman yang direndam sebentar dalam transfer buffer serta gel berisi elektroforesis tanpa pewarnaan. Pada *blotter* diletakkan lima lapis kertas whatman yang sudah direndam dalam *transfer buffer*. Gel hasil elektroforesis diletakkan tepat diatas membran nitroselulosa dan dihindarkan adanya rongga udara, kemudian diatasnya diberi lagi lima lapis kertas whatman yang sudah direndam transfer buffer, selanjutnya seluruh lapisan dibasahi lagi dengan transfer buffer.

Blotter ditutup kuat-kuat dan dilakukan running 100 Volt, 40 mA selama satu jam kemudian membran nitroselulosa diambil pelan-pelan dan dimasukkan ke dalam TBS. Membran nitroselulosa dicuci satu kali dengan TBS (*Trans Buffer Salin*) kemudian dipindah ke cawan petri baru. Selanjutnya dilakukan *blocking* membran nitroselulosa dengan satu persen BSA (*Bovine Serum Albumin*) dalam TBS tween 0,5 % dan diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Setelah blotting membran nitroselulosa dicuci dengan TBS tween 0,5 % sebanyak lima

kali masing-masing 10 menit dan dilakukan diatas *shaker*. Selanjutnya ditambahkan antibodi antiserum AI dalam buffer inkubasi dan diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang diatas *shaker*, kemudian membran nitroselulosa dicuci lagi dengan TBS tween 0,5 % sebanyak lima kali masing-masing 10 menit. Setelah dicuci dilakukan penambahan konjugat *anti-Chick* yang berlabel phosphatase dalam buffer inkubasi selama satu jam dengan *shaker* pada suhu ruang, kemudian dicuci lagi dengan TBS tween 0,5 % sebanyak lima kali masing-masing 10 menit.

Hasil *western blot* divisualisasi dengan penambahan phosphatase substrat dan diinkubasi pada suhu ruang di kamar gelap sampai terlihat hasil (warna). Stop reaksi dilakukan dengan memindahkan membran nitroselulosa ke dalam *aquadest non deionized*, selanjutnya membran nitroselulosa diambil dan dikeringkan pada suhu ruang dan hasil siap dianalisa.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

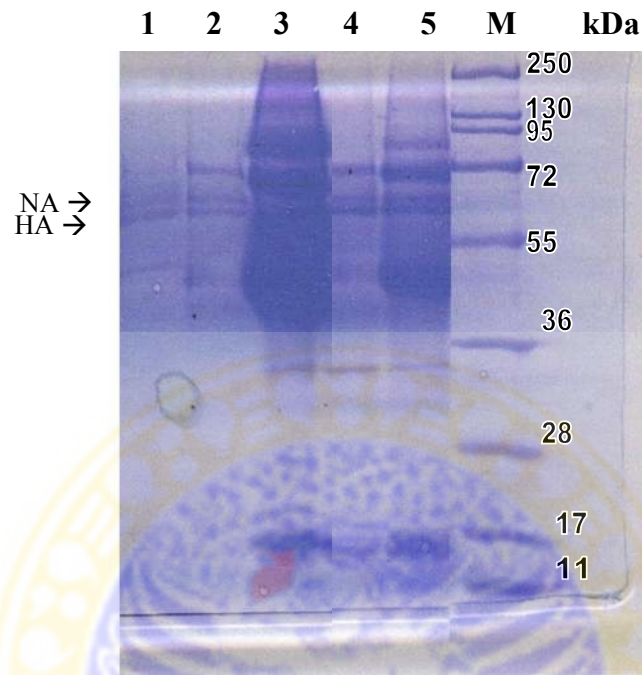
4.1. Hasil Analisis Protein Virus AI dengan SDS-PAGE 12,5 %

Protein-protein virus Avian Influenza dapat diekspresikan dengan menggunakan metode SDS-PAGE dengan indikator warna *Coomassie Brilliant Blue*. Metode SDS-PAGE memisahkan protein-protein berdasarkan berat molekulnya. Isolat virus yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Virologi dan Imunologi FKH Unair Surabaya yang berasal dari beberapa daerah di Jawa Timur yaitu Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang, dan Surabaya. Sampel yang telah dilakukan identifikasi berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan SDS-PAGE 12,5 % dan divisualisasikan dengan pewarnaan *Commasie Briliant Blue* menunjukkan beberapa protein dengan berat molekul yang berbeda antara lain protein Nonstruktural (NS1 dan NS2), protein Matriks (M1 dan M2) protein Hemaglutinin (HA1 dan HA2), Nukleoprotein (NP), Neuraminidase (NA), Polimerase *basic* 2 (PB2) dan protein Polimerase *Acidic* (PA).

Sementara itu protein yang muncul dibandingkan antar isolat dari beberapa daerah asal sampel yang berbeda menunjukkan bahwa protein virus Avian Influenza yang berasal dari daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang menunjukkan protein Nonstruktural 2 (NS2) dengan berat molekul 15,6 kDa, protein Matriks 2 (M2) dengan berat molekul 22,2 kDa, protein Hemaglutinin 2 (HA2) dengan berat

molekul 32,5 kDa, protein Matriks 1(M1) dengan berat molekul 34,8 kDa, protein Hemaglutinin 1 (HA1) dengan berat molekul 38,9 kDa, protein Nukleoprotein (NP) dengan berat molekul 42,6 kDa, protein Neuraminidase (NA) dengan berat molekul 56,1 kDa, protein Hemaglutinin (HA) dengan berat molekul 62,4 kDa, protein Polimerase *Basic* 2 (PB2) dengan berat molekul 79,1 kDa.

Sedangkan protein virus Avian Influenza dari daerah Mojokerto, dan Surabaya, menunjukkan protein Nonstruktural 2 (NS2) dengan berat molekul 16,7 kDa, protein Matriks 2 (M2) dengan berat molekul 22,2 kDa, protein Hemaglutinin 2 (HA2) dengan berat molekul 33 kDa, protein Matriks 1(M1) dengan berat molekul 34,8 kDa, protein Hemaglutinin 1 (HA1) dengan berat molekul 38,5 kDa, protein Nukleoprotein (NP) dengan berat molekul 41,6 kDa, protein Neuraminidase (NA) dengan berat molekul 56,1 kDa, protein Hemaglutinin (HA) dengan berat molekul 62,4 kDa, protein Polimerase *Basic* 2 (PB2) dengan berat molekul 77,6 kDa, protein Polimerase *Acidic* (PA) dengan berat molekul 104,0 kDa.



Gambar 1. Hasil analisis SDS-PAGE 12,5% protein isolat virus AI dari beberapa daerah di Jawa Timur yang divisualisasikan dengan pewarnaan *Commasie Brilliant*

1. Blitar
2. Pasuruan
3. Mojokerto
4. Jombang
5. Surabaya

M. Marker

HA : protein Neuraminidase dengan berat molekul 62,4 kDa

NA : protein Hemaglutinin dengan berat molekul 56,1 kDa

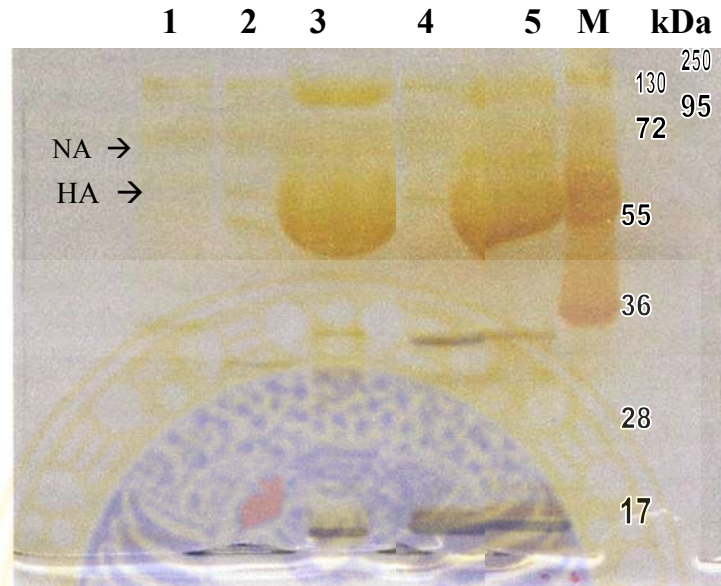
Berdasarkan BM protein yang terlihat pada gambar 2 terdapat dua kelompok virus yang berbeda, yang membedakan kedua kelompok virus dan daerah tersebut adalah berat molekul yang berbeda dari protein Nonstruktural 2 (NS2), protein Hemaglutinin 2 (HA2), protein Hemaglutinin 1 (HA1), protein Nukleoprotein (NP), protein Polimerase *basic* 2 (PB2) dan munculnya band (pita) protein Polimerase *Acidic* (PA) pada sampel dari daerah Mojokerto dan Surabaya.

Protein yang muncul ini adalah protein hasil SDS-PAGE yang masih bersifat umum karena bukan protein spesifik virus AI, sehingga diperlukan analisis reaktivitas dengan menggunakan metode *western blotting*.

4.2. Hasil Analisis Reaktivitas Virus AI dengan *Western Blotting*

Protein dari SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa kemudian direaksikan dengan antibodi poliklonal dari serum ayam yang diimunisasi dengan vaksin AI, selanjutnya direaksikan dengan konjugat (fragmen Imunoglobulin G *anti chicken* yang dilabel dengan *alkaline phosphatase*) dan akhirnya divisualisasi dengan *fast-red* menunjukkan bahwa tidak semua protein yang muncul pada SDS-PAGE dapat bereaksi dengan antibodi (tidak menunjukkan adanya reaktivitas) (terlihat pada gambar 3). Protein virus AI sampel dari daerah Blitar, Mojokerto, Jombang, dan Surabaya yang menunjukkan reaktivitas adalah protein Matriks 2 (M2), Hemaglutinin 2 (H2), Matriks 1 (M1), Hemaglutinin 1 (HA1), Neuraminidase (NA), Hemaglutinin (HA), dan protein Polimerase *Basic* 2 (PB2). Protein virus AI sample dari daerah Pasuruan yang menunjukkan reaktivitas saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI adalah protein Matriks 2 (M2),

Hemagglutinin 2 (H2), Hemagglutinin 1 (HA1), Neuraminidase (NA), Hemagglutinin (HA), dan protein Polimerase Basic 2 (PB2).



Gambar 2. Hasil analisis Western blot protein isolat virus AI dari beberapa daerah di Jawa Timur yang direaksikan dengan antibodi spesifik AI dan divisualisasi dengan pewarnaan *fast-red*

1. Blitar
2. Pasuruan
3. Mojokerto
4. Jombang
5. Surabaya

M. Marker

NA : protein Neuraminidase

HA : protein Hemagglutinin

BAB 5

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui profil protein dengan menggunakan metode SDS-PAGE, metode ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphat* (SDS) dilanjutkan dengan separasi protein berdasar berat molekulnya dengan cara elektroforesis, SDS dan protein kompleks berpisah melalui *gel polyacrilamide*, protein yang kecil bergerak melalui pori gel dengan lebih mudah dan cepat daripada protein yang besar. Protein yang terpisah akan terlihat seperti pita (Lodish *et. al.*, 1995). Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil running SDS-PAGE antara lain kebersihan isolat, tingkat kemurnian isolat, dan kadar protein dalam homogenat. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel sehingga pita terlihat lebih tajam dengan gel yang lebih terang. Isolat yang murni dan kadar protein homogenat yang baik akan memberikan gambaran pita protein yang baik pula (Kusnoto, 2003).

Hasil pada SDS-PAGE, protein yang muncul setelah dilakukan visualisasi dengan *Commassie Brilliant Blue* menunjukkan bahwa isolat virus AI dari beberapa daerah di Jawa Timur tidak semuanya sama antara satu daerah dengan daerah yang lainnya (seperti pada gambar 2), hal ini kemungkinan virus tersebut mempunyai sifat yang berbeda antara daerah satu dengan daerah lain, selain itu juga sampel virus AI tersebut mempunyai sifat patogenitas yang berbeda karena protein ini merupakan protein fungsional yang diekspresi pada saat virus menginfeksi sel.

Protein virus AI dari daerah Blitar, Pasuruan dan Jombang pada hasil SDS-PAGE tidak terlihat dengan jelas protein Polimerase *acidic* (PA) dengan berat molekul 104 kDa yang dimiliki oleh sampel virus AI dari daerah Mojokerto dan Surabaya. Perbedaan ini kemungkinan karena *band* yang diekspresikan oleh protein PA dari sampel virus daerah Blitar, Pasuruan dan Jombang sangat tipis sehingga tidak terlalu tampak hal ini dapat disebabkan kurangnya sampel.

Adanya kemiripan berat molekul antar isolat menunjukkan bahwa pita protein yang sama, hal ini dikarenakan perhitungan berat molekul menggunakan regresi linier serta adanya kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel. Adanya variasi berat molekul dapat menyebabkan perbedaan karakter biologis pada strain yang berlainan, meskipun masih termasuk dalam satu serotipe. Virus mempunyai keragaman genetik yang lebih besar daripada organisme lain. Keragaman yang besar tersebut terjadi melalui seleksi alam yang bekerja pada genom virus yang berubah secara berkesinambungan sebagai akibat dari mutasi, rekombinasi, dan penggabungan kembali. Pada setiap infeksi virus, satu atau sejumlah kecil partikel virus bereplikasi membentuk jutaan turunan. Pada populasi yang demikian, kesalahan dalam menyalin asam nukleat pasti terjadi sehingga mutasi tidak dapat dihindari (Fenner *et al.*, 1995).

Menurut Madrow dan Folke (1997), berat molekul Hemaglutinin (HA) adalah 77 kDa, Neuraminidase (NA) adalah 56 kDa, Matriks (M) 28 kDa, Nukleoprotein (NP) 55 kDa, Polimerase A (PA) 83 kDa, Polimerase B (PB) 90 kDa, Nonstruktural 1 (NS1) 26kDa, Nonstruktural 2 (NS2) adalah 11 kDa.

Setelah dilakukan analisis *western blotting* dengan cara mereaksikan antibodi poliklonal ayam yang telah divaksinasi virus Avian Influenza (AI) subtype H5N1 menunjukkan bahwa protein yang muncul pada pemeriksaan SDS-PAGE 12,5 % tidak semua ditemukan pada analisis dengan metode *western blot*. Hal ini karena protein tersebut kemungkinan tidak mempunyai kemampuan untuk menginduksi antibodi sehingga protein tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan vaksin. Hal tersebut diatas menandakan bahwa protein yang mempunyai daya reaktivitas mempunyai peranan penting dalam patogenesis virus dan oleh karena itu protein yang mempunyai daya reaktivitas tersebut dapat dikembangkan untuk diagnostik.

Protein Hemagglutinin 1 (HA1) merupakan protein yang berperan penting pada saat penempelan virus pada sel target yang kemudian dapat berkembang pada sel tersebut atau multiplikasi atau untuk menginfeksi sel target tersebut. Protein ini juga mempunyai peranan penting dalam menginduksi antibodi karena protein HA1 adalah protein yang imunogenik sehingga apabila direaksikan dengan antibodi poliklonal AI maka mempunyai reaktivitas yang cukup tinggi. Sedangkan protein HA2 (Hemagglutinin 2) setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal AI menunjukkan hasil yang spesifik terhadap protein HA2. kedua macam protein diatas sebenarnya merupakan satu kesatuan protein Hemagglutinin (HA) dimana pada awal infeksi, akibat aktivasi precursor HA (HAO) oleh protease inang, protein HA akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respon imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus

dengan membran endosomal inang. Protein HA1 dan HA2 berperan penting pada saat virus Avian influenza menempel pada sel host dan berperan penting pula dalam patogenesis virus AI dalam tubuh.

Protein NA adalah protein Neuraminidase, protein ini berfungsi untuk melepaskan ikatan HA (Hemagglutinin) dengan permukaan eritrosit dan mengkatalisasi pelepasan virus dari sel terinfeksi, yang selanjutnya berfungsi untuk penyebaran virus. Protein neuraminidase ini merupakan protein yang bersifat antigenik karena menunjukkan hasil yang spesifik pada saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI. Protein matriks (M) merupakan salah satu dari delapan segmen genom virus AI yang menjadi dua macam protein yaitu protein matriks 1 (M1) dan protein matriks 2 (M2). Protein M1 mempunyai fungsi untuk berasosiasi dengan membran virus dan merupakan bagian yang berfungsi aktif pada morfogenesis dalam penyusunan virion. Protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M2 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma menyusun struktur amplop virus. Protein M2 ini merupakan protein membran integral yang merupakan saluran ion yang berfungsi aktif paling dulu dalam siklus infeksi pada pelepasan kapsid dari endosom. Protein matriks 2 (M2) mempunyai daya reaktivitas saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI sehingga protein ini merupakan protein yang antigenik.

Nukleoprotein (NP) adalah protein yang merupakan komponen utama dari nukleokapsid yang berfungsi untuk signal transport ke nukleus. Protein ini tidak

mempunyai fungsi spesifik pada proses patogenesis virus AI sehingga protein ini bukan merupakan protein antigenik karena saat dilakukan blotting dan direaksikan dengan antibodi poliklonal AI tidak menunjukkan reaktivitas. Protein PB2 (Polimerase *Basic* 2) juga merupakan komponen nukleokapsid dan kompleks Polimerase yang mengikat pada struktur 5-cap. Protein PB2 ini menunjukkan hasil spesifik saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI dengan blotting, kemungkinan protein ini mempunyai fungsi pada patogenesis virus AI. Protein PB1 (Polimerase *Basic* 1) juga merupakan protein komponen nukleokapsid dan kompleks polimerase yang berfungsi untuk polimerase RNA dan mengatur derajat kebasaaan (*basic*) dari virus. Selain Nukleoprotein (NP), protein PB1 dan protein PB2, protein Polimerase *Acidic* (PA) juga merupakan protein komponen dari nukleokapsid yang berfungsi sebagai kompleks Polimerase dan mengatur derajat keasaman virus. Protein ini bukan merupakan protein antigenik karena tidak menunjukkan reaktivitas saat dilakukan analisis *western blot* yang direaksikan dengan antibodi poliklonal AI.

Protein Nonstruktural (NS) merupakan segmen genom virus AI yang juga menjadi dua macam protein yaitu protein Nonstruktural 1 (NS1) dan protein Nonstruktural 2 (NS2). Protein NS1 merupakan protein nukleus yang berfungsi sebagai cofaktor pada pemotongan (*splicing*) RNA dan untuk regulasi eksport mRNA yang telah terpotong. Protein NS2 berfungsi untuk regulasi protein dalam jumlah yang sedikit dalam virion. Protein ini merupakan protein fungsional yang diekspresi pada saat virus menginfeksi sel tetapi protein ini kemungkinan tidak

mempunyai kemampuan untuk menginduksi antibodi, hal ini terbukti protein ini tidak bereaksi dengan antibodi saat dilakukan immunoblotting.

Virus AI mempunyai delapan segmen gen yang menyandi sepuluh macam protein yaitu Hemaglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matriks (M), Polimerase *Acidic* (PA), Polimerase *Basic* 1 (PB1), Polimerase *Basic* 2 (PB2), dan protein Nonstruktural (NS). Diantara kesepuluh jenis protein tersebut, protein HA, NA, dan M2 merupakan protein penting dibidang medis. Protein HA dan NA digunakan untuk penentu subtipe. Subtipe virus AI ditentukan oleh kombinasi protein HA dan NA yang berada dipermukaan virus. Sampai sekarang telah diketahui adanya 16 subtipe HA yaitu H1-H16 dan 9 subtipe NA yaitu N1-N9, umumnya penyebutan subtipe virus AI ditunjukkan dengan HxNy (Tabbu, 2005).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Analisis dengan SDS-PAGE 12,5 % yang dilakukan pada sampel isolat virus Avian Influenza dari beberapa daerah di Jawa Timur menunjukkan protein HA dengan berat molekul 62,4 kDa dan protein NA dengan berat molekul 56,1 kDa.
2. Protein HA dan NA isolat virus Avian Influenza dari beberapa daerah di Jawa Timur merupakan protein antigenik karena menunjukkan reaktivitas saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI pada analisis *western blotting*.

6.2 Saran

Berdasarkan karakteristik protein HA dan NA isolat virus AI dari beberapa daerah di Jawa Timur perlu dilakukan penelitian tentang struktur protein HA dan NA sehingga nantinya dapat sebagai acuan pembuatan vaksin subunit protein.

RINGKASAN

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan salah satu metode elektroforesis yang sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul. Pada elektroforesis, arus listrik digunakan untuk memindahkan protein molekul melalui gel polyacrylamid sehingga protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau band yang tipis. Teknik western blot dilakukan untuk mengetahui sifat antigenisitas protein virus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein HA dan NA virus AI isolat beberapa daerah di Jawa Timur serta membuktikan bahwa protein HA dan NA tersebut merupakan protein antigenik.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap yaitu analisis dan karakterisasi protein HA dan NA. Analisis protein dilakukan untuk mengetahui berat molekul protein dilakukan dengan teknik SDS-PAGE, sedangkan karakterisasi protein dilakukan dengan teknik *western blot* menggunakan antibodi poliklonal AI.

Hasil penelitian menunjukkan adanya kesamaan dan perbedaan berat molekul protein virus AI yang diekspresikan dari masing-masing isolat daerah yang berbeda pada analisis dengan SDS-PAGE 12,5 %. Terdapat kesamaan berat molekul protein Hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) dari virus AI yang berasal dari daerah Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang dan Surabaya dimana protein HA diekspresikan dengan berat molekul 62,4 kDa dan protein NA dengan berat molekul 56,1 kDa tetapi terdapat perbedaan berat molekul HA1 dan HA2

dimana isolat dari daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang protein HA1 diaksresikan dengan berat molekul 38,9 kDa dan Protein HA2 dengan berat molekul 32,5 kDa sedangkan prtein HA1 isolat dari daerah Mojokerto dan Surabaya memiliki berat molekul 38,5 kDa dan HA2 33 kDa. Protein HA dan NA tersebut merupakan protein antigenik yang menunjukkan reaktivitas saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI, protein HA dan NA juga mempunyai peran dalam proses patogenesis virus.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dengan teknik SDS-PAGE 12,5 % dapat diketahui berat molekul protein-protein virus AI isolat dari daerah Blitar, Pasuruan, Mojokerto, Jombang dan Surabaya. Antigenitas protein virus AI tersebut dapat diketahui dengan analisis reaktivitas terhadap antibodi poliklonal AI dengan menggunakan teknik *western blotting*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, T. Y. 2000. Flu Burung pada Manusia. Kompas 31 Januari 2000.
- Anonimus. 2004. Mengenal Lebih Dekat Avian Influenza. Ed. 213. Bandung: Info Medion, Maret. 1-4.
- Anonimus_a. 2004. Avian Influenza.
[http://www.vet.uga.cdc/vpp/grav book/FAD/AVI.html](http://www.vet.uga.cdc/vpp/grav%20book/FAD/AVI.html).
- Anonimus_b. 2005. SDS-PAGE. <http://lsvl.la.asu.edu/resources/mamajis/sds-page/sds-page.html>.
- Anonimus_c. 2005. Western Blotting.
<http://lsvl.la.asu.edu/resources/mamajis/western/western.html>.
- Beard, C.W. 2003. Avian Influenza (Fowl Plaque) Shoutheast Poultry Research laboratory, Athens, GA.
- Beard, C. W. 2004. Avian Influenza. <http://www.vwt.uga.edu/vpp/grey-book/aka.htm>
- Estoepongastie, A. T. S. 2005. Amankah Mengonsumsi Daging dan Telur Unggas pada Saat Terjadi Wabah Flu Burung?. Seminar Kiat-kiat Mengantisipasi Pandemi Flu Burung tanggal 27 Oktober 2005. FKH Unair. Surabaya.
- Fenner, F. J., E. P.J. Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott, M. J. Studdert, D. O. White. 1995. Virologi Veteriner. 2nd Ed. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallenstens, T.M. Besteroer, S. Hersfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D.M.E Osterhaus. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained black-headed gulls. J Virol 79 (5): 2814-2822.
- Fouchier, R.A.M., M. Vincent, A. Wallansten, T. M. Bestebroer, S. Herfst. 2005. Characterization of Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16). Obtained from Black-Headed Gulls. Journal of Virology. March 2005, Vol. 79, No. 5, Pp 2814-2822.
- Hoffman, E.J. Stech, I. Leneva, S. Krauss, C. Schotissek, P.S. Chin, M. Peiris, K.F. Shortridge, and R.G. Webster. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: Was H6N1 a derivate or a precursor of H5N1? J Virol 74 (14): 6309-6315

- Horimoto, T., and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev.* 14: 129-149
- Irawan, A. 1996. Menanggulangi Berbagai Penyakit Ayam. *Aneka.* Solo. 63-65.
- Kusnoto, 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat lokal. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3 : 11-13
- Lin, Y.P., L.L. Shu, S. Wright, W.J. Bean, G.B. Sharp, K.F. Shortridge, and R.G. Webster. 1994. Analysis of the influenza virus gene pool of the avian species from Southern China. *Virology* 198: 557-566
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. C. Zupusky, P. Matsudaria and Darnel. 1995. *Molecular Biology.* 3th Edition. Scientific American Book. New York.
- Madrow, S., D. Falke. 1997. *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin. Oxford.
- Moerad, B., 2004. Kebijakan Pemerintah dalam Penanggulangan Wabah Avian Influenza di Indonesia. Seminar Nasional Menyikapi Dampak Flu Burung tanggal 14 Februari 2004. FKH Unair. Surabaya.
- Murtidjo B.A. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam. Kanisius. Yogyakarta. 24-26.
- Rahardjo_a, A.P. 2004. Avian Influenza: Biologi Virus, Diagnosa dan Evaluasi Sampel. Dalam Seminar Nasional Menyikapi Dampak Flu Burung tanggal 14 Februari 2004. FKH Unair. Surabaya.
- Rahardjo_b, Y. 2004. Avian Influenza, pencegahan, pengendalian dan pemberantasannya. *Gallus Indonesia Utama.* Jakarta.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi.* Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rantam, F.A. 2004. Kinetika Molekuler Virus Avian Influenza dan Pengendalian di Masa Datang. Seminar Menyikapi Dampak Flu Burung tanggal 14 Februari 2004. FKH Unair. Surabaya.
- Rantam, F.A., R. Ernawati, Suwarno, A. P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani. 2006. Laporan Penelitian Potensi Kaporit Sebagai Desinfektan Virus

- Avian Influenza. Kerjasama penelitian PT. Tjiwi Kimia/ Eka Tjipta Foundation dengan FKH Unair. Surabaya.
- Reid, A.H., T.G. Fanning, T.A. Janeczewski, S. McCall, and J.K. Taubenberger. 2002. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J Virol* 76: 101717-101723
- Ressang, A.A., 1986. Penyakit Viral pada Hewan. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Santoso, S. 2005. Kesiapan Dinas Kesehatan Kota Surabaya Terhadap Wabah Flu Burung. Dalam Seminar Sehari Kiat-kiat Mengantisipasi Pandemi Flu Burung tanggal 27 Oktober 2005. Surabaya.
- Sinambea, Y.H. 2008. Kematian Akibat Flu Burung Capai 81 %. <http://news.okezone.com/index.php/readstory/2008/04/07/1/98253>
- Smith, T. 2004. The Creation of Relenza For The Treatment of Influenza. <http://www.omedon.co.uk/influenza>
- Soeharsono. 2002. Zoonosis Penyakit Menular dari Hewan ke manusia. Kanisius. Yogyakarta. 232-244.
- Suzuki, Y., and M. Nei. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 19: 501-509
- Tabbu, C. R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. Kanisius. Yogyakarta.
- Tabbu, C.R. 2005. Strategi penanggulangan avian influenza (AI) pada unggas di Indonesia. Seminar Nasional Avian Influenza. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Tjiptardjo. 2007. Empat tahun bersama AI. *Infovet* Agustus 2007.
- Utama, A. 2003. Misteri Virus Flu Burung H5N1. <http://www.sinarharapan.co.id/iptek/kesehatan/2005/0722/kes1.html>.
- WHO. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* (serial in the internet). Available from <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no10/05-0644.htm>

Lampiran 1. Analisis Regresi

Summarize

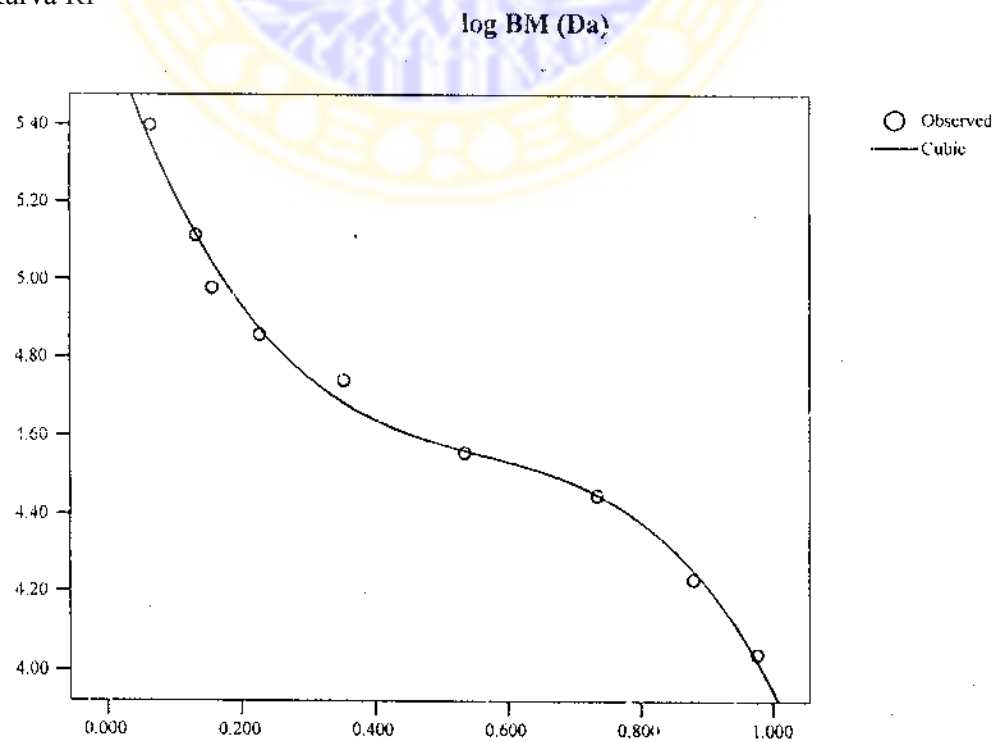
Tabel 1. Retardation factor (Rf) Marker

Case Summaries^a

	Jarak (mm)	Rf	BM kDa	BM Da	Log BM (Da)	
1	11.000	.066	250.00	250000.00	5.40	
2	22.000	.133	130.00	130000.009	5.11	
3	26.000	.157	95.00	5000.00	4.98	
4	38.000	.229	72.00	72000.00	4.86	
5	59.000	.355	55.00	55000.00	4.74	
6	89.000	.536	36.00	36000.00	4.56	
7	122.000	.735	28.00	28000.00	4.45	
8	146.000	.880	17.00	17000.00	4.23	
9	162.000	.976	11.00	11000.00	4.04	
Total	sum	675.000	4.067	694.00	649000.00	42.36
	Mean	75.00000	.45189	77.1111	77111.1111	4.7068
	Std. Deviation	56.949539	.343115	75.50570	75505.703	.43325

^a limited to first 100 cases

Kurva Rf



Cubic

Tabel 2. Case Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.996	.993	.988	.047

The independent variable is Rf.

Tabel 3. Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.491	3	.497	224.886	.000
Residual	.011	5	.002		
Total	1.502	8			

The independent variable is Rf.

Tabel 4. Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-5.017	.636	-3.973	-7.885	.001
Rf**2	8.160	1.434	6.800	5.689	.002
Rf**3	-4.845	.912	-3.878	-5.314	.003
(constant)	5.652	.071		80.095	.000

Berdasarkan analisis Regresi diketahui terdapat hubungan kubik negatif dengan nilai $a=5,652$; $b= -5,017$; $c= 8,16$; $d= -4,845$, sehingga diperoleh persamaan garis regresi sebagai berikut: $y = 5,652 - 5,017x + 8,16x^2 - 4,845x^3$

Lampiran 2. Penghitungan Protein Virus AI Pada Sampel dari Daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang

Persamaan garis regresi $y = 5,652 - 5,017x + 8,16x^2 - 4,845x^3$ digunakan untuk menghitung berat molekul protein sampel

Tabel 5. Berat Molekul Protein Virus AI dari Daerah Blitar, Pasuruan, dan Jombang

Jarak Protein sampel (mm)	Rf	Log y kDa	y Da	y kDa
36	0,217	4,898	79067,9	79,1
45	0,271	4,795	62373,5	62,4
50	0,301	4,749	56104,8	56,1
69	0,416	4,629	42559,8	42,6
79	0,476	4,590	38904,5	38,9
95,3	0,574	4,541	34753,6	34,8
107,4	0,647	4,512	32508,7	32,5
137	0,825	4,346	22181,9	22,2
151	0,910	4,194	15631,5	15,6

Panjang Gel = 166 mm

Lampiran 3. Penghitungan Protein Virus AI Pada Sampel dari Daerah Mojokerto dan Surabaya

Persamaan garis regresi $y = 5,652 - 5,017x + 8,16x^2 - 4,845x^3$ digunakan untuk menghitung berat molekul protein sampel

Tabel 5. Berat Molekul Protein Virus AI dari Daerah Mojokerto dan Surabaya

Jarak Protein Sampel (mm)	Rf	Log y Da	y Da	y kDa
28,1	0,169	5,017	103992,0	104
36,7	0,221	4,890	77642,7	77,6
45	0,271	4,795	62373,5	62,4
50	0,301	4,749	56104,8	56,1
70,8	0,426	4,619	41591,1	41,6
80,5	0,485	4,585	38459,2	38,5
95,3	0,574	4,541	34753,6	34,8
106,2	0,640	4,518	32961,0	33
137	0,825	4,346	22181,9	22,2
149	0,897	4,223	16711,0	16,7

Panjang Gel = 166 mm

Lampiran 4. Komposisi Bahan yang Digunakan Untuk SDS-PAGE 12,5%

1. Komposisi larutan *separating gel* 12,5 %
 - 30 % *Acrylamid* 0,8 % *bis acrylamid* 2,5 ml
 - Tris HCl pH 8,8 1,2 ml
 - 0,5 % SDS 1,2 ml
 - Aquadest 1,1 ml
 - TEMED 5 μ l
 - APS 10 % 30 μ l
2. Komposisi larutan *stacking gel*
 - Aquadest 0,87 ml
 - 0,625 M Tris HCl pH 6,8 0,4 ml
 - 30 % *Acrylamid* 0,8 % *bis acrylamid* 0,33 ml
 - 0,5 % SDS 0,4 ml
 - TEMED 2 μ l
 - APS 10% 10 μ l
3. Komposisi *electrophoresis buffer*
 - Tris (*hydrxymethyl amonimethan*) 30,29 g
 - *Glycin* 144,13 g
 - SDS 10 g
 - Aquadest ad 100 ml
4. Komposisi Larutan Laemmlı
 - SDS 10 % 11,5 ml

- 0,5 M Tris HCl 6,25 ml
- 5 g *Glycerin* 5 ml
- *Bromphenol Blue*

5. Komposisi larutan pewarna Commassie Brilliant Blue

- Commassie Blue 0,025 g
- Methanol 40 ml
- *Acetic Acid* 10 μ l
- Aquadest ad 100 ml

6. Komposisi sampel

- Sampel isolat virus 15 μ l
- *Laemml Buffer* 15 μ l