

LAPORAN PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN
HIBAH STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009

KKC
KK
LP.116/10
SUW
P



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ANTIBODI
ANTI-HEMAGLUTININ ASAL KUNING TELUR
DALAM UPAYA SEROTERAPI TERHADAP KASUS FLU BURUNG

Dr. Suwarno, MSi., drh.
Nanik Sianita Widjaja, SU., drh.

Sumber Dana : DIPA / APBN Rupiah Murni tahun Anggaran 2009
Universitas Airlangga

Halaman Pengesahan Laporan Penelitian Strategis Nasional

1. Judul Penelitian : **Produksi dan Karakterisasi Antibodi Anti-hemaglutinin Asal Kuning Telur dalam Upaya Seroterapi Terhadap Kasus Flu Burung.**

2. Ketua Peneliti :

Nama Lengkap : Dr. Suwarno, drh., MSi.
Jenis Kelamin : Laki-laki
NIP : 131 836 994
Jabatan Struktural : -
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Fakultas / Jurusan : Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga
Pusat Penelitian : Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga
Alamat : Kampus C Unair, Jl Mulyorejo Surabaya 60115
Telepon / Fax. : (031) 5992785 / (031) 5993015
Alamat Rumah : Pondok Benowo Indah AC-4 Surabaya 60197
Handphone/Fax/E-mail : 081331945757/-/snow_arno@yahoo.co.id

3. Jangka Waktu Penelitian : 1 tahun

4. Pembiayaan :

- Jumlah Biaya yang Diajukan : Rp. 100.000.000,-

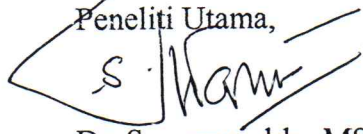
Mengetahui
Ketua Institute of Tropical Disease,


Dr. Nasronuddin, dr.Sp.PD,K-PTI

NIP. 140 159 073

Surabaya, 5 Desember 2009

Peneliti Utama,


Dr. Suwarno, drh., MSi.

NIP. 131 836 994

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Bambang Sektiari L., drh.

NIP. 131 837 004

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Flu Burung atau *Avian Influenza* (AI) merupakan penyakit menular pada unggas dan mamalia, termasuk manusia, sehingga penyakit ini bersifat zoonosis. Di Indonesia kejadian AI pertama kali terjadi pada pertengahan tahun 2003 dan sampai detik ini hampir semua propinsi telah terinfeksi virus AI. Data dari WHO menunjukkan, bahwa sampai dengan akhir 10 September 2008 jumlah kasus AI di Indonesia mencapai 137 orang dan 112 di antaranya meninggal dunia (WHO, 2008).

Upaya penanggulangan AI pada unggas di Indonesia telah difokuskan pada usaha vaksinasi, tetapi sampai dengan hari ini belum memberikan hasil yang optimal. Hasil infeksi buatan pada unggas yang divaksinasi tidak memberikan perlindungan maksimal. Unggas yang terinfeksi virus AI subtype H5N1 masih mensekresi virus sampai hari ke delapan pasca infeksi (FKH Unair, 2006).

Virus AI tipe A subtype H5N1 sebagai penyebab AI di Indonesia, termasuk virus *single stranded* (ss)-RNA famili Orthomyxoviridae, dengan diameter 80-120 nm dan panjang 200-300 nm. Virus tersusun atas 8 segmen gen yang menyandi 10 macam protein, yaitu *polymerase basic-2* (PB2), *polymerase basic-1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), hemagglutinin (HA), nukleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M) dan non-struktural (NS). Masing-masing segmen menyandi satu macam protein, kecuali segmen M menyandi protein M1 dan M2, serta segmen NS menyandi protein NS1 dan NS2. Berat molekul protein berturut-turut adalah: 87, 96, 85, 77, 50-60, 48-63, 24, 15, 26, dan 12 kDa. Berdasarkan perbedaan genetik antar virus AI, sehingga sekarang telah diketahui adanya 16 subtipe hemagglutinin (H1-16) dan 9 subtipe neuraminidase (N1-9).

Di antara kesepuluh jenis protein tersebut, protein HA, NA dan M2 merupakan protein terpenting di bidang medis. Protein HA dan NA digunakan untuk penentu subtype dan protein M merupakan target dari obat-obat antiviral. Protein HA dan NA juga merupakan protein terpenting di dalam proses replikasi virus (Horimoto *and* Kawaoka, 2001; Beard, 2003; Fouchier *et al.*, 2005).

Protein HA dengan BM 77 kDa disandi oleh gen HA yang tersusun atas nukleotida sekitar 1778 *base pair* (bp). Pada awal infeksi protein HA akan berikatan dengan reseptor sel dan melepaskan ribonukleoprotein (Horimoto and Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001).

Melalui reseptor *sialic acid 2,6- alfa galactosa (SA alfa 2,6 gal)* atau *sialic acid 2,3- alfa galactosa (SA alfa 2,3 gal)* virus AI menempel pada *cell tropism*. Infeksi dimulai ketika virus AI menemukan reseptor yang sesuai. Pada ayam, reseptor yang sesuai adalah *SA alfa 2,3 gal* (Vines *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999). Perlekatan reseptor ini diperantarai oleh protein HA. Akibat aktivasi precursor HA (HAO) oleh protease inang, protein akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respons imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membran endosomal inang. (Suzuki and Nei, 2002). Selama replikasi, virus AI memerlukan aktivitas glikoprotein permukaan, yaitu protein HA dan NA. Protein HA bertanggung jawab untuk berikatan dengan asam sialat yang terletak pada glikokonjugat permukaan sel. Sementara itu protein NA mempunyai fungsi terhadap aktivitas enzimatis untuk pelepasan asam sialat dari glikokonjugat sel dan dalam sintesis protein untuk memfasilitasi virion baru dalam

budding sel. Protein NA juga mempunyai fungsi memfasilitasi masuknya virus AI ke dalam sel (Kobasa *et al.*, 2001; Matrosovich *et al.*, 2004).

Antibodi anti-HA yang terbentuk dapat menetralkan virus AI, tetapi antibodi anti-NA hanya dapat menghambat-replikasi virus (Anwar *et al.*, 2006). Pemberian antibodi *whole molecule* terhadap semua komponen virus AI secara pasif pernah dicobakan pada ayam yang terinfeksi AI, tetapi belum memberikan hasil optimal. Penelitian ini akan mencoba untuk menjelaskan mekanisme pemblokiran reseptor *SA alfa 2,3 gal* pada *cell tropism* oleh antibodi anti-HA terhadap infeksi virus AI subtype H5N1.

Infeksi alam atau imunisasi, baik aktif maupun pasif, selalu berkorelasi terhadap timbulnya respons imun. Virus AI yang masuk tubuh akan diproses oleh *antigen presenting cell* (APC). Akibat aktivasi, APC akan menghasilkan interleukin-12 (IL-12) yang akan berfungsi untuk pematangan sel Th1 (*T helper-1*). Sel Th1 selanjutnya mensekresi interferon-gamma (IFN- γ) dan IL-2. Produksi IL-2 oleh sel Th1 akan meningkatkan proliferasi sel T *cytotoxic* (Tc). Sementara itu sel Th2 akan mensekresi IL-4 dan IL-5 yang akan digunakan menggerakkan sel B untuk menghasilkan antibodi. Antibodi yang dihasilkan akan melakukan proses netralisasi virus dengan cara mengikat virus bebas (Tamura and Kurata, 2004).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka yang menjadi permasalahan adalah :

1. Bagaimana karakter antibodi anti-HA virus AI subtype H5N1 berdasarkan berat molekul, antigenisitas dan imunogenisitasnya ?

2. Bagaimana mekanisme pemblokiran antibodi anti-HA terhadap virus AI pada *cell tropism* ?
3. Apakah terdapat efek samping berupa timbulnya antibodi anti-idiotip (anti-anti-HA) pada ayam yang diterapi dengan antibodi anti-HA ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan mengetahui mekanisme antibodi anti-HA asal kuning telur dalam menghambat perkembangbiakan virus AI subtype H5N1 melalui pemblokiran terhadap reseptor *SA alfa 2,3 gal*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui karakter antibodi anti-HA virus AI subtype H5N1 berdasarkan berat molekul, imunogenesitas dan antigenesitas protein.
2. Menjelaskan mekanisme antibodi anti-idiotip asal kuning telur dalam menghambat perkembangbiakan virus AI subtype H5N1 melalui pemblokiran reseptor *SA alfa 2,3 gal*.
3. Mengetahui adanya efek samping berupa timbulnya antibodi anti-idiotip pada ayam yang diterapi dengan antibodi anti-HA.

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1 Virus Avian Influenza

Virus AI adalah virus RNA yang termasuk ke dalam family *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus influenza tipe A ini dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia, termasuk manusia. Virus AI tipe A tersusun atas 8 segmen gen yang menyandi 10 macam protein, yaitu *polymerase basic-2* (PB2), *polymerase basic-1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), hemagglutinin (HA), nukleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M) dan non-struktural (NS). Masing-masing segmen menyandi satu macam protein, kecuali segmen M menyandi protein M1 dan M2, serta segmen NS menyandi protein NS1 dan NS2. Berat molekul protein berturut-turut adalah: 87, 96, 85, 77, 50-60, 48-63, 24, 15, 26, dan 12 kDa. Di antara kesepuluh jenis protein tersebut, protein HA, NA dan M2 merupakan protein terpenting di bidang medis. Protein HA dan NA digunakan untuk penentu subtype dan protein M merupakan target dari obat-obat antiviral. Protein HA dan NA juga merupakan protein terpenting di dalam menimbulkan respons imun. Sementara itu protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M1 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma *cell tropism*. Di lain pihak, protein M2 bersama dengan protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002).

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 (Fouchier *et al.*, 2005). Virus AI dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok, yaitu HPAI (*highly pathogenic avian influenza*) dan

(*low pathogenic avian influenza*). Secara alami kelompok LPAI dapat berubah menjadi HPAI atau sebaliknya. Perubahan ini dapat terjadi akibat adanya mutasi maupun *reassortment genetic* yang mengarah pada terjadinya *antigenic drift* maupun *antigenic shift*. Perubahan ini akan memunculkan strain baru yang lebih virulen dan dapat terjadi hanya dalam waktu beberapa bulan (Alexander, 2000; Swayne and Soarez, 2003)

Protein neuraminidase (NA) adalah suatu enzim berbentuk tetramerik, yang merupakan membrane glikoprotein integral tipe II yang didapatkan pada permukaan virion. Protein NA memiliki aktivitas *receptor-destroying neuraminidase* (acylneuraminiyl hydrolase) yang akan menghidrolisis ikatan galaktosa dan N-asetilneuraminik pada rantai ujung oligosacharida-glikoprotein untuk melepas asam sialat dari permukaan sel. Selain itu, protein NA memiliki beberapa fungsi lainnya, antara lain sebagai penentu inang, penentu patogenitas virus, memfasilitasi proses penetrasi virus ke dalam sel, melepaskan partikel virus yang sudah dibentuk dari sel, mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor asam sialat dan menentukan timbulnya respons imun pada inang (Basler *et al.*, 1999; Horimoto *and* Kawaoka, 2001; Kobasa *et al.*, 2001; Matrosovich *et al.*, 2004).

Protein NA dapat membentuk antibodi yang dapat menghambat aktivitas NA virus, tetapi tidak dapat menetralkan virus. Imunisasi dengan protein NA terbukti dapat menurunkan replikasi virus. Kekebalan humoral terhadap virus H5N1 manusia dapat memberikan perlindungan parsial pada mamalia. Diketahui adanya reaksi silang antara virus H1N1 manusia dengan virus unggas H5N1. Kedua virus diklasifikasikan ke dalam serotipe yang sama, tetapi secara filogenetik berbeda (Anwar *et al.*, 2006; Sandbulte *et al.*, 2007).

2.2 Imunoglobulin Yolk

Antibodi pada kuning telur adalah antibodi maternal yang ditransfer dari induk kepada anak dan merupakan kekebalan pasif. Antibodi maternal dapat berasal dari hasil vaksinasi atau infeksi alam. Antara antibodi dalam darah dan antibodi dalam kuning telur terdapat korelasi yang tinggi (Tizard, 1996).

Antibodi pada unggas yang dapat ditransfer ke dalam kuning telur adalah imunoglobulin *yolk* (Ig Y) , yang identik dengan Ig G pada mamalia. Konsentrasi Ig Y dalam kuning telur sebanding dengan konsentrasi dalam serum. Konsentrasi Ig Y dalam kuning telur berkisar antara 6-13 mg/ml atau sekitar 50-100 mg/butir telur. Kira-kira sekitar 2% atau 1-2 mg dari total tersebut merupakan antibodi spesifik (Covalab, 2004; Sigma-Aldrich, 2006). Penggunaan kuning telur untuk deteksi antibodi memiliki beberapa keunggulan, antara lain mengurangi efek stres berat terhadap reaksi pengambilan darah, mempermudah penanganan sampel, dan mengurangi resiko terhadap penularan zoonosis.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang bersifat deskriptif. Secara deskriptif bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler protein HA dan antibodi-anti-HA. Karakteristik molekuler diobservasi dengan melakukan preparasi protein HA virus avian influenza (AI), antibodi anti-HA dan aplikasi antibodi anti-HA pada ayam penderita AI.

3.2 Sampel Virus

Virus AI subtype H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil isolasi dari daerah wabah di Kabupaten Blitar (A/chicken/Blitar/2003). Virus yang berasal dari *swab* tracheal dan cloacal atau organ internal (paru, trachea, limpa, ginjal, otak, atau pankreas) diisolasi pada telur ayam berembrio (TAB) dan telur itik berembrio (TIB) dengan pengamatan selama tujuh hari. Setelah pengamatan selesai, baik TAB dan TIB yang mati atau tetap hidup selama pengamatan diuji melawan antibodi anti-H5N1 dengan uji HI. Cairan alantois dari TAB dan TIB yang positif terdapat virus AI kemudian dipanen dan disimpan dalam suhu 4°C sampai digunakan penelitian.

3.3 Analisis Protein

Hasil biakan virus segar yang berasal dari TAB yang baru dipanen dimurnikan dan berikutnya dilakukan analisis protein dengan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *western blot*.

3.3.1 SDS-PAGE

Setelah larutan gel pemisah 12 % dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal, kemudian di atasnya ditambahkan butanol sampai mengeras. Butanol kemudian dibuang, dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas Whatman. Proses selanjutnya adalah penambahan stacking gel dan setelah itu dimasukkan comb dan ditunggu sampai betul-betul set. Comb kemudian diambil dan dicuci dengan aquades untuk selanjutnya diberi bufer.

Sampel yang sudah dicampur dengan bufer lisis I/II dipanaskan 42 °C, kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke lubang. *Power supply* dinyalakan dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam dan jika gel sudah sampai ke bawah kemudian dimatikan. Plate dibuka dan dipishkan, selanjutnya dicuci dengan bufer.

Protein gel kemudian ditransfer ke kertas nitroselulose (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Kertas PVDF diinkubasi pada anode bufer II, kemudian disusun 6 sheet kertas absorben dari bufer I, 3 sheet dari bufer II, PVDF dan polyacrylamid dan 6 sheet pada katode bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik 0,8 mA/cm² dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquades dan larutan TBS, untuk kemudian, untuk kemudian di-*blotting*. rosululose dan selanjutnya dilakukan western *blotting*.

3.3.2 Western Blot

Membran PVDF blot diblok dengan 1 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal dan sebagai kontrol direaksikan dengan serum ayam normal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan

TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat anti-chicken yang dilabeli enzim alkaline fosfatase dan diberi substrat 4-NPP, serta diwarnai dengan *western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik dan dihitung berat molekul protein.

3.4 Isolasi Protein dengan Elusi

Gel elektroforesis yang terdapat pita protein HA dipotong sepanjang pita yang melintasi kolom. Potongan gel kemudian dimasukkan dalam kantong nilon dan dimasukkan ke dalam larutan PBS dan dialisis selama 24 jam, serta setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Arus listrik yang dipakai 100 Volt, 50 mA dan 12 W dan selanjutnya protein ditampung dalam tabung mikrosentrifus.

3.5 Pengujian Antigenisitas Protein Hemaglutinin subtype H5N1

Protein HA subtype H5N1 hasil isolasi diuji antigenisitasnya terhadap antibodi anti-HA, dan antibodi *whole molecule* AI dengan teknik *western blot* dan *indirect-ELISA*.

3.6 Pengujian Immunogenisitas Protein Hemaglutinin subtype H5N1

Antibodi anti-HA dari virus AI subtype H5N1 diproduksi pada ayam ras menjelang bertelur dengan cara melakukan imunisasi menggunakan protein HA virus AI subtype H5N1. Imunisasi dilakukan sebanyak 4 kali masing-masing mendapat 50 ug/ml protein HA per ekor ayam dengan interval waktu 2 minggu. Setiap 2 (dua) minggu

pascaimunisasi dilakukan pengambilan darah dan pengumpulan telur untuk selanjutnya antibodinya diuji melawan antigen HA dengan uji HI dan uji *indirect*-ELISA.

3.7 Pembuatan Antigen untuk Uji HI dan ELISA

Virus AI subtipe H5N1 A/chicken/Blitar/2003 digunakan dalam penelitian ini. Virus AI dibiakkan pada telur ayam berembrio (TAB) dan telur itik berembrio (TIB) serta diinaktivasi menggunakan formalin 0,1% (OIE, 2002).

3.8 Uji Hemagglutination Inhibition

Sebanyak 0,025 ml antibodi yang berasal dari ekstraksi kuning telur diletakkan pada sumuran 1 mikroplat, kemudian diencerkan dengan *phosphate buffer saline* (PBS) pada pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan seterusnya sampai 1/1024. Selanjutnya ditambahkan 0,025 ml 4 HA unit antigen AI H5N1 pada semua sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Berikutnya ditambahkan 0,05 ml eritrosit ayam 0,5% pada semua sumuran dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Adanya hambatan aglutinasi menunjukkan adanya antibodi dari kuning telur. Antibodi dinyatakan positif apabila memiliki titer $>2^4$ (OIE, 2002; Beck *et al.*, 2003; Rauber *et al.*, 2004).

3.9 Uji *indirect*-ELISA

Uji ini digunakan untuk mengetahui antigenisitas protein HA terhadap antibodi anti-HA. Sebanyak 5 ug/ml protein HA subtipe H5N1 diikatkan pada mikroplat fase padat dan diinkubasi selama 18 jam suhu 4 C. Mikroplat kemudian dicuci dan diblok dengan skim milk 4%, serta diinkubasi pada suhu 37 C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci

kembali dan ditambahkan antibodi anti-HA yang akan diuji. Pengenceran antibodi anti-HA dilakukan mulai 1/100, 1/200 sampai 1/204.800. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 C, dicuci dan ditambahkan konjugat *anti-chicken* yang berlabel enzim alkalin fosfatase (1:4000) dan diinkubasikan kembali pada suhu 37 C selama 1 jam. Setelah itu ditambahkan substrat p-NPP dan resapan dibaca pada panjang gelombang 405 nm. Antibodi dinyatakan positif apabila memiliki titer > 1600 (OIE, 2002; Beck *et al.*, 2003; Rauber *et al.*, 2004).

3.10 Isolasi Antibodi Anti-HA dari Kuning Telur

Telur yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan ekstraksi kuning telur untuk mendapatkan antibodi dengan menggunakan kloroform. Sebanyak 0,5 ml kuning telur ditambah 0,5 ml PZ pH 7,2 selanjutnya dicampur menggunakan *mixer vortex*, untuk kemudian ditambah 2 ml kloroform. Campuran diinkubasi selama 30-60 menit pada suhu ruang dan setiap lima menit di-*vortex*. Tahap berikut adalah sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Pasca sentrifugasi antibodi yang berada pada fase aquous dibekukan pada suhu -20°C atau siap untuk digunakan sebagai sampel

3.11 Pemurnian Antibodi Anti-hemaglutinin

Antibodi anti-HA diendapkan dengan cara penambahan amonium sulfat jenuh (50%), kemudian dilakukan pemurnian dengan *coloum chromatography*.

3.12 Digesti Antibodi Antihemaglutinin dengan Pepsin

Setelah antibodi anti-HA dimurnikan, kemudian didigesti dengan enzim pepsin untuk menghilangkan bagian Fc. Antibodi yang belum didigesti ataupun yang sudah didigesti (Fab2) selanjutnya dianalisis dengan SDS-PAGE dan *western blot*.

3.13 Karakterisasi Antibodi Antihemaglutinin dengan SDS-PAGE

Karakterisasi antibodi anti-HA dilakukan sama seperti pada karakterisasi protein HA (point 3.3) dengan teknik SDS-PAGE.

3.14 Infeksi Buatan dan Seroterapi Ig Y pada Ayam

Sebanyak 160 ekor ayam kampung umur dua minggu dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing sebanyak 40 ekor. Ayam-ayam tersebut dikandangkan pada kandang *Biosecurity Level-2* (BSL-2) yang bertempat di Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Ayam-ayam tersebut diberi perlakuan, yakni kelompok 1 diberi seroterapi dengan dosis 0 ug/ekor, kelompok 2 dengan dosis 50 ug/ekor, kelompok 3 dengan 100 ug/ekor dan kelompok 4 dengan 200 ug/ekor. Pada masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi empat kelompok kecil, yang akan ditantang dengan virus AI subtype H5N1 yang diberikan sehari setelah pemberian seroterapi, bersamaan dengan seroterapi, sehari sebelum seroterapi dan dua hari sebelum seroterapi. Dosis infeksi yang digunakan adalah 10^5 EID₅₀ per ml per ekor secara oral. Semua kelompok ayam diamati dan dicatat angka mortalitasnya.

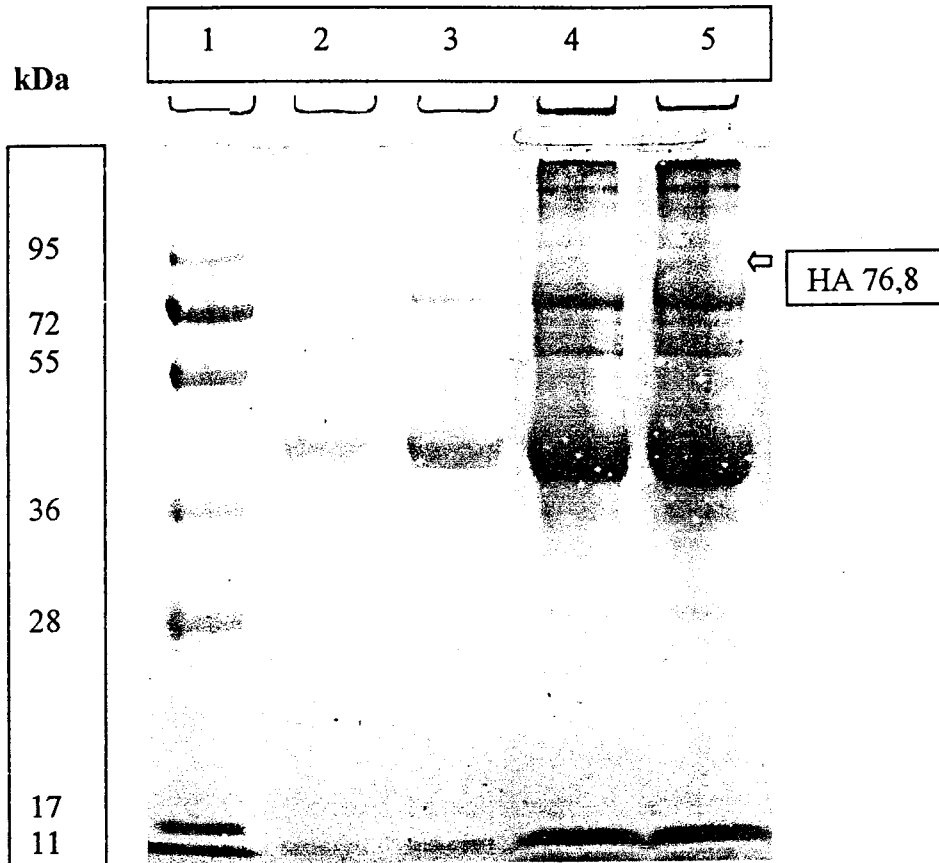
3.16 Analisis Data

Data yang diperoleh pada masing-masing variabel (titer antibodi anti-HA, titer antibodi anti-idiotip dan imunohitokimia) kemudian dianalisis untuk melihat hubungan keterkaitan antara seroterapi dengan infeksi.

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

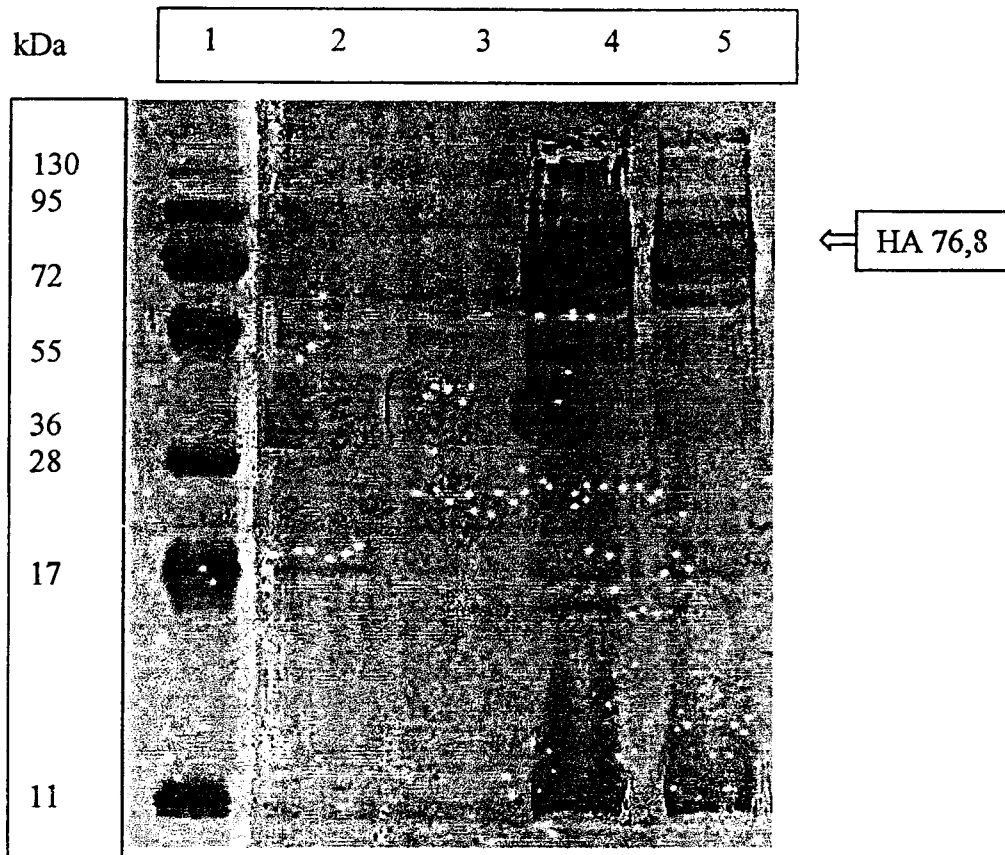
4.1 Karakterisasi Protein Virus Avian Influenza

Virus AI subtype H5N1 isolat Blitar yang dibiakkan pada telur ayam berembrio (TAB) dilakukan karakterisasi untuk melihat macam protein virus. Gambar 4.1 menunjukkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE



Gambar 4.1. Hasil preparasi protein virus Avian Influenza Subtype H5N1 dengan SDS-PAGE. Kolom 1 marker, kolom 2-3 cairan lantois TAB sebagai kontrol, kolom 4-5 virus AI.

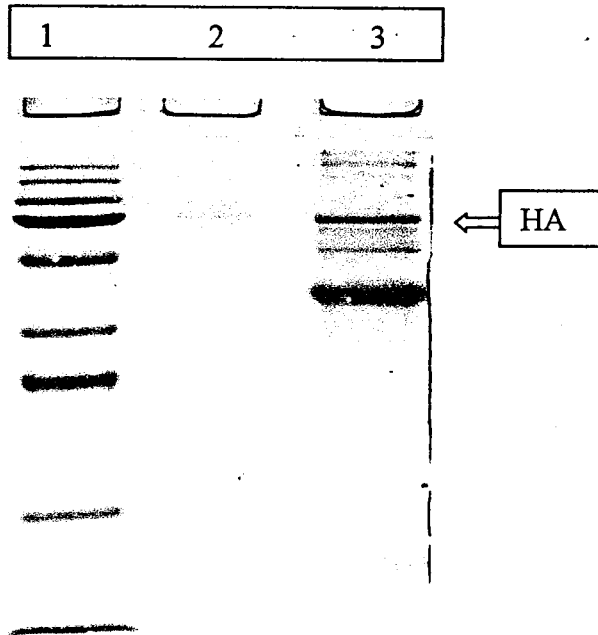
Penentuan protein virus dilakukan dengan teknik Western Blot dengan menggunakan antibodi anti-virus AI subtype H5N1. Gambar 4.2 memperlihatkan gambaran protein virus AI



Gambar 4.2. Hasil karakterisasi protein virus Avian Influenza Subtype H5N1 dengan Western Blot. Kolom 1 marker, 2-3 kontrol, kolom 4-5 virus AI.

Berdasarkan hasil karakterisasi virus AI dapat diketahui, bahwa protein HA memiliki berat molekul 76,8 kDa. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Reid *et al.*, (2002) yang menyatakan, bahwa protein HA memiliki berat molekul 77 kDa. Protein NA memiliki fungsi untuk melepas asam sialat dari permukaan sel pada saat release virus, dari permukaan sel. Fungsi lainnya adalah sebagai penentu inang, penentu patogenitas virus, memfasilitasi proses penetrasi virus ke dalam sel, melepaskan partikel virus yang sudah dibentuk dari sel, mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor asam sialat dan menentukan timbulnya respons imun pada inang (Basler *et al.*, 1999; Horimoto and Kawaoka, 2001; Kobasa *et al.*, 2001; Matrosovich *et al.*, 2004).

Gambar 4.3 memperlihatkan hasil elusi protein HA. Gambar tersebut menunjukkan, bahwa protein HA didapatkan dalam bentuk pita tunggal setelah mengalami proses pemotongan pada gel SDS-PAGE.



Gambar 4.3 Hasil karakterisasi protein HA virus Avian Influenza subtype H5N1 dengan SDS-PAGE.

Protein HA dengan BM 76,8 kDa selanjutnya digunakan untuk pembuatan antibodi anti-HA pada ayam. Hasil pengujian imunogenitas protein HA pada ayam dapat dilihat pada Tabel 4.1. Tabel tersebut menggambarkan, bahwa imunisasi dengan menggunakan protein HA dapat memicu pembentukan antibodi, baik antibodi pada kuning telur maupun pada serum. Titer antibodi spesifik terhadap protein HA yang terbentuk dalam kuning telur relatif lebih rendah bila dibanding titer antibodi dalam serum. Antigenitas antibodi anti-HA terhadap virus AI utuh (*whole molecule*) juga terlihat lebih tinggi dibanding antigenitas anti-HA terhadap protein HA. Berdasarkan

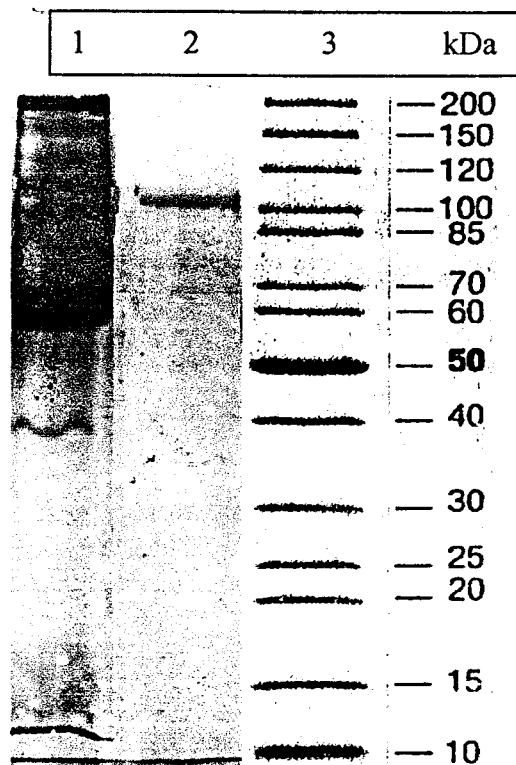
hasil pengujian ini dapat dikatakan, bahwa antibodi anti-HA dari kuning telur memiliki imunogenitas dan antigenitas yang cukup tinggi, sehingga sangat memungkinkan untuk digunakan sebagai bahan seroterapi.

Tabel 4.1 Titer Antibodi Anti-HA terhadap Protein HA Virus AI Subtype H5N1 dari Kuning Telur dan Serum Ayam yang Diuji dengan ELISA

Antigen	Antibodi Minggu ke:				
		0	2	4	8
Protein HA	Kuning Telur	0	400	800	1600
	Serum	0	400	800	3200
Whole Molecule	Kuning Telur	0	800	1600	6400
	Serum	0	1600	3200	6400

4.2 Karakterisasi Antibodi Anti-HA dari Kuning Telur

Pasca pemurnian antibodi anti-HA dengan amonium sulfat, antibodi kemudian didigesti dengan menggunakan pepsin. Imunoglobulin yang ada dalam kuning telur adalah Ig Y (yolk), yang identik dengan Ig G pada mamalia. Ig Y ayam memiliki berat molekul 180 kDa. Digesti dengan pepsin akan menghasilkan F(ab)₂ dengan berat molekul 110 kDa dan bagian Fc yang terfragmentasi menjadi bagian yang sangat kecil. Fragmen F(ab)₂ masih memiliki kemampuan untuk mengikat antigen. Imunoglobulin Y adalah kelas Ig yang terdapat dalam konsentrasi tinggi dalam serum darah dan karena itu memainkan peran utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai oleh antibodi. Ukuran Ig Y yang relatif kecil, sehingga lebih mudah keluar dari pembuluh darah dibandingkan molekul Ig yang lain. Selain di dalam serum Ig Y pada ayam dapat ditemukan dalam kuning telur (Tizard, 1996).



Gambar 4.4 Hasil digesti antibodi anti-HA dari kuning telur dengan pepsin. Kolom 1 antibodi utuh, kolom 2 antibodi terdigesti, 3 Marker.

4.3 Seroterapi pada Ayam

Hasil infeksi buatan pada ayam yang diberi seroterapi dengan antibodi anti-HA dapat dilihat pada Tabel 4.2. Tabel tersebut menggambarkan kondisi ayam pasca pemberian seroterapi dengan Ig Y asal kuning telur dengan dosis yang berbeda dan ditantang dengan virus AI subtype H5N1 pada waktu yang berbeda. Tanpa adanya seroterapi, semua ayam yang diinfeksi dengan virus AI mati pada hari ke-1 sampai ke-9. Sementara itu pada pemberian dosis seroterapi 50, 100 dan 200 $\mu\text{g/ekor}$ yang diberikan sebelum diinfeksi ternyata semua ayam menunjukkan kondisi yang sehat dan tidak ada tanda-tanda sakit atau kematian (tingkat perlindungan 100%). Hal ini menunjukkan bahwa adanya antibodi dalam tubuh sebelum terjadinya proses infeksi dapat melindungi

ayam dari infeksi virus AI sampai dengan 100%. Bila seroterapi diberikan bersamaan dengan proses infeksi, maka daya tahan tubuh hanya berkisar antara 40-60%. Pemberian seroterapi sehari setelah terjadi infeksi masih dapat melindungi ayam sampai dengan 40%, tetapi pemberian seroterapi dua hari pasca infeksi tidak dapat melindungi ayam dari infeksi (tingkat perlindungan 0%).

Tabel 4.2 Daya Tahan Ayam yang diberi Seroterapi dengan Anti-HA (Ig Y) Asal Kuning Telur pada Berbagai Dosis dan Ditantang dengan Virus AI pada Waktu yang Berbeda

Dosis Seroterapi (µg/ekor)	Pemberian Seroterapi Ig Y			
	Sehari sebelum tantang	Bersamaan dengan tantang	Sehari pasca tantang	Dua hari pasca tantang
0	0/10	0/10	0/10	0/10
50	10/10	4/10	4/10	0/10
100	10/10	6/10	4/10	0/10
200	10/10	6/10	4/10	0/10

Keterangan : Jumlah ayam hidup/Jumlah ayam dalam kelompok.

Pasca seroterapi dengan anti-HA dilakukan pengujian untuk membuktikan timbulnya antibodi anti-idiotipik atau anti-anti-HA pada ayam-ayam sehat setelah diinfeksi dengan virus AI subtype H5N1. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3. Tabel 4.3 menunjukkan respons ayam terhadap antibodi anti-HA. Sampai penelitian berakhir kurang lebih 14 hari pasca seroterapi, tidak dideteksi adanya antibodi anti-idiotipik (anti-anti-HA). Hal ini disebabkan seroterapi berupa antibodi anti-HA yang diberikan pada ayam berasal dari spesies yang sama, sehingga tidak memunculkan antibodi anti-anti-HA. Seperti diketahui imunoglobulin dapat bertindak sebagai antigen apabila diberikan pada spesies yang berbeda. Bagian hipervariabel dari imunoglobulin

merupakan idiotipik yang apabila diinjeksikan pada spesies berbeda akan mampu memicu timbulnya antibodi anti-idiotipik (Tizard, 1996).

Tabel 4.3 Hasil Pengujian Antibodi Anti-idiotipik pada Ayam Pasca Seroterapi dengan Antibodi Anti-HA dengan Teknik ELISA

Dosis Seroterapi ($\mu\text{g}/\text{ekor}$)	7	14
0	0	0
50	0	0
100	0	0
200	0	0

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan :

1. Protein HA virus Avian Influenza subtype H5N1 memiliki berat molekul sebesar 76,8 kDa, mampu memicu pembentukan antibodi dan mampu bereaksi dengan antibodi anti-HA secara spesifik.
2. Antibodi anti-HA F(ab)₂ dengan berat molekul 110 kDa. memiliki kemampuan mengikat antigen dan mampu melindungi ayam dari infeksi virus AI subtype H5N1 sampai pada tingkat perlindungan sebesar 100%.
3. Mekanisme perlindungan terhadap infeksi virus AI subtype H5N1 terjadi melalui pemblokiran terhadap reseptor reseptor *SA alfa 2,3 gal* .
4. Tidak ada efek samping berupa timbulnya antibodi anti-idiotipik atau anti-anti-HA akibat pemberian seroterapi pada ayam.

5.2 saran

Berdasar hasil penelitian ini dapat disarankan :

1. Pemberian seroterapi antibodi anti-HA pada ayam yang terinfeksi virus AI paling lambat diberikan sehari setelah terjadi infeksi atau gejala klinis mulai terlihat.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui daya proteksi antibodi anti-HA pada kasus AI di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74 : 3-17.
- Anwar, T., S.K. Lal, and A.V. Khan. 2006. In silico analysis of genes nucleoprotein, neuraminidase and haemagglutinin : A comparative study on different strains of influenza (A) (Bird Flu) virus subtype H5N1. In *Silico Biology* 6 (0015).
- Basler, C.F., A. Garcia-Sastre, and P. Palese. 1999. Mutation of neuraminidase cysteine residues yields temperature-sensitive influenza viruses. *J. Virol* 73 (10) : 8095-8103.
- Beard, C.W. 2003. Avian Influenza (Fowl Plague). Shoutheast Poultry Research Laboratory, Athens, GA.
- Beck, J.R., D.E. Swayne, S. Davison, S. Casavant, and C. Gutierrez. 2003. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. *Avian Dis.* 47 (3 Suppl) : 1196-1199.
- Covalab. 2004. Antibody Purification. Covalab UK Ltd. <http://www.covalab.co.uk/>
- Eder, W. 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in chicken of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 113 : 482-488.
- FKH Unair. 2006. Model Vaksinasi Virus Avian Influenza pada Ayam, Unggas Air dan Burung Merpati. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallenstens, T.M. Bestebroer, 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.
- Horimoto, T, and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev.* 14 : 129-149.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nature Immunol* 5 (10) ; 987-995.
- Kobasa, D., K. Well, and Y. Kawaoka. 2001. Amino acid responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase : relationship to growth in the duck intestine. *J. Virol.* 75 : 11773-11780.
- Manual Idexx. 2003. Avian Influenza.
- Matrosovich, M.N., T.Y. Matrosovich, t. Gray, N.A. Roberts, and H.D. Klenk. 2004. Neuraminidase is important for initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.* 78 : 12665-12667.
- OIE. 2002. Highly pathogenic avian influenza. World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/>
- Rauber, R.H., M.L. Flores, C.E. Pereira, and M. Grigulo. 2004. ELISA evaluation of the levels of antibodies against infectious bronchitis virus in laying hens using egg yolk as substrate. *Rev Bras Ciencia Avic.* 6 (2) Campinas abr./jun.

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 : 101717-10723.