

- AVIAN INFLUENZA
- NEURAMINIDASE



LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2007

KKC
KK
LP 27/109
SU
K

KARAKTERISASI PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS AVIAN INFLUENZA
SEBAGAI ANTIGEN DIAGNOSTIK UNTUK PENENTU SUBTIPÉ H5N1

Dr. Suwarno, MSi., drh.
Adi Prijo Rahardjo, MSi., drh.
Nanik Sianita, SU., drh.



LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Desentralisasi Penelitian
Nomor : 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007
Tanggal 29 Maret 2007
Nomor Urut : 08

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2007



UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL

1. a. Judul Penelitian : KARAKTERISASI PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS AVIAN INFLUENZA SEBAGAI ANTIGEN DIAGNOSTIK UNTUK PENENTU SUBTIPE H5N1
- b. Macam Penelitian : Fundamental
- c. Kategori : I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian:
 - a. Nama Lengkap : Dr. Suwarno, MSi., drh.
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. Pangkat/Golongan dan NIP : Pembina/IVa dan 131836994
 - d. Jabatan Sekarang : Lektor Kepala
 - e. Fakultas : Kedokteran Hewan
 - f. Universitas : Airlangga
 - g. Bidang Ilmu yang Diteliti : Biologi Molekuler
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Biologi Molekuler Veteriner FKH Unair
5. Kerjasama dengan Instansui Lain
 - a. Nama instansi : -
 - b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 8 (delapan) bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp. 20.000.000,- (dua puluh juta rupiah).

Surabaya, 28 Desember 2007.

Mengetahui :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga,

Prof. H. Romziah Sidiq, PhD., drh.
NIP. 130687305

Ketua Peneliti,

Dr. Suwarno, MSi., drh.
NIP. 131836994

Mengetahui :

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
NIP. 130701125

RINGKASAN

KARAKTERISASI PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS AVIAN INFLUENZA SEBAGAI ANTIGEN DIAGNOSTIK UNTUK PENENTU SUBTIPE H5N1 (Suwarno, Adi Prijo Rahardjo dan Nanik Sianita. 2008. 23 halaman).

Virus AI subtype H5N1 adalah virus RNA yang termasuk ke dalam family *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus AI subtype H5N1 dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia, termasuk manusia. Virus AI subtype H5N1 tersusun atas 8 segmen gen yang menyandi 10 macam protein. Di antara kesepuluh protein, protein NA memiliki beberapa fungsi penting, 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.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein NA virus AI subtype H5N1, antigenisitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9, serta reaktivitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9.

Virus AI subtype H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil isolasi dari daerah wabah di Kabupaten Blitar. Virus yang berasal dari *swab* tracheal dan cloacal atau organ internal (paru, trachea, limpa, ginjal, otak, atau pankreas) diisolasi pada telur ayam berembrio (TAB) atau telur itik berembrio (TIB) dan diidentifikasi terhadap antibodi anti-H5N1 dengan uji HI. Protein NA virus AI subtype H5N1 kemudian dikarakterisasi dengan teknik SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul. Antigenisitas protein NA ditentukan berdasarkan reaktivitas terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 dengan teknik *western blot* dan *indirect-ELISA*.

Hasil penelitian menunjukkan, bahwa protein NA virus AI subtype H5N1 memiliki berat molekul 53,5 kDa. Protein NA yang berasal dari alantois TIB terlihat lebih banyak konsentrasinya dibanding dengan yang berasal dari alantois TAB. Hasil identifikasi protein dengan *western blot* terlihat, bahwa protein NA virus AI subtype H5N1 hanya dikenali oleh antibodi anti-H5N1 dan tidak dikenali oleh antibodi anti-

H5N9 atau anti-H5N2. Antigenisitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9 menunjukkan adanya perbedaan. Protein NA bereaksi secara spesifik dengan antibodi anti-H5N1 dan memberikan nilai OD tertinggi dibanding reaksi terhadap antibodi anti-H5N2 atau anti-H5N9. Antibodi anti-H5N1 asal itik, angsa maupun ayam sama-sama menunjukkan nilai OD yang seragam, yakni antara 1,780 – 1,894. Sementara itu antibodi anti-H5N1 dan anti-H5N9 asal itik, angsa maupun ayam, memberikan nilai OD yang lebih rendah, yakni berkisar antara 0,508 – 0,645. Hasil pengujian dengan teknik *indirect-ELISA* ini identik dengan hasil pengujian antigenisitas protein NA dengan *western blot*. Hal ini berbeda dengan reaksi antara *whole molecule* virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi, baik anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9, semuanya menunjukkan nilai OD yang tinggi dan tidak dapat dibedakan afinitas antar ketiga jenis antibodi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan : 1) Protein neuraminidase virus avian influenza A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 memiliki berat molekul 53,5 kDa; 2) Antigenisitas protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 berbeda dengan subtype H5N2 dan H5N9; dan 3) Protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 secara spesifik dapat digunakan untuk membedakan serum hasil vaksinasi antara antibodi anti-H5N1 dan bukan anti-H5N1.

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah : 1) Protein NA virus AI A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 disarankan dapat digunakan sebagai antigen diagnosis untuk membedakan serum hasil vaksinasi antara antibodi anti-H5N1 dan bukan anti-H5N1 dan 2) Perlu penelitian lebih lanjut untuk pembakuan protein NA virus AI A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 sebagai sarana diagnosis dengan teknik *indirect-ELISA*.

(LPPM Unair, Kontrak Nomor : 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tanggal 29 Maret 2007).

KATA PENGANTAR

Avian Influenza (AI) merupakan penyakit zoonosis yang paling ditakuti saat ini, oleh karena itu berbagai penelitian telah dicoba untuk menyibak lebih jauh tentang peranan virus AI dalam menimbulkan penyakit, baik pada unggas atau manusia. Penelitian di bidang Biologi Molekuler banyak bermanfaat untuk mengetahui peran protein atau komponen lain di dalam menimbulkan respons imun, sehingga dengan demikian usaha untuk penanggulangan infeksi virus AI dapat dicegah sedini mungkin.

Penelitian ini mengupas tentang molekuler virus AI, utamanya peran protein neuraminidase (NA) virus AI subtype H5N1 di dalam menimbulkan respons imun dan adanya reaksi silang terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9. Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat memberikan masukan dalam hal pengujian diagnosis secara serologis untuk menentukan antibodi terhadap protein NA, apakah berasal dari subtype H5N1, H5N2 atau H5N9, mengingat banyak vaksin yang beredar di Indonesia berasal dari ketiga subtype tersebut. Selain itu untuk memudahkan para peneliti di dalam mendiagnosis secara serologis, mengingat sampai saat ini virus AI yang menginfeksi adalah berasal dari subtype H5N1.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar / DP2M Ditjen Dikti Depdiknas, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unair dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Akhirnya semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berhubungan dengan teknik karakterisasi protein virus AI. Manfaat yang dapat diperoleh dari hasil penelitian ini mengarah pada upaya pembuatan kit diagnostik untuk dapat membedakan antibodi yang berasal dari subtype H5N1 atau bukan. Penulis banyak mengharap kritik dan saran demi perbaikan dari makalah ini.

Surabaya, Desember 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kejadian AI di Dunia	5
2.2 Subtype Virus AI	5
2.3 Diagnosis AI	8
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat Penelitian	10
IV. METODE PENELITIAN	12
4.1 Sampel Virus	12
4.2 Analisis Protein	12
4.3 Isolasi Protein dengan Elusi	14
4.4 Pengujian Antigenitas Protein Neuraminidase subtype H5N1	14
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	20
6.1 Kesimpulan	20
6.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
5.1 Antigenisitas Protein Neuraminidase Virus Avian Influenza Subtype H5N1 terhadap Serum Hasil Vaksinasi Beberapa Jenis Unggas Berdasarkan Nilai <i>Optical Density</i> dengan Teknik <i>Indirect-ELISA</i>	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
2.1 Struktur virus AI dan komponen protein	6
2.2 <i>Antigenic shift</i> dan <i>Antigenic drift</i> virus AI	7
5.1 Hasil preparasi protein virus avian influenza subtype H5N1 dengan SDS-PAGE	16
5.2 Hasil identifikasi protein virus avian influenza subtype H5N1 dengan western blot	17

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Avian influenza (AI) yang mewabah sejak pertengahan tahun 2003, membuat Indonesia menjadi satu-satunya negara dengan angka kejadian dan kematian tertinggi di dunia. Data di Indonesia per 11 Januari Nopember 2008 menunjukkan, bahwa dari 117 kasus AI pada manusia, 94 di antaranya meninggal atau sekitar 80,3% (WHO, 2008). Sementara itu jumlah kerugian di sektor perunggasan sudah tidak terhitung jumlahnya.

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. 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 membrane endosomal inang. (Suzuki and Nei, 2002). Sementara itu protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M1 tidak hanya sebagai komponen structural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma sel tropisme. Di lain pihak, protein M2 bersama dengan protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002).

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).

Diagnosis yang selama ini dilakukan untuk menentukan subtype H5N1 virus AI yaitu dengan amplifikasi gen HA dan NA dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik atau secara sekuensing genetik, namun metode tersebut memerlukan peralatan dan bahan yang cukup mahal. Sementara itu secara serologik dengan uji *hemagglutination inhibition* (HI), *immunodifusion* (ID) atau *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) hanya dapat menentukan subtype H5 atau tipe A

saja. Uji HI-biasanya menggunakan antigen HA yang berasal dari subtipe H5N1, sedangkan uji ID dan ELISA menggunakan antigen M atau NP yang dimiliki oleh semua virus AI tipe A (OIE, 2002; Krafft *et al.*, 2005; Ungchusak *et al.*, 2005; Suwarno, 2006; Suwarno dkk., 2006). Secara serologik virus AI subtipe H5N1 hanya dapat dideteksi dengan menggunakan antibodi anti-H5 dan anti-N1. Dengan teknik *neuraminidase assay* dan *neuraminidase inhibiton assay* (NAI) dapat digunakan untuk membedakan subtipe NA (WHO, 2004), tetapi cara ini mahal dan tidak praktis.

Ikatan antara protein NA dengan molekul antibodi (imunoglobulin) dapat dijadikan dasar pada diagnosis AI. Protein NA dengan berat molekul 48-63 kDa memiliki 18-21 jumlah epitop dengan pH protein berkisar antara 5,92 – 6,21. Berat molekul, jumlah epitop dan pH protein ini cukup memadai untuk menimbulkan respons imun secara alami maupun vaksinasi. Tiga atau empat macam epitop protein NA secara spesifik dapat berikatan dengan antibodi yang dihasilkan tubuh (Matrosovich *et al.*, 2004; Nidom, 2005).

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).

Dengan mengisolasi dan menganalisis protein NA virus AI subtype H5N1 yang mempunyai kemampuan antigenik tinggi, terutama ikatannya terhadap antibodi pada

unggas yang terinfeksi subtype H5N1, merupakan dasar dari penelitian ini. Mengingat banyaknya subtype virus AI, di mana struktur antigenik protein NA pada kesembilan subtype (N1-9) memiliki tingkat heterologi yang tinggi, maka dengan isolasi dan karakterisasi protein NA yang berasal dari subtype H5N1 akan didapatkan bahan dasar sebagai komponen kit diagnostik yang dapat mengenali semua antibodi anti-H5N1, baik yang berasal dari infeksi alam atau hasil vaksinasi. Dengan demikian protein NA dapat digunakan sebagai komponen diagnostik, khususnya terhadap aplikasi dengan uji ELISA sebagai pembeda hasil vaksinasi atau untuk mendeteksi antibodi hasil infeksi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang masalah tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah protein NA dapat dikarakterisasi berdasarkan berat molekulnya ?
2. Apakah terdapat perbedaan antigenesitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9 ?
3. Apakah protein NA virus AI subtype H5N1 dapat dimanfaatkan untuk membedakan serum hasil vaksinasi dengan subtype H5N1, H5N2 dan H5N9 ?

II. TINJAUAN PUSTAKA

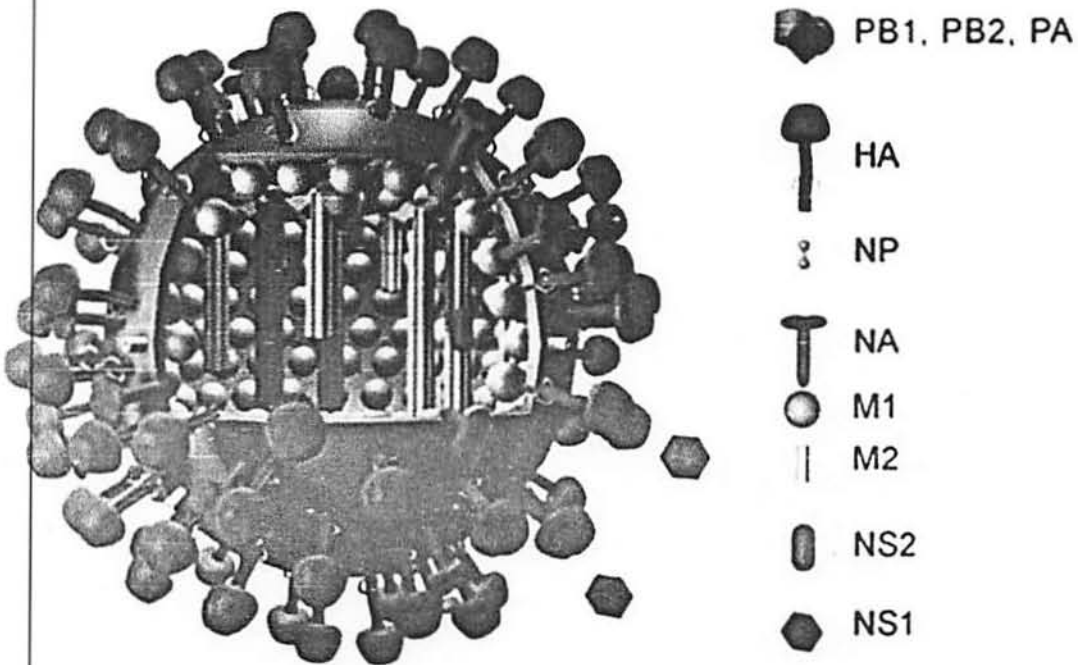
2.1 Kejadian AI di Dunia

Sejak wabah AI meletup di Hongkong pada tahun 1997, sampai dengan tahun 2008 terdapat 14 negara di Asia dan Afrika (Azerbaijan, Kamboja, China, Djibouti, Egypt, Indonesia, Iraq, Lao *People's Democratic Republic*, Myanmar, Nigeria, Pakistan, Thailand, Turki dan Vietnam) melaporkan adanya kejadian penyakit pada manusia dan unggas. Indonesia menduduki urutan tertinggi dalam kasus kematian pada manusia. Total kejadian AI di dunia adalah sebanyak 349 kasus dan 216 orang di antaranya meninggal (WHO, 2008).

2.2 Subtype Virus AI

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 (LP)AI (*low pathogenic avian influenza*). Secara alami kelompok LP)AI dapat berubah menjadi HPAI atau sebaliknya. Perubahan ini dapat terjadi akibat adanya mutasi maupun *reassortment genetic* yang mengarah pada terjadinya *antigenic drift* dan *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)

Virus AI dikenal sebagai virus yang gampang mengalami mutasi, yaitu perubahan yang menyangkut nukleotida atau asam amino di dalam gen. Pengaruh perjalanan waktu

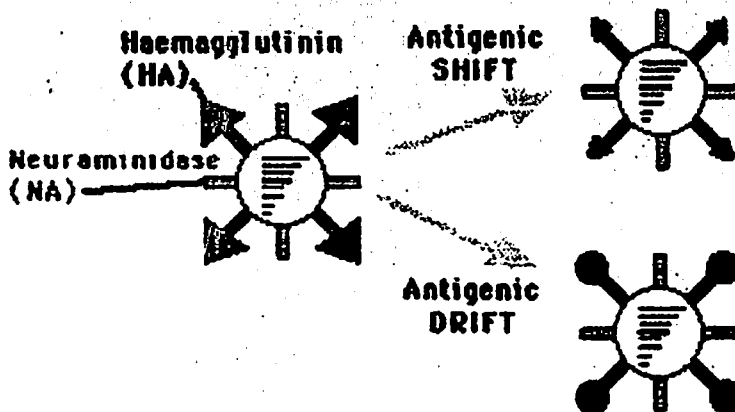


Gambar 2.1. Struktur virus AI dan komponen protein. PB : *polybasic*, PA : *polyacidic*, HA : *hemagglutinin*, NA : *neuraminidase*, NP : *nucleoprotein*, M : *matrix*, NS : *non-structural*.

dan perbedaan inang telah menyebabkan perubahan tersebut terjadi. Sebagai contoh, subtipe H5N1 yang menginfeksi manusia di Hongkong 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 Hongkong, tetapi gen HA muncul sebagai donor pada H5N1 angsa di Cina 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).

Mutasi pada virus AI mengarah pada terjadinya *antigenic drift* dan *antigenic shift*. Peristiwa mutasi pada virus AI sering terjadi karena enzim polymerase RNA yang

berperanan dalam replikasi genom virus tidak memiliki mekanisme *proof reading*. Pada virus AI, mutasi titik terjadi pada *antigenic sites* yang dikenali oleh antibody 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 antibody yang diinduksi oleh antigen virus sebelumnya Lin *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 2000).



Gambar 2.2 Skema *Antigenic shift* dan *Antigenic drift* virus AI.

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 genetic di antara virus influenza A apabila 2 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).

2.3 Diagnosis AI

Penegakan diagnosis AI dapat dilakukan berdasarkan isolasi dan karakterisasi virus. Isolasi virus yang sering dilakukan adalah menggunakan telur ayam berembrio (TAB), *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) atau *African green monkey kidney Vero cell line*. Secara serologik virus AI dapat diidentifikasi dengan uji *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *hemagglutination inhibition* (HI), *immunodifusion* (ID), imunohistokimia atau *western blot*; sedangkan konfirmasi adanya virus dilakukan dengan *convensional reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR), *real time RT-PCR* atau sekuensing genetik (OIE, 2002; Krafft *et al.*, 2005; Ungchusak *et al.*, 2005). Namun demikian, kegagalan diagnosis dengan teknik PCR dapat saja terjadi akibat ketidakcocokan primer yang digunakan atau telah terjadi mutasi pada virus AI.

Dalam diagnosis AI peran protein hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang terdapat pada amplop virus menjadi tumpuan dasar pada uji HI. Kedua protein ini merupakan target awal dalam pembentukan antibodi inang. Pada awal infeksi, protein ini akan berikatan dengan reseptor sel inang dan melepaskan ribonukleoprotein (RNP). Akibat aktivasi prekursor HA (HA0) 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). Sementara itu protein nukleokapsid dan matrix yang dilepas kemudian, menjadi acuan untuk membentuk antibodi yang dapat dideteksi dengan uji ID (OIE, 2002). Protein matrix (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 sel tropisme. Di lain pihak, protein M2 bersama dengan protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002).

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan memperoleh protein neuraminidase (NA) virus AI yang berasal dari subtipe H5N1 yang dapat dibakukan guna pembuatan *kit diagnostik*, dapat digunakan untuk menguji status kekebalan pada ayam dengan membedakan antibodi yang diperiksa terhadap berbagai subtype H5.

3.1.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan : 1) mengetahui berat molekul dan mengisolasi protein NA virus AI subtype H5N1, 2) mengetahui antigenisitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9, dan 3) mengetahui reaktivitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini dapat dimanfaatkan, baik secara teoritis maupun praktis.

3.2.1 Manfaat Teoritis

Secara teoritis hasil dari penelitian ini dapat dijadikan sebagai tambahan acuan pengetahuan dengan mengetahui karakter protein NA virus AI subtype H5N1 isolat Indonesia.

3.2.2 Manfaat Praktis

Secara praktis hasil dari penelitian ini dapat dimanfaatkan bagi para peneliti, khususnya untuk pengujian antibodi terhadap berbagai subtype H5 yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai sarana diagnosis.

IV. METODE PENELITIAN

4.1 Sampel Virus

Virus AI subtype H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil isolasi dari daerah wabah di Kabupaten Blitar. 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.

4.2 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*.

4.2.1 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*. roselulose dan selanjutnya dilakukan *western blotting*.

4.2.2 *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/kelinci normal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* atau *anti-chicken* yang dilabel enzim alkalin 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.

4.3 Isolasi Protein dengan Elusi

Gel elektroforesis yang terdapat pita protein NA dipotong sepanjang pita yang melintasi kolom. Potongan gel kemudian dimasukkan dalam kantong nilon dan dimasukkan ke dalam larutan PBS dan didialisis 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.

4.4 Pengujian Antigenisitas Protein Neuraminidase subtype H5N1

Protein NA subtype H5N1 hasil isolasi diuji antigenisitasnya terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 dengan teknik *western blot* dan *indirect-ELISA*.

4.4.1 Produksi Antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9

Antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 diproduksi pada ayam ras, itik dan angsa dengan cara melakukan vaksinasi menggunakan vaksin AI inaktif subtype H5N1, H5N2 dan H5N9. Vaksinasi dilakukan sebanyak 4 kali masing-masing satu dosis/ekor ayam menggunakan vaksin AI inaktif dengan interval waktu 2 minggu. Dua minggu pascavaksinasi terakhir dilakukan pengambilan darah untuk selanjutnya antibodinya diuji melawan antigen NA dengan uji *indirect-ELISA*.

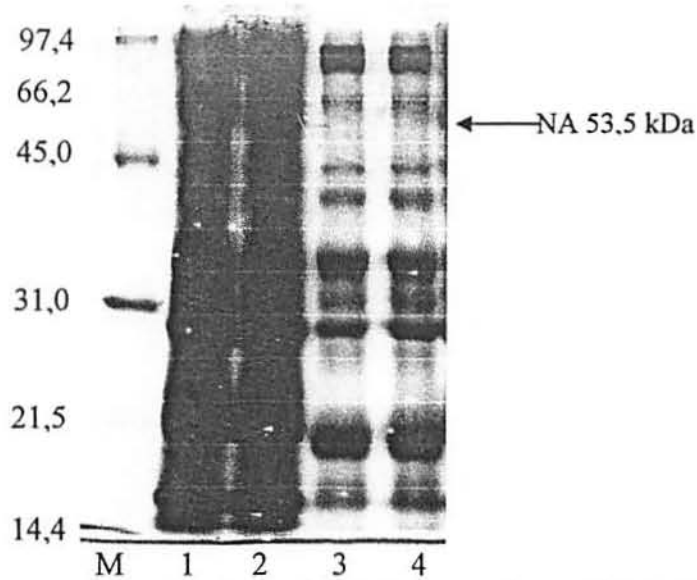
4.4.2. Uji *Indirect-ELISA*

Uji ini digunakan untuk mengetahui antigenisitas protein NA terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9. Sebanyak 5 ug/ml protein NA subtype 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-H5N1, anti-H5N2 atau anti-H5N9 yang akan diuji. 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.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

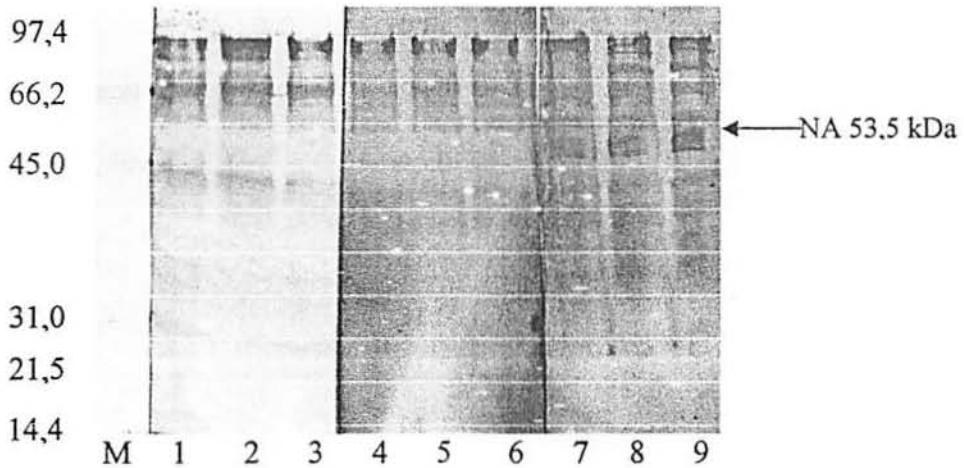
Hasil preparasi protein virus avian influenza A/Ck/Indonesia//BI/2003 subtype H5N1 ditampilkan pada Gambar 5.1. Pada SDS-PAGE, tampak protein NA virus AI subtype H5N1 dengan berat molekul 53,5 kDa terletak pada marker protein antara 45 - 66,2 kDa. Protein NA yang berasal dari alantois TIB (kolum 1 dan 2) terlihat lebih banyak konsentrasinya dibanding dengan yang berasal dari alantois TAB (kolom 3 dan 4). Hasil titrasi virus AI pada alantois TIB menunjukkan titer virus lebih tinggi dibanding titer virus pada alantois TAB (Data tidak dipublikasi).



Gambar 5.1 Hasil preparasi protein virus avian influenza subtype H5N1 dengan SDS-PAGE. Kolom 1 dan 2 virus AI asal alantois telur itik, 3 dan 4 virus AI asal alantois telur ayam, M marker.

Gambar 5.2 menyajikan identifikasi protein dengan *western blot*. Pada *western blot*, protein NA virus AI subtype H5N1 hanya dikenali oleh antibodi anti-H5N1 (kolom 7-9) dan tidak dikenali oleh antibodi anti-H5N9 (kolom 1-3) atau anti-H5N2 (kolom 4-6). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan antigenesitas virus AI antar protein NA subtype H5. Perbedaan antigenesitas, antara lain ditentukan oleh struktur nukleotida suatu molekul protein, jumlah dan jenis epitop, serta afinitas antibodi. Antara protein NA dari subtype

H5N1, H3N2 dan H7N7 tidak terdapat kesamaan. Antibodi anti-N1 hanya mengenali protein N1, tetapi tidak mengenali protein N2 atau N7 (Basler *et al.*, 1999). Mutasi pada gen NA menyebabkan subtype H1N1, H3N2 dan H5N1 menjadi resisten terhadap zanamivir dan oseltamivir (McKimm-Breschkin *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2006).



Gambar 5.2 Hasil identifikasi protein virus avian influenza subtype H5N1 dengan western blot. Kolom 1-3 identifikasi dengan serum anti-H5N9, 4-6 dengan serum anti-H5N2, 7-9 dengan serum anti-H5N1, M marker.

Hasil pengujian antigenisitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9 dapat dilihat pada Tabel 5.1. Protein NA bereaksi secara spesifik dengan antibodi anti-H5N1 dan memberikan nilai OD tertinggi dibanding reaksi terhadap antibodi anti-H5N2 atau anti-H5N9. Antibodi anti-H5N1 asal itik, angsa maupun ayam sama-sama menunjukkan nilai OD yang seragam, yakni antara 1,780 – 1,894. Sementara itu antibodi anti-H5N1 dan anti-H5N9 asal itik, angsa maupun ayam, memberikan nilai OD yang lebih rendah, yakni berkisar antara 0,508 – 0,645. Hasil pengujian dengan teknik *indirect-ELISA* ini identik dengan hasil

pengujian antigenisitas protein NA dengan *western blot*. Hal ini berbeda dengan reaksi antara *whole molecule* virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi, baik anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9, semuanya menunjukkan nilai OD yang tinggi dan tidak dapat dibedakan afinitas antar ketiga jenis antibodi.

Tabel 5.1 Antigenisitas Protein Neuraminidase Virus Avian Influenza Subtype H5N1 terhadap Serum Hasil Vaksinasi Beberapa Jenis Unggas Berdasarkan Nilai *Optical Density* dengan Teknik *Indirect-ELISA*

Antibodi	Antigen	Itik	Angsa	Ayam
Anti-H5N1	NA	1,780	1,804	1,894
	WM	2,341	2,229	2,411
Anti-H5N2	NA	0,583	0,582	0,645
	WM	2,389	2,380	2,373
Anti-H5N9	NA	0,513	0,545	0,508
	WM	2,172	2,177	2,164
Kontrol	NA	0,143	0,147	0,142
Negatif	WM	0,347	0,342	0,328

Keterangan : NA neuraminidase, WM *whole molecule*

Hasil vaksinasi unggas (ayam buras, itik, entok, angsa dan merpati) yang dilakukan oleh FKH Unair (2006) dengan menggunakan vaksin H5N1, H5N2 dan H5N9, diperoleh gambaran bahwa semua vaksin dapat memicu pembentukan antibodi. Antibodi hasil vaksinasi dengan ketiga jenis vaksin, semuanya bereaksi positif terhadap *whole molecule* protein virus AI subtype H5N1. Penggunaan *whole molecule* protein virus AI subtype H5N1 ternyata tidak dapat membedakan serotype yang diuji.

Berbeda dengan kit ELISA yang beredar di pasaran, di mana kit ini menggunakan antigen matrix dan nukleoprotein virus AI, sehingga uji tersebut hanya dapat menskrining

antibodi yang berasal dari type A dan tidak dapat mendeteksi serotypenya. Hampir semua type A dapat terdeteksi dengan teknik ini, seperti H7N2, H1N7, H7N3, H13,N6, H5N9, H11N6, H3N8, H9N2, H5N2, H4N8, H10N7, H2N9, H8N4, H14N5, H6N5, H12N5 dan H5N1 (Manual Idexx, 2003). Pada penelitian ini teknik *indirect*-ELISA dapat memberikan nilai spesifisitas yang tinggi berdasarkan reaksi protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1 dan dapat digunakan untuk membedakan serotype antibodi hasil vaksinasi, antara antibodi anti-H5N1 dan bukan anti-H5N1.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan :

1. Protein neuraminidase virus avian influenza A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 memiliki berat molekul 53,5 kDa.
2. Antigenisitas protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 berbeda dengan subtype H5N2 dan H5N9.
3. Protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 secara spesifik dapat digunakan untuk membedakan serum hasil vaksinasi antara antibodi anti-H5N1 dan bukan anti-H5N1.

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah :

1. Protein NA virus AI A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 disarankan dapat digunakan sebagai antigen diagnosis untuk membedakan serum hasil vaksinasi antara antibodi anti-H5N1 dan bukan anti-H5N1.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk pembakuan protein NA virus AI A/Ck/BI/Indonesia/2003 subtype H5N1 sebagai sarana diagnosis dengan teknik *indirect-ELISA*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74 : 3-17.
- Arwar, 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 Plaque)*. Shoutheast Poultry Research Laboratory, Athens, GA.
- FKH Unair. 2005. *Surveilans dan epidemiologi virus avian influenza di Pulau Sulawesi*. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- 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. Wallenstems, 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.
- Hoffmann, 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 derivative 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.
- 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.
- Kraft, A.E., K.L. Russell, A.W. Hawksworth, S. McCall, M. Irvine, L.T. Daum, J.L. Taubenberger. 2005. Evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J Clin Microbiol* 43 : 1768-1775.49-4354.

- Lin, Y.P., L.L. Shu, S. Wright, W.J. Bean, G.B. Sharp, K.F. Shortridgw, and R.G. Webster. 1994. Analysis of the influenza virus gene pool of avian species from Southern China. *Virology* 198 : 557-566.
- Lipatov, A.S., E.A. Govorkova, R.J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon, and R.G. Webster. 2004. Influenza : emergence and control. *J Virol* 78 : 8951-8959.
- 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.
- McKimm-Breschkin, J., T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, and M. Zambon. 2003. Neuraminidase analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy.* 47 (7) : 2264-2272.
- Nidom, C.A. 2005. Analisis molekuler genoma virus avian influenza H5N1 di Indonesia. Disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.
- OIE. 2002. Highly pathogenic avian influenza. World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/>
- 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.
- Russell, R.J., I.F. Haire, D.J. Stevens, P.J. Collins, Y.P. Lin, G.M. Blackburn, A.J. Hay, S.J. Gamblin, and J.J. Skehel. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443 : 45-49 (September)
- Sandbulte, M., G.S. Jimenez, A.C.M. Boon, L.R. Smith, J.J. Treanor, and R.J. Webby. 2007. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed human. *PLoS Med.* 4(2) : February.
- Suwarno. 2006. Penggunaan teknik PCR untuk diagnosis virologik (Rabies dan Avian Influenza). Pelatihan Teknik PCR untuk Diagnosis Virologik. BPPV Regional III Tanjung Karang. 17-21 Januari.
- Suwarno, A.P. Rahardjo, Fauziah, dan E.A. Srihanto. 2006. Karakterisasi virus AI dengan uji serologic dan *reverse transcriptase polymerase chain reaction*. *MKH* 22 (2) : 74-76.

- Suzuki, Y., and M. Nei. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 19 : 501-509.
- Swayne, D.E. and D.L. Suarez. 2003. Biology of avian influenza specially the change of low pathogenicity virus to high pathogenecity. *Proc Latin American Poultry Congress*, Oct.7.
- WHO. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. The World Heath Organization Global Influenza Program Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* (serial in the Interned). Available from http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol_11_no_10/05-0644.htm
- WHO. 2008. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 11 January.

