

PERTANIAN

LAPORAN PENELITIAN KATEGORIS NASIONAL

TAHUN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S. RABAYA

**KORELASI INFEKSI H5N1 PADA MONYET (*Macaca fascicularis*) DENGAN
AKTIVITAS TIROSIN KINASE SPERMATOZOA MELALUI HAMBATAN
PEMBENTUKAN ENERGI DALAM MITOKONDRIA**

KETUA PENELITIAN :

Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009
sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang
Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2009**

LAPORAN PENELITIAN STRATEGIES NASIONAL

TAHUN ANGGARAN 2009



kk
kfc
LP.43/10
Mad
k

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**KORELASI INFEKSI H5N1 PADA MONYET (*Macaca fascicularis*) DENGAN
AKTIVITAS TIROSIN KINASE SPERMATOZOA MELALUI HAMBATAN
PEMBENTUKAN ENERGI DALAM MITOKONDRIA**

KETUA PENELITI :

Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009
sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang
Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2009**

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Penelitian :

KORELASI INFEKSI H5N1 PADA MONYET (*Macaca fascicularis*) DENGAN AKTIVITAS TIROSIN KINASE SPERMATOZOA MELALUI HAMBATAN PEMBENTUKAN ENERGI DALAM MITOKONDRIA

2. Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap	: Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., MSi.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan	: Pembina / IV a
d. NIP	: 131 837 006
e. Jabatan Struktural	: Kepala Bagian Akademik
f. Jabatan Fungsional	: Lektor Kepala
g. Fakultas/Jurusan	: Kedokteran Hewan
h. Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
i. Alamat	: Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya
j. Telepon/Faks	: (031) 5993016 / (031) 5993015
k. Alamat Rumah	: Pondok Sedati Asri H-46 Sidoarjo
l. Telepon/Faks/E-mail	: (031)8910441 / - / spantja@unair.ac.id
3. Jangka Waktu Penelitian	: 1 tahun
4. Pembiayaan	
a. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti	: 100.000.000,-
b. Jumlah biaya dari sumber pembiayaan lain	: -

Surabaya, 11 Desember 2009

Mengetahui
Dekan
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh
NIP. 130.687.305

Peneliti Utama

Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.
NIP. 131 837 006

Mengetahui,

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat
Universitas Airlangga



Dr. Bambang Sektjari L. DEA., drh
NIP. 131 837 004

DAFTAR ISI



	halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
RINGKASAN.....	4
BAB 1 PENDAHULUAN	6
1.1. TUJUAN PENELITIAN.....	8
BAB 2 STUDI PUSTAKA	10
BAB 3 METODE PENELITIAN	13
BAB 4 HASIL PENELITIAN	19
DAFTAR PUSTAKA	22

RINGKASAN

Penyakit Avian Influenza atau Flu Burung bukan hanya telah menginfeksi hewan, melainkan sudah menginfeksi manusia. Daerah yang telah dinyatakan terinfeksi sebanyak 31 provinsi dari 33 provinsi yang ada di Indonesia. Sampai dengan bulan November 2008 ini virus AI telah menyebabkan kematian pada manusia sebanyak 114 orang dari 139 orang yang dinyatakan positif terinfeksi Flu Burung di Indonesia.

Dari perjalanan penyakit Flu Burung yang telah ada menunjukkan bahwa Virus H5N1 ini bukan hanya menginfeksi saluran pernafasan, tetapi juga dapat menginfeksi semua organ (*multiorgan disfunctions*), termasuk organ reproduksi.

Virus Avian Influenza subtype H5N1 terdiri dari 10 macam protein yang dikoden oleh 8 fragmen, yaitu protein Hemagglutinin (HA), Neuramindase (NA), Polymerase Acidic (PA), Polymerase Basic-1 (PB1), Polymerase Basic-2 (PB2), Non-structural (NS), Matrix (M), dan protein Nucleoprotein (NP).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan pada tahun 2008, menunjukkan bahwa PB2 mempunyai suatu signal targetting pada mitokondria dan PB1 dalam replikasinya di simpan pada membran dalam dan luar mitokondria. Kedua protein ini berpengaruh terhadap gen COX6A1, sehingga kedua protein PB1 dan PB2 berpengaruh terhadap fungsi mitokondria dalam menghasilkan ATP sebagai sumber energi.

Tirosin Kinase (TK) adalah salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP 3). Terjadinya peningkatan tirosin kinase berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivitas spermatozoa. Autofosforilasi menyebabkan dua subdomain dari kinase intrinsik berubah posisi, membuka domain kinase untuk pengikatan ATP. Dalam bentuk in aktif, subdomain kinase bekerja sama dengan ATP tidak dapat mencapai pusat katalitik dari kinase. Ketika beberapa asam amino sesuai untuk fosforilasi berada dalam domain kinase (misalnya : *insulin like growth factor receptor*), maka aktivitas dari kinase akan meningkat dengan adanya sejumlah asam amino yang terfosforilasi.

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris di Laboratorium Animal BSL-3 (ABSL-3) Universitas Airlangga. *Maccaca fascicularis* diinfeksi dengan virus flu burung subtype H5N1 selanjutnya dikoleksi sampel sperma untuk dilakukan pengujian selanjutnya.

Penelitian ini dilakukan dengan cara menginfeksi virus H5N1 pada monyet jantan (*Macaca fascicularis*), koleksi semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*), pemisahan protein melalui uji kualitas semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*).

Tujuan penelitian ini untuk melakukan identifikasi dan karakterisasi tirosin kinase dari spermatozoa monyet jantan (*Macaca fascicularis*) berdasarkan berat molekul, spesifisitas dengan monoklonal antibodi tirosin kinase dan aktivitas tirosin kinase. Membuktikan bahwa semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*) yang telah diinfeksi virus H5N1 dapat menurunkan aktivitas tirosin kinase melalui hambatan pembentukan ATP sehingga proses fosforilasi tirosin kinase akan terhambat. Hal ini akan menurunkan angka fertilisasi.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan tidak menunjukkan adanya perubahan pada kualitas spermatozoa monyet jantan yang diinfeksi oleh virus Avian Influenza H5N1.

PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan karunia dan kekuatan sehingga penelitian Hibah Strategies Nasional ini dapat kami laksanakan dengan baik.

Pada kesempatan ini kami sampaikan terima kasih kepada :

1. **Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan Hibah Penelitian Strategies Nasional melalui Dana DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009**
2. **Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat atas diterimanya proposal penelitian kami**
3. **Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah merekomendasikan proposal penelitian kami hingga dapat diterima dan di dani**
4. **Kepala Laboratorium Animal BSL3 dan staf yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di laboratoriumnya**

Hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu kami sangat mengharapkan masukan dan saran untuk perbaikan penelitian ini.

11 Desember 2009

Penulis

I. PENDAHULUAN

Avian Influenza adalah penyakit viral pada unggas, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza type A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama avian flu dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Swayne, 2000).

Sejak akhir tahun 2003, virus *avian influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

Struktur virus Avian Influenza sub tipe H5N1 terdiri dari protein Hemagglutinin (HA); Neuraminidase (NA); Polymerase Asidic (PA); Polymerase Basic 1 (PB1); Polymerase Basic2 (PB2); Nucleoprotein (NP); Non-Structural 1 dan 2 (NS) dan Matrix 1 dan 2 (M). Ke sepuluh protein ini mempunyai fungsi yang berbeda-beda, sehingga sangat menentukan perubahan yang terjadi pada aktivitas sel induk yang terinfeksi (Nidom, 2008; Yamada *et al*, 2006).

Dari perkembangan penelitian yang telah dilakukan pada sel *Drosophila sp*, menunjukkan bahwa protein PB1 dan PB2 mempunyai fungsi spesifik pada mitokondria. Protein PB1 dan PB2 dapat mempengaruhi gen COX6A1 dalam transpor elektron enzim2 yang tergolong pada enzim cytochrom c. Jika dirinci lebih lanjut maka protein PB 2 mempunyai peran dalam signal targetting dalam mitokondria sedangkan PB1 akan mengganggu fungsi mitokondria pada membran dalam maupun luar mitokondria. Akibat gangguan virus H5N1 pada sistem di mitokondria, akan mengganggu produksi energi dalam bentuk ATP (Hao *et al*.2008).

Fakta lain dari virus H5N1 yang telah menginfeksi hewan maupun manusia menunjukkan gangguan pada semua organ, termasuk organ reproduksi.

Upaya pemerintah dalam meningkatkan populasi ternak untuk keperluan peningkatan produksi daging dan susu dilakukan melalui penyediaan bibit ternak, khususnya ternak sapi perah, dan penerapan bioteknologi reproduksi (Direktorat Jenderal Peternakan, 2005). Salah satu bioteknologi reproduksi yang telah diterima oleh masyarakat peternak dalam meningkatkan produksi ternak adalah teknologi inseminasi buatan (IB). Melalui penggunaan teknologi IB akan dapat memperbaiki mutu genetik ternak sapi FH dengan cara membuat semen beku yang berasal dari pejantan unggul, ini merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez, 2000).

Tirosin kinase (TK) adalah salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3) (Leyton and Saling, 1989), selanjutnya akan terjadi beberapa perubahan seluler yaitu terjadinya influks kalsium ekstraseluler dan efluks proton secara tiba-tiba, yang mengakibatkan induksi eksositosis akrosom dan merangsang membran plasma fusogenik sehingga mampu mengenali membran vitelin oosit untuk berfusi (Bunch *et al.*, 1994; Leyton *et al.*, 1992). Morales and Llanos (1996) menyatakan bahwa tirosin kinase merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin. Hasil penelitian Naz and Ahmed (1994) melaporkan beberapa protein membran spermatozoa pada tikus yang mempunyai kemampuan mengikat protein zona pelusida (ZP) sel telur mempunyai berat molekul 95, 63, 51 dan 14-18 kDa. Namun yang mempunyai aktivitas autofosforilasi paling potensial adalah protein dengan berat molekul 95 kDa. Protein dengan berat molekul 95 kDa ini digolongkan kedalam protein tirosin kinase.

Proses fosforilasi tirosin kinase terjadi secara fisiologis dalam sel spermatozoa melalui serangkaian signal transduksi yang diawali dengan aktifnya enzim adenilat siklase membran spermatozoa untuk mengubah adenosin triphosphat (ATP) menjadi cyclic adenosin monophosphat (cAMP). Meningkatnya cAMP akan menginduksi protein kinase yang semula inaktif menjadi aktif (PK A). Selanjutnya PK A akan mengaktivasi tirosin kinase yang ada dalam bagian ekor spermatozoa (*principal piece*) sebagai biokatalisator dalam proses

fosforilasi tirosin kinase. Selain itu PK A akan menstimulasi pembukaan *channel voltage gated dependent* Ca^{2+} sehingga menyebabkan masuknya ion Ca^{2+} ke dalam sel. Produk fosforilasi tirosin kinase akan menyebabkan hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa dan diikuti dengan terjadinya kapasitasi (Naz and Rajesh, 2004)

Berdasarkan uraian diatas menjadi sangat penting dilakukan pengkajian tentang karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) serta peran tirosin kinase, sekaligus dapat diketahui pengaruh infeksi virus H5N1 terhadap kualitas spermatozoa pada monyet.

DASAR PERTIMBANGAN

Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan RI, penyakit Avian Influenza atau Flu Burung bukan hanya telah menginfeksi hewan, melainkan sudah menginfeksi manusia. Daerah yang telah dinyatakan terinfeksi sebanyak 31 provinsi dari 33 provinsi yang ada di Indonesia. Sampai dengan bulan November 2008 ini virus AI telah menyebabkan kematian pada manusia sebanyak 114 orang dari 139 orang yang dinyatakan positif terinfeksi Flu Burung di Indonesia.

Berdasarkan pertimbangan di atas dapat disimpulkan bahwa pemahaman terhadap infeksi virus H5N1 pada mamalia, manusia dan hewan mamalia terhadap kesehatan reproduksi, khususnya kesehatan spermatozoa sangat penting dan besar. Peranan faktor reproduksi sangat sangat diperlukan dalam peningkatan kualitas sperma baik bagi manusia maupun dalam upaya meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas ternak.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai adalah :

1. Identifikasi dan karakterisasi tirosin kinase dari spermatozoa monyet jantan (*Macaca fascicularis*) berdasarkan berat molekul, spesifisitas dengan monoklonal antibodi tirosin kinase dan aktivitas tirosin kinase.
2. Membuktikan bahwa semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*) yang telah diinfeksi virus H5N1 dapat menurunkan aktivitas tirosin kinase melalui hambatan pembentukan

ATP sehingga proses fosforilasi tirosin kinase akan terhambat. Hal ini akan menurunkan angka fertilisasi

Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai adalah :

1. Mengungkap mekanisme molekuler hambatan pembentukan ATP dalam mitokondria akibat infeksi H5N1
2. Mengungkap mekanisme molekuler aktivitas tirosin kinase spermatozoa melalui proses fosforilasi tirosin kinase yang berpengaruh terhadap proses kapasitasasi dan hiperaktivasi spermatozoa

II. STUDI PUSTAKA

Sejak akhir tahun 2003, virus *avian influenza* sub tipe H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

Struktur virus Avian Influenza sub tipe H5N1 terdiri dari protein Hemagglutinin (HA); Neuraminidase (NA); Polymerase Asidic (PA); Polymerase Basic 1 (PB1); Polymerase Basic2 (PB2); Nucleoprotein (NP); Non-Structural 1 dan 2 (NS) dan Matrix 1 dan 2 (M). Kesepuluh protein ini mempunyai fungsi yang berbeda-beda, sehingga sangat menentukan perubahan yang terjadi pada aktivitas sel induk yang terinfeksi (Nidom, 2008; Yamada *et al*, 2006).

Dari perkembangan penelitian yang telah dilakukan pada sel *Drosophila* sp, menunjukkan bahwa protein PB1 dan PB2 mempunyai fungsi spesifik pada mitokondria. Protein PB1 dan PB2 dapat mempengaruhi gen COX6A1 dalam transpor elektron enzim² yang tergolong pada enzim cytochrom c. Jika dirinci lebih lanjut maka protein PB 2 mempunyai peran dalam signal targetting dalam mitokondria sedangkan PB1 akan mengganggu fungsi mitokondria pada membran dalam maupun luar mitokondria. Akibat gangguan virus H5N1 pada sistem di mitokondria, akan mengganggu produksi energi dalam bentuk ATP (Hao et al.2008).

Fakta lain dari virus H5N1 yang telah menginfeksi hewan maupun manusia menunjukkan gangguan pada semua organ, termasuk organ reproduksi.

Sel spermatozoa mempunyai perbedaan susunan kimiawi. Kepala spermatozoa terdiri dari *deoxyribo nucleic acid* (DNA) yang terdapat di bagian nukleus spermatozoa. Bagian akrosom mengandung beberapa enzim proteolitik yaitu hyaluronidase, akrosin dan *coronary penetrating enzyme* (CPE) yang penting untuk penembusan sel telur saat proses fertilisasi (Hafez, 2000).

Pada bagian leher spermatozoa mempunyai panjang 5-7 μm dipisahkan dari ekor oleh cincin yang disebut annulus. Dalam sitoplasma spermatozoa banyak mengandung lipid juga terdapat mitokondria dan dikelilingi oleh suatu filamen yang berbentuk heliks. Bagian leher berhubungan dengan kebutuhan energi untuk motilitas serta berperan dalam metabolisme oksidatif. Beberapa zat yang dihasilkan di bagian leher spermatozoa antara lain enzim glikolitik, asam amino, sulfhidril, kolesterol, sitokrom oksida, lipoprotein dan sitokrom yang penting dalam reaksi respirasi spermatozoa. Plasmalogen merupakan senyawa lemak terbanyak di dalam spermatozoa didapatkan di bagian ekor terutama pada mitokondria yang merupakan sumber energi endogen untuk aktivitas spermatozoa. Beberapa enzim yang mengatur metabolisme aerob maupun anaerob pada sel spermatozoa banyak ditemukan pada bagian leher dan ekor, kecuali enzim hyaluronidase yang hanya ditemukan di bagian kepala dan akrosom (Hardjopranjoto, 1995, Toelihere, 1985).

Menurut Pablo, *et al.* (1990), protein membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai reseptor ,enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan membran kepala spermatozoa seperti adhesi zona pelusida dengan spermatozoa, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa – sel telur (Herrero *et al.*, 1999).

Hasil penelitian Pommer *et al.*, (2003) menggunakan spermatozoa kuda yang dikapitasi secara *in vitro*, terjadi peningkatan fosforilasi tirosin kinase yang dideteksi dengan metode imunofluoresen. Adanya peningkatan fosforilasi tirosin kinase ini berhubungan dengan motilitas dan hiperaktivitas spermatozoa . Penelitian serupa juga dilakukan oleh Visconti and Kopf (1998) pada spermatozoa tikus, sapi dan manusia bahwa fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapitasi spermatozoa melalui mekanisme peningkatan influks kalsium yang akan mengaktifkan adenilat siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan cyclic adenosin monophosphat (cAMP). Selanjutnya hasil penelitian pendahuluan Madyawati, dkk. (2004) menunjukkan bahwa penambahan *crude* tirosin kinase sebesar 7% dalam *Tissue Culture Medium* (TCM) -199 dapat meningkatkan fusi spermatozoa-sel telur dan dispersi dari sel-sel granulosa secara *in vitro*.

BAB 3

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris yang terdiri dari beberapa tahap penelitian, yaitu :

1. Menyuntikkan virus H5N1 (menginfeksi) pada monyet jantan (*Macaca fascicularis*)
2. Melakukan koleksi semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*) menggunakan elektro ejakulator
3. Melakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa meliputi : persentase spermatozoa yang hidup, persentase motilitas dan integritas membran spermatozoa
4. Melakukan pemisahan protein spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan sentrifugasi dan sonikasi
5. Melakukan karakterisasi dan identifikasi protein spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan SDS - PAGE
6. Melakukan isolasi tirosin kinase dari protein spermatozoa dengan Elektroelusi
7. Melakukan konfirmasi isolat tirosin kinase spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan teknik imunoblotting (Dot blot, Western blot dan Imunositokimia)
8. Uji aktivitas tirosin kinase berdasarkan pH, suhu dan waktu inkubasi optimum

Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan dihasilkan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium. Hari pengerjaan dianggap sebagai ulangan.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. Menyuntikkan virus H5N1 (menginfeksi) pada monyet jantan (*Macaca fascicularis*)
2. Melakukan koleksi semen monyet jantan (*Macaca fascicularis*) menggunakan elektro ejakulator
3. Melakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa meliputi : persentase spermatozoa yang hidup, persentase motilitas dan integritas membran spermatozoa

4. Melakukan pemisahan protein spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan sentrifugasi dan sonikasi
5. Melakukan karakterisasi dan identifikasi protein spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan SDS - PAGE
6. Melakukan isolasi tirosin kinase dari protein spermatozoa dengan Elektroelusi
7. Uji aktivitas tirosin kinase berdasarkan pH, suhu dan waktu inkubasi optimum

1. **Menyuntikkan virus H5N1 (menginfeksi) pada monyet jantan (*Macaca fascicularis*)**
Monyet jantan yang telah dewasa kelamin diinfeksi dengan virus H5N1 (yang telah diidentifikasi di laboratorium BSL3 TDC Unair) secara intranasal

2. **Melakukan koleksi semen monyet (*Macaca fascicularis*) menggunakan elektro ejakulator**

Sampel semen yang ditampung dalam tabung reaksi dilakukan pemeriksaan makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan mikroskopis (motilitas, gerakan massa dan persentase spermatozoa hidup)

3.a. Melakukan pemeriksaan persentase spermatozoa yang hidup

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. 10 μ l suspensi semen ditetaskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian tetaskan zat warna eosin-negrosin dicampur sampai homogen. Ambil gelas obyek lain, tempelkan bagian ujung pada campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin. Selanjutnya diangin-anginkan sampai kering. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedang yang berwarna merah muda adalah spermatozoa yang mati (Partodihardjo, 1992).

3.b. Melakukan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa terdiri dari pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif. Sepuluh mikroliter suspensi semen pada tiap kelompok perlakuan ditetaskan pada *obyek glass* yang terdapat lekukan di bagian tengah, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diamati motilitas spermatozoa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pemeriksaan kuantitatif motilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan tingkatan

pergerakan progresif kedepan. Motilitas spermatozoa dibagi empat kriteria yaitu : a. pergerakan sangat baik (bergerak cepat ke depan), b. pergerakan yang baik (bergerak maju ke depan), c. pergerakan ditempat atau berputar dan d. spermatozoa tidak bergerak. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil dan tidak motil pada beberapa lapangan pandang secara acak. Persentase pergerakan spermatozoa dihitung berdasarkan rataan persentase motilitas untuk semua lapangan pandang yang dihitung (Tuty, 2004).

4. Pemisahan Protein Spermatozoa

Sampel semen yang telah dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan pellet (spermatozoa) dengan plasma seminalis. Kemudian pellet ditambah dengan media BO-cafein 1 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan PBS-tween 5 kali volume, ditambah *Phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF) sebagai inhibitor enzim protease sebanyak 5 kali volume, selanjutnya di-vortex selama 10 menit, dilanjutkan dengan sonikasi selama 20 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang, supernatan ditambah dengan etanol dingin 1 : 1, disimpan dalam refrigerator selama 1 jam sampai terbentuk bintik-bintik putih, sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, dimasukkan ke refrigerator lagi selama 5 menit, Kemudian etanol dibuang dan dikeringkan menggunakan tissue dan dibiarkan sampai bau etanol hilang. Selanjutnya ditambah dengan Tris-HCl. Hasil akhirnya adalah isolat *crude* protein dari membran plasma spermatozoa (Aulanni'am, 2004).

5. Melakukan karakterisasi dan identifikasi protein spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) dengan SDS - PAGE

Identifikasi tirosin kinase dengan SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran beberapa pita protein. Tahapan kerjanya adalah sebagai berikut: masukkan *separating gel* ke dalam alat Elektroforesis melalui dinding sampai di bawah batas atas. Selanjutnya tambahkan akuades sampai batas atas supaya *separating gel* rata. Selanjutnya akuades diserap dengan tissue dan tambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh, masukkan *comb* (pencetak sumuran dari gel) dan ditunggu terbentuk gel. Selanjutnya *comb* diambil dan dibersihkan dari sisa gel dengan tissue. Cetakan gel yang

sudah jadi dipindahkan dan dimasukkan ke dalam *chamber*, kemudian direndam dalam *running buffer*. Selanjutnya diletakkan cetakan penuntun sampel yang akan di *running*. Sampel penelitian berupa isolat protein membran spermatozoa sapi sebanyak 35 μ l dimasukkan ke dalam lubang cetakan dengan tip 200 μ l. Langkah berikutnya *chamber* dihubungkan dengan alat Biörad, *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 130 V, 30 mA selama 1,5 jam. Jika reaksi *gel* sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan. Selanjutnya hasilnya berupa lembaran berbentuk gel diwarnai dengan *coomasie blue* dan di *sacker* (digoyang) selama 30 menit. Kemudian dikeluarkan dan ditambahkan dengan cairan *destaining* dan di *sacker* lagi selama 30 menit. Jika cairan sudah terlihat biru diganti dengan cairan *destaining* yang baru begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasilnya berupa beberapa pita protein. Berat molekul akan dapat terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003).

6. Isolasi Tirosin Kinase dengan Teknik Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selopahan. Selanjutnya dimasukkan dalam *block glass* yang mengandung PBS, setelah itu di *stirer* selama 24 jam. Setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan pewarnaan silver, bila tidak terdapat pita artinya protein sudah ter-elusi (Aulanni'am. 2004).

7. Uji Aktivitas Tirosin Kinase berdasarkan pH, suhu dan waktu inkubasi

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku ATP

Dilarutkan 0,0125 g ATP dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Selanjutnya diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan ini merupakan larutan stock ATP dengan konsentrasi 125 ppm. Kemudian diambil dengan pipet mikro 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ml larutan stock ATP 125 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi ATP 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur absorbansi dari larutan ATP 50 ppm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang antara 250 – 350 nm, sedangkan pembuatan kurva baku ATP diukur absorbansi dari larutan standar ATP 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm pada

panjang gelombang maksimum. Selanjutnya persamaan regresi dan kurva baku ATP antara absorbansi versus konsentrasi A

2. Uji Aktivitas Isolat Tirosin Kinase

Sebanyak 400 µl isolat tirosin kinase ditambahkan ke dalam 400 µl larutan ATP 125 ppm dalam bufer asetat pH 6,8. selanjutnya ditambahkan 400 µl Histon 75 ppm lalu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit (Matsuo,1985). Langkah berikutnya ditambahkan 400 µl larutan TCA 8% ke dalam larutan diatas lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang antara 260 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama tetapi tidak ditambahkan larutan ATP. Aktivitas tirosin kinase ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi ATP yang tidak bereaksi (sisa) menjadi konsentrasi ATP yang tidak bereaksi atau sisa (ppm) dengan menggunakan persamaan kurva baku ATP. Konsentrasi ATP yang bereaksi ditentukan dengan menghitung selisih antara konsentrasi ATP awal dengan konsentrasi ATP sisa. Kemudian unit aktivitas tirosin kinase dihitung dengan rumus :

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{[ATP_{awal} - ATP_{sisa}]}{BM \text{ ATP}} \times \frac{v}{p \cdot q} \times fp$$

Dimana : c = konsentrasi ATP yang bereaksi (µg / mL)

v = volume total tiap tabung (mL)

p = jumlah enzim (mL)

q = waktu reaksi (menit)

fp = faktor pengenceran

BM ATP = 551,2 µg / µmol

3. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Tirosin Kinase

3.1 Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase dengan variasi pH yaitu 6,0 , 6,4 , 6,8 , 7,2, 7,4 dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara tirosin kinase terhadap variasi pH. Aktivitas maksimum menunjukkan harga pH optimum.

3.2 Penentuan Suhu Optimum

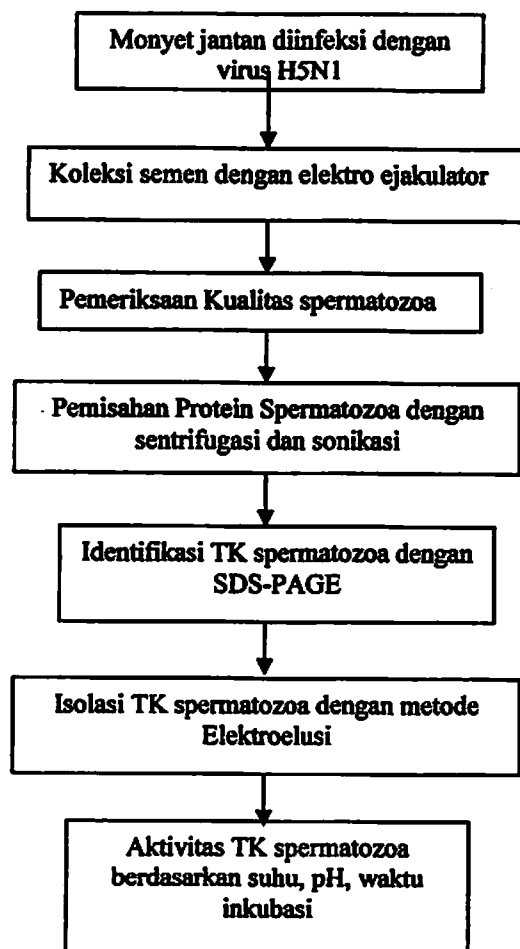
Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase dengan variasi suhu yaitu 30, 32, 35, 38 dan 40 (°C) dan diinkubasi selama 30 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tirosin kinase terhadap variasi suhu. Aktivitas maksimum menunjukkan harga suhu optimum.

3.3. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tirosin kinase pada pH dan suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi yaitu 15, 30, 60, 90 dan 120 menit.

Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tirosin kinase terhadap variasi waktu inkubasi. Aktivitas maksimum menunjukkan harga waktu inkubasi optimumnya



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

BAB IV HASIL PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2009. Sampai saat ini penelitian ini mencapai tahapan penyiapan hewan coba yaitu *Macaca fascicularis* (Monyet Ekor Panjang) dan perbanyak virus yang akan digunakan.

4.1 Penyiapan Hewan Coba

Macaca fascicularis yang akan digunakan dalam penelitian ini berjumlah dua ekor, dengan data karantina sebagaimana terlampir

Sebelum digunakan dalam suatu penelitian, *Macaca fascicularis* harus melalui beberapa tahapan antara lain, pemeriksaan awal waktu kedatangan, karantina dan tes TB. Karantina monyet ekor panjang dilakukan di instalasi hewan ABSL-3 Universitas Airlangga selama 42 hari dengan tujuan mengamati kondisi kesehatan monyet dan waktu adaptasi monyet terhadap lingkungan yang baru.

Selama masa karantina, dilakukan tiga kali Tes Tuberkulosis berselang 14 hari dengan tujuan memastikan bahwa monyet yang digunakan dalam penelitian bebas dari Tuberkulosis sehingga aman bagi peneliti yang kontak dengan hewan coba. Tes Tuberkulosis dilakukan penyuntikan MOT (*Mammalian Old Tuberculin*) sebanyak 0,1 mL pada kelopak mata monyet yang sebelumnya di anastesi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya kebengkaan dan peradangan pada mata yang disuntik setelah 24 – 48 jam. Pemeriksaan yang lain adalah pengamatan adanya gejala klinis terhadap Herpes dan SIV.

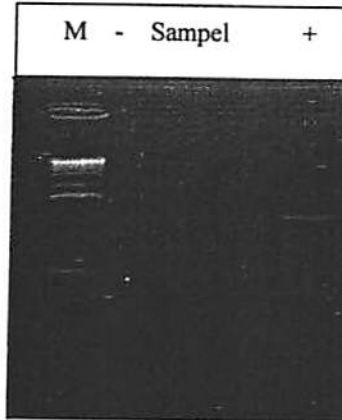
4.2 Penyiapan virus

Virus yang akan diinfeksi adalah virus H5N1. Dalam fase ini telah berhasil didapatkan 1 isolat virus H5N1 yang berasal dari manusia. Virus – virus ini didapatkan dengan menginokulasi sampel ke MDCK yang telah konfluen. Kemudian dilakukan pengamatan pada kondisi sel setelah diinfeksi, selama kurun waktu 5 – 7 hari. Sel yang mengalami kerusakan atau muncul CPE dipanen pada hari ke-7. Analisa hasil panen ini dilakukan dengan uji HA yang dilakukan dengan dua macam RBC yaitu RBC ayam dan RBC marmot.

Tabel 4.1 : Hasil Inokulasi dan HA test virus H5N1

Jenis Isolat	Kemunculan CPE	Hasil HA test RBC ayam	Hasil HA test RBC marmot
Isolat H5N1	Hari ke 2	2^{10}	Nt

Kemudian isolate ini dilanjutkan dengan analisis PCR dengan primer spesifik dan dapat diamati pada gambar berikut :

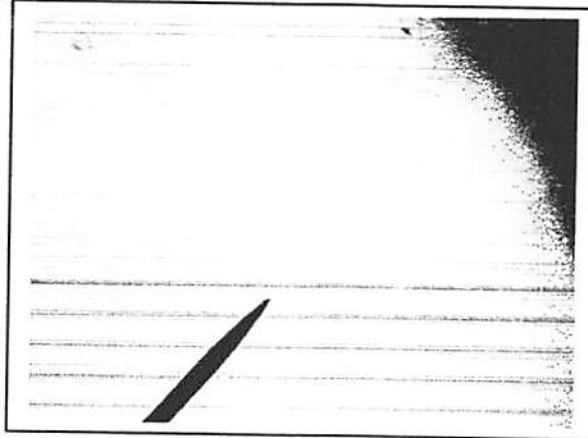


Gambar 4.1 Hasil PCR Virus H5N1

Koleksi Spermatozoa Hewan *Maccaca fascicularis*

Dengan menggunakan alat bantu ejakulator telah diperoleh dan dikoleksi spermatozoa monyet baik sebelum diinfeksi maupun setelah di infeksi. Rerata jumlah yang diperoleh sebanyak 0,9 ml. Adapun foto dari spermatozoa yang diperoleh sebagaimana di bawah ini.

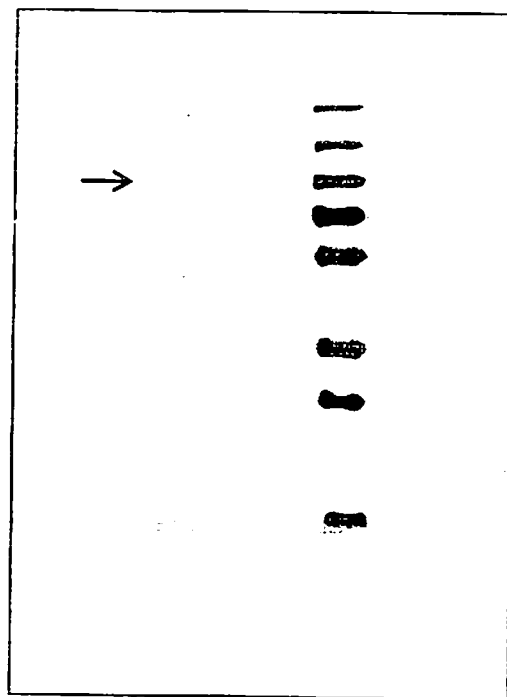
Selanjutnya akan dilakukan pengujian terhadap Tirosin Kinase dan aktivitas lain dari spermatozoa yang diperoleh.



Gambar 4.2.Spermatozoa Monyet (Hewan coba)

4.1.1. Konfirmasi Pita Protein Spermatozoa Monyet menggunakan Metode SDS-PAGE

Isolat protein dari sampel spermatozoa monyet yang sudah dikonfirmasi mengekspresikan tirosin kinase, selanjutnya dilakukan konfirmasi berat molekul tirosin kinase dengan metode Western Blot menggunakan MAb-tirosin kinase (ABGENT, no. Cat. AP7704b) yang didahului dengan metode SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE dari isolat protein spermatozoa monyet ditemukan ada sebelas pita protein yaitu 160,39 , 114,20 ,95,00 , 76,45 , 59,70 ,46,64 , 37,58 , 31,18 ,21,55 , 17,91 dan 14,42 kDa. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.2

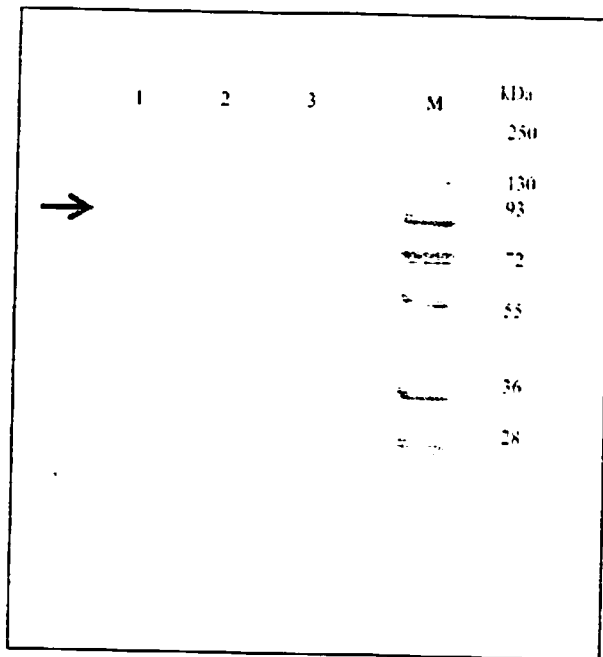


Gambar 4.3. Hasil SDS-PAGE protein membran spermatozoa monyet menunjuk pada pita protein yang diduga tirosin kinase

Panah biru :

4.1.2. Western Blot

Untuk melakukan konfirmasi lebih lanjut berat molekul tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa monyet digunakan teknik Western Blot. Isolat tirosin kinase hasil dari spermatozoa sapi FH dipakai sebagai antigen dan MAb-tirosin kinase sebagai antibodi primer dari rangkaian teknik ini. MAb- tirosin kinase ini hanya akan mengenali tirosin kinase dari pita protein yang dikandung oleh spermatozoa monyet. Satu pita protein yang muncul pada membran nitroselulose dengan berat molekul 95 kDa adalah tirosin kinase. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Konfirmasi Berat Molekul Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa monyet dengan Teknik Western Blot (tanda panah menunjuk pada pita protein dengan berat molekul tirosin kinase 95 kDa)

V. Kesimpulan dan Saran

5.1. Kesimpulan

Spermatozoa monyet (*Macaca fascicularis*) yang diinfeksi oleh Virus Avian Influenza sub tipe H5N1 tidak menunjukkan perubahan performans yang nyata.

5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang perubahan eksternal dari invidu yang terinfeksi oleh virus H5N1

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2005. *Semen, Processing, Storage, Thawing and Handling*. File: "Chapter 16 htm.download 9/27/2005
- Aulanni'am, 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Cetakan pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Hal 16 – 22
- Aulanni'am, 2005. *Protein dan Analisisnya*. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. Hal. 19-27
- Bunch, D., L. Leyton and P. Saling. 1992. *Sperm Interaction with The Zona Pellucida : Role of a Tyrosine Kinase receptor for ZP3 in Fertilization and Contraception*. Schering Foundation Workshop 4 (ed. E Nieschlag and U.F. Habenicht). p. 367-381.
- Direktorat Jendral Peternakan, 2005. *Panduan Lomba dan Kontes Ternak Nasional dalam rangka Pekan Peternakan Unggulan Nasional 2005*. Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian. Hal.1
- Hafez E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Haila, A. and D.R. Tulsiani, 2000. *Mammalian Sperm Acrosome : Formation, Contents and Function*. Arch Biochem Biophys, Jul 15 : 392 (2) : 173 – 182.
- Hao L., Sakurai L., Watanabe T., Sorencen E., Nidom C.A., Newton M.A., Ahlquist P., Kawaoka Y. 2008. *RNAi Screen identifies host genes important for influenza virus replication*. Nature. vol.564 : 378-382.
- Herrero MB., E. de Lamirande and C.Gagnon, 1999. *Nitric Oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein Tyrosine*. Biol. of Reprod. 61:575-581
- Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P.M. Saling., 1992. *Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89. 11692 – 11695
- Madyawati, SP., H.A. Hermadi dan T. Sardjito, 2004. *Produksi Protein Tyrosin Kinase hasil Isolasi Spermatozoa Sapi Potong; Alternatif Meningkatkan Produksi Semen Beku*. Penelitian proyek Due-Like Batch III. Fakultas Kedokteran Hewan . Universitas Airlangga, Surabaya.
- Naz, R.K. and K. Ahmed, 1994. *Molecular Identities of Human Sperm Proteins That Bind Human Zona Pellucida : Nature of Sperm –Zona Interaction, Tyrosine Kinase Activity and Involvement of FA-1*. Mol. Reprod. Dev. 39, 397 – 408.
- Nidom C.A, Sasayama M, Yamaoka M, Reviany V. N., Arlita L. A, Yusuf M, Amin M, Suzuki Y., Kawaoka Y., Hotta H. 2008. *Isolation of Avian Influenza Viruses in Stray Cats (Felis*

- silvestris cats) in Indonesia By Using Serological Test and Real Time PCR. Bangkok International Conference on Avian Influenza, Bangkok, Thailand, 23-25 January 2008*
- Nurhidayat, 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Imunohistokimia dalam Modul Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan terapan Bidang Biologi dan Biomedis. Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber daya Manusia Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.*
- Pablo, E.V., J.L. Bailey, G.D. Moore, Dieyun Pan, P.O. Clarke and G.S. Kopf. 1995. *Capacitation of Mouse Spermatozoa : Correlation Between The Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation Development* 121. 1129-1137.
- Partodihardjo, S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal. 522 – 556.*
- Pommer, A.C., J. Rutlant and S.A. Meyers., 2003. *Phosphorylation of Protein tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa Under capacitating Conditions. Biol. of Reprod.*, 68, 1208-1214.
- Santam, F.A. 2003. *Metode Immunologi. Cetakan pertama, Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 79-98*
- Schubinsky, B. 200. *Cryosurgery. Annual Review in Biomedical Engineering. University of California at Berkeley. Berkeley.*
- Suprayogi, T.W., 1996. *Pengaruh Waktu Penyimpanan Bahan Pengencer Kuning Telur Sitrat Terhadap Daya Fertilisasi Sel Mani Domba. Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga, Surabaya*
- Susilawati, T. 2000. *Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.*
- Teitel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika : Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi II. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.*
- Tanaka H., Herliantien, E. Herwiyanti, O.P. Lubis, Buwono dan J. Pujiyanto., 2002. *Reproduksi Klinik. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. Hal. 2.*
- Wahlihere, M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak. 6th.Ed. Penerbit Angkasa Bandung.*
- Wong, L.Y., 2004. *Pengembangan Laboratorium Inseminasi Buatan Melalui Semen Cair dan Semen Beku. Pelatihan Laboran, Puspitnak, Ditjenak, Lembang.*

Visconti, P.E. and G.S. Kopf, 1998. *Regulation of Protein Phosphorylation During Sperm Capacitation*. Biol. of Reprod. 59, 1 – 6

WHO, 2005. WHO Laboratory Manual for *The Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Ed 5th, United Kingdom : Cambridge University Press.

Yamada S., Y.Suzuki, Mai Q Le, Nidom C.A., Takagawa Y.S., Muramoto Y., Ito M. Horimoto T., Shinya K., Kawaoka Y. 2006. *Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors*. Nature. vol.444 : 378-382.

