

KK  
KKA

THD. 32/11

Qos  
K

# TESIS

## KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 DENGAN ANTIBODI H5N1 VAKSIN HOMOLOG, DAN VAKSIN HETEROLOG H5N2 AVIAN INFLUENZA



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

DAHLIATUL QOSIMAH  
NIM : 090610215 M

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN VIRUS AVIAN INFLUENZA  
SUBTIPE H5N1 DENGAN ANTIBODI H5N1 VAKSIN HOMOLOG, DAN  
VAKSIN HETEROLOG H5N2 AVIAN INFLUENZA**

**TESIS**

**Untuk memperoleh gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**DAHLIATUL QOSIMAH  
NIM : 090610215 M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal 19 September 2008**

Lembar pengesahan

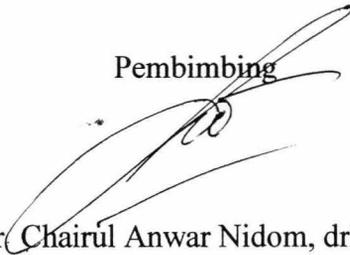
TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL : 19 September 2008

Oleh  
Pembimbing Ketua



Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
NIP. 130676011

Pembimbing



Dr Chairul Anwar Nidom, drh, MS  
NIP. 131406056

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD  
NIP. 130541984

Telah diuji pada

Tanggal 19 September 2008

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua** : Prof Dr Rahaju Ernawati, drh, MSc

**Anggota** : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK

2. Dr Chairul Anwar Nidom, drh, MS

3. Maria Lucia Inge Lusida, dr, MKes, PhD, SpMK

4. Budiono, dr, M.Kes

5. Dr Garry Cores de Vries, MS, MSc, drh

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat dan berkah serta limpahan kasih sayang sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN VIRUS AVIAN INFLUENZA A SUBTIPE H5N1 DENGAN ANTIBODI H5N1 VAKSIN HOMOLOG, DAN VAKSIN HETEROLOG H5N2 AVIAN INFLUENZA. Selain itu penulis juga ingin menyampaikan terima kasih tak terhingga kepada semua pihak yang turut serta membantu dan mendukung baik secara moril maupun material demi terselesainya tesis ini :

1. Dr H. Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK selaku dosen dan pembimbing pertama yang senantiasa dengan kesabarannya selalu memberikan waktu untuk membimbing, memberi saran dan memotivasi penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis.
2. Dr Chairul Anwar Nidom, drh, MS selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium Avian influenza, *Tropical Disease Center*, Universitas Airlangga serta bersedia memberikan sarana dan prasana demi kelancaran tesis ini. Selain itu penulis juga menyampaikan terima kasih banyak karena beliau dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis untuk selalu berjuang menyelesaikan penelitian dengan baik tanpa mengenal putus asa.
3. Dosen penguji Prof Dr Rahaju Ernawati, drh, MSc, Dr Maria Lucia Inge Lusida, dr, MKes, PhD, SpMK dan Budiono, dr, M.Kes yang selalu siap memberikan saran demi terselesainya tesis ini.

4. Semua teman-teman di Laboratorium Avian influenza, Tropical Disease Center baik secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis terutama kepada Mas Ucup, Vivin, mas Amin, Bu Koen, Mikiko, Mbak Lita, Mbak Evi, Nani, Rio, Ima, Asri, Mas Surip, Mbak Ida, Yamaoka sensei, Shinya sensei, Motoko dan teman-teman lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.
5. Dr Suwarno, drh, MS ; Nanik Sianita, drh, SU ; Adi Prijo, drh, MSi serta dosen-dosen Virologi dan Imunologi, FKH, UNAIR yang bersedia membantu penulis untuk melengkapi bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini, Drh Nanik Sianita, SU
6. Teman suka dan duka penulis dalam selama menempuh pendidikan pascasarjana jurusan Mikrobiologi, Dwi Utami Anjarwati, dr, MKes yang dengan penuh kesabaran memberikan dukungan moril kepada penulis.
7. Teman-teman S2 Angkatan 2006 yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.
8. Bapak H. Achmad Qosim dan Ibu Hj. Sumiati, Spd selaku orang tua penulis yang tidak pernah lelah dan putus asa selalu memberikan kasih sayang, dukungan moril dan material demi terselesainya tesis ini. Serta kakak tersayang Ira Septembriana, S.Sos dan adik tersayang Hikmatul Qosimah, AmdKeb yang tidak pernah lelah untuk selalu memberikan semangat, dukungan moril dan mengingatkan kepada penulis agar dapat menyelesaikan kuliah dengan baik.
9. Suami tercinta Supriyanto drh, S Kom yang dengan penuh kasih sayang dan kesabaran selalu memberikan motivasi, dukungan dan bantuan kepada penulis untuk segera menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran sangat diharapkan demi perbaikan kearah lebih baik.

Akhirnya penulis menyampaikan semoga hasil penelitian dapat memberikan manfaat di bidang ilmu pengetahuan.

Surabaya, 19 September 2008

Penulis

## RINGKASAN

### **KARAKTERISASI PROFIL PROTEIN VIRUS AVIAN INFLUENZA A SUBTIPE H5N1 DENGAN ANTIBODI H5N1 VAKSIN HOMOLOG, DAN VAKSIN HETEROLOG H5N2 AVIAN INFLUENZA**

Penyakit flu burung (Avian influenza) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus influenza A yang dapat menyerang hewan dan manusia sehingga keberadaannya dianggap sangat mengkhawatirkan. Strain virus yang beredar saat ini adalah H5N1 yang sangat potensial menyebabkan pandemi.

Kemampuan virus untuk mudah melakukan mutasi sehingga menyebabkan *Antigenic drift* dan *Antigenic shift*, menyebabkan sulit untuk dikenali tubuh hospes yang pada akhirnya dapat menyulitkan pemberantasannya. Vaksin dan obat antiviral yang beredar saat ini belum cukup untuk dapat mengendalikan keganasan virus sehingga perlu dilakukan tindakan manajemen pencegahan dan pengendalian yang baik.

Teori yang berkembang saat ini adalah bahwa vaksin yang efektif untuk melawan virus Avian influenza A sub tipe H5N1 adalah vaksin homolog H5N1, dimana yang berperan sebagai antibodi untuk menetralkan virus adalah protein HA dan NA yaitu mencegah perlekatan virus dan penyebaran virus ke luar. Hingga saat ini pengkajian mengenai profil protein virus Avian influenza H5N1 masih belum banyak terungkap di Indonesia. Pengkajian antara reaktifitas virus Avian influenza yang beredar di lapangan dengan vaksin yang tersedia, masih dilakukan dengan teknologi PCR dan sequencing yang dapat mengeluarkan biaya mahal dan waktu lama dengan menggunakan pendekatan pada sisi genom. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui reaktifitas antara virus Avian influenza A sub tipe H5N1 dengan antibodi H5N1 vaksin homolog dan vaksin heterolog H5N2 avian influenza melalui pendekatan protein.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah SDS PAGE untuk mengetahui profil dari protein virus Avian influenza A di lapangan. Selanjutnya dilakukan uji western blotting untuk mengetahui reaksi antara antigen dari virus

Avian influenza A dengan antibodi yang berasal dari serum hasil vaksinasi pada ayam dengan menggunakan vaksin Avian influenza H5N1 dan H5N2, dimana selanjutnya serum diukur titer antibodinya menggunakan uji HI (*hemagglutination inhibition*). Pada uji western blotting, antibodi yang direaksikan dengan antigen memiliki titer 1/1280.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa virus Avian influenza A subtype H5N1 di lapangan memiliki 7 profil protein yaitu PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, dan M1 dengan berat molekul berturut-turut 86,5 kDa ; 85,8 kDa ; 82,5 kDa ; 63,5 kDa ; 56,2 kDa ; 49,7 kDa dan 27,9 kDa.

Terjadi reaktifitas antara antigen dari virus Avian influenza H5N1 di lapangan dengan antibodi dari vaksin Avian influenza H5N1 dan H5N2. Pada uji western blotting, protein yang muncul dengan menggunakan antibodi dari vaksin H5N1 dan vaksin H5N2 adalah sama yaitu protein HA dan protein NA.

## SUMMARY

### **The Characterization of Profile of Avian Influenza A Virus H5N1 Subtype Protein with H5N1 Antibody From Homolog Vaccine, and Heterolog Vaccine H5N2 Avian Influenza**

Avian influenza is a disease caused by Influenza A virus which is able to infect animals and human beings. This condition is worrying. One strain of Avian influenza A virus, H5N1, can cause potential pandemic.

Avian influenza A virus is known capable to mutate easily, and it causes *Antigenic drift* and *Antigenic shift* so that it would be difficult to be recognized by host for controlling. Availability of vaccine and antiviral medicine are not enough to control virulence of virus so a good management for virus prevention and control are needed.

Until now, the research about profile of Avian influenza A H5N1 virus has not been expanded thoroughly in Indonesia. The theory which is developing is that the efficacy of H5N1 vaccine to combat Avian influenza A H5N1 to trigger antibody are HA and NA protein which responsible for virus attachment and spreading virus in host. The analysis about homology level between field virus and available vaccine is still done by PCR and sequencing which need much money and abundant time by approach genome.

The purpose of this research is to study the reactivity between Avian influenza H5N1 virus and antibody from H5N1 and H5N2 Avian influenza vaccine through protein approach.

The methods that used were SDS PAGE to know the profile of Avian influenza A H5N1 virus field isolate. Then followed with western blotting to know the reaction between antigen and antibody which obtained from H5N1 and H5N2 chicken sera. Antibody titre of sera were measured by HI test. Previously antibody titre was 1/1280.

The result showed that Avian influenza A H5N1 virus from field have profile of protein including PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, and M1 with molecular weight in sequence were 86,5 kDa ; 85,8 kDa ; 82,5 kDa ; 63,5 kDa ; 56,2 kDa ; 49,7 kDa dan 27,9 kDa.

There were reactivity between Avian influenza H5N1 field virus with antibody from H5N1 and H5N2 Avian influenza vaccine. Western blotting test showed that there were same protein by using H5N1 and H5N2 vaccine were NA protein and HA protein.

## **Abstract**

### **The Characterization of Profile of Avian Influenza A H5N1 Virus Protein with Anti H5N1 Antibody From Homolog Vaccine, and Heterolog Vaccine H5N2 Avian Influenza**

The purpose of this research is to study the reactivity between Avian influenza H5N1 virus and antibody from H5N1 and H5N2 Avian influenza vaccine through protein approach.

The methods that used were SDS PAGE to know the profile of Avian influenza A H5N1 virus field isolate. Then followed with western blotting to know the reaction between antigen and antibody which obtained from H5N1 and H5N2 chicken sera. Antibody titre of sera were measured by HI test. Previously antibody titre was 1/1280.

The result showed that Avian influenza A H5N1 virus from field have profile of protein including PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, and M1 with molecular weight in sequence were 86,5 kDa ; 85,8 kDa ; 82,5 kDa ; 63,5 kDa ; 56,2 kDa ; 49,7 kDa dan 27,9 kDa.

There were reactivity between Avian influenza H5N1 field virus with antibody from H5N1 and H5N2 Avian influenza vaccine. Western blotting test showed that there were same protein by using H5N1 and H5N2 vaccine were NA protein and HA protein.

**Key words:** Avian influenza A H5N1 virus, HI test, SDS PAGE, Western blotting, Avian influenza A H5N1 and H5N2 vaccine.



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul depan.....	i
Sampul dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	ix
Summary.....	xi
Abstrak.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan umum.....	6
1.3.2 Tujuan khusus.....	7
1.4 Manfaat.....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Struktur dan Sifat Virus Avian Influenza.....	8
2.2 Protein Virus Avian Influenza.....	9
2.3 Patogenesis.....	10
2.4 Replikasi.....	13
2.5 Patologi Anatomi.....	15
2.6 Diagnosis Laboratorium.....	17
2.7 Respon Imun.....	18
2.8 Mekanisme Adaptasi Virus Avian Influenza.....	24
2.9 Pengendalian dan Pemberantasan terhadap Infeksi Avian Influenza..	25

2.10	Antibodi.....	31
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	33
3.1	KERANGKA KONSEPTUAL.....	33
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	35
4.1	Rancangan Penelitian.....	35
4.2	Definisi Operasional.....	36
4.3	Bahan Penelitian.....	35
4.4	Instrumen Penelitian.....	37
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	38
4.6.1	Lokasi penelitian.....	38
4.6.2	Waktu penelitian.....	38
4.7	Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	40
4.7.1	Prosedur penelitian.....	40
4.7.2	Pengumpulan data.....	44
4.8	Kerangka Operasional Penelitian.....	44
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	45
BAB 6	PEMBAHASAN.....	50
BAB 7	PENUTUP.....	55
	DAFTAR PUSTAKA.....	56

**DAFTAR TABEL**

Tabel 5.4 Hasil karakterisasi profil protein virus Avian influenza H5N1 dengan tehnik SDS PAGE dan western blotting..... 48

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Virus Avian Influenza A.....	8
Gambar 2.2 Replikasi Virus Avian Influenza.....	15
Gambar 2.3 Kongesti pada : a). Parenkim Paru-Paru, dan b) Cecal Tonsil.....	16
Gambar 2.4 Mekanisme Pertahanan yang diinduksi oleh infeksi Virus Influenza.....	23
Gambar 5.1 Profil protein virus Avian Influenza A sub tipe H5N1 dari lapangan.....	46
Gambar 5.2 Profil ikatan antara antigen virus Avian influenza dengan antibodi dari vaksin homolog H5N1 dengan menggunakan uji western blotting.....	47
Gambar 5.3. Profil ikatan antara antigen virus Avian influenza dengan antibodi dari vaksin heterolog H5N2 dengan menggunakan uji western blotting.....	47

## DAFTAR SINGKATAN

CPE	: Cytophatogenic Effect
ds	: Double stranded
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	: Fetal calf serum
HA	: Hemagglutinin
HI	: Hemagglutination Inhibition
kDa	: Kilo Dalton
MDCK	: Madine-darby-canine kidney
MEM	: Modified Eagle Medium
NP	: Nucleoprotein
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PBST	: Phosphate Buffer Saline Tween
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RDE	: Reseptor Destroying Enzime
Rf	: Retardation Factor
RNA	: Ribo Nucleic acid
SDS PAGE	: Sodium Dedocyl Sulphate polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	: Tetramethylenediamine
$\mu$ l	: Mikro liter

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Komposisi bahan pembuatan SDS PAGE.....64

# BAB I

## PENDAHULUAN

# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Avian influenza (Flu burung) dan dahulu dikenal sebagai *fowl plaque* pertama kali ditemukan di Italia pada tahun 1978 yang menyebabkan mortalitas tinggi pada unggas. Avian influenza merupakan penyakit zoonosis infeksius yang disebabkan oleh virus influenza A, dapat menyerang saluran pernafasan burung-burung liar dan kadang-kadang berhubungan dengan *outbreak* ayam dan kalkun komersial (Suarez et al., 2004 ; Mehrabanpour et al., 2007).

Berdasarkan prototipe, virus avian influenza A yang menginfeksi unggas dibagi menjadi 2 kelompok yaitu *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) yang bersifat sangat ganas, lethal pada unggas domestik tertentu (ayam dan kalkun) hingga 100% dan menunjukkan gejala klinik bervariasi (asimtomatis, ringan hingga kematian) pada unggas liar dan unggas air domestik sedangkan *low pathogenic avian influenza* (LPAI) bersifat kurang ganas. Patogenitas dan keganasan dari virus HPAI dibatasi oleh strain yang memiliki subtipe H5 dan H7 dan adanya *multibasic cleavage site* (arginin dan lisin) pada prekursor dari molekul hemagglutinin. Virus HPAI muncul dari progenitor LPAI H5 dan H7 melalui mutasi atau rekombinasi (Capua and Maragon, 2006). Sedangkan *cleavage motif* dari virus LPAI memiliki 2 asam amino basic pada posisi 1 dan 4 dari *cleavage site* untuk subtipe H5 dan pada posisi 1 dan 3 untuk subtipe H7 (Suarez et al., 2004). Protein HA dari virus avian influenza non patogen hanya mengandung *single basic residue* pada ikatan peptida yang hanya dapat dipecah oleh *trypsin like protease* yang hanya dibatasi pada tipe sel tertentu seperti sel epitel yang berada di saluran pernafasan manusia dan saluran pencernaan unggas (Martin et al., 2006).

Akhir-akhir ini virus influenza A mendapat perhatian dunia ketika ditemukan ada strain dari sub tipe H5N1 yang sangat patogen yang mungkin sudah muncul di Cina Selatan sebelum tahun 1997, dimana dapat menyerang ternak unggas di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi dan manusia) (Rahardjo dan Nidom, 2004; Webster and Hulse, 2004). Tetapi hingga saat ini masih belum ada bukti ilmiah penularan terjadi antar manusia (Saif and Espinoza, 2006). Beberapa faktor yang dapat berperan dalam perkembangan virus avian influenza antara lain : standar higiene kurang, karakterisasi dari strain dan keberadaan dari dosis virus yang cukup untuk menginfeksi manusia (Capua and Marangon, 2006).

Virus influenza A strain H5N2 pertama kali *outbreak* di Pennsylvania tahun 1983 dan menyebabkan kematian tinggi pada ayam, kalkun dan *guinea fowl* dimana 17 juta unggas di *culling* dengan total kerugian hingga 65 juta dolar ; tahun 1997, strain H5N1 menyerang unggas domestik di Hong Kong dan menyebabkan kematian hingga 15 juta unggas dan pertama kali kejadian penularan ke manusia dengan 18 kasus ; tahun 2003, strain H7N7 menginfeksi unggas dan menyebabkan kerugian hingga 28 juta dan juga ditemukan lebih dari 80 kasus pada manusia. Sejak tahun 2003, muncul epidemi H5N1 di Vietnam, Indonesia, dan Thailand yang menyebabkan *culling* dari jutaan unggas dan terdapat 173 *confirmed cases* pada manusia dengan total kematian 93 yang dilaporkan oleh WHO hingga tahun 2006 (Klopfleish et al., 2006). Pada tiap-tiap episode tersebut, biosekuriti yang diterapkan di peternakan tidak cukup untuk mencegah penyebaran virus avian influenza yang cepat (Capua and Marangon, 2006).

Wabah flu burung yang sangat patogen secara keseluruhan dapat mengakibatkan kehancuran bagi industri ternak unggas, apalagi bagi peternak individual di wilayah

yang terserang. Bagi negara berkembang yang memerlukan unggas dan telur sebagai sumber utama protein, dampak wabah ini terhadap keadaan gizi rakyatnya juga sangat besar. Sekali wabah sudah meluas, pengendaliannya semakin sulit dilakukan dan mungkin memerlukan waktu sampai bertahun-tahun.

Strategi yang digunakan untuk mengurangi evolusi dari virus influenza dan kemungkinan munculnya pandemi meliputi pemisahan dari spesies terinfeksi, peningkatan biosekuriti, perkembangan *rapid diagnostic*, strategi perkembangan dari vaksin baru dan pengetahuan dasar yang baik tentang virus influenza (Webster and Hulse, 2004; Nwe *et al.*, 2006).

Biosekuriti yang dilakukan terhadap penyebaran virus influenza adalah mengontrol akses unggas. Sedangkan pencegahan yang dapat dilakukan meliputi program vaksinasi. Penggunaan vaksinasi untuk mengurangi kecepatan penyebaran dapat menyediakan suatu alternatif untuk *preemptive culling* untuk mengurangi kepekaan dari flock sehat. Efektifitas dari program vaksinasi tergantung beberapa faktor antara lain : kepadatan dari area flock unggas, level dari biosekuriti, karakteristik dari strain virus dan ketersediaan vaksin (Capua and Marangon, 2006).

Vaksinasi dapat digunakan sebagai alat untuk program pengendalian jika digabungkan dengan metode pengendalian virus influenza yang lain. Vaksin yang ada hanya dapat mencegah gejala tetapi tidak dapat mencegah secara komplit terjadinya mutasi virus. Vaksin influenza terbaru meliputi vaksin sub unit, vaksin attenuasi, vaksin DNA dan vaksin influenza inaktif yang telah berkembang selanjutnya menjadi skala komersial (Webster and Hulse, 2004; Nwe *et al.*, 2006).

Berdasarkan penelitian di laboratorium dikatakan bahwa vaksin dapat menyediakan perlindungan yang efektif melawan infeksi virus influenza pada ayam dengan cara menurunkan jumlah total virus yang mengkontaminasi lingkungan akan

tetapi vaksin dapat juga berperan sebagai sumber infeksi pada unggas dan manusia. Bagaimanapun juga agar dapat menimbulkan respon imun protektif, maka vaksin harus memiliki kualitas bagus dan memiliki massa antigenik yang cukup pada unggas. Analisis dari struktur antigenik berguna khususnya untuk mendesain vaksin. Saat ini hanya vaksin inaktif heterolog atau homolog yang digunakan sebagai kandidat vaksin dalam menghadapi pandemi (FAO, 2004). Penggunaan vaksin avian influenza inaktif telah dilaporkan dapat menurunkan *shedding* virus avian influenza pada paparan baru (Sattar et al., 2007).

Virus avian influenza A subtipenya dibagi berdasarkan *serological reactivity* terhadap kombinasi dari glikoprotein HA dan NA sehingga vaksin avian influenza yang digunakan memiliki determinan HA homolog (seperti H5) dan determinan NA homolog (seperti N1) dan heterolog (seperti N2) untuk menyediakan perlindungan melawan strain lapangan virus H5N1 (Mittelholzer, 2006). Penggunaan vaksin sub tipe NA juga dapat digunakan sebagai *serological surveillance* dan strategi untuk mendeteksi sirkulasi dari virus lapangan melalui deteksi antibodi terhadap sub tipe NA dari virus lapangan, dikenal sebagai pendekatan DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*) (FAO, 2004). Vaksin akan menyediakan perlindungan optimal melawan virus yang secara antigenik cocok dengan vaksin tersebut (Tumpey et al., 2001). Sehingga masalah utama dalam persiapan vaksin influenza adalah bahwa vaksin tersebut tidak mampu memberikan perlindungan silang terhadap strain yang berbeda (Szecsi et al., 2006).

Glikoprotein HA dan NA merupakan target dari respon imun protektif dan dapat menghindari respon imun dengan melakukan variasi antigenik dan genetik. Aksi antagonis glikoprotein HA dan NA berperan dalam perlekatan dan pelepasan virion (Harder and Werner, 2006 ; Brett and Johansson, 2005).

Penelitian tentang profil protein dari *whole* virus influenza A H5N1 masih belum banyak diketahui. Sedangkan Nwe *et al.*, (2006) mengemukakan bahwa berat molekul protein HA dari virus influenza H5N1 adalah 56 kDa. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Shaw *et al.*, 2008 dengan menggunakan uji SDS PAGE bahwa berat molekul virus influenza A adalah sebagai berikut : PB1 86,5 kDa ; PB2 85,8 kDa ; PA 82,5 kDa ; HA 63,5 kDa ; NP 56, 2 kDa ; NA 49, 7 kDa ; M1 27,9 kDa ; M2 11, 3 kDa dan NEP 14,3 kDa. Sedangkan penelitian tentang berat molekul dari virus Avian influenza A H5N2 sampai saat ini masih belum terungkap.

Tingkat homologi antara antigen virus avian influenza dengan antibodi saat ini pengujiannya dilakukan melalui pendekatan molekuler dengan menggunakan metode PCR dan sequencing berdasarkan kemiripan asam amino dan nukleotida yang memerlukan pengkajian lebih dalam dan memerlukan waktu lebih lama serta biaya lebih besar (Garcia-Sastre and Palese, 2002 ; Suarez *et al.*, 2004). Sehingga perlu dicarikan metode yang cepat untuk mengetahui tingkat reaktifitas antara antigen avian influenza dengan antibodi yang berasal dari vaksin avian influenza A homolog H5N1 dan vaksin heterolog H5N2 yaitu melalui pendekatan protein dengan menggunakan metode SDS PAGE dan western blotting yang sampai saat ini masih belum pernah diuji coba.

Elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan massa molekul relatif. Salah satu metode elektroforesis adalah satu dimensi elektroforesis yaitu SDS PAGE. PAGE (*Polyacrilamide gel electrophoresis*) merupakan metode pengujian terhadap massa molekul relatif protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. Selama PAGE, protein dipisahkan seperti migrasi melalui matrik tiga dimensi dengan elektrik, maka matrik memiliki dua fungsi yaitu memisahkan protein sesuai dengan ukuran, bentuk, dan muatan listrik yang

memerlukan pH buffer yang sesuai (Rantam, 2003). Prinsip dasar metode ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah *polyacrilamid*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan massa molekul relatifnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu (Mufasirin dkk, 2001). Protein antigen yang sudah diketahui massa molekul relatifnya dapat dibuktikan apakah bersifat immunogen dengan tehnik immunoblotting untuk menentukan massa molekul relatif protein antibodi serum darah yang dapat berikatan dengan protein antigen yang digunakan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimanakah profil protein virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan berdasarkan berat molekul ?
2. Apakah terjadi reaktivitas virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1?
3. Apakah terjadi reaktivitas virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi heterolog subtipe H5N2 ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengetahui karakter profil protein virus avian influenza subtipe H5N1 lapangan dan reaktivitas terhadap antibodi dari hasil vaksinasi yang homolog dan heterolog.

### **1.3.2 Tujuan khusus**

1. Karakterisasi protein virus Avian influenza subtype H5N1 lapangan
2. Untuk mengetahui reaktivitas virus Avian influenza A sub tipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1.
3. Untuk mengetahui reaktivitas virus Avian influenza A sub tipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi heterolog H5N2

### **1.4 Manfaat penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat akademis**

Memberikan informasi ilmiah tentang hasil analisis protein virus influenza A sub tipe H5N1 yang antigenik dan imunogenik.

#### **1.4.2 Manfaat umum**

Dapat melengkapi temuan ilmiah sebagai bahan dasar pengembangan metode untuk pengujian tingkat reaktifitas virus avian influenza A sub tipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1 dan antibodi heterolog H5N2.

## **BAB II**

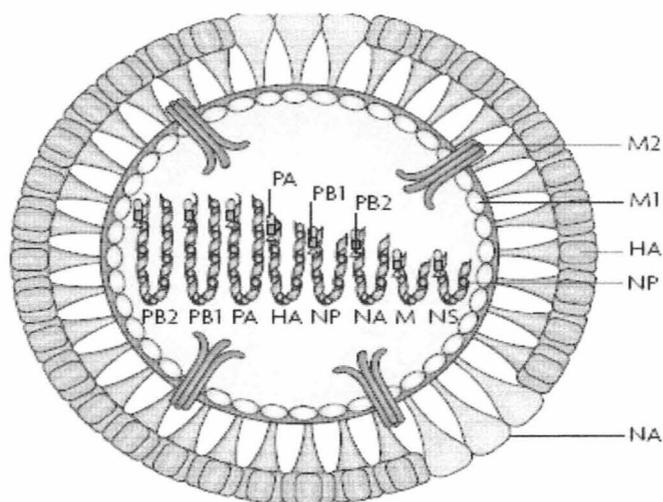
# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Struktur dan Sifat Virus Avian Influenza A

Berdasarkan sifat antigeniknya pada matrik dan nukleoprotein, virus Influenza dibagi dalam 3 tipe yaitu tipe A, B dan C. Virus avian influenza termasuk genus influenza A dari famili *Orthomyxoviridae* yang beramplop, berukuran 80-120 nm, dan mempunyai 8 segmen genom ssRNA *negative sense* yang mengkode 10 protein yaitu hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), nukleoprotein (NP), 3 subunit viral polimerase (PA, PB1 dan PB2), matriks (M1 dan M2), dan protein non struktural (NS1 dan NS2/NEP/*nuclear export protein*) (Gambar 2.1). Hingga saat ini glikoprotein HA dan NA terbagi menjadi 16 subtipe HA (H1-H16) dan 9 subtipe NA (N1-N9) yang telah diidentifikasi pada burung air (Subbarao and Joseph, 2007 ; Rahardjo dan Nidom, 2004 ; Webster and Hulse, 2004). Virus influenza B seperti influenza A yaitu memiliki 8 segmen genom, sedangkan virus influenza C hanya memiliki 7 segmen genom (Mittelholzer, 2006).



Gambar 2.1. Virus Avian Influenza A (Subbarao and Joseph, 2007)

Virus influenza dapat persisten dan tetap infeksi dalam feses pada suhu 4°C selama 35 hari dan suhu 25°C selama 4 hari. Di dalam air, virus persisten dan tetap infeksi pada suhu 0°C selama lebih dari 30 hari dan suhu 22°C selama 4 hari (FAO, 2004). Virus influenza rentan terhadap beberapa desinfektan seperti detergen dan virus ini tetap stabil pada pH sekitar 5,5-8 (Martin et al., 2006).

## 2.2 Protein Virus Avian Influenza

Protein yang dimiliki oleh virus avian influenza A terdiri dari :

### a. Glikoprotein Eksternal

Virus avian influenza A memiliki 2 glikoprotein yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Virus ini memiliki tonjolan (*spike*) untuk dapat menempel pada reseptor yang spesifik pada sel hospes saat menginfeksi sel. Tonjolan HA memiliki bentuk seperti batang dan menonjol ke luar dari selubung sebagai trimer sedangkan tonjolan NA merupakan *mushroom-shaped tetramer*. Kedua glikoprotein ini melekat pada selubung lemak yang berasal dari membran plasma sel hospes oleh rangkaian pendek asam amino hidrofobik (*transmembrane region*). HA merupakan glikoprotein tipe I (terdiri dari 1 N-terminal ectodomain dan 1 C-terminal anchor), sedangkan NA merupakan glikoprotein tipe II (terdiri dari 1 N-proximal anchor dan 1 C-terminal ectodomain) (Horimoto and Kawaoka, 2001).

HA berperan penting untuk mengikat virus pada residu asam sialik permukaan sel hospes dan sebagai fusi amplop virus dengan membran endosom selama *viral uncounting*. Sedangkan aktivitas NA berperan untuk memecah reseptor asam sialik membran sel hospes dan permukaan virion yang dapat mencegah penggabungan virion sehingga dapat memfasilitasi pelepasan virus influenza baru sel terinfeksi (Garcia-Sastre and Palase, 2002 ; De Jong and Hien, 2006).

## **b. Protein internal**

Protein internal dari virus avian influenza A terdiri dari polimerase RNA (PB1, PB2, dan PA), nukleoprotein (NP), matrik (M1, M2), dan protein non struktural (NS1 dan NS2).

Protein M1 berada di dalam amplop, merupakan protein terbanyak di dalam virion, yang berhubungan dengan kompleks ribonukleoprotein. M1 diduga berperan dalam perakitan dan *budding*. Protein M2 adalah protein membran integral yang berfungsi sebagai pH untuk mengaktifkan channel ion yang dapat menyebabkan asidifikasi dari interior virion dalam proses *uncoating* (Subbarao and Joseph, 2007).

Protein NS1 dari virus influenza A merupakan protein non struktural yang diekspresikan pada sejumlah besar dari virus yang terinfeksi, tetapi tidak dapat dideteksi di dalam virion. Aktivitas regulator dari protein virus ini berperan pada patogenitas virus influenza. Virus influenza A mengkode protein NS2 pada sel yang terinfeksi virus. Protein ini dikode oleh *open reading frame* alternatif dari segmen RNA PB1 yang juga secara langsung mensintesis protein PB1, komponen untuk polimerase virus. Protein NS2 berada dalam virion dan berperan untuk ekspor RNP dari nukleus melalui interaksi dengan M1. Protein PB1, PB2 dan PA berperan dalam proses transkripsi dan replikasi RNA virus (Garcia-Sastre and Palase, 2002).

## **2.3 Patogenesis**

Glikoprotein HA pada virus influenza disintesis dalam bentuk HA0 yang pada *post-translation* dipecah menjadi subunit HA1 dan HA2 oleh enzim protease hospes sebelum menjadi protein fungsional dan partikel virus infeksius, dimana pemecahan ini berperan dalam patogenitas virus antara HPAI dan LPAI. Pada virus LPAI dan virus influenza manusia, glikoprotein HA0 dipecah pada daerah *conserved arginine*

*residue* oleh *trypsin-like protease*. Oleh karena itu, infeksi oleh virus influenza dibatasi pada jaringan dimana *trypsin* dan *trypsin-like protease* berada. Sedangkan glikoprotein HA0 dari virus HPAI merupakan daerah *highly cleavable*, memiliki *multiple basic amino acid* pada *cleavage site*, yang dapat dipecah oleh protease intraseluler seperti furin atau *non-trypsin-like extracellular protease* dari protein HA (Subbarao and Joseph, 2007 ; Klopfeisch et al., 2006).

Dasar molekuler dari *neurotropism* pada strain virus influenza tertentu masih belum diketahui tetapi mungkin dapat dipengaruhi oleh hospes dan strain virus. Lebih jauh lagi, adaptasi virus terhadap hospes mungkin penting karena adanya peningkatan *neuropathogenicity* virus influenza subtipe H5N3 yang dapat diproduksi melalui pasase berulang dari kantung udara dan otak ayam. Hal ini menunjukkan bahwa virus HPAI bereplikasi pada sel endotel selama tahap awal infeksi pada ayam dan selanjutnya akan menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah. Pada saat penetrasi ke *blood-brain barrier*, infeksi di propagasi pada sel glia dan neuron (Klopfeisch et al., 2006).

Virus avian influenza A yang berasal dari unggas air telah dapat melintasi barrier hospes dan dapat menginfeksi unggas domestik dan unggas liar (ayam, kalkun, bebek, *guinea fowl*, angsa, burung puyuh, *pheasants*, *partridge*, *mynah birds*, *passerines*, *psittacines*, *budgerigars*, burung camar laut, burung pantai, dan burung laut), babi, kuda, mamalia (anjing laut, ikan paus, unta, anjing, kucing dan manusia). Beberapa burung yang terinfeksi ada yang menunjukkan gejala mulai dari infeksi pernafasan atas ringan, penurunan produksi hingga penyakit sistemik fatal dan ada juga yang tidak menunjukkan gejala atau asimtomatis. Keparahan dari penyakit tergantung pada banyak faktor antara lain virulensi virus, status imun dan stres hospes, yang kadang-kadang diikuti infeksi bakteri. Diantara spesies unggas, kalkun sering menimbulkan

kejadian *outbreak* avian influenza, sedangkan ayam jarang (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Semua subtipe virus avian influenza A yang berbeda telah diisolasi dari burung, tetapi tidak semua strain avian adalah patogenik dimana patogenitas bervariasi tergantung pada spesies burung yang terinfeksi (Mittelholzer, 2006). Sebagian besar virus yang diisolasi dari lapangan adalah avirulen. Virus influenza A yang patogen terhadap unggas tertentu, kemungkinan tidak patogen terhadap unggas lainnya (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Unggas terinfeksi akan mengekskresi virus influenza dalam fekesnya sehingga akan dapat menimbulkan kontaminasi pada pakan, air, peralatan dan kandang yang berperan untuk penyebaran virus (Horimoto and Kawaoka, 2001). Virus HPAI dapat ditularkan secara horizontal dari unggas ke populasi burung liar.

Patogenitas dan virulensi virus influenza ditentukan oleh beberapa faktor yaitu (Behrens and Stoll, 2006) : faktor hospes (keberadaan reseptor target pada sel hospes, ketersediaan enzim pada sel hospes yang penting untuk masuknya virus dan replikasi, kondisi *immunocompetence* dari hospes, imunitas spesifik melawan epitop virus tertentu pada hospes individu dan populasi target, kemampuan sistem imun untuk mengontrol replikasi virus secara efektif respon imun tanpa menyebabkan kerusakan *collateral* yang serius pada sel hospes melalui respon inflamasi), dan faktor virus (kemampuan mengikat sel hospes, kemampuan virus melakukan *shedding*, pembatasan dari efek sitopatogenik untuk mempertahankan keseimbangan antara replikasi virus dan kontrol hospes, pelepasan diri dari *immunosurveillance* melalui evolusi variasi antigenik yang digerakkan oleh tekanan selektif dari respon imun dan rekombinan dengan strain virus yang berbeda).

## 2.4 Replikasi

Virus influenza melekat pada permukaan sel epitel hospes melalui pengikatan glikoprotein HA ke reseptor *sialic acid* hospes. *Sialic acid* berhubungan dengan galaktosa, baik pada reseptor  $\alpha$ -2,3 (avian dan *equine*) maupun pada reseptor  $\alpha$ -2,6 (manusia) yang di *co-express* pada jaringan yang dapat menentukan spesifisitas hospes. Oleh karena itu, *co-infection* influenza pada avian dan manusia dapat menyebabkan terjadinya *genetic reassortment* pada babi yang dikenal sebagai *mixing vessel* (Gurtier, 2006 ; Behrens and Stool, 2006).

Virus yang berikatan dengan reseptor kemudian masuk ke dalam sel hospes melalui endositosis dengan cara membentuk *coated vesicle* (gambar 2.2). Selanjutnya terjadi fusi antara hospes dengan membran virus dalam *acidic vacuole*. Virion (partikel virus) menempel pada *coated pit* khusus di daerah membran sitoplasma dengan protein *clatherin* (Harder and Werner, 2006). Virus selanjutnya akan melakukan penetrasi ke dalam membran plasma setelah mengalami absorpsi. Kemudian virus mengalami *uncoating* (pelepasan selubung) setelah kapsid dilepaskan dan asam nukleat dilepaskan ke dalam inti.

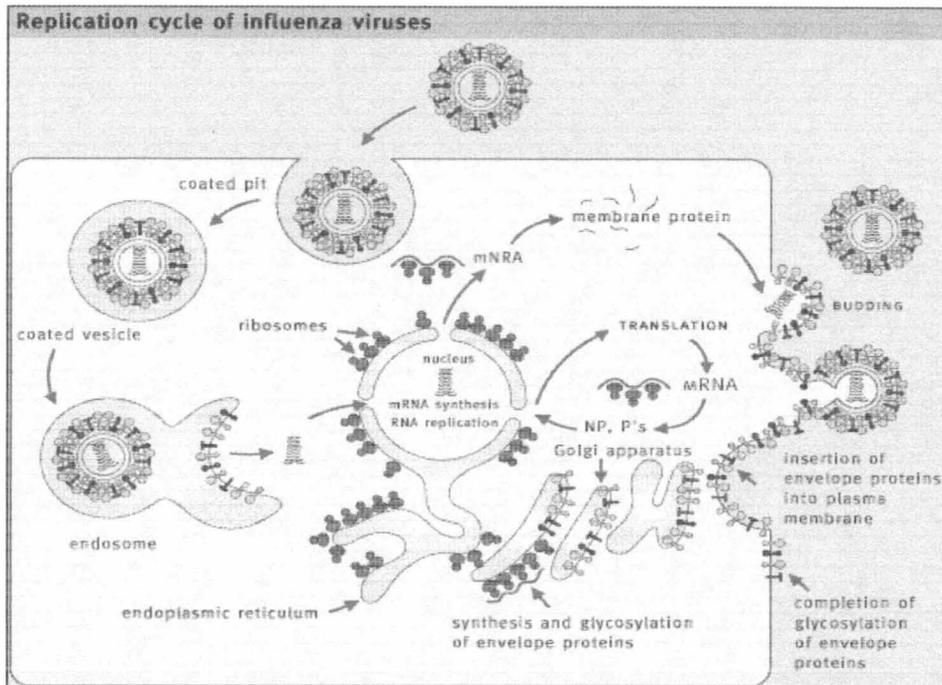
Tahap *uncoating* virion dalam endosom tergantung pada pH asam. Pada famili *Orthomyxoviridae*, seperti virus influenza, pH rendah sangat diperlukan untuk mengaktifkan HA yang akan melebur pada membran virus dengan membran fagolisosom (Rantam, 2003). Saat mencapai level tertentu, penurunan pH diberhentikan melalui protein M2 dimana merangsang pelepasan sebagian dari fusi peptida HA. Hal ini menyebabkan fusi HA dengan membran vesikel dan pelepasan ribonukleoprotein (RNPs) menuju sitoplasma dari sel yang terinfeksi. Influx ion dari endosom ke partikel virus menyebabkan *disconnection* protein virus yang berbeda.

*Uncoating* akan selesai dalam waktu 20 menit-30 menit dari perlekatan *virion* (Gurtier, 2006).

Di dalam nukleus dari sel yang terinfeksi selanjutnya akan terjadi proses transkripsi. Transkripsi adalah suatu mekanisme untuk regulasi pada ekspresi gen. Pada virus influenza, genom RNA (vRNA) langsung dikopi menjadi mRNA (Rantam, 2005 ; Metreveli, 2006 ; Mittelholzer, 2006). Mekanisme transkripsi RNA virus influenza sangat unik yaitu 5' tutup dari mRNA dirubah menjadi mRNA di dalam monosistronik manner dan selanjutnya dirubah menjadi HA, NA, NP, PB1, PB2, dan PA. Untuk masing-masing gen M dan NS, mRNA ini dirubah menjadi kerangka yang berbeda secara berurutan menjadi protein M1 dan M2, NS1 dan NS2. Protein ini digunakan untuk meningkatkan konsentrasi pemicu NP bebas dari perubahan sintesis mRNA menjadi sintesis cRNA dan vRNA. Sintesis terbaru vRNA diselubungi oleh NP, dimana berfungsi untuk tempat transkripsi kedua mRNA virus (Harimoto and Kawaoka, 2001).

Ribonukleoprotein kemudian diangkut menuju nukleus, dimana kompleks polimerase mengikat virus RNA dan selanjutnya terjadi *cleavage* virus RNA melalui aktivasi endonuklease dan secara bersamaan menyebabkan *elongasi* (pemanjangan). Produksi virus RNA dibatasi oleh nukleoprotei di dalam mRNA. Translasi mRNA oleh ribosom terjadi di dalam sitoplasma. Produk translasi adalah protein M1, HA, dan NA. HA dan NA di glikosilasi di dalam retikulum endoplasma kasar, kemudian di proses di dalam Golgi apparatus, dan selanjutnya ditranspor ke permukaan sel dimana mereka berintegrasi dengan membran sel. Lokalisasi nuklear protein M1 dan NS2 berperan untuk migrasi RNP ke luar dari nukleus untuk perakitan *progeny viral particles* di dalam sitoplasma. Selanjutnya RNP-M1 complex berinteraksi dengan protein M1 yang berhubungan dengan membran plasma dan partikel virus baru akan

dilepaskan dengan cara *budding* melalui membran sel oleh aktivitas enzim neuraminidase (NA) dengan memecah reseptor *sialic acid* dari membran sel hospes.



Gambar 2.2 Replikasi virus avian influenza (Heinen, 2003).

## 2.5 Patologi Anatomi

Perubahan patologi anatomi yang tampak pada unggas akibat terinfeksi virus avian influenza A dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu (Metreveli, 2006) :

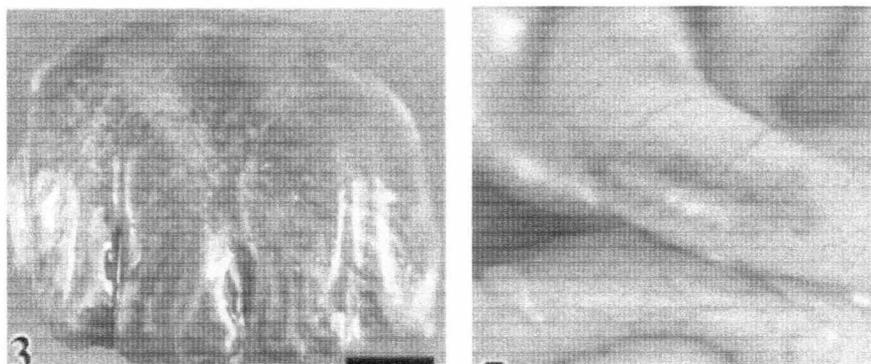
### a. LPAI (*Low pathogenic Avian Influenza*)

Pada kalkun dapat terjadi sinusitis, trakheitis dan radang kantung udara. Pernah juga dilaporkan terjadinya pankreatitis pada kalkun. Pada ayam, yang paling sering dijumpai adalah radang ringan di saluran pernafasan. Selain itu lesi katarhal, serofibrinous, mukopurulen atau kaseosa juga terjadi pada organ reproduktif (ovarium, saluran telur, peritonitis kuning telur) unggas petelur. Mukosa trakea edem dengan eksudat bervariasi mulai dari *serous* hingga *caseous*. Kantung udara menebal dan terdapat fibrin hingga eksudat *caseous*. Eksudat juga dapat dilihat pada oviduk dari ayam petelur (Martin et al., 2006).

### b. HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*)

Harder and Werner (2006) mengemukakan bahwa perubahan patologi pada HPAI yang tampak yaitu :

(i) Bentuk perakut (kematian terjadi dalam waktu 24-36 jam setelah infeksi) dan akut menunjukkan terjadinya hidroperikardium yang tidak jelas, kongesti usus yang ringan dan kadang-kadang dijumpai ptechi pada selaput serosa mesenterium dan perikardium. Ayam yang terinfeksi oleh subtipe H5N1 di Asia kadang-kadang menunjukkan adanya ptechi dan dijumpai lendir di trakhea dan mukosa proventrikulus. Dapat juga dijumpai exudat serosa dalam paru-paru (Elbers, 2003). Selain itu juga ditemukan pembengkakan pada mikrovaskular endothelium, kongesti sistemik, odem dan kongesti pada parenkim paru-paru (gambar 2.5a), kongesti pada peyer patches dan cecal tonsil (gambar 2.5b), dan hemoragi multifokal (Horimoto and Kawaoka, 2001).



Gambar 2.3 Kongesti pada : a) parenkim paru-paru dan b) cecal tonsil pada ayam (Perkins and Swayne, 2001).

Pada penyakit yang mengalami progres, pankreas, liver, limpa, ginjal dan paru-paru dapat menunjukkan foci nekrotik kekuningan. Hemoragi (ptechie dan *echymotic*) menyelubungi lemak abdominal, permukaan serosa dan peritoneum. Peritoneal cavity sering terisi yolk akibat ovarium yang ruptur dan kadang-kadang berhubungan dengan inflamasi berat kantung udara dan peritonium pada unggas yang mampu bertahan hingga 7-10 hari.

Hemoragi dapat juga ditemukan pada proventrikulus, khususnya pada *junction* dengan ventrikulus (*gizzard*) (Martin et al., 2006).

(ii) Pada bebek, burung camar dan burung gereja, menunjukkan terjadinya pneumonia interstisial yang ringan, radang kantung udara dan kadang-kadang miokarditis limfositik.

## 2.6 Diagnosis Laboratorium

Deteksi awal dari infeksi avian influenza sangat penting untuk mengawali program pengendalian dan pemberantasan efektif. Diagnosis infeksi virus influenza dapat dikonfirmasi melalui : isolasi virus, deteksi protein virus, deteksi RNA virus, dan diagnosis serologis. Pada pemeriksaan virologi, swab diperoleh dari kloaka dan oropharynx. Sedangkan pada pemeriksaan serologis digunakan darah. Diagnosis serologis penting ketika tidak tersedia spesimen klinik atau laboratorium tidak memiliki sumber isolasi virus. Metode serologis seperti *hemagglutination inhibition* (HI), *virus neutralization* (VN) dan ELISA penting untuk studi epidemiologi, dan imunologi seperti dalam evaluasi imunogenitas vaksin (antibodi). Uji HI untuk mendeteksi keberhasilan vaksinasi berupa antibodi dapat dilakukan pada hari ke 14 setelah vaksinasi (Ali et al., 2007 ; Harder and Werner, 2006).

Kultur virus dianggap sebagai "*gold standard*," dan dapat mendeteksi virus dalam waktu lama 3-10 hari sehingga dapat mempengaruhi strategi pencegahan. Seperti pada virus influenza manusia, virus avian influenza dapat diisolasi dalam media sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*). Selain itu juga dapat tumbuh baik dalam telur ayam berembrio SPF umur 9-10 hari (Horimoto and Kawaoka, 2001 : De Jong and Hien, 2006).

Uji RT-PCR merupakan metode sensitif dan spesifik untuk mendeteksi asam nukleat virus dan menunjukkan peningkatan sensitifitas diagnostik dibandingkan dengan kultur sel dan metode deteksi antigen lainnya (De Jong and Hien, 2006). Uji ini digunakan pada ekstraksi RNA dari plasma, cairan cerebrospinal, jaringan, feses dan sekresi pernafasan (Rennels et al., 2002). Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi gen matrix yang cepat mengalami perubahan sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi semua subtype virus avian influenza. Selain itu juga dikembangkan untuk mendeteksi gen H5 dan H7. Uji RT\_PCR memiliki *turnaround time* 3 jam dengan isolasi RNA (Lupiani and Reddy, 2005). Tetapi metode RT PCR juga memiliki kerugian antara lain : dapat terjadi kontaminasi dan resiko adanya hasil positif palsu (De Jong and Hien, 2006).

Uji rapid yang dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus antara lain : *immunofluorescence*, *antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *dip-stick lateral flow systems* di dalam cairan swab (Wong and Yuen, 2006 ; Lee et al., 2006).

## 2.7 Respon Imun

Respon imun terhadap infeksi virus avian influenza dibagi 2 yaitu :

### 2.7.1 Respon imun non-spesifik (Respon imun alamiah)

Respon imun non spesifik awal meliputi pelepasan sitokin (IFN  $\alpha/\beta$ ), influk dari granulosit neutrofil dan sel NK. Respon imun non spesifik merupakan *prerequisite* penting untuk respon imun spesifik, dengan cara: 1) Membatasi replikasi virus awal dan *viral load*, 2) Limfosit spesifik antigen dari respon imun spesifik yang diaktifkan oleh molekul ko-stimulator diinduksi pada respon imun non spesifik selama berinteraksi dengan virus. Sitokin dapat mengaktifkan mekanisme efektor lain melalui

induksi respon sel pada respon imun non spesifik seperti sel monosit, sel NK, leukosit dan sel dendrit serta dalam limfosit T dan limfosit B dari sistem imun adaptif. Sitokin diproduksi secara cepat setelah infeksi pada epitel dan oleh sel imun dari mukosa pernafasan yang dapat mengaktifkan sel khususnya dalam sistem imun (Behrens and Stoll, 2006).

Respon imun alamiah terhadap influenza A (H5N1) mempunyai peran dalam patogenesis penyakit. Pertahanan awal dari infeksi virus dilakukan oleh *innate immunity*, tetapi jika respon ini tidak mampu melawan virus dan virus mampu meloloskan diri maka virus akan dideteksi dan dilawan oleh *adaptive immunity*. Mekanisme pertahanan hospes terhadap infeksi virus influenza meliputi barier mekanik yang terdiri dari sel silia, sel dan kelenjar yang mensekresi mukus. Epitel pernafasan dilengkapi secara khusus untuk pertahanan dari masuknya patogen oleh lapisan dari mukus (bronkus), sel silia (bronkus dan bronkioli), dan makrofag alveolar (alveoli). Selama infeksi influenza, makrofag memperantarai lisis dari sel terinfeksi, sekresi interleukin (IL1, IL6, IL12) dan TNF $\alpha$ . Partikel asing di dalam *nasal cavity* atau saluran pernafasan atas akan terjebak di dalam mukus, dibawa kembali ke kerongkongan kemudian ditelan. Dari saluran pernafasan bawah, partikel asing kemudian dibawa ke atas melalui aksi silia dari sel epitel. Di dalam alveoli, apabila terjadi kekurangan silia atau mukus maka makrofag bertanggung jawab untuk merusak partikel asing. Epitel *mucociliary* berperan sebagai barier fisik dalam kaitannya sebagai fungsi dari silia aktif dan adanya *complex array* dari komponen *glycocalyx* seperti *tethered* dan *soluble mucin* yang menunjukkan adanya *cialyloligosakarida* yang berfungsi sebagai reseptor palsu yang menghalangi pengiriman virus pada permukaan epitel (Behrens and Stoll, 2006).

### 2.7.2 Respon Imun Spesifik (Respon Imun Dapatan)

Mekanisme respon imun spesifik meliputi 1). *specific-secretory* antibody IgA dan sel T sitotoksik (CTLs) untuk *recovery* dari infeksi virus, 2). *pre-existing specific* untuk mengeliminasi virus melalui bentuk kompleks Ig-virus setelah reinfeksi. Sel-sel yang berperan penting dalam respon imun spesifik (*adaptive immunity*) adalah sel limfosit T dengan berbagai subsetnya (Sel T-*helper*/sel Th, sel T-sitotoksik/sel Tc, sel T-*suppressor*/sel Ts) yang berperan sebagai respon imun seluler dan sel B yang berperan sebagai respon imun humoral (Kresno, 2001). Infeksi influenza menginduksi kedua macam respon tersebut (Kauffmann et al., 2002).

Respon imun hospes terhadap virus influenza sangat kompleks seperti respon imun humoral yang diperankan oleh antibodi terhadap glikoprotein hemagglutinin dan neuraminidase, sedangkan respon imun seluler berperan terhadap protein membran atau protein internal. Data sebelumnya menunjukkan bahwa sintesis dari antibodi anti hemagglutinin yang protektif memerlukan keberadaan dari sel T. Sel T spesifik virus influenza berperan, baik pada reaksi inflamasi awal maupun *recovery* dari infeksi virus. *Recovery* berhubungan dengan titer virus di dalam paru-paru (Bot et al., 1996). Respon imun humoral yang diperantarai antibodi mampu melawan strain virus homolog tetapi tidak cukup kuat melawan strain heterolog sedangkan pada respon seluler pada sel limfosit T dapat mencapai protein virus pada strain virus heterolog. *Ligand antigen-specific* dari reseptor sel limfosit T dapat menginduksi mekanisme efektor yang secara langsung maupun tidak langsung dapat menyebabkan lisis dari sel yang terinfeksi. Subset sel limfosit T diidentifikasi berdasarkan ekspresi mereka yang berbeda dari ko-reseptor CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> (Thomas et al., 2006).

Glikoprotein HA dan NA dari virus influenza melakukan variasi antigenik dan genetik untuk menghindari respon imun hospes. Antibodi spesifik HA berperan

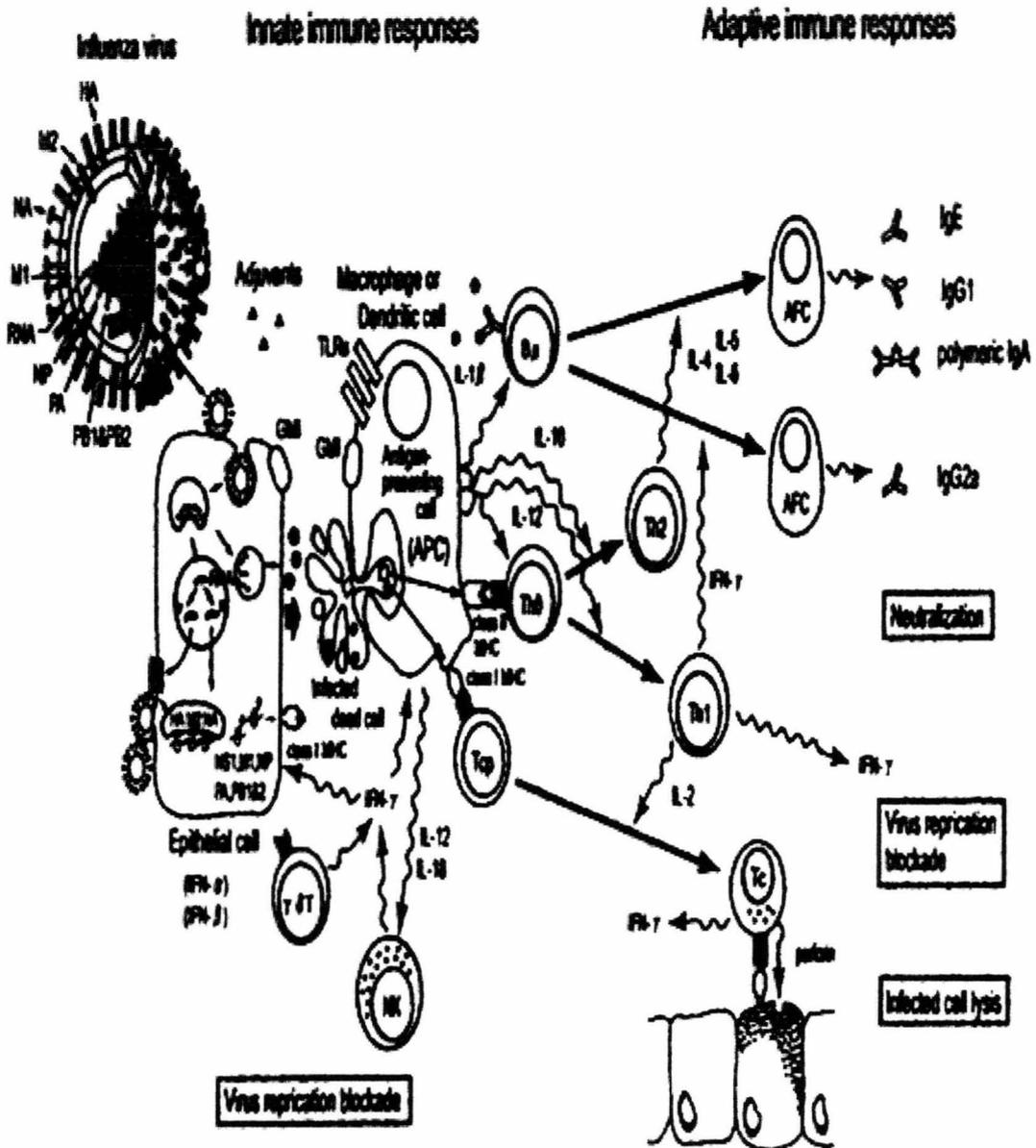
sebagai proteksi karena kemampuannya mencegah penetrasi virus ke sel hospes dengan cara mengblok perlekatan virus. Antibodi spesifik terhadap glikoprotein NA tersebut tidak dapat menetralkan infektivitas tetapi hanya membatasi replikasi virus melalui pencegahan dari pelepasan partikel virus baru. Oleh karena itu, antibodi spesifik terhadap NA dapat menurunkan keparahan dari penyakit. Secara *in vivo*, antibodi spesifik terhadap protein M2 tidak dapat menetralkan infektivitas virus tetapi hanya bersifat protektif (Subbarao and Joseph, 2007). Jika sebuah virus avian influenza dengan glikoprotein HA dan atau NA baru muncul dalam populasi manusia, maka *cell-mediated immunity* secara langsung melawan protein internal *highly conserved* yang memiliki peran perlindungan pada waktu pandemi (Bot *et al.*, 1996). *Cell-mediated immunity* tidak dapat mencegah infeksi tetapi dapat mencegah keparahan penyakit dan kematian akibat infeksi virus avian influenza (Subbarao and Joseph, 2007).

Sel dendritik berperan dalam mengawali dan memicu respon sel limfosit T. Antigen dalam *Lung-resident dendritic cell* selanjutnya diaktifkan untuk kemudian menuju nodus limfatikus. Pada nodus limfatikus, sel dendritik matur akan memacu respon imun melalui sel T dengan reseptor yang spesifik untuk *peptide-MHC complex* pada permukaan sel dendritik. Antigen diproses dan diletakkan pada permukaan sel dendritik sebagai peptida kemudian disajikan melalui molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (Thomas *et al.*, 2006).

*Cell mediated immunity* berperan terhadap resistensi hospes ketika sel T CD8<sup>T</sup> spesifik terhadap protein virus seperti NP atau protein RNA polymerase (PB2 dan PA) yang mengenali peptida virus yang disajikan oleh MHC class I sehingga menyebabkan pelepasan dari sitokin dengan aktivitas antiviral seperti interferon gamma (IFN  $\gamma$ ), *tumor necrosis factor* (TNF) dan perforin (gambar 2.4). Lisis dari sel

epitel yang terinfeksi diperantarai oleh granula eksositosis yang berisi perforin dan *granzymes* yang dapat menurunkan jumlah dari virus yang dilepaskan oleh sel (Thomas *et al.*, 2006 ; Subbarao and Joseph, 2007). Respon sel Tc CD8<sup>+</sup> berperan melalui perlambatan *clearance* virus influenza, membangkitkan rekoveri dari infeksi virus sekunder *lethal* lainnya yang kekurangan sel B maturasi atau antibodi (Thomas *et al.*, 2006).

Respon sel Th CD4<sup>+</sup> bertanggung jawab membantu sel imun lainnya melalui interaksi antar sel secara langsung atau melalui sekresi sitokin intraseluler IFN- $\gamma$  setelah mengenal peptida virus oleh MHC class II. Sel Th CD4<sup>+</sup> sebagai mediator langsung dari pusat efektor, merupakan pusat dari imun adaptif (Thomas *et al.*, 2006).



Gambar 2.4 Mekanisme pertahanan yang diinduksi oleh infeksi virus influenza (Tamura and Kurata, 2004).

## 2.8 Mekanisme Adaptasi Virus Avian Influenza

Mekanisme adaptasi yang dilakukan oleh virus avian influenza terhadap hospes meliputi :

### a. *Antigenic drift*

*Antigenic drift* terjadi akibat kesalahan selama replikasi virus influenza yang tidak dapat diperbaiki dan sering muncul pada virus influenza yang menginfeksi manusia dan jarang terjadi pada virus influenza yang menginfeksi babi, kuda dan unggas. Mutasi ini mengakumulasikan perubahan asam amino di dalam genom virus, yang digerakkan oleh pola *glycosylation* dari dua glikoprotein amplop virus, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) yang dapat menghasilkan strain dengan variasi antigenik baru (Coleman, 2007).

*Antigenic drift* merupakan proses menerus pada virus influenza mamalia dan sebagai dasar untuk evolusi pada influenza epidemik manusia. Penelitian terbaru menunjukkan adanya hubungan antara *antigenic drift* dengan munculnya virus influenza yang ditemukan pada subtipe H5 di Asia. *Antigenic drift* di dalam virus avian influenza pada reservoir alami unggas air dibatasi setelah virus menyebar ke unggas domestik. *Antigenic drift* diperantarai oleh *antibody pressure*, hal ini diartikan bahwa variasi antigenik pada virus influenza disebabkan oleh *immune pressure* pada unggas, sehingga vaksinasi mempunyai kontribusi penting dalam peningkatan kecepatan dari *antigenic drift* (Webster and Hulse, 2004).

### b. *Reassortment (antigenic shift)*

Pandemi terjadi ketika subtipe baru virus avian influenza A melintasi barrier hospes antara burung dan manusia. Hal ini dapat terjadi melalui adaptasi virus influenza A ke sel hospes manusia atau melalui *reassortment (antigenic shift)* segmen

gen pada sel hospes yang terinfeksi secara bersamaan melalui 2 subtipe virus influenza A yang berbeda (Mittelholzer, 2006 ; Coleman, 2007).

Novel glikoprotein HA dan NA bersama-sama dengan gen novel avian PB1 dapat menyebabkan virus mengalami *reassortment* untuk menghindari imunitas humoral hospes saat virus menyebar dari manusia ke manusia lain, dari *precursor* human influenza. Contoh terbaru dari *reassortment* diantara virus influenza dari manusia, babi dan unggas adalah virus H3N2 yang bersirkulasi dalam babi di Amerika Serikat (Webster and Hulse, 2004).

### **c. Rekombinasi**

Rekombinasi menghasilkan segmen RNA influenza tunggal yang mengandung materi genetik dari 2 sumber RNA berbeda. Rekombinasi jarang terjadi pada virus influenza (Webster and Hulse, 2004).

## **2.9 Pengendalian dan Pemberantasan Terhadap Infeksi Avian Influenza**

Penyakit flu burung pada unggas sampai saat ini masih belum ada obatnya, pemberian antibiotika hanya untuk mengobati infeksi sekunder oleh bakteri. Sehingga perlu langkah strategis mengendalikan penyebaran flu burung antar unggas sekaligus mengurangi resiko kesehatan manusia yang mungkin timbul akibat infeksi flu burung subtipe H5N1. Secara menyeluruh strategi pengendalian dan pemberantasan yang efektif terhadap wabah avian influenza meliputi program *biosecurity*, depopulasi atau pemusnahan terbatas di daerah tertular, surveilans dan penelusuran, *stamping out*, dan vaksinasi serta yang lebih penting lagi adalah peningkatan kesadaran masyarakat terhadap penyakit flu burung (Rahardjo dan Nidom, 2004 ).

## A. Biosekuriti

Hal yang paling utama untuk mengendalikan penyakit flu burung adalah tindakan biosekuriti di peternakan untuk mencegah penyebaran penyakit antar unggas melalui manajemen *all-in-all-out*, isolasi unggas terinfeksi dari unggas sehat, mencegah kontak antara unggas dengan burung liar atau unggas air, mengatur lalu lintas unggas, desinfeksi terhadap kandang, dan peralatan kandang (formalin, klorin, fenol, dan detergen) serta sanitasi pekerja kandang (Rahardjo and Nidom, 2004).

Kontrol terhadap infeksi LPAI pada unggas melalui unggas yang terinfeksi secara akut dianjurkan pada daerah non endemik dengan tujuan untuk mengurangi resiko terhadap perkembangan dari infeksi HPAI. Hal ini dilakukan pada daerah yang memiliki densitas tinggi dari populasi unggas. Oleh karena itu selama kejadian *outbreak* tahun 1999-2000 di Italia, tidak hanya unggas yang terinfeksi atau pernah kontak dengan unggas terinfeksi yang diberantas, tetapi juga flock yang memiliki resiko terhadap infeksi dalam radius 1 kilometer dari peternakan terinfeksi yang diberantas (Harder and Werner, 2006).

## B. Depopulasi atau Pemusnahan terbatas di daerah tertular

Depopulasi adalah suatu tindakan untuk mengurangi populasi unggas yang menjadi sumber penularan penyakit flu burung. Jika terjadi *oubreak* flu burung maka dapat dilakukan depopulasi pada daerah unggas yang terserang walaupun infeksi terjadi oleh LPAI. Pada depopulasi, semua unggas dan produknya termasuk feses dibakar. Depopulasi dilaksanakan pada seluruh populasi unggas dalam satu kandang baik yang terinfeksi maupun masih sehat untuk mencegah timbulnya gejala penyakit (Rahardjo dan Nidom, 2004).

### C. Surveilans dan Penelusuran

Pada surveilans, pengambilan sampel dilakukan dari peternakan yang cukup representatif di daerah tertular, terancam maupun bebas. Sampel-sampel tersebut kemudian diuji untuk dilakukan pengkajian terhadap dinamika virus dan memantau perubahan antigenik virus ; memantau vaksin (monitoring setelah vaksinasi) dan pemetakan wilayah untuk daerah bebas penyakit.

Penelusuran dapat dilakukan dengan menggunakan kajian epidemiologi retrospektif untuk menelusuri asal sumber infeksi dan *risk assessment* untuk mengidentifikasi penyebaran penyakit. Penelusuran dapat dimulai dengan mengikuti seluruh lalu lintas unggas, produk unggas, pekerja peternakan, maupun kendaraan pengangkutan unggas (Rahardjo dan Nidom, 2004).

### D. *Stamping Out*

*Stamping out* atau pemusnahan total seluruh ternak unggas yang sakit maupun sehat dilakukan pada daerah tertular virus avian influenza baru dan juga terhadap semua unggas yang berada dalam radius 1 km dari peternakan tertular. Pada daerah bebas atau terancam apabila timbul kasus flu burung burung dan telah didiagnosa secara klinis, patologi anatomi dan epidemiologi serta dikonfirmasi secara laboratoris maka dilakukan tindakan *stamping out* (Rahardjo dan Nidom, 2004 ; Martin et al., 2006).

Dasar dari pengendalian infeksi HPAI melalui *stamping out* adalah : isolasi daerah tertular, menyembelih unggas yang terinfeksi maupun potensial untuk menjadi terinfeksi dan membuang karkas, dekontaminasi area kandang unggas, melakukan *rapid surveillance* dari area sekitar untuk menentukan kemungkinan terjadi penyebaran, desinfeksi pasar dan unggas sakit atau mati seharusnya tidak masuk ke rantai makanan manusia maupun hewan (Martin et al., 2006).

## E. Vaksinasi

Vaksinasi telah digunakan sebagai alat penting untuk melawan penyakit infeksius lebih dari 200 tahun lalu. Vaksinasi pada manusia pertama kali dikembangkan pada tahun 1798 ketika Edward Jenner telah berhasil mencegah infeksi smallpox pada *milkmaids*. Saat ini pencegahan dari infeksi bakteri dan virus melalui vaksinasi sangat bermanfaat dalam menurunkan mortalitas penyakit dan biaya kesehatan

Vaksin merupakan usaha pencegahan terhadap infeksi influenza yang dapat memberikan imunitas terhadap individu dan kelompok serta kejadian pandemi. Selama *seasonal epidemic*, vaksin tahunan dapat menurunkan kemungkinan terjadinya *reassortment* virus pada manusia dan menurunkan insidensi untuk memfasilitasi *surveillance*. Tehnologi terbaru menunjukkan bahwa perkembangan vaksin influenza memerlukan waktu hingga 6 bulan dari munculnya sub tipe baru (Lee et al., 2006).

Vaksinasi adalah proses rangsangan terhadap respon imun adaptif yang protektif melawan mikroba dalam bentuk nonpatogenik atau komponen dari mikroba sendiri (Abbas and Lichtman, 2006).

Dua pertimbangan utama dalam penggunaan vaksin influenza pada unggas yaitu ekskresi persisten dari virus avian influenza pada unggas yang divaksin dan perkembangan strain baru dari virus influenza sebagai hasil dari vaksinasi. Sedangkan Tujuan utama penggunaan vaksinasi adalah untuk mengurangi penurunan produksi unggas akibat penyakit ; mengurangi resiko penyebaran virus avian influenza pada hewan atau manusia melalui penurunan *shedding* virus ; menciptakan barrier antara daerah bebas dengan daerah infeksi dan untuk membantu mengendalikan dan memberantas penyakit (FAO, 2004).

Kriteria terhadap seleksi dari strain vaksin yang akan digunakan untuk persiapan vaksin komersial meliputi kecepatan replikasi tinggi dalam telur berembrio, penurunan *shedding* virus pada ayam yang divaksin, titer antibodi tinggi yang dapat ditimbulkan dan replikasi rendah dari virusantang (Sattar et al., 2007).

Dua strategi yang telah digunakan untuk mempersiapkan vaksin unggas H5 adalah : 1). Vaksin rekombinan. Beberapa contoh novel dari vaksin ini meliputi vaksin subunit, vaksin DNA, vaksin *reverse genetics*, vaksin *adenovirus-vectored vaccine* yang diberikan melalui air minum, dan *Newcastle disease-vectored vaccine* yang pemberiannya melalui aerosol. Beberapa *recombinant fowlpox virus-vector vaccines* yang mengekspresikan antigen H5 telah dikembangkan dan penggunaannya telah diijinkan tahun 1990 di Mexico untuk *highly pathogenic* H5N2, dan 2). Vaksin konvensional, vaksin inaktif yang ditumbuhkan di telur ayam bertunas, seperti vaksin A/chicken/Mexico/232/94 (H5N2) yang telah digunakan di Hong Kong dan vaksin A/turkey/England/N-28/73 (H5N2) yang telah digunakan di Republik Cina. Vaksin ini meliputi vaksin inaktif homolog dan vaksin inaktif heterolog. Vaksin ini berasal dari *whole antigen* virus avian influenza yang diinaktifkan ditambah dengan adjuvant emulsi (Saif and Espinoza, 2006 ; Webster and Hulse, 2004).

Virus avian Influenza ditumbuhkan pada telur berembrio dan diinaktifkan secara kimiawi. Selanjutnya virus yang sudah diinaktifkan ditambahkan dengan adjuvant oil emulsion untuk meningkatkan respon imun. Keberhasilan vaksin tergantung pada vaksin antigen dan virus lapangan yang memiliki tipe H yang sama (*homologous haemagglutinin*) (Breytenbach, 2005).

Vaksin homolog inaktif adalah vaksin yang berasal dari antigen HA dan NA, sama seperti strain yang diisolasi pada waktu *outbreak*. Keuntungan dari penggunaan vaksin ini adalah : sudah tersedia sebagai vaksin komersial, *onset of immunity* cepat

dengan penambahan adjuvant, harga murah dan aman penggunaannya. Sedangkan kerugiannya adalah tidak mungkin untuk membedakan vaksinasi dari unggas yang terinfeksi secara serologis, memerlukan booster untuk meningkatkan respon imun, dan pemberian tidak efektif karena harus melalui injeksi perkutan (Martin et al., 2006).

Vaksin heterolog inaktif adalah vaksin yang dibuat dengan menggunakan strategi DIVA (*Differentiation of Infected from Vaccinated Animals*) yaitu berasal dari subtipe HA sama dan NA berbeda dibandingkan dengan virus yang diisolasi saat *outbreak*. Keuntungan dari vaksin ini adalah subtipe NA dari infeksi lapangan dapat digunakan sebagai marker. Berdasarkan pemeriksaan serologis dapat menentukan apakah unggas dalam flock yang divaksin juga terinfeksi. Sedangkan kerugiannya adalah pada pemeriksaan serologis mengeluarkan biaya mahal karena memerlukan penambahan reagen ; memerlukan pengetahuan luas mengenai sirkulasi subtipe antigen NA dan pemberiannya melalui injeksi perkutan dan harus dibooster (Martin et al., 2006). Strategi DIVA memerlukan uji dari sampel serum untuk antibodi terhadap NA, untuk membedakan strain lapangan dari strain vaksin. Hal ini diasumsikan bahwa antigen NA heterolog tidak bersirkulasi di lapangan sehingga pengetahuan mengenai sirkulasi virus avian influenza (virulen atau tidak) diketahui (Martin et al., 2006).

Vaksin *recombinant fowlpox virus* dibuat dari virus fowlpox yang disisipi gen HA influenza di dalamnya, dimana memiliki beberapa keuntungan antara lain memungkinkan untuk membedakan antara unggas yang diinfeksi dengan unggas yang divaksin melalui uji serologis, spesifisitas dari respon imun secara langsung melawan komponen HA dan pelaksanaan vaksinasi cepat dan hanya memerlukan dosis tunggal dengan biaya murah. Sedangkan kerugiannya adalah hanya dapat digunakan untuk vaksinasi ayam yang tidak pernah terpapar fowlpox sebelumnya. Sehingga hanya dapat diaplikasikan pada ayam umur 1 hari (Martin et al., 2006). Respon terhadap vaksinasi menggunakan *fowlpox virus vectored* hanya dibatasi pada unggas dewasa yang sebelumnya pernah terpapar infeksi dengan virus fowlpox atau vaksin melawan

fowlpox. Vaksin menggunakan *fowlpox virus-vectored* masih belum diketahui tingkat keberhasilannya terhadap spesies unggas. Selain itu vaksin ini juga tidak dapat menginduksi antibodi terhadap antigen NA. Oleh karena itu hanya burung atau unggas yang terinfeksi lapangan yang dapat menimbulkan antibodi (FAO, 2004).

Vaksin baru untuk melawan infeksi virus influenza A adalah berasal dari klon *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA), menggunakan delapan sistem transfeksi plasmid DNA yang dikenal sebagai *reverse genetic*. Beberapa keunggulan penggunaan vaksin *reverse genetic* pada unggas adalah : perkembangan vaksin yang mudah dan cepat; vaksinasi seragam; biaya murah dan aman serta efektif (Webster and Hulse, 2004).

Penggunaan vaksinasi untuk infeksi influenza harus berdasarkan OIE *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. OIE *Manual* menetapkan '*Principles of Veterinary Vaccine Production*', meliputi tipe vaksin atau bentuk vaksin, kualitas vaksin, *master seed management*, dokumentasi dari *manufacturing process* dan *record-keeping* (FAO, 2004).

## 2.10. Antibodi

Antibodi adalah *epitope-binding proteins* yang dapat ditemukan dalam 2 bentuk yaitu sebagai antibodi yang berikatan dengan membran dari sel B atau sebagai molekul terlarut yang disekresi oleh sel plasma. Antibodi yang disekresi bersirkulasi dalam darah, dimana berperan sebagai efektor dari imunitas humoral melalui penangkapan antigen untuk selanjutnya dieliminasi (Nossal, 1993).

3 fungsi utama dari antibodi antara lain : (1) opsonisasi, yang merangsang fagositosis antigen melalui makrofag dan netrofil, (2) aktivasi komplemen, yang dapat mengkoleksi protein untuk perforasi membran sel, dan (3) *antibody-dependent cell-*

*mediated cytotoxicity* (ADCC), dimana dapat membunuh target sel yang terikat antibodi (Nossal, 1993).

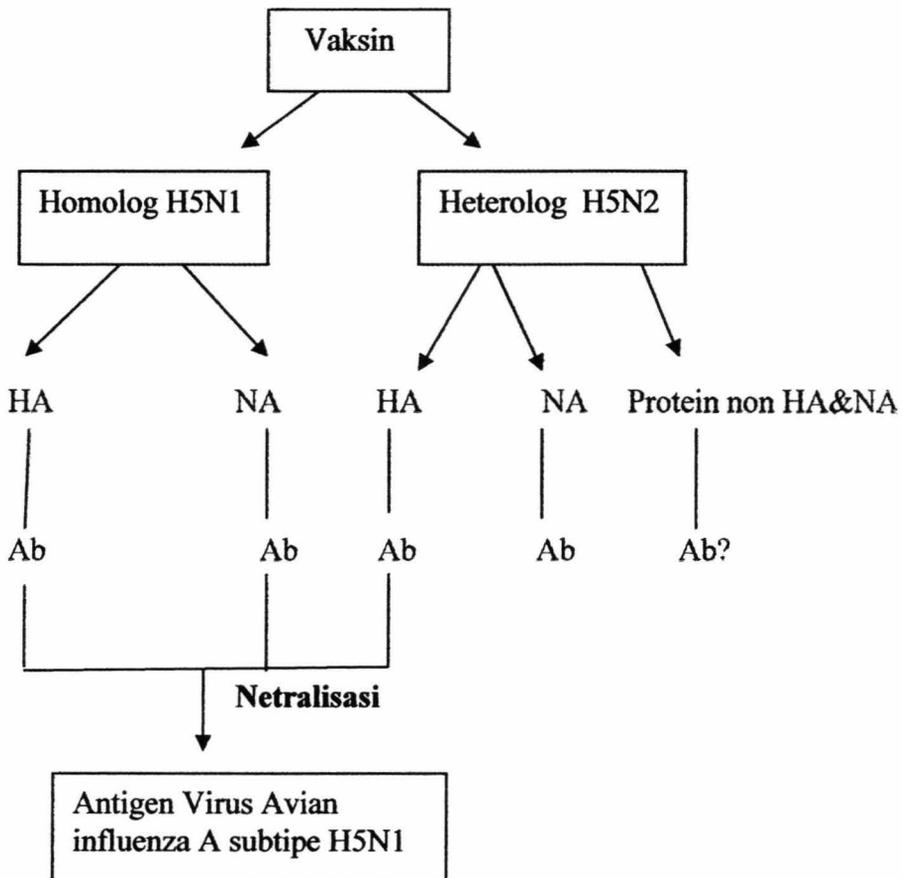
*Immunogenicity* adalah kemampuan untuk menginduksi respon imun humoral maupun respon imun seluler. Sedangkan imunogen adalah substansi yang dapat merangsang respon imun. *Immunogenicity* ditentukan oleh 4 properti dari imunogen yaitu : keasingan, ukuran molekul, komposisi kimia dan kompleksitas serta kemampuan untuk diproses dan disajikan dengan molekul MHC pada permukaan dari *Antigen presenting cell* (APC) (Nossal, 1993).

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS**  
**PENELITIAN**

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual**



**Keterangan Singkatan :**

**HA : Hemagglutinin**

**NA : Neuraminidase**

**Ab : Antibodi**

Keterangan diagram alir :

Pada penelitian ini serum yang digunakan sebagai antibodi berasal dari vaksin Avian influenza H5N1 dan H5N2. untuk pengujian reaktivitas antara antigen virus Avian influenza H5N1 di lapangan dengan antibodi. Berdasarkan teori bahwa protein virus Avian influenza permukaan, hemagglutinin dan neuraminidase dari vaksin H5N1 mampu menimbulkan antibodi untuk menetralsir antigen virus Avian influenza H5N1 lapangan. Vaksin H5N2 hanya mampu menimbulkan antibodi untuk menetralsir virus pada protein hemagglutinin sedangkan antibodi terhadap protein neuraminidase masih belum terbukti apakah mampu menetralsir virus Avian influenza dan juga adanya protein non hemagglutinin dan neuraminidase Avian influenza yang belum terbukti mampu menimbulkan antibodi.

## **BAB IV**

# **METODE PENELITIAN**

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yaitu untuk mengetahui profil protein virus avian influenza subtipe H5N1 dari lapangan dan tingkat reaktifitas antara virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1 dan antibodi heterolog H5N2 avian influenza.

#### 4.2 Definisi Operasional :

1. Profil protein adalah kemunculan protein virus avian influenza berupa band atau pita dengan variasi berat molekul pada pemeriksaan SDS PAGE.
2. a. Reaktivitas adalah reaksi antara antigen virus avian influenza subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1.  
b. Reaktivitas adalah reaksi antara antigen virus avian influenza subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi heterolog H5N2.
3. Titer antibodi adalah pengenceran tertinggi dari antibodi yang masih mampu menghambat aglutinasi dengan sempurna dengan uji HI (*Hemagglutination Inhibition*)

#### 4.3 Bahan Penelitian

##### a. Bahan untuk produksi antibodi poliklonal (Antibodi primer)

1). Serum, berasal dari :

- Ayam kampung umur 4 minggu, menggunakan vaksin homolog H5N1 dan vaksin heterolog H5N2. Pengambilan sampel serum dilakukan setelah booster kedua

melalui vena brachialis di desa Geluran, Sepanjang, Sidoarjo pada bulan April-Juli 2007.

- Ayam layer umur 24 minggu, menggunakan vaksin heterolog H5N2. Dan Ayam layer umur 40 minggu, menggunakan vaksin homolog H5N1. Pengambilan sampel serum dilakukan setelah booster kedua di Blitar pada bulan April 2008.

#### **b. Bahan untuk inokulasi virus Avian influenza pada kultur sel MDCK**

- 1). Virus influenza A subtipe H5N1, isolat lokal A/Chicken/Jatim/122/2005 (Nidom, 2005).
- 2). Sel MDCK
- 3). Tripsin-EDTA
- 4). MEM

#### **c. Bahan untuk Uji HA dan HI**

- 1). PBS
- 2). RBC (*red blood cell*) ayam
- 3). Serum ayam
- 4). Virus avian influenza A H5N1, isolat lokal A/chicken/Jatim/122/2005
- 5). RDE

#### **d. Bahan untuk Uji SDS-PAGE**

- 1). Acrilamid dan bisakrilamid
- 2). Tris HCl pH 6,8 dan pH 8,8
- 3). Temed
- 4). APS 10%
- 5). SDS 10%
- 6). Bahan untuk pengembang Warna : zitronensaure dan formaldehid
- 7). Bahan untuk Elektroforesis

9). Comassie Blue

**e. Bahan untuk Uji Western Blotting**

- 1). Membran PVDF
- 2). Kertas Whatmann
- 3). Bahan untuk transfer Buffer
- 4). 0,05% Tween 20
- 5). Antibodi I : Serum hasil vaksinasi dari vaksin homolog H5N1 dan heterolog H5N2  
dan antibodi II ( conjugated anti chicken)

**4.5 Instrumen Penelitian**

**a. Instrumen untuk Kultur sel**

- 1). Flask sel kultur
- 2). Mikropipet
- 3). Sentrifus
- 4). Inkubator
- 5). Blue tip dan yellow tip

**b. Instrumen untuk Uji HA dan HI**

- 1). Mechanical vibrator
- 2). Microtiter Plate untuk uji *hemagglutinin inhibition* HI (Nunc)
- 3). Multichannel pipette
- 4). Blue tip, Yellow tip
- 5). Tabung Conical
- 6). Sduit tuberculin 1ml, 3 ml
- 7). Sentrifus

8). Inkubator

### **c. Instrumen untuk Uji SDS-PAGE dan Western Blotting**

- 1). Inkubator
- 2). Apparatus SDS-PAGE Bio Craft
- 3). Penjepit
- 4). Blue tip dan Yellow Tip
- 5). Shaker

## **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

### **4.6.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium Avian Influenza, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

### **4.6.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan April 2008-September 2008

## **4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan data**

### **4.7.1 Prosedur Penelitian**

#### **1. Inokulasi virus pada kultur sel MDCK dan panen virus**

##### **a. Persiapan Pembuatan Kultur Sel MDCK (*Madin-Darby-Canine Kidney*)**

Sel MDCK di dalam MEM (*Modified Eagle Medium*) dimasukkan dalam konikal. Selanjutnya flash dicuci dengan 3 ml PBS sebanyak 2 kali. Setelah itu PBS dikeluarkan dan flash dicuci dengan 2 ml Tripsin-EDTA sebanyak 2 kali. Sisakan  $\pm$  2/3 tetes dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 35-36°C dan selanjutnya diamati

di bawah mikroskop. Setelah sel lepas, ditambahkan 9 ml *growth medium* (berisi 38 ml MEM+ 2 ml FBS + 400 ml L-Glutamin selanjutnya ditambah NaHCO<sub>3</sub> sampai cairan berwarna merah kekuningan) dan dilakukan pipetting *up-down* sampai semua sel terpecah. Selanjutnya dari cairan tersebut diambil 3 ml untuk kemudian ditambahkan ke dalam konikal yang berisi *growth medium*. Setelah itu diambil 8 ml dari campuran tersebut dan diisikan ke dalam flash baru. Kemudian di inkubator dalam suhu 35-36°C. Pertumbuhan sel diamati setiap hari sampai confluent > 80%.

Virus avian influenza dari lapangan yang sudah diidentifikasi dan dikarakterisasi oleh Nidom, 2005 selanjutnya dilakukan propagasi pada *cell line continous* MDCK dengan cara menginokulasikan 200 µl suspensi virus pada 6 *well plate* setelah medium dibuang dan dicuci dengan PBS. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 jam. Setelah itu pada masing-masing *well* diisikan 2 ml *maintenance medium* dan diamati pertumbuhan CPE setiap hari (Gioia, 2008).

Panen dilakukan bila sudah tampak banyak CPE yang *confluent* (lebih dari 80%). Setelah tampak CPE kemudian supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tube 15 ml dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Kemudian dipindahkan ke dalam *screw tube* untuk dibuat stock atau langsung dibuat penelitian selanjutnya. Sisa virus dapat disimpan secara aliquot dalam suhu -80°C (Gioia, 2008 ; Clavijo, 2002).

### **2.a. Prosedur Kerja Uji Hemaglutinasi (HA)**

Uji HA mikrotehnik digunakan untuk mengetahui titer antigen dan retitrasi antigen. Metode uji HA yang dilakukan adalah dengan cara berikut yaitu mengisi lubang pada mikroplate berbentuk "V" (A2-A12 dan B2-B12) dengan PBS sebanyak 50µl. Kemudian pada lubang A1 dimasukkan 100µl antigen, dan pada lubang B1 dimasukkan 100µl PBS digunakan sebagai kontrol eritrosit. Selanjutnya

dilakukan pengenceran berseri dengan cara mengambil 50µl dari lubang pertama kemudian dilanjutkan ke lubang berikutnya sampai lubang akhir, lalu sisa 50µl dibuang. Semua lubang selanjutnya diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50µl dan dicampur dengan menggunakan *mechanical vibrator* lalu diinkubasi pada suhu ruangan (22-25°C) selama 30-60 menit. Kemudian titer antigen dibaca. Hemaglutinasi terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata pada dasar lubang dan penjernihan dari cairan bagian atas tanpa terjadinya pengendapan eritrosit berbentuk titik di tengah lubang. Setelah titer antigen diketahui kemudian dilakukan pengenceran antigen. Antigen yang diperlukan dalam pengenceran adalah antigen yang memiliki titer 8HA Unit/50µl (WHO, 2004 dan Ernawati dkk., 1996)

#### **b. Prosedur Kerja Uji Retitrasi Antigen 8HA Unit/0,05 ml**

Untuk menguji ketepatan pengenceran perlu dilakukan retitrasi dengan metode yang sama seperti uji HA dengan menggunakan antigen yang telah diencerkan. Retitrasi dilakukan dengan cara mengisi lubang pada mikroplate (A2-A6 dan D2-D6) dengan 50µl PBS. Selanjutnya antigen yang telah diencerkan sebanyak 100µl dimasukkan ke dalam lubang A1-C1, kecuali lubang D1 diisi 100µl PBS, yang digunakan sebagai kontrol eritrosit. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan cara mengambil 50µl dari lubang pertama kemudian dilanjutkan ke lubang berikutnya demikian seterusnya sampai lubang akhir, lalu sisa 50µl di buang. Selanjutnya semua lubang diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50µl dan dicampur dengan menggunakan *mechanical vibrator* lalu diinkubasi pada suhu ruangan (22-25°C) selama 30-60 menit. Selanjutnya titer retitrasi dibaca. Bila pengenceran pada uji HA tepat, maka pada lubang 1-3 (A-C) akan terjadi aglutinasi.

### c. Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI)

Uji hambatan hemaglutinasi digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik avian influenza subtipe H5.

Sebelum dilakukan uji HI, untuk menginaktivkan inhibitor non spesifik, serum ditambah dengan RDE (*Receptor Destroying Enzyme*). 3 bagian RDE ditambah dengan 1 bagian serum dan selanjutnya diinkubasi overnight pada suhu 37°C. Kemudian diinkubasi lagi selama 56°C selama 30 menit dan ditambahkan 6 bagian PBS sehingga diperoleh pengenceran akhir dari serum 1 : 10 (Bright et al., 2008).

Metode uji HI yang digunakan dengan cara memasukkan 25µl PBS ke dalam baris B-H (B1-H12) dan 50µl serum ke dalam baris A1-A12. Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri dengan cara memindahkan 25µl dari baris A ke baris B, demikian seterusnya hingga baris G, buang sisa 25µl, kecuali baris H (H1-H12) ditambahkan 25µl serum sebagai kontrol serum. Kemudian semua lubang plate diisi dengan 25µl antigen standard 8HA kecuali pada baris H (H1-H12). Selanjutnya dicampur dengan menggunakan *mechanical vibrator* lalu diinkubasi pada suhu ruangan selama 30-45 menit. Setelah diinkubasi, semua lubang diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50µl lalu dicampur dengan *mechanical vibrator* dan diinkubasi selama 30-60 menit pada suhu ruangan kemudian dibaca titer HI. HI dinyatakan positif jika terdapat endapan eritrosit berbentuk titik di tengah lubang.

### 3. Prosedur Kerja SDS-PAGE

Kedua glass plate yang telah diberi *spacer* dipasang secara rapat dan kuat dengan menggunakan penjepit. Kemudian campuran *separating gel* 10% (3 ml solution A + 2,25 ml solution B + 3,75 ml H<sub>2</sub>O + 40 µl APS 10% + 5 µl TEMED) dimasukkan secara hati-hati ke dalam glass plate dan biarkan selama 10-30 menit hingga terbentuk gel. Setelah itu dituangi air hingga rata. Kemudian air dibuang dan plate

diisi dengan campuran *stacking* gel 4,5% (0,45 ml solution A + 0,75 ml solution B + 1,8 ml H<sub>2</sub>O + 10 µl APS 10% + TEMED 5 µl) sambil dipasang sisir dan biarkan selama 30 menit hingga terbentuk gel dan sumuran. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. Selanjutnya plate dipasang pada apparatus elektroforesis Bio craft dan di dalamnya diisi dengan buffer. Kemudian sampel virus avian influenza dimasukkan ke dalam masing-masing well (10µl sampel + 2 µl RIPA Buffer + 10 µl *reducing sample buffer/ laemly sample buffer*) lalu dipanaskan dengan waterbath selama 5 menit pada suhu 95°C dan selanjutnya didinginkan. Setelah itu anoda dihubungkan dengan reservoir bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 40 mA, tegangan listrik 125 volt. Running dihentikan setelah warna biru penanda mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah plate gel kira-kira sekitar 2 jam. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan merendam gel dalam larutan comassie blue selama 30-60 menit sambil digoyang. Setelah itu dicuci selama 3 kali dengan masing-masing pencucian selama 30 menit sambil digoyang sampai gel jernih. Kemudian hasil elektroforesis di dokumentasikan.

Selanjutnya ukuran hasil elektroforesis sampel dibandingkan dengan marker protein sebagai indikasi penentuan berat molekul yang dapat dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing band dengan menggunakan rumus :

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

Setelah itu dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan

diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker (Rantam, 2003 ; Ausubel et al., 1992 ; Invitrogen, 2003).

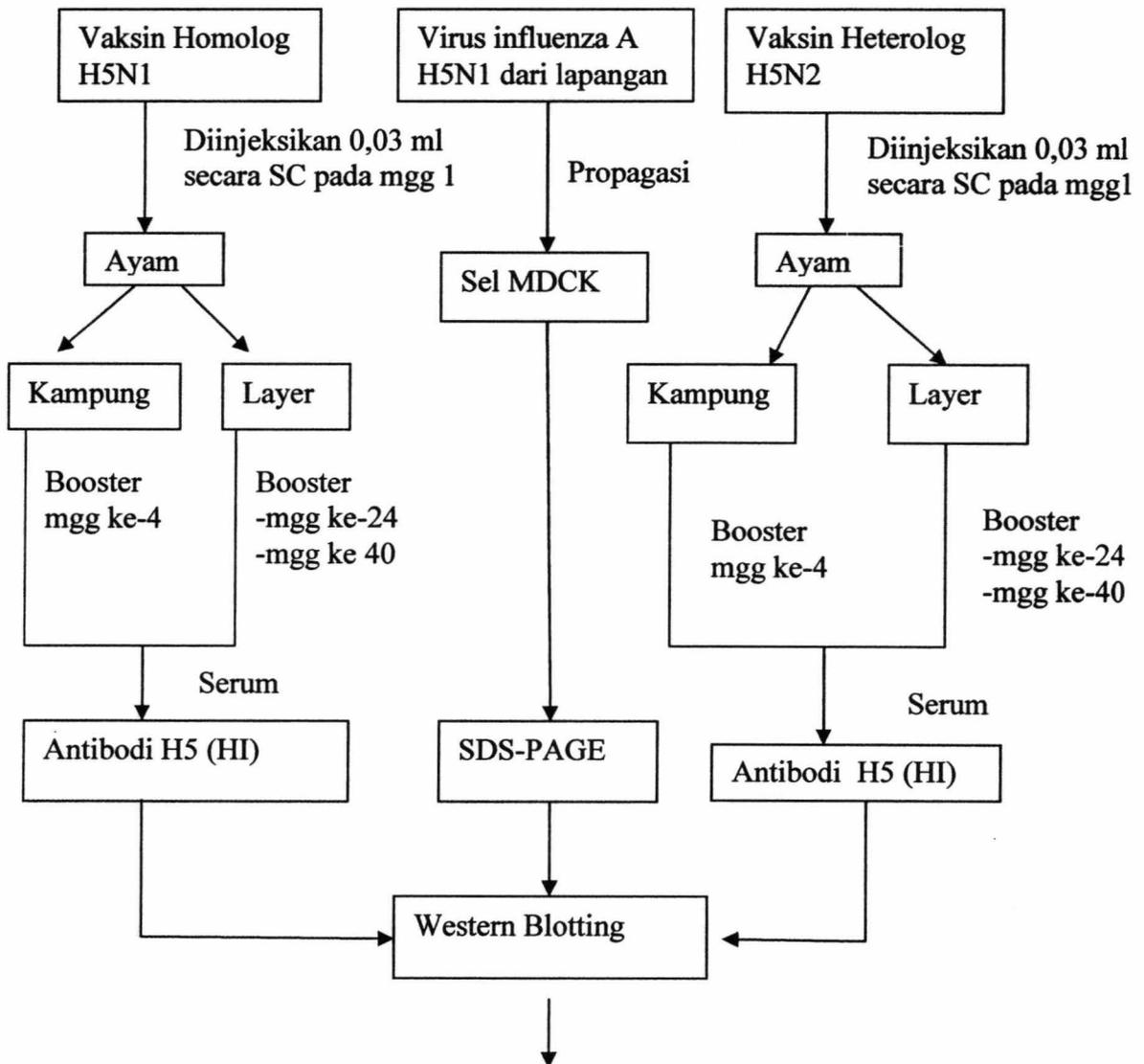
#### 4. Prosedur Kerja Western Blotting

Prosedur SDS-PAGE dilakukan sampai running tanpa pencucian. Selanjutnya gel hasil SDS-PAGE yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan berat molekulnya dilepas dari glass plate. Kemudian dimasukkan dan disusun pada transfer apparatus berturut-turut 2 kertas whatmann yang sudah dibasahi dengan transfer buffer, 1 lembar membrane nitroselulosa, gel SDS-PAGE, dan 2 kertas whatmann. Kemudian blotting dijalankan pada arus listrik 100 mA, tegangan listrik 50 V selama 1 jam. Setelah selesai dikeluarkan dari cetakan lalu membran PVDF diblocking dengan creamer 5% dalam PBS dan goyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali (PBS yang mengandung 0,05% tween 20), masing-masing pencucian selama 20 menit lalu ditambahkan antibodi I yang diencerkan 1:100 dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBST sebanyak 3 kali dan selanjutnya direaksikan dengan antibodi kedua goat anti-chicken IgG conjugated yang berlabel alkalin phosphatase (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.) dengan pengenceran 1:1000 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam kemudian dicuci dengan PBST sampai 3 kali dan dicuci dengan *distilled water*. Kemudian dideteksi dengan menambahkan substrat western blue (Invitrogen, 2003 ; Ausubel et al., 1992) sambil digoyang sampai muncul band warna ungu. Reaksi dihentikan dengan penambahan *distilled water* lalu membran dikeringkan. Penentuan berat molekul dengan membandingkan ukuran hasil sampel western blotting dengan marker

#### 4.7.2 Pengumpulan data

Data berupa berat molekul fraksi protein dan adanya band (komplek antigen-antibodi) virus avian influenza A pada western blotting.

#### 4.8 Kerangka Operasional Penelitian



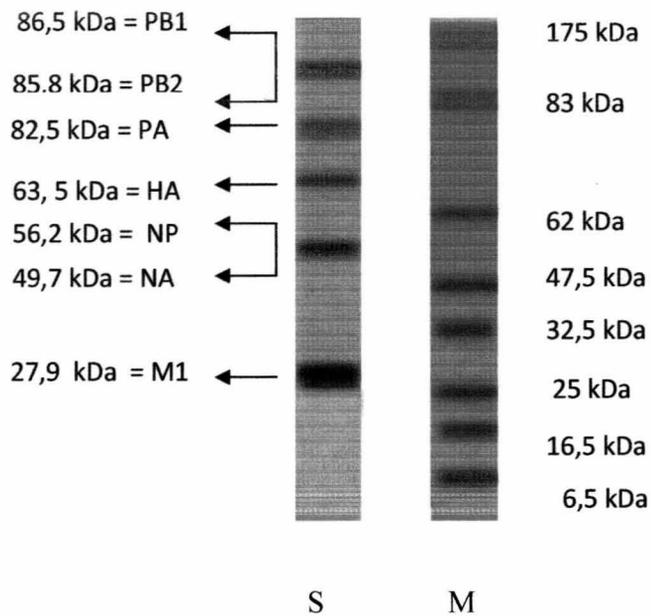
Profil protein yang antigenik dengan anti protein ditandai dengan kemunculan band

**BAB V**  
**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS**  
**HASIL PENELITIAN**

**BAB 5****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN**

Pada penelitian ini, untuk mendapatkan *seed* virus Avian influenza maka dilakukan inokulasi untuk memperbanyak pada sel MDCK selama 2-3 hari pada suhu 35°C. Keberadaan virus Avian influenza pada sel MDCK dapat diketahui dengan adanya CPE (*Cytophatic Effect*) yang ditandai oleh bentuk morfologi sel yang bulat dan besar. Setelah virus dipanen dalam suspensi sel MDCK, selanjutnya dilakukan uji SDS-PAGE untuk pemisahan protein berdasarkan berat molekul dengan menggunakan resolving gel 10% dan stacking gel 4,5%. SDS PAGE dilakukan untuk mendapatkan protein yang antigenik.

Profil protein yang didapatkan dari hasil SDS PAGE yang berasal dari sampel virus Avian influenza A subtipe H5N1 adalah sebagai berikut : 27,5 kDa ; 49,7 kDa ; 56,2 kDa ; 63,5 kDa ; 82,5 kDa ; 85,8 kDa dan 86,5 kDa. Pita dengan berat molekul (27,5 = protein M1, 49,7 kDa = protein NA, 56,2 kDa = protein NP, 63,5 kDa = protein, 82,5 kDa = protein PA, 85,8 kDa = protein PB2, dan 86,5 kDa = protein PB1) (Shaw et al., 2008) (Gambar 5.1).



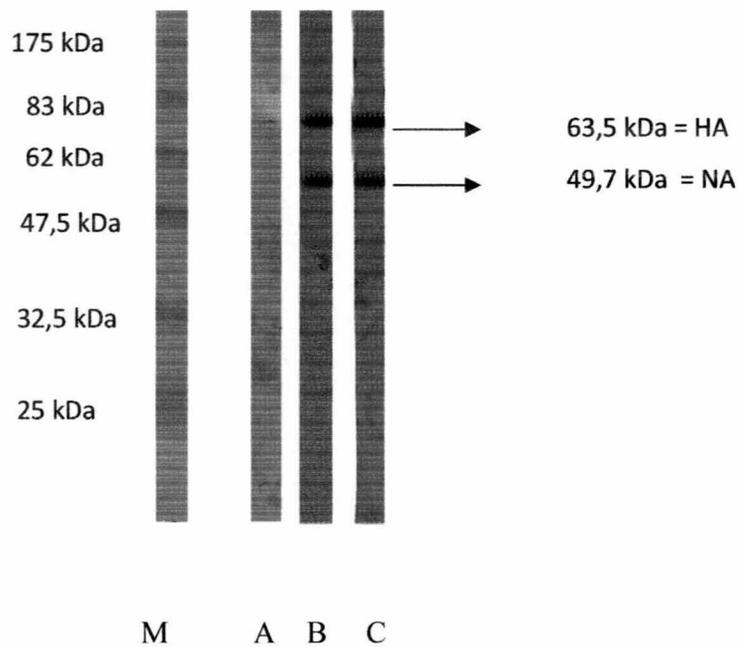
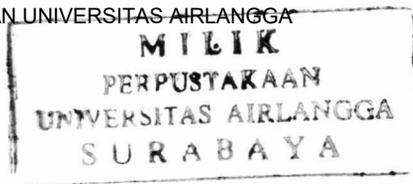
Keterangan : M = Marker, S = Sampel virus Avian influenza H5N1

Gambar 5.1. Profil protein virus Avian Influenza A sub tipe H5N1 dari lapangan

Pada penelitian ini serum yang digunakan sebagai produksi dari antibodi primer berasal dari ayam kampung (hewan coba) dan ayam layer (lapangan) dimana keduanya divaksinasi menggunakan vaksin Avian influenza H5N1 dan H5N2. Selanjutnya serum tersebut diuji HI dengan menambahkan RDE dimana serum yang akan digunakan untuk uji western blotting yang memiliki nilai titer antibodi tinggi terhadap H5 yaitu 1/1280.

Selanjutnya untuk mengetahui adanya reaksi antara protein virus Avian influenza dan antibodi dilakukan uji western blotting dimana pada uji ini, gel hasil SDS PAGE ditransfer ke membran PVDF untuk kemudian diikat dengan antibodi yang berasal dari serum hasil vaksinasi avian influenza H5N1 dan H5N2

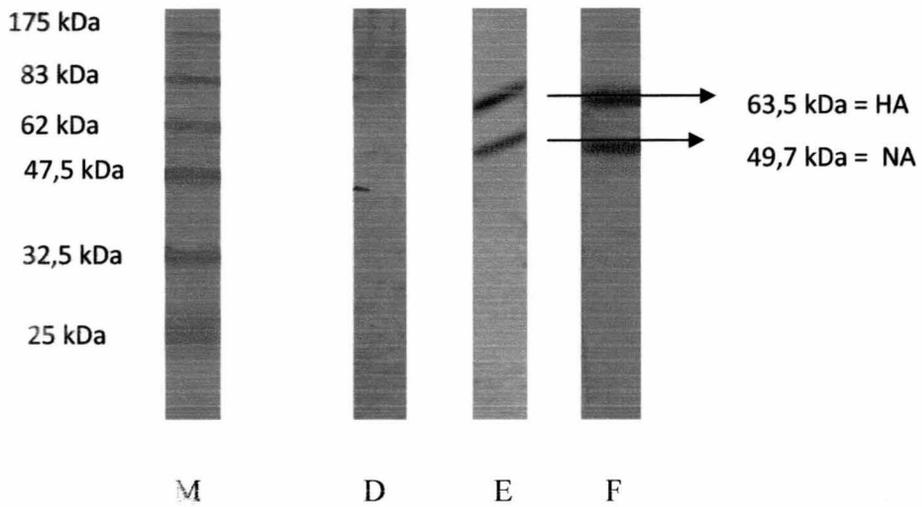
Hasil yang didapat melalui uji western blotting dengan menggunakan sampel serum H5N1 adalah sebagai berikut (Gambar 5.2) :



Penjelasan : M= Marker ; A. Sampel Ayam layer (japangan), B dan C. Sampel ayam kampung (hewan coba).

Gambar 5.2. Profil ikatan antara antigen virus Avian influenza dengan antibodi dari vaksin homolog H5N1 dengan menggunakan uji western blotting.

Pada penelitian ini juga direaksikan antara antigen virus Avian influenza dengan antibodi yang berasal vaksin heterolog H5N2 (gambar 5.3).



Keterangan : M = Marker, D. Sampel Ayam layer (lapangan). E dan F. Sampel ayam kampung (hewan coba)

Gambar 5.3. Profil ikatan antara antigen virus Avian influenza dengan antibodi dari vaksin heterolog H5N2 dengan menggunakan uji western blotting..

Secara singkat hasil SDS PAGE dan western blotting tercantum dalam tabel 5.4 :

Tabel 5.4 Hasil karakterisasi profil protein virus avian influenza H5N1 dengan tehnik SDS PAGE dan western blotting.

SDS PAGE	Western Blotting	
	Vaksin H5N1	Vaksin H5N2
86,5 kDa = PB 1		
85,8 kDa = PB 2		
82,5 kDa = PA		
63,5 kDa = HA	63,5 kDa	63,5 kDa
56,2 kDa = NP		
49,7 kDa = NA	49,7 kDa	49,7 kDa
27,9 kDa = M 1		

Pada pita A dan D tidak ada protein yang muncul. Hal ini menunjukkan tidak ada antigen dari virus avian influenza yang komplementer dengan antibodi. Pada pita B dan C, menggunakan vaksin H5N1 tampak protein HA dan NA dengan berat molekul masing-masing sebagai berikut : 63,5 kDa dan 49,7 kDa. Protein-protein ini juga tampak dengan menggunakan vaksin H5N2, dimana protein HA dan NA merupakan protein imunogenik.

# **BAB VI**

## **PEMBAHASAN**

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Sel MDCK (*Madin Darby canine kidney*) merupakan *cell line* yang baik untuk pertumbuhan virus influenza, meskipun genom dari anjing belum banyak dibahas. Sedangkan pertumbuhan virus influenza pada telur berembrio bukanlah pilihan yang baik karena tidak dapat menumbuhkan virus influenza dalam level tinggi (Shaw et al., 2008). Sel MDCK memiliki sensitifitas lebih tinggi dibandingkan sel line lainnya seperti sel line Vero dan sel line MRC-5 sehingga sel line MDCK direkomendasikan untuk isolasi virus influenza. Dari tahun 1975, sel line MDCK sering digunakan untuk isolasi virus influenza A dengan penambahan tripsin untuk merangsang pertumbuhan virus influenza dan memungkinkan banyak strain dari virus influenza untuk membentuk plaque dengan tingkat keberhasilan tinggi. Selain itu juga human influenza dan swine influenza tidak dapat tumbuh baik pada telur ayam berembrio sehingga penggunaan sel line MDCK masih menjadi pilihan tepat (Clavijo et al., 2002).

Untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul dilakukan dengan menggunakan uji SDS PAGE untuk mendeteksi protein yang antigenik selanjutnya dilakukan uji western blotting. Uji Western blotting merupakan uji *highly-specific confirmatory* yang disediakan untuk mendeteksi *cross-reaction*. Uji Western blotting memisahkan protein melalui massa molekular dengan menggunakan gel untuk mendeteksi antibodi terhadap protein spesifik (imunogen) (Henderson and Schmitt, 2005).

Protein merupakan diversifikasi antigen yang paling umum yang dihadapi oleh sistem imun. Sehingga tidak mengherankan jika banyak penelitian *immunochemical* menggunakan protein sebagai model antigen untuk menjelaskan mekanisme biologi dari sintesis antibodi dan

sebagai dasar molekuler dari spesifisitas dan diversitas antibodi. Sebagian besar dari permukaan molekuler dari antigen protein dapat menjadi imunogenik sehingga dapat menjadi reaktif dengan antibodi spesifik (Poljak and Braden, 1995).

Pada uji SDS PAGE, menggunakan konsentrasi resolving gel 10% karena berat molekul protein yang diinginkan sekitar 20-200 kDa (AES Application Focus). Hasil SDS PAGE terhadap virus avian influenza A subtipe H5N1 tidak dapat menunjukkan profil protein virus secara keseluruhan, hal ini kemungkinan sudah terjadi delesi dari protein virus itu sendiri maupun delesi pada tahap asam amino dari *seed vaccine* yang membuat antibodi. Selain itu ketidakhadiran dari protein antigenik kemungkinan disebabkan karena kesalahan pengamatan maupun pengukuran, sehingga pita protein yang diharapkan dengan berat molekul tertentu tidak dapat tampak.

Dalam penelitian ini digunakan vaksin inaktif atau *killed vaccine*, karena dianggap lebih aman daripada vaksin hidup. Vaksin ini tidak dapat bereplikasi dalam tubuh hospes dan bersifat non infeksius. Akan tetapi vaksin inaktif ini juga memiliki kelemahan yaitu kurang efektif dalam menginduksi perlindungan imunitas dibandingkan dengan vaksin *live attenuated*. Sehingga untuk meningkatkan imunogenisitas dari vaksin inaktif ini perlu ditambahkan adjuvan (Andersson, 2000).

Vaksin inaktif tidak hanya berperan untuk menginduksi antibodi netralisasi pada level tinggi pada protein permukaan tetapi juga menimbulkan respon terhadap sel T CD8 untuk melawan *conserved antigen* yang berasal dari protein internal virus yang kemungkinan bisa menyediakan perlindungan lebih pada saat epidemi maupun pandemi. Infeksi intracellular influenza A, sel yang terinfeksi terutama dieliminasi oleh efektor sel T CD8+ (Haque et al., 2007).

Uji Imunoassay konvensional yang dapat digunakan untuk mendiagnosa penyakit hewan berdasarkan deteksi antibodi terhadap patogen antara lain netralisasi virus, *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), *complement fixation* dan *agar gel immunodiffusion*. Uji-uji tersebut berdasarkan interaksi dari serum yang mengandung antibodi poliklonal melawan agen infeksi (Henderson and Schmitt, 2005). Pada penelitian ini uji yang digunakan untuk mendeteksi antibodi adalah uji HI karena paling umum dilakukan dan hasil yang didapatkan secara kuantitas.

Pada uji *Hemagglutination inhibition* (HI test), protein HA akan melekat pada eritrosit unggas maupun mamalia sehingga menyebabkan partikel virus memiliki kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah yang dapat dihambat secara spesifik oleh antibodi. Hambatan ini sebagai dasar untuk identifikasi virus influenza dan antibodi anti-influenza (De Jong, 2000). Antiserum yang digunakan berasal dari vaksin influenza karena antiserum dengan strain virus tertentu hanya dapat bereaksi dengan virus homolog pada titer tinggi (De Jong, 2000).

Berdasarkan penelitian didapatkan hasil HI yang positif dengan menggunakan RDE untuk preparasi serum, dimana RDE berfungsi untuk menghilangkan reseptor non spesifik yang ada pada serum. Pada uji western blotting, antibodi poliklonal yang digunakan berasal dari serum ayam hasil vaksinasi dengan menggunakan vaksin H5N1 dan H5N2 yang memiliki nilai titer antibodi 1/1280, karena diasumsikan dengan titer tinggi maka antibodi akan lebih kuat untuk berikatan dengan antigen.

Pada uji SDS PAGE muncul 7 protein antigenik dari virus Avian influenza H5N1 yang berasal dari lapangan yaitu protein HA, NA, M1, NP, PA, PB1, dan PB2. Pada uji western blotting, sampel serum berasal dari ayam yang divaksin di lapangan dan juga dari hewan coba yang ditempatkan dalam kandang dengan perlakuan dan pengamatan intensif. Berdasarkan hasil

dari uji western blotting menunjukkan bahwa ayam yang berasal dari hewan coba, setelah divaksin dengan menggunakan vaksin avian influenza H5N1 (sampel B dan C) menunjukkan reaktivitas sama yaitu adanya pita dari protein HA dan NA, hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi reaksi dari antibodi HA dan NA terhadap virus Avian influenza, dimana protein HA dan NA merupakan protein imunogenik yang dapat menimbulkan antibodi untuk menetralkan virus influenza H5N1. Ayam mengalami puncak kenaikan titer antibodi pada umur 3-3,5 minggu setelah vaksinasi sehingga untuk mempertahankan agar titer tetap tinggi diperlukan vaksinasi booster. Protein yang muncul juga sama ditunjukkan dengan menggunakan vaksin H5N2 (sampel E dan F) yaitu protein HA dan NA. Kemunculan protein yang sama yaitu HA dan NA yang didapatkan dari hasil vaksinasi menggunakan H5N2, kemungkinan disebabkan karena adanya reaksi silang antara virus influenza H5N1 yang berasal dari lapangan dengan vaksin H5N2. Kemungkinan yang lain yaitu bahwa ayam-ayam yang telah divaksin menggunakan vaksin influenza H5N2, di dalam tubuhnya masih terinfeksi virus influenza H5N1 meskipun sudah terbentuk antibodi, tetapi tidak menunjukkan gejala sakit atau mati sehingga serum yang nantinya diambil masih mengandung antibodi terhadap H5N1 dan H5N2. Kemungkinan kegagalan terbentuknya antibodi bisa juga disebabkan karena faktor individu, dosis vaksin, dan kondisi lingkungan. Faktor individu meliputi kondisi tubuh ayam tersebut, apakah waktu divaksinasi dalam kondisi sehat atau tidak, karena hal ini juga berpengaruh terhadap efektivitas hasil vaksinasi. Ayam yang sehat akan mudah merespon terhadap antigen yang dimasukkan ke dalam tubuh. Kondisi lingkungan meliputi cuaca dan manajemen kandang karena kebersihan akan meminimalkan penyebaran penyakit dari luar. Pada sampel A dan D tidak menunjukkan adanya respon protein terhadap antibodi dari vaksin H5N1 dan H5N2. Hal ini mengindikasikan bahwa antibodi yang didapat dari perlakuan vaksinasi di lapangan tidaklah sekuat antibodi yang

didapat dari hewan coba (sampel B, C, E, dan F). Hal ini tampak dengan tidak timbulnya pita protein pada sampel B dan E. Pada sampel hewan coba ada pengawasan dan manajemen mulai dari produk vaksin (dosis, masa kadaluwarsa vaksin, vaksinator) disuntikkan pada ayam hingga vaksinasi berikutnya perkembangannya diikuti intensif, sehingga bisa terbentuk antibodi. Sedangkan pada ayam hasil vaksinasi di lapangan tidak diikuti perlakuan dan perkembangannya mulai dari pemberian vaksin sampai terbentuknya antibodi. Sehingga antibodi yang terbentuk hasil uji HI tidak dapat diketahui apakah antibodi tersebut imunogenik atau tidak sehingga tidak dapat muncul profil proteinnya melalui uji western blotting.

Berdasarkan hasil dari western blotting dengan menggunakan vaksin influenza H5N1 dan H5N2 didapatkan profil protein imunogenik yaitu protein NA dan NA. Dimana menurut teori sebelumnya bahwa hanya protein HA dan NA yang mampu menimbulkan antibodi terhadap virus Avian influenza subtipe H5N1.

# **BAB VII**

## **PENUTUP**

## BAB 6

### PENUTUP

#### 6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat ditarik adalah sebagai berikut :

1. Profil protein antigenik virus Avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan yang muncul adalah protein PB1, PB2, PA, HA, NA, M1 dengan berat molekul berturut-turut : 86,5 kDa ; 85,8 kDa ; 82,5 kDa ; 63,5 kDa, 56,2 kDa, 49,7 kDa dan 27,9 kDa. Profil protein imunogenik dari vaksin H5N1 dan H5N2 adalah protein HA dan protein NA dengan berat molekul berturut-turut 63,5 kDa dan 56,2 kDa.
2. Terjadi reaktivitas virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi homolog H5N1.
3. Terjadi reaktivitas virus avian influenza A subtipe H5N1 dari lapangan dengan antibodi heterolog subtipe H5N2.

#### 6.2 SARAN

1. Tingkat homologi antara antigen virus Avian influenza A subtipe H5N1 dengan antibodi dari vaksin H5N1 dan H5N2 dapat diketahui dengan menggunakan uji western blotting melalui pendekatan protein sehingga dapat digunakan untuk mengetahui profil imunogenik dari antibodi yang ditimbulkan oleh suatu vaksin.
2. Penelitian dapat dilanjutkan secara *in vivo* dengan menggunakan antibodi hasil vaksinasi untuk imunoterapi.

# DAFTAR PUSTAKA

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas AK, Lichtman AH, 2006. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System. 2<sup>nd</sup> Ed. Updated Edition 2006-2007. Saunder elsevier. Philadelphia. Pp 158.
- AES Application Focus. [Http:www.aesociety.org/areas/pdfs/garvin-1DE\\_webarticle9-07.pdf](http://www.aesociety.org/areas/pdfs/garvin-1DE_webarticle9-07.pdf). Diakses : 21 agustus 2008.
- Ali WH, Kheir SAM, Ballal A, 2007. Serological Survey of Type A Avian Influenza Antibody in Chicken Sera in Sudan Using Indirect ELISA. Research Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2: 12-14, 2007.
- Andersson C, 2000. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. Royal Institute of Technology Department of Biotechnology. Stockholm. [Http:urn\\_nbn\\_se\\_kth\\_div\\_a-3027-2-fulltext.pdf](http://urn_nbn_se_kth_div_a-3027-2-fulltext.pdf).
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1992. Short Protocol In Molecular Biology. 2<sup>nd</sup> Ed. Greene Publishing Associates. Canada. P: 10.1-10.33
- Behrens G, Stoll M, 2006. Pathogenesis and Immunology. <http://www.influenzareport.com/ir/pathogen.htm>
- Bot A, Reichlin A, Isobe H, Bot S, Schulman, 1996. Cellular Mechanisms Involved in Protection and Recovery from Influenza Virus Infection in Immunodeficient Mice. Journal of Virology, Aug. 1996, p. 5668–5672 Vol. 70, No. 8.
- Breytenbach JH, 2005. Guidelines for the Administration of Nobilis Influenza H5 Vaccine as Part of an Avian Influenza Control Strategy. [Http:www.avia-influe.com/binaries/95\\_60641.pdf](http://www.avia-influe.com/binaries/95_60641.pdf). Diakses 17 Maret 2008.
- Brett IC, Johansson BE, 2005. Immunization Against Influenza A Virus: Comparison of Conventional Inactivated, Live-Attenuated and Recombinant Baculovirus Produced Purified Hemagglutinin and Neuraminidase Vaccines in Amurine Model System. Virology 339 (2005) 273 – 280. Diakses : 11 Desember 2007.
- Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, Toapanta FR, Steckbeck JD, Cole KS, Kumar NM, Pushko P, Smith G, Tumpey TM, Ross TM, 2008. Cross-Clade Protective Immune Responses to Influenza Viruses with H5N1 HA and NA Elicited by an Influenza Virus-Like Particle. Plos One. January 2008/Issue 1/e1501.
- Capua I, Maragon S, 2006. Control of Avian Influenza in Poultry. Emerging Infectious Diseases. Vol 12, No 9, Sept 2006.

- Coleman JR, 2007. The PB1-F2 Protein of Influenza A Virus : Increasing Pathogenicity by Disrupting Alveolar Macrophages. *Virology Journal* 2007, 4:9 doi:10.1186/1743-422X-4-9.
- Clavijo A, Tresnan DB, Jolie R, Zhou EM, 2002. Comparison of Embryonated Chicken Eggs with MDCK Cell Culture for The Isolation of Swine Influenza Virus. *The Canadian Journal of Veterinary Research. Short Communication.* 2002;66:117.121
- De Jong M.D, Hien TT, 2006. Avian Influenza A (H5N1). Review. *Journal of Clinical Virology* 35 (2006).
- Ernawati R, Rahardjo AD, Sianita N, Rahmani J, rantam FA, Tjahjaningsih W, Suwarno, 1996. Petunjuk Praktikum Penyakit Viral. *Labotatorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. UNAIR. Surabaya. Hal : 20-24).*
- FAO, 2004. *FAO Recommendations on the Prevention, Control and Eradication of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) in Asia.* <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseasescards/expertconsult.pdf>
- Garcia-Sastre A, Palese P, 2002. Influenza Vaccines : Present and Future. *J. Clin. Invest.* 110:9–13 (2002).
- Gioia C, Castillette C, Tempestilli C, Piacentini P, Bordi L, Chiappini R, Agrati C, Squarcione S, Ippolito G, PuroV, Capobianchi MR, Poccia F, 2008. Crosssubtype Immunity against Avian Infl uenza in Persons Recently Vaccinated for Infl uenza. *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 14, No. 1, January 2008.
- Gurtier L, 2006. *Virology of Human Influenza.* <http://www.influenzareport.com/ir/virology.htm>.
- Harder TC, Werner O, 2006. *Avian Influenza.* <http://www.influenzareport.com/ir/ai.html>
- Haque A, Hober D, Kasper LH, 2007. Confronting Potential Influenza A (H5N1) Pandemic with Better Vaccines. *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 13, No. 10, October 2007.
- Heinen P, 2003, Swine Influenza : a Zoonosis. *Veterinary Sciences Tomorrow.* <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>.
- Henderson L, Schmitt L, 2005. *Diasnostic Tools for Animal Diseases. Rev. Sci. Tech.* Off. int. Epiz., 2005, 24 (1), 243-250.

- Horimoto T, Kawaoka Y, 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, January 2001, P. 129-149, Vol. 14, No. 1
- Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DJ, 2004. Molecular Determinants within the Surface Proteins Involved in the Pathogenicity of H5N1 Influenza Viruses in Chickens. *Journal of Virology*, September 2004, p. 9954-9964, Vol. 78, No. 18.
- Invitrogen, 2003. Instruction Manual. WesternBreeze. Chromogenic Western Blot. Immunodetection Kit. Version F, June 4, 2003. [Http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/pdf/protein/detection/qxp.detection.assay/1022972mb.qxp.1002ww.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/pdf/protein/detection/qxp.detection.assay/1022972mb.qxp.1002ww.pdf).
- Kauffmann SHE, Sher A, Ahmed R, 2002. *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press. pp 307-308, 247-255.
- Kresno, SB, 2001. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi Ke-4. Balai Penerbit FK UI. Hal 5-29.
- Klopfleish R, Werner O, Mundit E, Harder T, Teifke JP, 2006. Neurotropism of Highly pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/Indonesia/2003 9H5N1) in Experimentally Infected Pigeons (*Columbia livia* F. *Domestica*). *Vet pathol* 43 :463-470 (2006).
- Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, Sung HW, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Kim JH, 2005. Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) in the Commercial Domestic Ducks of South Korea. *Avian Pathol* 2005; 34: 367-70.
- Lee V J, Fernandez GG, Chen MI, Lye D, Leo YS, 2006. Influenza and The Pandemic Threat. Review Article. *Singapore Med J* 2006; 47(6) : 463.
- Lupiani B, Reddy S, 2005. Improved Diagnostic Tests for Avian Influenza Surveillance. Proceedings of The Institute of Food Technologists. First annual Food Protection and Defense. Research Conference. November 3-4, 2005. Atlanta, Georgia.
- Martin V, Forman A, Lubtoth J, 2006. Preparing for Highly Pathogenic Avian Influenza. A Manual for Countries at Risk. <http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/animal/aviar/pdf/manualiapzen.pdf>
- Mehrabanpour MJ, Dadras H, Khodakaram-Tafti A, Rahimian A, Toffan A, 2007. Pathological Findings of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Duck/Vietnam/12/2005 (H5N1) in Turkeys. *International Journal of Poultry Science* 6 (9): 679-683, 2007.
- Metreveli G, 2006. Expression of Influenza Virus Non Structural Protein 1 (NS1). [http://www.diss-epsilon.slu.se/archieve/00001492\\_01\\_07.625\\_trickfil\\_from-dimitri.pdf](http://www.diss-epsilon.slu.se/archieve/00001492_01_07.625_trickfil_from-dimitri.pdf).

- Mittelholzer CM, 2006. Influenza Virus-Protection and Adapation. Thesis. <http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-656-5/thesis.pdf>
- Mufasirin, Retno DR, Aksono B. 2001. Profil Protein Intestin *Haemonchus contortus* Dewasa. Lembaga Penelitian Unversitas Airlangga. Hal:11-12.
- Nidom CA, 2005. Ringkasan Disertasi. Analisis Molekuler Genom Virian Influenza H5N1 Di Indonesia. Hal 31.
- Nossal, 1993. Antigens and Antibodies. Sci. Am. 269(3) : 22. <http://www.whfreeman.com/college/pdfs/kuby6epdfs/bkuby6each04.pdf>. Di akses : 27 Mei 2008.
- Nwe N, He Q, Damrongwatanapokin S, Du Q, 2006. Expression of Haemagglutinin Protein from the Avian Influenza Virus H5N1 in a Baculovirus/Insect Cell System Significantly Enhanced by Suspension Culture. Research Article. *BMC Microbiology* 2006, 6:16 doi:10.1186/1471-2180-6-16.
- Poljak RJ, Braden BC, 1995. Reviews. Structural Features of the Reactions Between Antibodies and Protein Antigens. The FASEB Journal. Vol 9 Januari 1995.
- Rahardjo Y, Nidom CA, 2004. Avian Influenza. Pencegahan, Pengendaliannya dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka. Jakarta. Hal : 88-94
- Rantam FA, 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Hal 153-156
- Rennels MB, Meissner C, Committee on Infectious Diseases, 2002. Technical Report: Reduction of the Influenza Burden in Children. *Pediatrics* Vol. 110 No. 6 December 2002, pp. e80.
- Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P, 2008. Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. *Plos pathogens*. June 2008 | Volume 4 | Issue 6 | e1000085.
- Saif M, Espinoza M, 2006. Avian Influenza : An Internal Report For the College Of Food, Agricultural, and Environmental Sciences.
- Sattar S, Naeem K, Ahmed Z, Malik SA, 2007. Influence of Virus Strain on the Efficacy of Vaccine Against Avian Influenza Virus Subtype H7N3. *International Journal of Poultry Science* 6 (12): 989-993, 2007.
- Shirvan AN, Moradi M, Aminian M, Madani R, 2007. Preparation of Neuraminidase-Specific Antiserum from the H9N2 Subtype of Avian Influenza Virus. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007 ; 31 (4): 219-223.
- Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee C, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E

- Alexander DJ, 2004. Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10, No. 4, April 2004.
- Subbarao K, Joseph T, 2007. Scientific Barriers to Developing Vaccines against Avian Influenza Virus. *Nature Reviews Immunology*. Published Online 16 March 2007 ; Doi : 10.1038/nri 2054.
- Szecs J, Boson B, Johnsson P, Dupeyrot-Lacas P, Matrosovich M, Klenk HD. 2006. Induction of Neutralising Antibodies by Virus-Like Particles Harboring Surface Proteins from Highly Pathogenic H5N1 and H7N1 Influenza Viruses. *Short Report. Virology Journal* 2006, 3:70.
- Tamura S, Kurata T, 2004. Defence Mechanisms against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 236-247. 2004.
- Thomas PG, Keating, R, Hulse-Post DJ, Doherty PC, 2006. Pathogenesis. Cell-Mediated Protection in Influenza Infection. <http://www.cdv.gov/ncidod/EID/vol112no01/05-1237.html>.
- Tumpey TM, Renshaw M, Clements JD, Katz JM, 2001. Mucosal Delivery of Inactivated Influenza Vaccine Induces B-Cell-Dependent Heterosubtypic Cross-Protection Against Lethal Influenza A H5N1 Virus Infection. *Journal of Virology*, June 2001, p.5141-5150, Vol.75, No. 11
- Webster RG, Hulse DJ, 2004. Microbial Adaptation and Change : Avian Influenza. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23 (2), 453-465.
- WHO, 2004. WHO Manual on Animal Influenza Diagnostic and Surveillance. P:28-38
- Wong SSY, Yuen KY, 2006. Avian Influenza Infections in Humans. *Chest*. 2006:129:156-168.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1 : Komposisi Bahan Pembuatan SDS PAGE dan Western blotting****1. Pembuatan Resolving Gel 10%**

Solution A	: 3 ml
Solution B	: 2,25 ml
H <sub>2</sub> O	: 3,75 ml
10% APS	: 40 $\mu$ l
TEMED	: 5 $\mu$ l

**2. Pembuatan Stacking Gel 4,5%**

Solution A	: 0,45 ml
Solution C	: 0,75 ml
H <sub>2</sub> O	: 1,8 ml
10% APS	: 10 $\mu$ l
TEMED	: 5 $\mu$ l

**Cara pembuatan Larutan untuk SDS PAGE:****1. Solution A: (simpan pada suhu 4°C)**

Acrylamide	29,2 g
N'N-methylen bis (acrylamide)	0,8 g
DW	
<hr/>	
Total	100 ml

**2. Solution B : (simpan pada suhu 4°C)**

Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
HCl	(pengatur pH 8,8)
DW	
<hr/>	
Total	100 ml

**3. Solution C: (simpan pada suhu 4°C)**

Tris	6,1 g
SDS	0,4 g
HCl	(pengatur pH 6,8)
DW	
<hr/>	
Total	100 ml

## 4. 2 x sample buffer (simpan pada suhu -20°C)

0,5 Tris HCl buffer (pH 6,8)	2,5 ml
2-ME	1 ml
10% SDS	4 ml
Sucrose	1 g
BPB ( <i>Brom Phenol Blue</i> )	1 mg
DW	
<hr/>	
Total	10 ml

## 5. 10 x Running Buffer

Tris	15 g
Glycine	72 g
10% SDS	50 ml
DW	
<hr/>	
Total	500 ml

## 6. SDS 10%:

10 g SDS dalam 100 ml Aquades

## 7. APS 10%:

Amonium persulfat 10 gr dalam 100 ml Aquades

**Cara pembuatan Transfer Buffer :**

10 x trans buffer

230 mM Tris	30,3 g
1,92 M glisin	144,2 g
H <sub>2</sub> O	
<hr/>	

Total 1 L

	Anoda buffer	Katoda buffer
10x trans buffer	50 ml	50 ml
H <sub>2</sub> O	350 ml	400 ml
Metanol	100 ml	50 ml
<hr/>		

Total 500 ml