

CARA PEMURNIAN HBsAg

Pemurnian HBsAg dilakukan 2 tahap; pertama HBsAg dikonsentrasikan dengan cara presipitasi bertahap PEG, kemudian disusul pemurnian dengan ultrasentrifugasi.

Presipitasi Bertahap Dengan PEG 6000 :

Presipitasi HBsAg bertahap dengan PEG dilakukan menurut cara yang dimodifikasi oleh Iizuka (1988). Pertama, 3 liter plasma yang mengandung HBsAg diberi larutan 50% (w/v) PEG 6000 pada pH 4,5 sehingga konsentrasi akhir PEG menjadi 1,3%. Dibiarkan selama 6 jam pada temperatur 4 derajat Celcius, sehingga terjadi endapan. Larutan tersebut kemudian di sentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan lagi larutan 50% PEG 6000 sampai konsentrasi akhir PEG menjadi 4,5%. Dibiarkan semalam pada temperatur 4 derajat Celcius, kemudian disentrifus supaya endapan sempurna. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan lagi dengan aquadest pada pH 7,5 sampai volume menjadi 850 cc dan siap untuk dimurnikan lebih lanjut dengan cara ultrasentrifugasi. Dengan demikian 6 liter plasma yang dipakai dalam penelitian ini membutuhkan 2 kali presipitasi bertahap dengan PEG. Endapan akhir yang diperoleh dari presipitasi yang kedua ini diencerkan menjadi 600 cc disatukan dengan hasil pemurnian KBr buoyant pertama dan selanjutnya dimurnikan dengan cara KBr buoyant ultracentrifugation tahap kedua.

Pemurnian HBsAg dengan ultrasentrifugasi zonal.

Pemurnian HBsAg dengan ultrasentrifugasi terdiri atas 4 tahap meliputi 2 kali *KBr buoyant density*, *KBr rate zonal* dan *sucrose rate zonal* (Mishiro et al, 1980). *Buoyant density ultracentrifugation* dilakukan dengan membuat densitas sampel menjadi 1,30 g/cc, dengan jalan menambahkan KBr pada 850 cc larutan HBsAg hasil presipitasi dengan PEG. Sampel dimasukkan kedalam rotor melalui lubang pinggir pada waktu rotor berputar 3.000 rpm, yang sebelumnya telah diisi lebih dahulu dengan 250 cc bufer Tris-HCl dan 400 cc larutan KBr densitas 1,27 g/cc. Setelah sampel dan larutan gradient selesai dimasukkan kedalam rotor, putaran diatur menjadi 30.000 rpm selama 16 jam, suhu 10 derajat Celcius. Setelah 16 jam, isi rotor dikeluarkan melalui lubang tengah dengan cara mendorongkan larutan KBr 1,34 g/cc melalui lubang pinggir. Fraksi yang terkumpul diperiksa titer HBsAg, densitas larutan dan optical density pada 280 nm (OD280). Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan densitas antara 1,17 g/cc - 1,24 g/cc dikumpulkan. Fraksi yang terkumpul ditambah larutan HBsAg hasil presipitasi PEG yang kedua, selanjutnya dilakukan pemurnian ulang KBr buoyant dengan cara yang sama. Hasil pemurnian buoyant kedua ini didialisis menggunakan tube selulose terhadap larutan 0,01 M bufer Tris-HCl (pH 7,5) dan dikonsentrasikan dengan tekanan negatif sehingga volume menjadi 75 cc dan siap untuk dimurnikan lebih lanjut dengan KBr rate zonal.

Lampiran 1 (lanjutan).

KBr rate zonal ultracentrifugation dilakukan dengan memasukkan *density gradient* larutan KBr densitas 1,15 g/cc, 1,20 g/cc, 1,25 g/cc dan 1,30 g/cc berturut-turut melalui lubang pinggir rotor, pada kecepatan rotor 3.000 rpm. Sampel (75 cc) dimasukkan kedalam rotor melalui lubang tengah; setelah itu ditambahkan *overlay* Tris-HCl sebanyak 75 cc. Kemudian diputar pada 28.000 rpm, pada 10 derajat Celcius, selama 16 jam. Setelah 16 jam isi rotor dikeluarkan dengan mendorong larutan KBr 1,34 g/cc melalui lubang pinggir rotor. Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan densitas 1,17 g/cc - 1,22 g/cc dikumpulkan dan didialisis serta dikonsentrasikan sehingga volume menjadi 123 cc. Kemudian sampel yang terkumpul dibagi menjadi 6 bagian masing-masing 20 cc dan siap untuk pemurnian tahap akhir (*sucrose rate*).

Sucrose rate zonal ultracentrifugation dilakukan dengan memasukkan larutan *sucrose* konsentrasi 15%, 30% dan 40% (w/v) melalui lubang pinggir rotor pada putaran rotor 3.000 rpm. Sampel (20 cc) diencerkan dengan bufer Tris-HCl menjadi 75 cc, dimasukkan kedalam rotor melalui lubang tengah dan didorong lagi dengan 75 cc bufer Tris-HCl (*overlay*). Diputar 26.000 rpm, pada 10 derajat Celcius, selama 16 jam. Setelah itu isi rotor dikeluarkan dengan mendorong bufer Tris-HCl melalui lubang tengah rotor. Fraksi yang terkumpul diperiksa titer HBsAg, OD280 dan konsentrasi *sucrose* dengan densitometer. Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan larutan *sucrose* antara 30% - 20%, dikumpulkan kemudian didialisis dan dikonsentrasikan sehingga volume menjadi 25 cc. HBsAg hasil pemurnian ini selanjutnya siap untuk diteliti antigenisitas dan imunogenisitas serta diperiksa titer antigen pre-S2.

CARA PENGAWETAN ERITROSIT (Hirata & Brandriss, 1968).

Darah domba diambil dari tempat pemotongan hewan sebanyak 0,5 L langsung ditampung dalam beaker glas yang telah diisi larutan alsever 0,5 L. Kemudian disaring, dicuci dengan larutan garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (3000 rpm, 12 menit). Setelah dicuci, dibuat suspensi eritrosit 10%; kemudian ditambahkan larutan glutaraldehyde 5% sebanyak 1/4 volume darah. Diinkubasikan dalam temperatur kamar selama 2 jam. Diaduk dengan sendok pada menit ke 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, dan menit ke 105. Setelah itu dicuci dengan air garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (3000 rpm, 5 menit). Selesai dicuci, dilarutkan lagi dengan PBS, konsentrasi 5% dan siap untuk ditempli HBsAg.

CARA PEMBUATAN SEL PHA-antiHBs (Boyden, 1951).

Inkubasikan 25 cc suspensi eritrosit 5% (dalam botol gelas 200 cc) pada 37 derajat C, didalam waterbath. Inkubasikan larutan tannic acid (1 mg/100 cc) pada temperatur 37 derajat C, selama 10 menit; didalam water bath. Tambahkan 50 cc larutan tannic acid tadi kedalam botol yang berisi suspensi eritrosit yang telah diinkubasikan, kocok sampai rata dan dibiarkan selama 12,5 menit. Kemudian tambahkan larutan 65 mikrogram HBsAg/cc (dalam PBS) sebanyak 25 cc kedalam masing-masing campuran eritrosit-tannic acid tadi; kocok baik-baik. Inkubasikan selama 2jam pada temperatur 37 derajat C, kocok dengan baik pada menit ke 15, 30, 45, 60, 90 dan menit ke 120. Kemudian cuci dengan larutan garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (1800 rpm, 5 menit); selanjutnya larutkan dalam buffer PHA menjadi 1,5 cc (larutan 10%). Simpan pada suhu 2-8 derajat C, selama seminggu; sebelum diperiksa.

Pemurnian Anti-HBs Dengan Affinity Column Chromatograph

Serum yang mengandung anti-HBs/ayw diperoleh dari kelinci yang disuntik dengan HBsAg subtype ayw yang dicampur Freund complete adjuvant (FCA).

Serum kelinci imun sebanyak 40 cc dilewatkan column yang berisi 100 cc sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) yang telah mengikat HBsAg subtype adr. Setelah dicuci dengan NaCl 0,85%, kemudian dilakukan elusi menggunakan larutan glycine 0,01M pH 2,0; ditampung dalam 10 botol masing-masing 10 cc. Fraksi yang banyak mengandung anti-HBs dikumpulkan menjadi satu dan didialisis dalam bufer fosfat 0,15 M, pH 7,2. Setelah dialisis, suspensi anti-HBs tersebut dilewatkan lagi dalam column yang sama, untuk dimurnikan dengan cara yang sama. Proses pemurnian tersebut diulang 2 kali, sehingga diperoleh anti-HBs/a murni.

CARA PEMERIKSAAN SENSITIFITAS SEL PHA-antiHBs.

Pemeriksaan ini dilakukan terhadap sel PHA-antiHBs yang dibuat dari HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw dengan cara sebagai berikut. Suspensi PHA 10%, disentrifuse pada 1800 rpm selama 5 menit; buang supernatan dan encerkan kembali dengan buffer RPHA menjadi suspensi 1%. Buat standard anti-HBs dengan pengenceran $2^1 - 2^{12}$ dalam buffer PHA. Teteskan 0,025 cc larutan standard anti-HBs tersebut kedalam microplate pada sumur ke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan sumur ke 10, sesuai dengan pengenceran anti-HBs. Teteskan masing-masing sel PHA kedalam sumur microplate dan getarkan microplate tadi pada mesin getar selama 10 detik. Kemudian biarkan pada temperatur kamar selama 1 jam, pada dasar yang rata dan tidak terkena getaran. Setelah 1 jam baca hasilnya, sensitivitas ditentukan dari titer tertinggi yang masih menunjukkan hemaglutinasi. Aglutinasi sempurna (tanpa ada endapan eritrosit) dinilai 1; aglutinasi 50% (endapan eritrosit sebesar 50% endapan eritrosit pada kontrol negatif) dinilai 0,5; aglutinasi 75% (endapan eritrosit sebesar 25% endapan pada kontrol negatif) dinilai 0,8 dan aglutinasi 25% (endapan eritrosit sebesar 75% endapan eritrosit pada kontrol negatif) dinilai 0,3.

CARA PEMERIKSAAN LABORATORIUM :

1. Penentuan kadar protein HBsAg

Kadar protein HBsAg diukur secara spektrofotometrik menggunakan panjang gelombang 280 nm (UV). Kadarnya ditentukan dengan pedoman bahwa nilai absorbance (1 cm) = 3,726 ekivalent dengan 1 mg protein HBsAg (Vyas et al, 1972).

2. HBsAg :

Diperiksa dengan metoda *reverse passive hemagglutination* (Hepatika Lab., Mataram) dengan cara pengenceran langsung di dalam microplate. Pertama serum diencerkan 64 kali dengan PBS dalam tabung. Teteskan 0,025 cc bufer RPHA kedalam sumur pertama microplate sampai sumur 10, menggunakan dropper. Kemudian ambil 0,025 cc sampel yang telah diencerkan tadi menggunakan microdiluter taruh di sumur 1 dan encerkan secara serial dalam sumur-sumur tadi menggunakan microdiluter. Kemudian teteskan 0,025 cc sel RPHA 1% kedalam sampel yang telah diencerkan dalam sumur-sumur tadi, menggunakan dropper. Diamkan pada tempat datar dan bebas dari getaran selama 1 jam, kemudian baca hasilnya. Titer HBsAg ditentukan oleh pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan aglutinasi. Pemeriksaan konfirmasi dilakukan dengan mengganti bufer RPHA dengan bufer inhibisi yang mengandung anti-HBs; sampel dinilai positif HBsAg bila selisih antara pengenceran HBsAg dalam bufer RPHA dengan pengenceran dalam bufer inhibisi $\geq 2^2$.

3. Antigen pre-S2:

Titer antigen pre-S2 diperiksa dengan metoda RPHA menggunakan kit buatan Institute of Immunology Co., Ltd. Sel RPHA tersebut dibuat dengan menempelkan antibodi monoklonal (Hyb. no. 5520) terhadap protein pre-S2 sintetik. Cara pemeriksaannya sama dengan pemeriksaan RPHA-HBsAg, juga menggunakan sampel yang telah diencerkan 64 kali dalam buffer pengencer dalam kit; tetapi bufer inhibisi disini mengandung antibodi terhadap antigen pre-S2.

4. HBeAg:

Diperiksa dengan metoda enzyme-linked immunosorbant assay (Elisa) menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.) anti-HBe Hyb 904 yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dan anti-HBe Hyb 905 yang ditempelkan horseradish peroxidase. Substrat yang digunakan adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Hasilnya dinilai positif bila absorbance pada 492 nm sama dengan atau lebih besar dari 2,5 kali absorbance kontrol negatif. Pemeriksaan dilakukan 2 kali yaitu pada serum yang tidak diencerkan dan serum yang diencerkan 100 kali dalam *bovine serum*

5. Antigen pre-S1

Diperiksa dengan metoda Elisa menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.) anti-preS1 Hyb T0606 yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dan anti-preS1 Hyb T0606 yang ditempelkan horseradish peroxidase. Substrat yang digunakan adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Hasilnya dinilai positif bila absorbance pada 492 nm sama dengan atau lebih besar dari 2,5 kali absorbance kontrol negatif.

6. Subtipe HBsAg:

Subtipe HBsAg diperiksa dengan metoda Elisa menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.). Prinsip kerjanya meliputi pembuatan *sandwich* partikel HBsAg (dari sampel) diantara anti-HBs poliklonal kuda (adr) yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dengan salah satu atau lebih antibodi monoklonal terhadap determinat subtipe: anti-d (Hyb 3423), anti-y (Hyb 3427), anti-w (Hyb 4111) dan anti-r (Hyb 313), yang ditempel horseradish peroxidase. Substrat yang dipakai adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Antibodi yang terikat pada HBsAg kemudian diukur dengan spektrofotometer. Hasilnya dinilai positif bila absorbance sampel 2,5 kali atau lebih dari nilai absorbance kontrol negatif.

7. Pemeriksaan anti-HBs

Pemeriksaan anti-HBs dilakukan dengan metoda radioimmunoassay (RIA), menurut cara yang tertulis dalam buku petunjuk. Sistem kerjanya menggunakan prinsip *sandwich*. Bila pada *plastic beads* yang mengikat HBsAg (subtipe adw & ayw) ditambahkan anti-HBs dari sampel (bila ada) maka selama masa inkubasi akan terbentuk ikatan antigen-antibodi. Setelah dicuci kemudian ditambahkan HBsAg (subtipe adw & ayw) yang dilabel dengan isotop I¹²⁵, sehingga selama waktu inkubasi akan terbentuk *sandwich* antigen-antibodi-antigen radioaktif. Pengukuran radioaktifitas menggunakan gama counter ANSR buatan Abbott Laboratory, USA. Pemeriksaan dilakukan terhadap serum gabungan dari masing-masing lot tiap kelompok perlakuan (6 lot anti-HBs untuk tiap perlakuan). Sampel serum diencerkan sedemikian rupa sehingga hitungan per menit (cpm) sampel mendekati 10 kali cpm rata-rata kontrol negatif.

KURIKULUM VITE

Nama lengkap : Mulyanto
 Tempat dan tanggal lahir : Cilacap, 20 Mei 1948
 Agama : Islam
 Pangkat/Golongan/NIP : Pembina Tk. I/IVb/130534446.
 Jabatan Pokok : Lektor Kepala Madya pada Fakultas
 Peternakan Universitas Mataram
 Alamat Kantor : Fak. Peternakan Universitas
 Mataram, Jl. Pendidikan Mataram,
 Alamat : Komplek UNRAM, Jl. Pemuda 47B,
 Mataram.

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. Pendidikan Dasar :

1955-1961 : Sekolah Dasar di Cilacap
 1961-1964 : Sekolah Menengah Pertama di Cilacap
 1964-1967 : Sekolah Menengah Atas di Cilacap

2. Pendidikan Sarjana :

1968-1974 : Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

3. Pendidikan Tambahan :

1981-1982 : Akta Mengajar V
 Training dalam bidang imunologi hepatitis B di Jichi
 Medical School/Institute of Immunology, Jepang :

1984 : Immunology and Purification of Hepatitis B
 Surface Antigen and Antibody : 1984.
 1985 : Quality Control of RPHA/PHA Cells, Produc-
 tion of Monoclonal Antibodies and Purifica-
 tion of anti-HBs.
 1988 : New Method of HBsAg and anti-HBs Purifica-
 tion by PEG and Affinity Chromatography.
 1989 : Epidemiological Study of HBV Antigen and
 antibodies (subtypes and pre-S2) and Basic
 Technique of Elisa System.

Lampiran 7.

RIWAYAT PEKERJAAN

- 1976 - sekarang : Memberi kuliah Fisiologi Hewan pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1982 - 1983 : Memberi kuliah Fisiologi Lingkungan pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1986 - 1988 : Memberi kuliah Biokimia Umum pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1987 - 1989 : Memberi kuliah Biokimia Molekuler pada Fak. Pertanian Universitas Mataram.
- 1977 - 1989 : Bekerja part timer pada UPF Penyakit Dalam RSU Mataram.
- 1986 - sekarang : Bekerja part timer pada Laboratorium Hepatitis Bumi Gora Nusa Tenggara Barat

KEANGGOTAAN PROFESI

1. Ikatan Dokter Indonesia (IDI)
2. Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (PPHI)

KARYA ILMIAH

- I. Sebagai Penulis Utama :
 - A. Tingkat Nasional : 20 judul
 - B. Tingkat Internasional : 2 judul

- II. Sebagai Penulis Pembantu :
 - A. Tingkat Nasional : 35 judul
 - B. Tingkat Internasional : 2 judul

Karya Ilmiah Yang Terpenting (Penulis Utama) :**A. Tingkat Nasional :**

1. HBsAg pada penderita penyakit hati di Unit Penyakit Dalam RSUD Mataram. Dimuat dalam buku prosiding Konggres Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia (KOPAPDI) IV, Medan, 1978.
2. Pertanda serologik HBV pada penderita penyakit hati yang dirawat di Unit Penyakit Dalam RSUD Mataram. Dimuat dalam buku prosiding Konggres Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia VI, Jakarta, 1984.
3. Beberapa Aspek Pemurnian partikel VHB dari darah donor HBsAg positif. Dimuat dalam buku prosiding Pertemuan Ilmiah III Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (PPHI), Palembang, 1985.
4. Subtipe HBsAg dalam hubungannya dengan golongan darah ABO dari darah donor di DTD PMI Surabaya. Dimuat dalam buku prosiding Pertemuan Ilmiah IV PPHI, Surabaya 1987.
5. Pengaruh Jenis Eritrosit terhadap sensitivitas Sel RPHA untuk mendeteksi HBsAg. Di presentasikan pada Seminar Immunologi Nasional PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta, 1988.
6. Protein pre-S2 dan subtipe HBsAg pada darah donor pengidap HBsAg titer tinggi. Dipresentasikan pada Komunikasi Ilmiah antar Cabang PPHI dalam rangka Konker PPHI, Manado, 1989.