

KK  
KKA  
TI.08/11  
Woe  
S

## TESIS

# **SURVEI SEROLOGIS ANTIBODI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE H5N1 PADA DARAH DONOR SEHAT (HEALTHY BLOOD DONOR) DI SURABAYA**



**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**EVY DIAH WOELANSARI**

**090710320/M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2009**

Telah diuji pada

Tanggal 11 Agustus 2009

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Sri Hidajati Bayu S, dr, DTM, MS, Sp.ParK

Anggota : 1. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr, M.Sc, S p.ParK.

2. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh, MS.

3. Budiono, dr, M.Kes.

4. Kadek Rachmawati, drh, M.Kes

5. Dr. H. Nur Achmad Tjiptoprajitno, MSc

## UCAPAN TERIMA KASIH



Puji dan syukur yang tak terhingga saya panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah berkenan melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini dengan sebaik-baiknya.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr, M.Sc, Sp.ParK, sebagai pembimbing ketua, yang telah penuh perhatian memberikan dorongan, arahan, masukan dan bimbingan, saran dan pengetahuan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Chairul Anwar Nidom, drh, MS sebagai pembimbing yang dengan penuh kesabaran telah banyak memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan tesis dengan sebaik-baiknya.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya menyampaikan dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati yang paling dalam ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr Fasichul Lisan Apt, yang telah memberikan kesempatan studi pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya serta membantu kelancaran administrasi (dana beasiswa) melalui pelaksanaan kerjasama dengan Politeknik Kesehatan Depkes Surabaya.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr Muhammad Amin dr, SpP(K), yang telah memberikan kesempatan studi pendidikan Magister di Program Studi Imunologi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr. Harjanto JM dr, AIF, yang telah banyak membantu memperlancar kegiatan yang berkenaan dengan pelaksanaan pendidikan.

Ketua Program Studi Imunologi Universitas Airlangga Prof. Dr. Sri Hidajati Bayu Santoso, dr, DTM, MS, Sp.ParK yang telah banyak membantu, memberikan arahan, masukan, dorongan dan bimbingan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Direktur Politeknik Kesehatan Surabaya Departemen Kesehatan, sebagai kepala Instansi tempat saya bekerja, yang telah memberikan dukungan moril

berupa kesempatan dan materil untuk melanjutkan pendidikan Magister Program Studi Immunologi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Surabaya, Dra. Wieke Sri wulan, ST, MARS, Mkes yang telah, memberikan kesempatan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan.

Dr. H. Nur Achmad Tjiptoprajitno, MSc, selaku Kepala UTD PMI Surabaya, Dr. Budi Arifah beserta staf dan karyawan PMI Surabaya yang banyak membantu saya dalam melakukan penelitian

Sahabatku Ocky Dwi suprobowati, drh, M.Kes yang banyak memberikan dorongan moril dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Teman-teman seangkatan Rahmaniyah, SKM dan Narwati, S.Si (Poltekkes Kesling Surabaya) yang telah banyak memberikan masukan dan dorongan pada penyelesaian tesis ini.

Revianny V. Nidom, S.Farm, Apt yang telah membantu dengan ketekunan dan kesabaran membimbing saya dalam melakukan penelitian tesis sampai selesai.

Teman-teman di Lab. Avian Influenza TDC, Kadek Rachmawati, drh, M.Kes, dr. Ema Qurnianingsih, M. Yusuf Alamudi, M.Kes, drh. Mia, drh. Zakki M, drh. Kholik dan mas Surip yang telah memberikan bantuan, semangat dan motivasi bagi penyelesaian tesis ini.

Kepada ayahanda Roestamadji Santoso (Alm) dan ibunda Lilik Rifa'ah (Alm) tercinta yang tidak sempat menyaksikan putrinya menyelesaikan pendidikan Magister Program Studi Immunologi di Universitas Airlangga Surabaya. Semoga amal ibadah mereka diterima oleh Allah SWT dan kepada ibu dan bapak mertua, H. Kusni dan Hj. Aminah, yang telah memberikan semangat dan doanya.

Kepada Adikku, Widya Ruliyanti Sari dan Deny Widyanto serta keponakanku Moh. Farrel Ramadhan, terima kasih atas segala bantuan dan doanya.

Suami tercinta, Amri, S.Ag, M.Pd, dan calon bayiku, terima kasih telah memberikan kasih sayang, dorongan, semangat dan doa yang selalu menyertai hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Magister ini.

Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, namun tanpa bantuan mereka, penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.

Surabaya, 11 Agustus 2009  
Penulis

## RINGKASAN

### **SURVEI SEROLOGIS ANTIBODI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE H5N1 PADA DARAH DONOR SEHAT (*HEALTHY BLOOD DONOR*) DI SURABAYA**

*Avian influenza* merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A dari famili *orthomyxoviridae*. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek dan ayam) di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi dan manusia). Insidensi penularan *Avian influenza* secara langsung melalui darah memang belum banyak diketahui.

Tujuan dari penelitian ini untuk melaksanakan survei serologis antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengetahui titer antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor di Surabaya dan mengetahui serum yang mengandung antibodi dapat menetralisasi efek sitopatik dari virus *Avian influenza* H5N1. Jumlah sampel darah donor yang diperiksa sebanyak 773 spesimen darah yang diambil dari Palang Merah Indonesia Surabaya dan diproses di laboratorium BSL-3 *Avian Influenza* dengan metode Hambatan Haemaglutinasi (HI) dan Netralisasi.

Hasil penelitian menunjukkan dari 773 darah donor didapatkan sebanyak 13 darah donor yang memiliki antibodi terhadap *Avian influenza* sub tipe H5. Titer antibodi 1:10 untuk golongan darah A sebanyak 2 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, dan golongan darah O sebanyak 2 orang. Antibodi dengan titer 1:20 ditemukan pada golongan darah A sebanyak 4 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, golongan darah AB sebanyak 1 orang dan golongan darah O sebanyak 1 orang, sedangkan titer 1:40 hanya 1 orang dengan golongan darah O. Berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan uji netralisasi pada serum tidak ditemukan antibodi yang dapat menetralisasi efek sitopatik dari virus *Avian influenza* H5N1. Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah diperlukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi adanya virus *Avian influenza* dari sub tipe lain dan dilakukan penelitian adanya hubungan antara virus *Avian influenza* pada darah donor dengan golongan darah.

## SUMMARY

### **SEROSURVEY ANTIBODY Avian influenza SUBTYPE H5N1 IN HEALTHY BLOOD DONOR AT SURABAYA**

Avian influenza was zoonosis disease that caused by influenza A virus from family orthomyxoviridae. Avian influenza virus subtype H5N1 was very patogen can be attack bird livestock (bird, duck and chicken) in at South-east Asia and could be infected from bird to mammals (cat, pig and human). Incidence of Avian influenza virus infection directly to blood was still unclear.

The purpose of this study is to research serosurvey Avian influenza H5N1 antibody in healthy blood donor at Surabaya.

This research is descriptive study to found prevalence and titre of antibody existence Avian influenza H5N1 antibody in blood donor at Surabaya and antibody in sera healthy blood donor can be neutralized cytopathic effect Avian influenza H5N1 virus. Total sample blood donor that inspected amount 773 specimen blood from Red Blood Cross Surabaya and processed at BSL-3 Avian Influenza laboratory with Haemagglutination Inhibition (HI) and neutralization method.

Result showed 13 blood donor from 773 blood donor have Avian influenza subtype H5 antibody. Antibody titre of subtype H5 1: 10, 2 people of blood type A, 1 people of blood type B and 2 people of blood type O. Antibody titre 1: 20 found 4 people of blood type A, 1 people of blood type B, 1 people of blood type AB and 1 people of blood type O. antibody titre 1: 40 only 1 people with blood type O. These research was not found antibody in sera blood donor which can be neutralized cytopathic effect of Avian influenza virus subtype H5N1. Suggestions of this research will be needed detection antibody from other subtype of Avian influenza virus and do research for analyzed correlation between Avian influenza with blood group.

**ABSTRACT****SEROSURVEY ANTIBODY Avian influenza SUBTYPE H5N1  
IN HEALTHY BLOOD DONOR AT SURABAYA**

The purpose of this study is to research serosurvey Avian influenza H5N1 antibody in healthy blood donor at Surabaya. This research is descriptive study to found prevalence and titre of antibody existence Avian influenza H5N1 antibody in blood donor at Surabaya and antibody in sera healthy blood donor can be neutralized cytopathic effect Avian influenza H5N1 virus. Total sample blood donor that inspected amount 773 specimen blood from Red Blood Cross Surabaya and processed at BSL-3 Avian Influenza laboratory with Haemagglutination Inhibition (HI) and neutralization method.

Result showed 13 blood donor from 773 blood donor have Avian influenza subtype H5 antibody. Antibody titre of subtype H5 1: 10, 2 people of blood type A, 1 people of blood type B and 2 people of blood type O. Antibody titre 1: 20 found 4 people of blood type A, 1 people of blood type B, 1 people of blood type AB and 1 people of blood type O. antibody titre 1: 40 only 1 people with blood type O. These research was not found antibody in sera blood donor which can be neutralized cytopathic effect of Avian influenza virus subtype H5N1. Suggestions of this research will be needed detection antibody from other subtype of Avian influenza virus and do research for analyzed correlation between Avian influenza with blood group.

**Keyword :** Avian influenza H5N1, blood donor, antibody titre

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Persyaratan Gelar .....	iii
Lembar Pengesahan .....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	viii
Summary .....	ix
Abstract .....	x
Daftar Isi .....	xi
Daftar Tabel .....	xiv
Daftar Gambar .....	xv
Daftar Lampiran .....	xvi
Daftar Singkatan .....	xvii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	5
1.4.2 Manfaat Praktis .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Virus <i>Avian influenza</i> .....	6
2.1.1 Etiologi dan Morfologi Virus <i>Avian influenza</i> .....	6
2.1.2 Sifat Virus <i>Avian influenza</i> .....	9
2.2 Epidemiologi Virus <i>Avian influenza</i> Subtipe H5N1 Pada Manusia ....	9
2.3 Penularan Virus <i>Avian influenza</i> Subtipe H5N1 Pada Manusia .. .....	13
2.4 Patogenesis Virus <i>Avian influenza</i> .....	15
2.5 Gejala Klinis .....	17
2.6 Replikasi .....	18
2.7 Respon Imun .....	21
2.8 Respon Antibodi Terhadap Virus <i>Avian Influenza</i> .....	25
2.9 Pengendalian dan Pencegahan Terhadap Infeksi <i>Avian influenza</i> .....	27
2.10 Diagnosis Laboratorium .....	28
2.11 Uji Hambatan Hemaglutinasi ( <i>HI Test</i> ) .....	29
2.12 Uji Netralisasi .....	30
2.13 Donor Darah .....	31



2.13.1 Keamanan darah .....	31
2.13.2 Seleksi Donor Darah.....	32
2.13.3 Uji Darah Donor .....	33
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL</b> .....	<b>35</b>
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	35
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>36</b>
4.1 Jenis Penelitian .....	36
4.2 Definisi Operasional Penelitian .....	36
4.3 Sampel dan Besar Sampel Penelitian .....	37
4.3.1 Sampel Penelitian .....	37
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	38
4.4.1 Lokasi Penelitian .....	38
4.4.2 Waktu Penelitian .....	38
4.5 Bahan Penelitian .....	38
4.5.1 Bahan Antigen Virus .....	38
4.5.2 Bahan Penelitian .....	39
4.5.3 Instrumen Penelitian .....	39
4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data .....	40
4.6.1 Teknik Pengambilan Sampel Darah di PMI Surabaya .....	40
4.6.2 Pemeriksaan Golongan Darah .....	41
4.6.3 Preparasi Spesimen .....	41
4.6.4 Prosedur Penelitian .....	42
4.6.4.1 Pembuatan <i>Red Blood Cell</i> Ayam .....	42
4.6.4.2 Uji Hemaglutinasi (HA) Mikroteknik .....	42
4.6.4.3 Uji Retitrasi Antigen 4HA Unit / 0,025 ml .....	43
4.6.4.4 Perlakuan Serum .....	44
4.6.4.5 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik .....	44
4.6.4.6 Inokulasi Sel MDCK ( <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> ) pada 48 <i>Well Tissue Culture Plate</i> .....	45
4.6.4.7 TCID <sub>50</sub> ( <i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i> ) .....	46
4.6.4.8 Uji Netralisasi Virus ( <i>Virus Neutralization Assay</i> ) .....	47
4.6.5 Pengumpulan Data .....	50
4.7 Kerangka Operasional Penelitian .....	51
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>52</b>
5.1 Palang Merah Indonesia (PMI) Surabaya .....	52
5.2 Hasil Penelitian .....	53
5.2.1 Data Darah Donor PMI Surabaya .....	53
5.2.2 Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik .....	54
5.2.3 Hasil Uji TCID <sub>50</sub> ( <i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i> ) .....	56
5.2.4 Hasil Uji Netralisasi .....	58

<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	62
<b>BAB 7 PENUTUP</b> .....	68
7.1 Kesimpulan.....	68
7.2 Saran .....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	69

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Data Jumlah Kumulatif WHO Avian influenza H5N1 Pada Manusia per 11 Februari 2009 .....	12
Tabel 5.1 Data Sampel Darah Donor Digolongkan Berdasarkan Golongan Darah	53
Tabel 5.2 Data Darah Donor Yang Positif Terhadap Uji Hambatan Hemaglutinasi	54
Tabel 5.3 Penghitungan Pengenceran Virus dengan Rumus <i>Reed and Muench</i> ....	57
Tabel 5.4 Hasil Darah Donor Terhadap Virus <i>Avian Influenza</i> Subtipe H5N1 Dengan Uji Netralisasi .....	59

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Virus <i>Avian influenza</i> A .....	8
Gambar 2.2 Daerah Endemis Virus <i>Avian influenza</i> subtipe H5N1 di Indonesia	11
Gambar 2.3 Spesies yang Dapat Terinfeksi oleh <i>Avian influenza</i> .....	14
Gambar 2.4 Replikasi virus <i>Avian influenza</i> .....	21
Gambar 2.5 Respon Imun Terhadap virus <i>Avian influenza</i> .....	25
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian .....	35
Gambar 4.1 Skema Kerangka Operasional Penelitian.....	51
Gambar 5.1 Lokasi Pengambilan Sampel Darah Donor di UTD PMI Surabaya	53
Gambar 5.2 Hasil Uji TCID <sub>50</sub> Pada A / <i>Chicken/Indonesia/114/2008</i> H5N1 .....	58
Gambar 5.3 Hasil Uji Netralisasi Negatif Pada Sel MDCK .....	60
Gambar 5.4 Hasil Uji Netralisasi Positif Pada Sel MDCK .....	60

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat Ijin Pengambilan Sampel di PMI Surabaya .....	76
Lampiran 2 Hasil Pemeriksaan Virus <i>Avian Influenza</i> H5N1 Pada Sampel Darah Donor Sehat PMI Surabaya Tgl 10 Oktober-29 November 2008 .....	77
Lampiran 3 Pembuatan Reagen Penelitian .....	96
Lampiran 4 Prosedur Seleksi Donor Darah PMI Surabaya .....	97
Lampiran 5 Pemeriksaan Golongan Darah.....	98
Lampiran 6 Preparasi Spesimen dan Uji Netralisasi.....	99
Lampiran 7 Hasil Uji HI Mikroteknik.....	100

## DAFTAR SINGKATAN

ARDS	: Acute Respiratory Distress Syndrome
CD	: Clusters of Differentiation Antigen
H	: Hemagglutinin
HA	: Hemagglutination
HI	: Hemagglutinasasi Inhibition
HPAI	: Highly Pathogenic Avian Influenza
IFN	: Interferon
LPAI	: Low Pathogenic Avian Influenza
M	: Matrik
N	: Neuraminidase
NP	: Nucleoprotein
NS	: Non-structural
PA	: Polymerase acidic
PB1	: Polymerase basic 1
PB2	: Polymerase basic 2
RNA	: Ribo Nucleic Acid
RNP	: Ribo Nucleic Protein
Th	: T-helper cell
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TCID <sub>50</sub>	: Tissue Culture Infectious Dose 50

**BAB 1**  
**PENDAHULUAN**

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Avian influenza* atau dikenal sebagai *fowl plague* pertama kali ditemukan di Italia pada tahun 1878 sebagai penyakit yang menjangkiti unggas (Werner, 2006). *Avian influenza* merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A dari famili *orthomyxoviridae*. Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek dan ayam) 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). Penularan dari unggas ke kucing terbukti dengan ditemukannya virus *Avian influenza* H5N1 pada kucing jalanan yang berada di daerah pasar di wilayah Semarang (Dwiyanto, 2008). Yamaoka *et.al* (2008) telah melakukan surveilans virus *Avian influenza* subtipe H5N1 pada unggas di Surabaya dan Reviany *et.al* (2008) pada unggas, kucing dan babi di Indonesia. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya virus *Avian influenza* yang menginfeksi ayam dan unggas lainnya di Surabaya bahkan di Indonesia merupakan subtipe H5N1 yaitu A/Ck/Ind/114/2008 (H5N1). Virus A/Ck/Ind/114/2008 (H5N1) memiliki kemiripan kluster dengan virus yang menginfeksi dan menyebabkan kematian pada manusia di Jabotabek.



Virus *Avian influenza* subtipe H5N1 merupakan salah satu virus yang menyebabkan infeksi pada manusia dan menimbulkan derajat keparahan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Suarez *et al*, 2004 ; WHO, 2007). Tidak kurang dari 417 orang telah dilaporkan terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 dan 254 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, menurut Departemen Kesehatan RI angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 8 April 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009). Tetapi hingga saat ini masih belum ada bukti ilmiah yang menunjukkan adanya penularan antar manusia (Saif and Espinoza, 2006).

Manifestasi *Avian influenza* H5N1 yang menginfeksi manusia terutama pada saluran pernafasan melalui udara yang mengandung virus atau dengan leleran (droplet) infeksi dari unggas. Penularan infeksi juga dapat melalui air liur, cairan hidung, feses, darah dan kontak langsung dengan cairan tubuh yang terkontaminasi oleh virus *Avian influenza* (CDC, 2006).

Khakpour *et.al* (1969) mendeteksi adanya virus *Avian influenza* dalam darah orang yang terinfeksi dengan tanpa gejala (asimtomatik). Alamudi, *et.al* (2008) melaporkan 136 orang pedagang unggas yang berasal dari penjual unggas di pasar tradisional dan Rumah Pematangan Hewan (RPH) di Surabaya, 3 orang diantaranya terindikasi adanya antibodi terhadap virus *Avian influenza* H5N1.

Selama ini insidensi penularan *Avian influenza* secara langsung melalui darah memang belum banyak diketahui (Norris, 2003). Hal ini disebabkan keadaan viremia influenza sangat kecil, antara 2-3 hari setelah infeksi. Selain itu virus dalam darah jarang terdeteksi selama adanya gejala infeksi *Avian influenza*, tetapi viremia dapat terjadi simptomatik atau asimptomatik infeksi influenza (WHO, 2006).

Kemungkinan pendonor yang terdapat viremia dengan asimptomatik berpotensi dapat menularkan virus *Avian influenza* melalui darah atau produk darah. *Avian influenza* dalam darah menyebabkan terjadi peningkatan penularan virus *Avian influenza* melalui transfusi darah (AABB, 2006).

Deteksi adanya antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor di Palang Merah Indonesia Surabaya saat ini belum pernah dilakukan, sehingga dibutuhkan monitoring atau survei di daerah atau tempat yang dapat menjadi penularan virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada manusia. Bertolak dari latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan survei serologis untuk mengetahui adanya antibodi terhadap virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan tersebut, maka penelitian ini dilakukan sehingga disusun rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat antibodi terhadap virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya ?
2. Berapa titer antibodi terhadap virus *Avian influenza* pada darah donor sehat yang positif ?
3. Apakah serum dari darah donor sehat yang mengandung antibodi dapat menetralisasi efek sitopatik dari virus *Avian influenza* H5N1 ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk melaksanakan survei serologis antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk :

1. Membuktikan bahwa terdapat antibodi terhadap virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya
2. Mengetahui titer antibodi terhadap virus *Avian influenza* pada darah donor sehat yang positif

3. Membuktikan bahwa serum dari darah donor sehat yang mengandung antibodi dapat menetralkan efek sitopatik dari virus *Avian influenza* H5N1.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hasil survei serologis antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

1. Data survei serologis antibodi virus *Avian influenza* H5N1 supaya dapat digunakan untuk memberi masukan kepada pihak yang berwenang
- 2 Hasil survei serologis antibodi ini dapat dikembangkan oleh peneliti lain dengan mengidentifikasi virus *Avian influenza* dari subtipe lain.

**BAB 2**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2

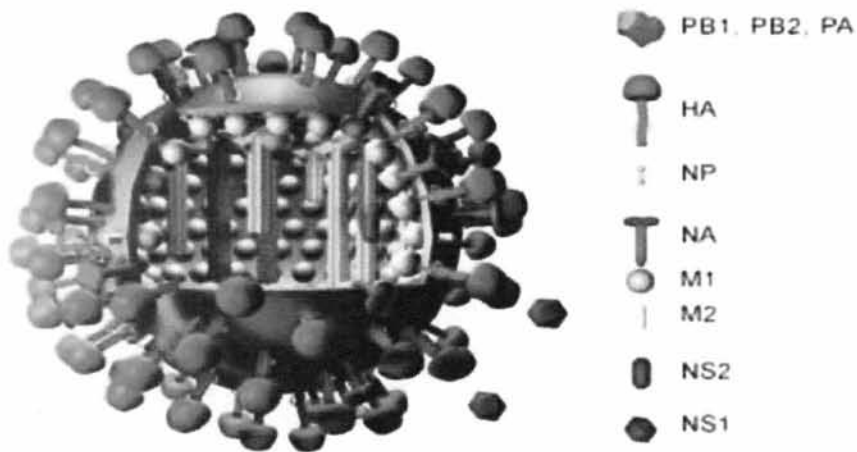
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Virus *Avian influenza*

##### 2.1.1 Etiologi dan Morfologi virus *Avian influenza*

Virus Influenza terdapat tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Virus *Avian influenza* atau virus Flu Burung termasuk dalam virus influenza tipe A dari famili *Orthomyxoviridae* (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Genoma virus influenza tipe A berbentuk RNA rantai untai tunggal, dengan diameter 80-120 nm, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 fragmen yang menyandi 10 macam protein. Kedelapan fragmen tersebut adalah *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase acidic* (PA), *hemagglutinin* (H), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (N), *matriks* (M) serta *non-structural* (NS). Masing-masing fragmen virus *Avian influenza A* menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan fragmen NS yang masing-masing menghasilkan dua macam protein, yaitu protein M1 dan M2 serta protein NS1 dan NS2 (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001). Virus ini mempunyai amplop dengan *lipid bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktifitas hemaglutinasi dan neuraminidase. Aktifitas ini diperankan oleh 2 glikoprotein

utama pada permukaan virus yaitu hemagglutinin (H) dan neuraminidase (N) yang berada dalam bentuk homotrimer dan homotetramer. Analisis serologik dan genetik pada virus Flu Burung dapat diketahui adanya 16 macam H dan 9 macam N ( Dybing *et al* 2000; Hoffman *et al*, 2000; Donatelli *et al*, 2001; Swayne, 2004). Virus tersebut dapat menginfeksi berbagai jenis unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang mamalia lain misalnya, anjing dan ikan paus. Meskipun semua sub tipe virus influenza A dapat ditemukan pada burung, tetapi 3 hemagglutinin (H1, H2 dan H3) dan 2 neuraminidase (N1 dan N2) dapat bersirkulasi ke dalam tubuh manusia (Trampuz *et al*, 2004). Susunan asam amino protein H, N serta protein NS dan PB2 ikut berperan dalam sifat antigenik, virulensi dan spesifitas virus terhadap hospes. Virus influenza tipe A terdiri dari beberapa sub tipe, yaitu H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2 dll (Hoffman *et al*, 2000). H berperan penting dalam penempelan virus Influenza pada permukaan sel hospes melalui asam sialat reseptor sel epitel, menyebabkan fusi pada membran endosom dan terjadi respon antibodi (Trampuz *et al*, 2004). Sedangkan aktivitas NA berperan untuk memecah reseptor asam sialat membran sel hospes dan permukaan virion yang dapat mencegah penggabungan virion sehingga dapat memfasilitasi pelepasan virus influenza baru dari sel terinfeksi (Garcia and Palase, 2002; De Jong and Hien, 2004). Kemampuan virus Flu Burung untuk melakukan mutasi dan reasorpsi genetik memungkinkan virus untuk berubah sifat antigeniknya, patogenisitasnya serta spesifitas hospesnya (Hoffman *et al*, 2000; Asmara, 2005).



Gambar 2.1 Struktur virus *Avian influenza A* (Gürtler.L, 2006)

Variasi antigenik pada virus Flu Burung dapat ditemukan dengan frekuensi tinggi dan terjadi melalui 2 cara yaitu *antigenic shift* dan *antigenic drift*. *Antigenic shift* dapat timbul akibat gen *reassortment* (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai sub tipe virus Flu burung baru. *Antigenic shift* terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan (mayor) pada antigen permukaan H dan atau N dan dapat menimbulkan keadaan pandemik (Swayne and Suarez, 2003; Raharjo dan Nidom, 2004). *Antigenic drift* dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen permukaan H dan atau N dan dapat ditemukan pada virus influenza tipe A dan B. *Antigenic drift* berlangsung lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu daerah/domain. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus (Capua *et al*, 2000; Tumpey *et al*, 2002; Swayne and Suarez, 2003).



### 2.1.2 Sifat Virus *Avian Influenza*

Virus *Avian influenza* dapat bertahan hidup tergantung pada suhu, pH, mineral dan bahan organik. Virus *Avian influenza* bertahan di dalam lendir, darah dan tinja. Virus influenza dapat persisten dan infeksiif dalam feses pada suhu 4°C selama 30-35 hari dan suhu 20°C selama 7 hari (FAO, 2004 ; CFSPH, 2007). Virus influenza dapat bertahan lama dengan suasana lembab dan dingin serta dapat diisolasi dari air danau atau air kolam yang terletak di daerah yang ditempati oleh unggas air (Tabbu, 2000). Virus influenza persisten dan infeksiif di dalam air, pada suhu 0°C selama lebih dari 30 hari dan suhu 28°C selama 26-30 hari (FAO, 2004 ; CFSPH, 2007).

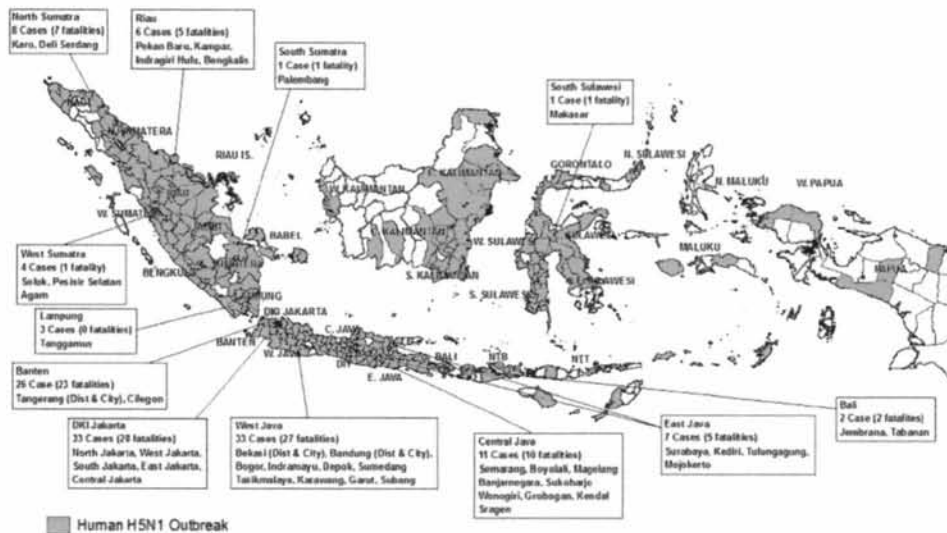
Virus *Avian influenza* menjadi inaktif pada suhu 56°C minimum 1 jam, suhu 60°C selama 3 menit, radiasi ion dan pH rendah (pH 2) (CFSPH, 2007). Virus influenza rentan terhadap beberapa desinfektan seperti detergen, sodium hipoklorit, etanol 70%, aldehid (formalin, glutaraldehid, formaldehid), fenol, iodium dan larutan lemak. dan tetap stabil pada pH antara 5,5-8 (Martin *et al*, 2006; CFSPH, 2007).

## 2.2 Epidemiologi Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Pada Manusia

Wabah flu burung pada manusia pertama kali ditemukan di Hongkong. Selama wabah tersebut terjadi, diketahui bahwa terdapat 18 orang pasien menderita flu burung dan 6 orang meninggal. (Dybing *et al*, 2000; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004). Kasus infeksi virus flu burung pada

manusia dilaporkan telah menyebar di Azerbaijan, Kamboja, Cina, Mesir, Indonesia, Irak, Thailand, Turki dan Vietnam (CDC, 2004; WHO, 2004; WHO, 2005). Penderita yang terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 90% berumur antara 18-40 tahun. Kematian 61% terdapat pada penderita yang berumur 10-20 tahun atau 50 tahun keatas. Kebanyakan penderita yang terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 sebelumnya terlihat sehat (WHO, 2008).

Kasus flu burung pada manusia di Indonesia, pertama kali ditemukan di kota Tangerang, Banten. Berdasarkan hasil konfirmasi dari laboratorium rujukan WHO di Hongkong, Pemerintah Indonesia melaporkan bahwa kejadian meninggalnya keluarga yang berasal dari kota Tangerang Propinsi Banten disebabkan oleh infeksi virus *Avian influenza*. Menteri Kesehatan mengemukakan bahwa telah terjadi infeksi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 pada manusia, tiga dari kasus ini berakibat fatal. Pada kasus tersebut, kebanyakan individu yang terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 mempunyai hubungan yang dekat dengan ayam atau unggas yang mati di sekitar rumah tempat tinggal mereka sebelum gejala klinis mulai berkembang (Depkes RI, 2006).



Gambar 2.2 Daerah endemis virus *Avian influenza* subtype H5N1 di Indonesia (WHO, 2008)

Infeksi virus *Avian influenza* telah diketahui menyebar secara geografis. Berbagai kasus infeksi virus *Avian influenza* H5N1 terus berkembang dan hingga tanggal 11 Februari 2009 dilaporkan lebih dari 407 orang telah terinfeksi dengan virus *Avian influenza* H5N1 dan 254 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, menurut Departemen Kesehatan RI angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009).

Tabel 2.1. Data Jumlah Kumulatif WHO *Avian influenza* H5N1 Pada Manusia Sampai Dengan 8 April 2009

Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		Total	
	cases	deaths	cases	deaths	cases	Deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	0	0	8	7
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	7	4	38	25
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	4	0	55	23
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	0	0	141	115
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's Democratic Republic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	1	0	108	52
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	44	33	12	4	417	257

Kira-kira 25% dari kasus *Avian influenza* H5N1 dilaporkan terjadi dalam satu keluarga, hal ini kemungkinan adanya hubungan dekat dengan anggota keluarga yang terinfeksi (Uyeki, 2008). Hal ini memungkinkan penularan virus *Avian influenza* H5N1 dalam satu keluarga dapat meningkat (WHO, 2008).

Kejadian dan frekuensi adanya infeksi virus *Avian influenza* H5N1 dengan gejala yang ringan sampai yang asimtomatik sangat jarang dilaporkan. Penelitian seroepidemiologi pada orang di pedesaan yang mempunyai halaman belakang rumah untuk unggas, pekerja di pasar unggas dan pekerja kesehatan

yang kemungkinan mengalami infeksi *Avian influenza* H5N1, sangat jarang dilakukan (WHO, 2008).

Oleh karena tingginya angka kematian infeksi virus *Avian influenza* H5N1 maka diperlukan penelitian yang lebih lanjut dengan melihat spektrum infeksi virus sehingga didapatkan data yang tepat dan akurat (Uyeki, 2008).

### **2.3 Penularan Virus *Avian influenza* Subtipe H5N1 Pada Manusia**

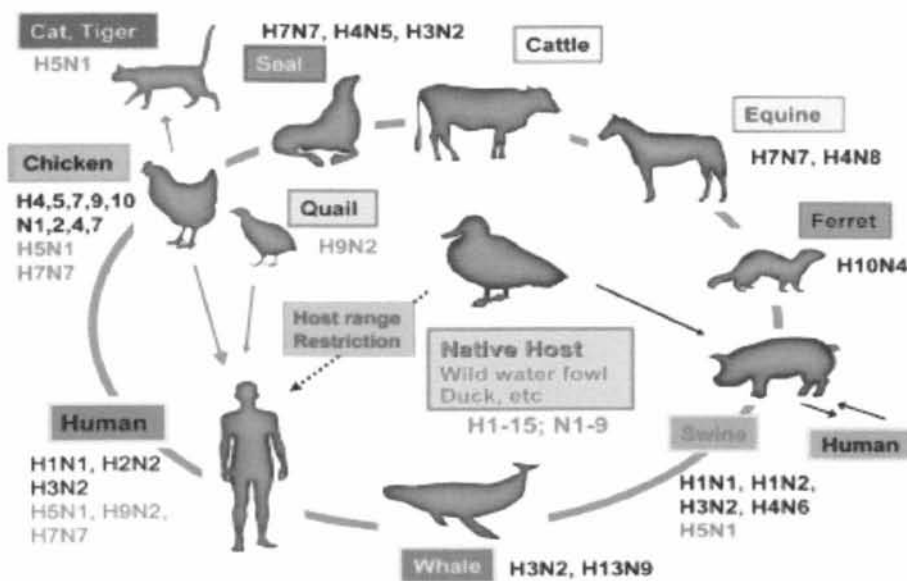
Penularan unggas yang terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 ke manusia dapat terjadi melalui hubungan langsung dengan unggas yang sakit atau unggas mati dan faktor lingkungan juga dapat menjadi sumber penularan ke manusia seperti permukaan atau obyek yang terkontaminasi oleh sekresi atau ekskresi unggas yang terinfeksi (Harner *and* Werner, 2006 ; Kamps *and* Reyes Teran, 2006 ; WHO, 2008). Selain itu seseorang yang bekerja di tempat pemotongan hewan, pedagang unggas seperti ayam jago dan bebek, pencabut bulu ayam atau bulu angsa liar, penjual makanan, pemakaman, serta petugas kesehatan yang bekerja di rumah sakit sangat beresiko dapat terinfeksi virus *Avian influenza* H5N1 (WHO, 2008).

Virus *Avian influenza* dikeluarkan dari hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka hewan yang terinfeksi. Hal ini karena virus *Avian influenza* berkembang biak dalam saluran pencernaan, ginjal, sistem reproduksi bahkan dapat mencapai ke sistem syaraf pusat (Tabbu, 2000, APHIS, 2004).

Infeksi virus influenza ditularkan ke manusia melalui debu yang terhirup dan mengandung virus atau droplet infeksi. Kemudian virus influenza masuk ke

dalam saluran pernafasan bagian atas atau melalui konjungtiva. Selain itu dapat melalui makanan, air minum, burung, mamalia dan lain-lain (Tabbu, 2000; Hayden *et al*, 2005).

Mekanisme transmisi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 terjadi dengan transmisi langsung melalui batuk atau bersin, air ludah, sekresi nasal, feses, darah atau kontak obyek yang terkontaminasi dengan cairan tubuh (Hayden *et al*, 2005). Transmisi dari virus influenza melalui air merupakan mekanisme mayor penyebaran virus ini diantara burung liar yang bermigrasi (WHO, 2004).



**Gambar 2.3** Spesies yang dapat terinfeksi oleh *Avian influenza* (Suzuki,2005)

## 2.4 Patogenesis Virus *Avian influenza*

Patogenitas virus *Avian influenza* dikategorikan berdasarkan kemampuannya untuk menyebabkan penyakit yang ringan atau ganas pada hospes. Secara umum virus ini dibedakan menjadi dua yaitu *Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI)* dan *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)* (WHO, 2004).

Berdasarkan *patotype* Virus *Avian influenza* dibedakan dua kelompok yaitu HPAI yang bersifat sangat ganas dan LPAI bersifat kurang ganas (Rahardjo, 2004). Virus *High Pathogenic Avian Influenza (HPAI)* mampu berkembang biak pada saluran pernafasan dan pencernaan juga pada sistem syaraf dan peredaran darah sehingga dapat menyerang dan merusak hampir semua organ tubuh. Kematian akibat HPAI berlangsung cepat dan didahului dengan gejala pernafasan atau kadang-kadang tanpa gejala (APHIS, 2004). Menurut Raharjo (2004), salah satu tanda HPAI adalah tingkat kematian yang ditimbulkan sangat tinggi yaitu mencapai 100%.

Virus *Avian influenza* yang berasal dari unggas air telah dapat melintasi barrier hospes dan dapat menginfeksi unggas domestik dan unggas liar, babi, kuda mamalia (anjing laut, ikan paus, unta, anjing, kucing dan manusia). Hospes yang terinfeksi menunjukkan gejala mulai dari infeksi pernafasan atas ringan hingga penyakit sistemik yang fatal dan adapula yang tidak menunjukkan gejala atau asimtomatis. Keparahan dari penyakit tergantung banyak faktor antara lain

virulensi virus, status imunitas dan kadang-kadang diikuti infeksi bakteri (Horimoto *and* Kawaoka, 2001).

Kerusakan yang disebabkan oleh virus *Avian influenza* H5N1 ini berasal diantara satu dari tiga proses yaitu proses perbanyak virus secara langsung dalam sel, jaringan dan otak; efek secara tidak langsung dari produksi mediator seluler seperti sitokin serta iskemik (suplai darah yang tidak mencukupi) akibat adanya bekuan darah dalam jantung atau pembuluh darah (Radji, 2006).

Patogenitas dan virulensi virus influenza ditentukan oleh faktor hospes dan faktor virus. Beberapa faktor hospes tergantung pada keberadaan reseptor target pada sel hospes, kesediaan enzim pada sel hospes yang penting untuk masuknya virus dan replikasi, kondisi *immunocompetence* 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. Sedangkan faktor virus dipengaruhi oleh kemampuan mengikat sel hospes, kemampuan virus melakukan *shedding*, pembatasan dari efek sitopatogenik dalam mempertahankan keseimbangan antara replikasi virus dan kontrol hospes, pelepasan diri dari *immunosurveillance* melalui evolusi variasi antigenik yang dimodulasi oleh tekanan selektif dari respon imun dan rekombinan dengan strain virus yang berbeda (Behrens *and* Stoll, 2006).



## 2.5 Gejala Klinis

Tingkat keganasan virus AI bervariasi dan dapat dibedakan atas virus *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) dan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Virus LPAI dapat menimbulkan penyakit yang bersifat asimtomatik atau penyakit ringan yang terbatas pada saluran pernafasan atau reproduksi dengan tingkat mortalitas rendah. Sebaliknya virus HPAI dapat menimbulkan multisistemik dengan tingkat morbiditas dan atau mortalitas yang tinggi, diantaranya 70% sampai 100%. Virus HPAI bersifat sangat kontagius dan dapat berasal dari virus LPAI mutasi melalui pada protein hemagglutinin (Harimoto and Kawaoka, 2001 ).

Gejala penyakit sangat bervariasi dan tergantung pada virulensi virus yang menginfeksi, spesies virus, umur, jenis kelamin, penyakit yang diderita dan faktor lingkungan (FAO, 2007).

Masa inkubasi virus *Avian influenza* pada manusia sangat sulit ditentukan. Biasanya terjadi 2-3 hari setelah terinfeksi. Menurut WHO untuk mendeteksi dan memonitor penderita masa inkubasinya adalah 7 hari (WHO, 2007).

Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* dapat menyebabkan infeksi gejala lebih berat daripada virus *Low Pathogenic Avian Influenza*. Sekarang ini virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) subtipe H5N1 sebagian besar ditandai awal dengan demam yang tinggi selain itu juga mengalami sakit kepala,

perdarahan di hidung dan gusi, diare, mual, muntah dan sakit lambung dan gangguan saluran pernafasan atas.

Gejala klinis yang terlihat berupa konjungtivitis, gejala influenza tipikal, sampai keadaan yang fatal seperti pneumonia, sindrom respirasi akut, beberapa pneumonia bronchointerstitial, dan disfungsi beberapa organ. Infeksi influenza juga mengakibatkan encephalopati, myelitis, myositis, myocarditis, pericarditis (CSFPH, 2007).

Komplikasi sekunder pneumonia bakteri merupakan juga sering terjadi pada penderita influenza. Komplikasi biasanya disebabkan oleh kegagalan pernafasan sindrom distres pernafasan akut (ARDS), *ventilator-associate pneumonia*, *pulmonary hemorrhage*, *Reye's syndrome*, pansitopenia, sepsis dan bakterinemia (Radji, 2006).

## 2.6 Replikasi

Virus influenza melekat pada permukaan reseptor spesifik yang terdapat di bagian terminal *bronchioli* dan sel epitel alveolar hospes melalui pengikatan glikoprotein H ke reseptor asam sialat hospes. Asam sialat berhubungan dengan galaktosa, baik pada reseptor  $\alpha$ -2,3 (avian dan kuda) maupun pada reseptor  $\alpha$ -2,6 (manusia) yang diekspresikan 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 ; Malik Peiris *et al*, 2007).

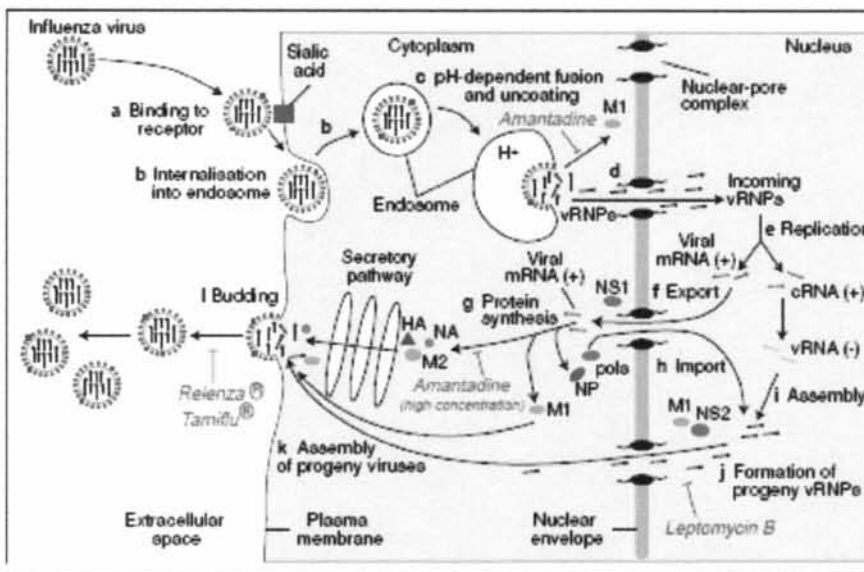
Mutasi genetik seringkali terjadi sesuai dengan kondisi dan lingkungan replikasinya. Mutasi genetik tidak hanya untuk memepertahankan diri melainkan juga meningkatkan patogenitasnya. Mutasi adanya *polymerase basic protein* oleh gen PB2 yang dapat menyebabkan meningkatnya aktivitas replikasi virus *Avian influenza* H5N1 dalam sel hospes dan adanya *nonstructural protein* yang menyebabkan virus menjadi resisten terhadap IFN dan TNF- $\alpha$  secara *in vitro* (Radji, 2006).

Virus yang berikatan dengan reseptor kemudian masuk ke dalam sel hospes melalui endositosis dengan cara membentuk *coated vesicle* (gambar 2.4). 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. 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 hemagglutinin (H) yang akan melebur pada membran virus dengan membran fagolisosom (Rantam, 2005). Saat mencapai level tertentu, penurunan pH diberhentikan melalui protein M2 dimana merangsang pelepasan sebagian dari fusi peptida H. Hal ini menyebabkan fusi H 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). Dalam nukleus dari sel yang terinfeksi selanjutnya akan terjadi proses transkripsi. 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 dan selanjutnya dirubah menjadi H, N, NP, PB 1, 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 *oligomerase* mengikat virus RNA dan selanjutnya terjadi *cleavage* virus RNA melalui aktivasi endonuklease dan secara bersamaan menyebabkan *elongasi* (pemanjangan). Produksi virus RNA dibatasi oleh nukleoprotein di dalam mRNA. Translasi mRNA oleh ribosom terjadi di dalam sitoplasma. Produk translasi adalah protein M1, H, dan N. H dan N diglikosilasi di dalam retikulum endoplasma kasar, kemudian diproses 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 kompleks 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 (N) dengan memecah reseptor asam sialat dari membran sel hospes. Keseimbangan aktifitas pelepasan H dan N virus dapat mengoptimalkan virus bereplikasi (Malik Peiris *et. al*, 2007)



**Gambar 2.4** Replikasi virus *Avian influenza* (Cambridge Univ. Press, 2001)

## 2.7 Respon Imun

Respon imun alamiah (non spesifik) terjadi melalui pelepasan sitokin IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ , influk dari granulosit neutrofil dan sel NK. Respon ini merupakan *prerequisite* penting untuk respon imun spesifik. Sitokin mengaktifkan mekanisme efektor lain melalui induksi respon sel pada respon imun non spesifik seperti sel monosit, sel NK, leukosit, dan sel dendritik serta dalam limfosit T dan limfosit B dari sistem imun adaptif. Sitokin diproduksi secara cepat setelah infeksi

pada epitel dan sel imun dari mukosa pernafasan yang dapat mengaktifkan sel khususnya dalam sistem imun (Behrens *and* Stoll, 2006). Respon imun alamiah terhadap virus *Avian influenza* H5N1 berperan dalam patogenesis penyakit. Mekanisme pertahanan hospes terhadap infeksi virus *Avian influenza* meliputi barier mekanik yang terdiri dari sel silia, sel dan kelenjar yang mensekresi mukus. Sel epitel pernafasan dalam mempertahankan masuknya patogen oleh lapisan dari mukus (bronkus), sel silia (bronkus dan bronkioli), dan makrofag alveolar (alveoli). Selama infeksi, makrofag yang memperantarai lisis dari sel yang terinfeksi, sekresi interleukin (IL1, IL6, IL12) dan TNF- $\alpha$ . Partikel asing dalam *nasal cavity* pada saluran pernafasan atas akan terjebak di dalam mukus, dibawa kembali ke kerongkongan kemudian ditelan. Di saluran pernafasan bawah, melalui silia dari sel epitel, partikel akan dibawa ke atas. Dalam alveoli, apabila terjadi kekurangan silia atau mukus maka makrofag bertanggung jawab untuk merusak partikel asing. Epitel *mucociliary* berperan pada barier fisik sebagai fungsi dari silia aktif dan adanya kompleks *array* dari komponen *glycocalyx* seperti *tethered* dan *soluble mucin* yang menunjukkan adanya *sialyloligosaccharide* yang berfungsi sebagai reseptor palsu yang menghalangi pengiriman virus pada permukaan epitel (Behrens *and* Stoll, 2006 ; Thompson *et al*, 2006).

Pada mekanisme respon imun spesifik meliputi 1. spesifik sekresi antibodi IgA dan sel T sitotoksik (CTLs) untuk *recovery* dari infeksi virus, 2. *pre-existing* spesifik untuk mengeliminasi virus melalui bentuk kompleks imunoglobulin virus setelah reinfeksi. Sel-sel yang berperan penting dalam respon

imun spesifik adalah sel limfosit T (sel T *helper*, sel T sitotoksik, sel *suppressor*) yang berperan sebagai respon imun seluler dan sel B yang berperan sebagai respon imun humoral. Infeksi influenza menginduksi kedua macam respon tersebut (Kauffmann *et al*, 2002).

Respon imun hospes terhadap virus *Avian influenza* sangat kompleks seperti respon imun humoral yang diperankan oleh antibodi terhadap glikoprotein hemaglutinin dan neuraminidase, sedangkan respon imun seluler berperan terhadap protein membran atau protein internal. Sel T spesifik virus influenza berperan baik pada reaksi inflamasi awal maupun *recovery* dari infeksi virus.

Respon imun humoral yang diperantarai antibodi mampu melawan strain virus homolog tetapi tidak cukup kuat melawan strain virus heterolog sedangkan respon imun seluler pada sel limfosit T dapat mencapai protein virus dengan strain virus heterolog. *Ligand* antigen spesifik dari reseptor sel limfosit T dapat menginduksi mekanisme efektor yang secara langsung maupun tidak langsung dapat menyebabkan lisis dari sel yang terinfeksi ( Thomas *et al*, 2006).

Glikoprotein H dan N virus *Avian influenza* melakukan variasi antigenik dan genetik untuk menghindari respon imun hospes. Antibodi spesifik H berperan sebagai proteksi karena mempunyai kemampuan mencegah penetrasi virus ke sel hospes dengan cara memblokir perlekatan virus. Antibodi spesifik terhadap glikoprotein N tersebut tidak dapat menetralkan infeksi tetapi hanya membatasi replikasi virus melalui pencegahan dari pelepasan partikel virus baru. Secara *in vivo*, antibodi spesifik terhadap protein M2 tidak mampu menetralsir infeksi dari

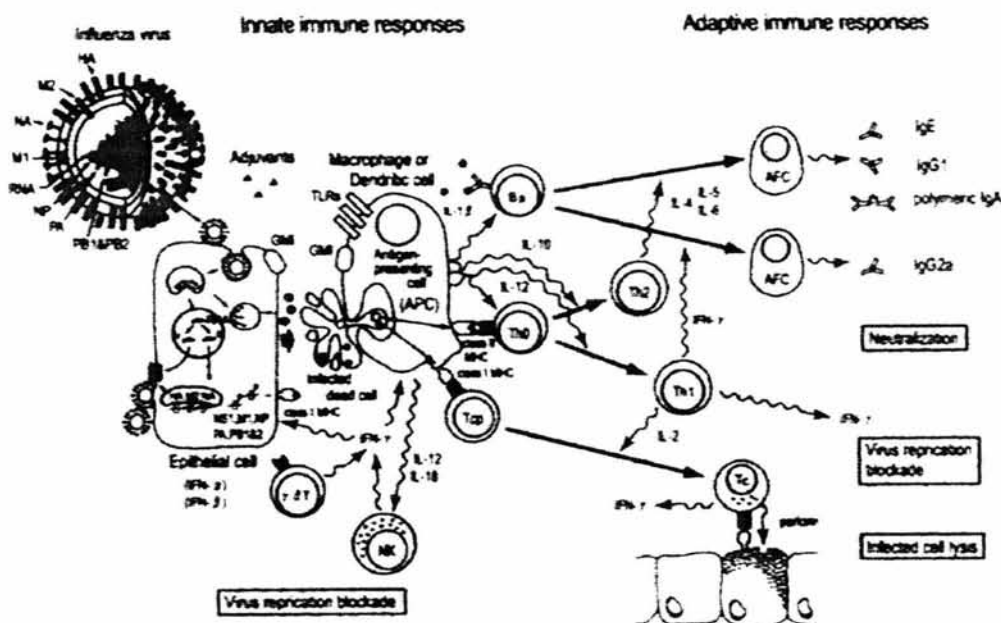
virus tetapi hanya bersifat protektif. Apabila virus *Avian influenza* dengan glikoprotein H dan atau N baru muncul pada manusia, maka *cell mediated immunity* secara langsung melawan protein *internal highly conserved* yang memiliki peran perlindungan pada waktu pandemi. *Cell mediated immunity* tidak dapat mencegah keparahan penyakit dan kematian akibat infeksi virus *Avian influenza* (Subbarao and Joseph, 2007).

Sel dendritik berperan dalam mengawasi dan memicu respon sel limfosit T. Antigen dalam *lung-resident dendritic cell* kemudian diaktifkan untuk dilanjutkan menuju nodus limfatikus. Sel dendritik matur pada nodus limfatikus akan memacu respon imun melalui sel T dengan reseptor yang spesifik untuk kompleks peptida-MHC 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 limfosit T CD8<sup>+</sup> spesifik terhadap protein virus seperti NP atau protein RNA *polymerase* (PB2 dan PA) yang mengenali peptida virus yang disajikan oleh MHC kelas I sehingga menyebabkan pelepasan dari sitokin dengan aktivitas antiviral seperti IFN- $\gamma$ , TNF dan perforin. Lisis sel epitel yang terinfeksi diperantarai oleh eksositosis 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 *recovery* dari infeksi virus sekunder, yang kekurangan sel limfosit B maturasi atau antibodi. Respon sel Th CD4<sup>+</sup> bertanggung jawab membantu sel imun yang lainnya melalui interaksi antar sel secara langsung atau melalui sekresi sitokin intraseluler IFN- $\gamma$  setelah mengenali peptida virus oleh MHC kelas II. Sel Th CD4<sup>+</sup> sebagai mediator langsung dari pusat efektor, yang merupakan pusat dari sistem imun adaptif (Thomas *et al*, 2006)



Gambar 2.5 Respon imun terhadap virus *Avian influenza* (Tamura and Kurata, 2004)

### 2.8 Respon Antibodi Terhadap Virus *Avian influenza*

Antibodi merupakan komponen utama respon imun spesifik untuk melindungi dari virus influenza dan membentuk korelasi imun melalui vaksin Influenza. Glikoprotein virus *Avian influenza* berupa 16 sub tipe hemagglutinin (H)

dan 9 subtipe neuraminidase (N) merupakan target utama pembentukan antibodi (Yen HL *and* Peiris, 2009). Infeksi virus *Avian influenza* secara sistemik menghasilkan antibodi terhadap glikoprotein hemagglutinin (H), neuraminidase (N) (Treanor, 2004). Antibodi yang terbentuk akan menetralkan atau memblokir glikoprotein virus yang akan mengikat dengan reseptor sel (Yen *and* Peiris, 2009).

Pembentukan antibodi terhadap neuraminidase (N) berupa antibodi yang menghambat hemagglutinin dan terjadi peningkatan titer antibodi antara 4-7 minggu setelah infeksi. Antibodi terhadap hemagglutinin (H) berperan penting dalam melindungi dari infeksi virus dan menginduksi antibodi untuk menetralkan. Antibodi yang terbentuk akan menghambat virus sebelum masuk ke dalam sel pada awal infeksi maupun virus keluar dari sel yang terinfeksi dengan cara mengikat virus tersebut kemudian melakukan *uncoating* pada virus. (Treanor, 2004 ; Hunt, 2006 ; Abbas, 2007).

Respon antibodi humoral seperti IgM, IgG dan IgA penting dalam memberikan perlindungan terhadap virus influenza. Sel B *naive* masuk ke dalam sirkulasi darah, jaringan limfatik dan organ limfoid. Sel B *naive* mengenali antigen yang sama melalui permukaan antibodi. Sel B yang aktif akan berubah menjadi sel plasma atau sel B memori. Sel plasma yang afinitasnya meningkat, membentuk imunoglobulin spesifik berupa IgM, IgG dan IgA. Sel plasma memproduksi IgG melalui *switching* dari IgM. IgA dapat menembus mukosa epitel saluran pernafasan atas dan menetralkan infeksi virus. Respon IgG terutama melindungi saluran pernafasan bawah dari infeksi virus influenza (Behrens *and* Stoll, 2006 ; Hunt, 2006).

Respon imun pada mukosa terhadap virus *Avian influenza* berupa IgA dan IgG dapat diukur dengan sekresi nasal. Antibodi pada mukosa dan sistemik dapat melindungi secara optimal apabila terdapat kedua antibodi dalam serum maupun pada nasal (Treanor, 2004). IgG berperan penting dalam respon imunitas lebih lama ketimbang IgA (Hunt, 2006). Peranan antibodi pada respon imun terhadap virus *Avian influenza* dengan netralisasi virus atau melisiskan sel yang terinfeksi melalui komplemen atau *antibody-dependent cellular toxicity* (Behrens and Stool, 2006)

## **2.9 Pengendalian dan Pencegahan Terhadap Infeksi *Avian influenza***

Prinsip dasar kontrol penyakit Avian influenza adalah mencegah kontak antara hewan yang terinfeksi dan material yang telah tercemar oleh virus. Sehubungan dengan hal tersebut, maka sangat penting langkah strategis pengendalian penyebaran penyakit flu burung antar unggas dan sekaligus mengurangi resiko penularan kepada manusia yang mungkin timbul akibat infeksi virus *Avian influenza* H5N1. strategi pengendalian dan pemberantasan yang efektif terhadap wabah Avian influenza meliputi program *biosecurity* melalui manajemen *all-in-all-out*, isolasi unggas terinfeksi dari unggas yang sehat, mengatur lalu lintas unggas, desinfeksi terhadap kandang, serta sanitasi pekerja kandang (Rahardjo dan Nidom, 2004).

Hal lain yang juga membantu pencegahan adalah dengan depopulasi atau pemusnahan terbatas di daerah tertular, surveilans dan penelusuran, *stamping out* atau pemusnahan total seluruh ternak unggas yang sakit maupun yang sehat, dan

vaksinasi dapat menjadi alat kontrol karena dapat menekan angka kematian dan sakit, tetapi tidak mencegah infeksi dan penyebaran virus. Hal yang lebih penting yaitu peningkatan kesadaran dan pengetahuan masyarakat terhadap penyakit *Avian influenza* (Rahardjo dan Nidom, 2004).

## 2.10 Diagnosis Laboratorium

Deteksi awal untuk infeksi *Avian influenza* sangat penting untuk mengawali pengendalian dan pemberantasan secara efektif. Penegakan diagnosis *Avian influenza* dilakukan dengan mengamati tanda-tanda klinis seperti gejala penyakit, pemeriksaan pasca kematian, dan dengan pemeriksaan laboratorium. (Rahardjo dan Nidom, 2004).

Diagnosis infeksi virus influenza dapat dilakukan dengan mengisolasi virus, deteksi protein virus, deteksi RNA virus, dan diagnosis serologis. Pada umumnya spesimen berupa swab nasal dan tenggorokan. Selain itu virus *Avian influenza* dapat dideteksi di dalam darah, cairan serebrospinal dan feses (Radji, 2006).

Metode serologis virus *Avian influenza* dapat diidentifikasi dengan *Hemagglutination inhibition* (HI), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), dan *virus neutralization* (VN). Metode serologis penting untuk studi epidemiologi dan imunologi seperti dalam evaluasi imunogenitas (antibodi) seseorang. Uji HI juga dapat digunakan untuk mendeteksi keberhasilan vaksinasi berupa antibodi yang dapat dilakukan pada hari ke 14 setelah vaksinasi (WHO, 2005 ; Ali *et al*, 2007). Peran protein yang terdapat pada amplop virus menjadi

tumpuan dasar pada uji HI. Kedua protein ini menjadi target awal dalam pembentukan antibodi inang (Suzuki, 2002).

Kultur virus dapat digunakan untuk mendeteksi virus dalam waktu 3-10 hari sehingga dapat mempengaruhi strategi pencegahan. Pada virus *Avian influenza* dapat diisolasi dalam media sel MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) atau sel LLC-MK2 (*Rhesus Monkey Kidney*). Selain itu juga tumbuh baik dalam telur ayam berembrio umur 9-10 hari (Horimoto *and* Kawaoka, 2001; De Jong *and* Hien, 2006).

Uji RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) 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 RT-PCR digunakan pada ekstraksi RNA dari plasma, cairan serebrospinal, jaringan, feses dan sekresi pernafasan. Uji RT-PCR memiliki *turnaround time* 3 jam dengan isolasi RNA (Lupiani, 2005).

Uji rapid yang dapat digunakan untuk mendeteksi antigen virus Avian influenza antara lain *immunofluorescence* (IF), *antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *dipstick lateral flow systems* di dalam cairan swab (Lee *et al*, 2006).

### **2.11 Uji Hambatan Haemaglutinasi (*HI Test*)**

Antibodi spesifik terhadap hemagglutinin virus yang terbentuk dapat menghambat terjadinya hemagglutinasi. Reaksi penghambatan ini kemudian

disebut uji hambatan hemaglutinasi (*Haemagglutination Inhibition Test*). Reaksi hambatan aglutinasi ini dapat membantu diagnosis laboratorium dalam melakukan identifikasi virus. Selain itu juga dapat digunakan untuk menentukan kekebalan dengan mengetahui titer antibodi setelah vaksinasi atau sembuh dari penyakit. Uji hambatan aglutinasi bermanfaat untuk mengidentifikasi virus, mengetahui titer antibodi hasil infeksi serta bermanfaat untuk surveilans *Avian influenza* (WHO, 2002 ; Ernawati *et al*, 2004). Uji hambatan aglutinasi antigen kontrol yang positif dan antibodi yang sesuai seharusnya memberikan hasil yang tetap ketika dibandingkan dengan uji sebelumnya. Peningkatan titer  $2^4$  diantara keadaan akut dan pada keadaan sembuh dapat dianggap sebagai diagnosis positif untuk tipe influenza. Sedangkan menurut OIE (2005) uji HI yang menggunakan antigen 4HA unit akan menunjukkan hasil positif apabila titer yang dihasilkan adalah 16 ( $2^4$ ) atau lebih.

## 2.12 Uji Netralisasi

Metode serologis yang merupakan '*gold standard*' untuk mendeteksi antibodi virus *Avian influenza* H5N1 adalah uji netralisasi (Uyeki, 2008).

Uji netralisasi berguna untuk mengetahui adanya antibodi spesifik terhadap virus *Avian influenza* pada manusia maupun hewan. Uji netralisasi mempunyai dua tahap yaitu reaksi adanya antibodi terhadap virus serta tahapan kedua yaitu inokulasi pada sel kultur, telur berembrio, atau hewan coba, untuk melihat infektifitas virus. Hasil uji netralisasi dapat dilihat dengan ada tidaknya

CPE (*Cytopathic Effect*) pada sel kultur MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*). Hasil positif pada uji netralisasi, diindikasikan adanya antibodi spesifik yang mampu menetralkan virus *Avian influenza* pada sel kultur MDCK (WHO, 2002).

Meskipun uji HI secara rutin dilakukan untuk mendeteksi antibodi virus influenza dalam serum, tetapi uji netralisasi lebih sensitif dan spesifik daripada uji HI, dalam mendeteksi kadar antibodi yang tinggi maupun kadar antibodi yang rendah yang kemungkinan memberikan hasil negatif dengan uji HI (Rowe *et al*, 1999). Reaksi silang pada antibodi dengan uji netralisasi sangat jarang terjadi, meskipun antigen virus dengan antibodi HI bereaksi secara bersamaan (WHO, 2002). Uji ini dapat digunakan pada serosurvei untuk mendeteksi angka kejadian infeksi virus *Avian influenza A* dari beberapa subtipe (Rowe *et al*, 1999).

## **2.13 Donor Darah**

### **2.13.1 Keamanan Darah**

Kualitas dan keamanan darah serta produk darah harus dijamin melalui proses yang diawali dari pemilihan donor darah hingga pemberiannya kepada pasien. Keamanan transfusi darah memerlukan pelayanan yang dikelola secara baik dengan berbagai sistem yang berkualitas di segala bidang. Selain itu darah yang diperoleh dari calon donor/sukarelawan yang berasal dari populasi masyarakat beresiko rendah serta melalui prosedur seleksi donor yang ketat.

Pemeriksaan skrining semua darah yang didonorkan harus dilakukan terhadap infeksi yang dapat ditularkan melalui transfusi yaitu HIV, hepatitis, sifilis dan mikroorganisme penyebab infeksi lainnya seperti malaria (WHO, 2002).

### **2.13.2 Seleksi Donor Darah**

Seleksi donor merupakan upaya dalam menjaga keselamatan donor darah dan untuk menjaga keselamatan penerima darah/ resipien.

#### **a. Syarat Donor darah**

Pendonor melakukan pengisian formulir calon donor darah. Calon donor untuk lolos seleksi harus memenuhi persyaratan yang tertera dalam formulir isian yang memuat beberapa kriteria umur, berat badan, tidak mempunyai riwayat kesehatan antara lain : keadaan umum pendonor tidak tampak sakit, riwayat transfusi darah dan tidak dalam pengaruh obat-obatan seperti golongan narkotika dan alkohol, serta tidak menderita penyakit seperti jantung, paru-paru, hati, ginjal, kencing manis, penyakit darah dan gangguan pembekuan darah. Selain itu penyakit epilepsi, kanker atau penyakit kulit kronis kecuali diperbolehkan oleh dokter yang merawatnya. Wanita diperkenankan menyumbangkan darahnya apabila setelah selesai haid, 6 bulan setelah melahirkan, masa kehamilan dan 3 bulan setelah berhenti menyusui.



Frekuensi pendonoran biasanya dua atau tiga kali setahun. Jarak penyumbangan donor untuk darah lengkap tidak kurang dari 8 minggu, maksimal 5 kali setahun. Penyumbangan darah lengkap dapat dilakukan minimal 48 jam setelah menjalani plasma / tromboferesis. Jarak penyumbangan komponen darah trombosit, minimal 1 bulan (jumlah trombosit > 150.000/uL), maksimal 6 kali setahun untuk pria dan 4 kali wanita.

b. pemeriksaan fisik donor dengan melakukan penilaian hasil pengisian status donor di formulir pendaftaran, anamnesis, dan pemeriksaan kesehatan dengan inspeksi (melihat), palpasi (meraba nadi), dan auskultasi.

c. Seleksi donor darah

Persiapan untuk seleksi donor darah terdiri dari pemeriksaan golongan darah dan rhesus, pemeriksaan kadar hemoglobin, dan pemeriksaan tekanan darah (Depkes, 2008).

### 2.13.3 Uji Darah Donor

Pertimbangan paling utama adalah menghindari mikroorganisme infeksius yang menular, yang dapat ditularkan melalui transfusi darah. Kombinasi kriteria ketat untuk penyeleksian donor dan penggunaan uji penyaringan di laboratorium.

Pengujian semua pendonoran terhadap penyakit hepatitis yaitu antigen dan antibodi hepatitis B (HbsAg dan anti-HBV) dan antibodi virus hepatitis C (anti-HCV), virus HIV 1 dan HIV 2 dan *Treponema pallidum* rutin dijalankan. Di

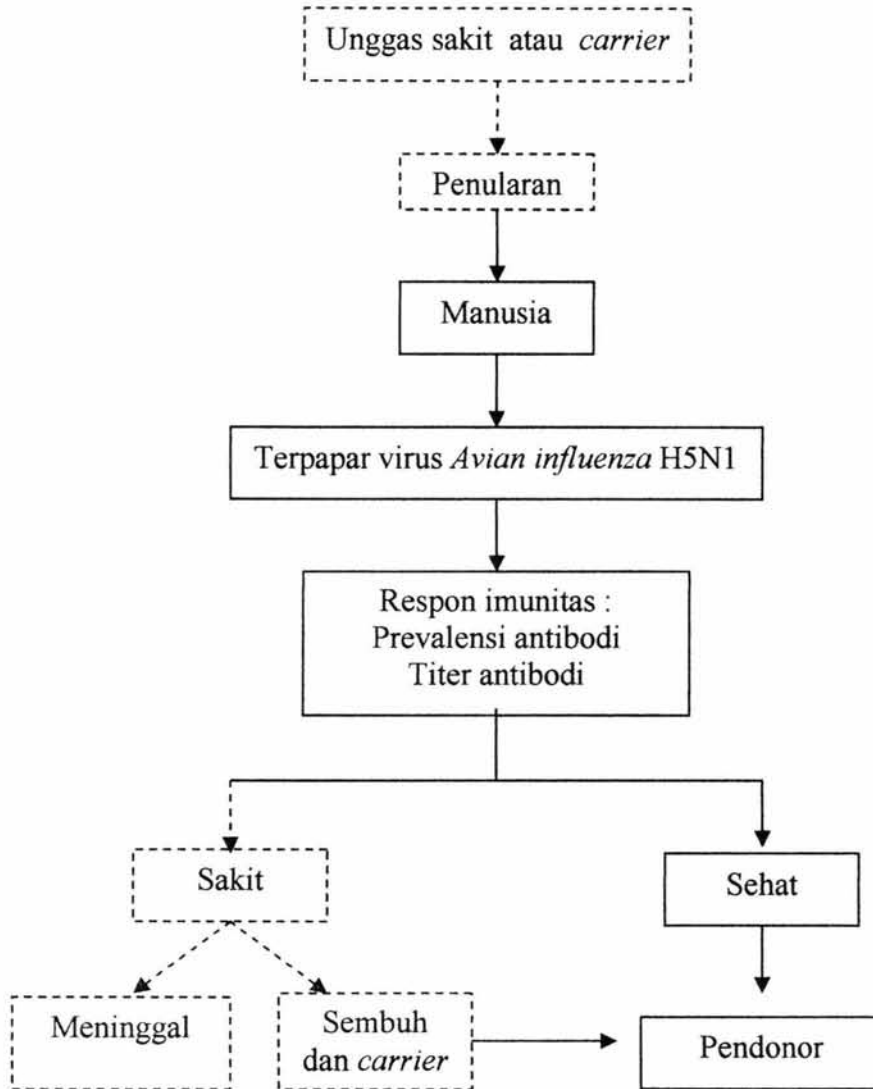
samping itu penyaringan selektif dengan pemeriksaan malaria dijalankan untuk mendapatkan pendonoran yang tidak mengandung virus tersebut. Hal ini berguna bagi transfusi pada penderita dengan daya tahan tubuh yang rendah.

Pengujian mikrobiologis juga mencakup penyaringan selektif titer dari penyakit tetanus . penyaringan pendonoran secara klinis sangat penting karena mencegah tertularnya resipien dari penyakit menular yang dapat ditularkan melalui transfusi (Contreras M, 2000).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL**

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**



Keterangan :

- - - - - : Tidak diteliti
- : Diteliti

**Skema 3.1** Kerangka Konsep Penelitian

**BAB 4**  
**METODOLOGI PENELITIAN**

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yaitu untuk mengetahui prevalensi dan titer antibodi adanya antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor di Surabaya (Notoatmodjo, 2005).

#### 4.2 Definisi Operasional Penelitian

- a. Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 merupakan virus influenza tipe A dan famili *Orthomyxoviridae* yang menyebabkan penyakit zoonosis. Genoma virus berbentuk RNA dan memiliki 8 fragmen yang menyandi 10 macam protein yaitu PB1, PB2, PA, H, N, NP, protein M1 dan M2 serta NS1 dan NS2 (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001).
- b. Darah donor adalah darah yang diperoleh dari calon donor / sukarelawan yang berasal dari masyarakat beresiko rendah serta melalui prosedur seleksi donor dan uji skrining yang ketat (WHO, 2002 ; Depkes, 2008).
- c. Titer antibodi adalah pengenceran antibodi tertinggi yang mampu menetralkan virus dengan cara menghambat pembentukan CPE (*Cytopathic Effect*).

### 4.3 Sampel dan Besar Sampel Penelitian

#### 4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah darah donor sehat yang diambil dari UTD Palang Merah Indonesia (PMI) Surabaya. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Oktober–November 2008, dengan besar sampel menggunakan rumus : (Notoatmodjo, 2005)

$$n = \frac{N}{1 + N (d^2)}$$

Keterangan :

N = besar populasi

n = Besar sampel

d = Tingkat kepercayaan / ketepatan

Besar populasi pendonor di UTD PMI Surabaya pada bulan Oktober 2008 telah diketahui yaitu sebesar 9951 pendonor dan bulan November 2008 sebesar 12150 pendonor, maka perhitungan besar sampel adalah :

Besar sampel bulan Oktober 2008 adalah :

$$n = \frac{9951}{1 + 9951 (0,05^2)}$$

$$n = \frac{9951}{25,8775}$$

$$n = 384,54 \text{ ----- } n = 385 \text{ sampel}$$

Besar sampel bulan November 2008 adalah :

$$n = \frac{12150}{1 + 12150 (0,05^2)}$$

$$n = \frac{12150}{31,375}$$

$$n = 387,25 \text{ ----- } n = 388 \text{ sampel}$$

Sehingga total sampel yang diambil pada bulan Oktober – November 2008 sebesar 773 sampel

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **4.4.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di BSL-3 Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga Surabaya.

##### **4.4.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama 9 bulan.

#### **4.5 Bahan Penelitian**

##### **4.5.1 Bahan Antigen Virus**

*Virus Avian influenza strain A /Chicken /Indonesia /114 /2008 (H5N1)*



#### 4.5.2 Bahan Penelitian

*Receptor destroying enzyme (RDE II) Denka Seiken®*, *Red blood cell (RBC) ayam*, *Phosphate buffer saline (PBS)*, reagen golongan darah  $\alpha$ -*Shield anti-A*, *anti-B* dan *anti-AB*, *MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)*, *DMEM (Dulbecco's Modified Eangles Medium)*, *Cell culture monolayer*, *Maintenance medium*, *Growth medium*, *Virus growth medium*, *Trypsin-EDTA Gibco Cat # 25300=054*, *TPCK trypsin : Sigma Cat # 3072*, *formalin 10%*, *Crystal violet 2%* dalam *22% ethanol*.

#### 4.5.3 Instrumen Penelitian

*Tabung venojeck*, *ice box*, *dry bath incubator*, *vorteks nissin mixer N-20M*, *MX-301 high speed refrigerated micro centrifuge*, *mechanical vibrator*, *Power suplay*, *Freezer -80 °C* dan *-20 °C*, *capillary tube*, *tabung conical 15 ml*, *tabung conical 50 ml*, *microplate "U" dan "V"*, *yellow tip*, *blue tip*, *eppendorf*, *micropipette* dan *micropipette multichanel 50  $\mu$ l*, *Couting chamber*, *microtube*, *flasks T-25 cm<sup>3</sup>*, *48 microplate well cell culture Cluster Castar 3548*, *Falcon 96 well tissue culture plates*, *serological pipette 5 ml* dan *10 ml*, *hemocytometer*, *incubator 37°C 5% CO<sub>2</sub>*, *inverted microscope*, *Class II biological safety cabinet*.

## **4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data**

Prosedur pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut :

### **4.6.1 Teknik Pengambilan Spesimen Darah di PMI Surabaya**

Pengambilan sampel dilakukan sesuai dengan Prosedur Kerja Standar dan dilakukan oleh petugas Unit Transfusi Darah PMI Surabaya. Donor dipersilahkan mencuci lengan dengan sabun aseptik, kemudian dipersilahkan tidur di tempat tidur yang sudah disediakan. Tangan donor ditempatkan lurus di samping, di atas tempat tidur dengan posisi menghadap ke atas. Tensimeter dipasang dan dinaikkan sampai batas antara sistole dan diastole, raba dan ditentukan letak vena yang akan dilakukan penusukan, tensimeter diturunkan antara 40 mmHg – 50 mmHg. Kapas beralkohol diambil dan lokasi penusukan didesinfeksi dengan gerakan melingkar ke luar dari satu titik yang akan ditusuk. Kantong darah yang telah diberi identitas yang sesuai dengan formulir donor darah, ditempatkan di atas timbangan darah. Setelah itu dilakukan penusukan pada vena yang tepat. Apabila volume darah sudah tercapai sesuai dengan jenis kantong darah yang dipakai, maka slang dijepit, diserut dari klem A ke kantong darah dan di potong slang kantong darah. Kemudian tempatkan tabung spesimen di ujung potongan slang dan buka klem A dan diisi tabung spesimen sebanyak 2-3 ml darah vena yang didapatkan langsung dari slang yang masih di tangan donor tersebut. Tabung sampel yang telah terisi darah kemudian ditutup dan diberi identitas yang sama dengan kantong darah asalnya. Tabung spesimen kemudian

dikoleksi dan dimasukkan secepatnya ke dalam *ice box* dan dikirim langsung ke laboratorium untuk dilakukan preparasi spesimen (Depkes, 2008).

#### 4.6.2 Pemeriksaan Golongan Darah

Spesimen darah yang diperoleh, segera dilakukan pemeriksaan golongan darah. Ambil darah donor pada tabung dengan menggunakan *capillary tube* dan teteskan 1 tetes darah pada permukaan *slide* di tiga tempat. Tambahkan masing-masing 1 tetes anti-A dan anti-B di atas tetesan darah donor. Kemudian diaduk dengan batang pengaduk masing-masing campuran darah donor dengan reagen. Pembacaan hasil dengan melihat ada / tidaknya aglutinasi. Aglutinasi berarti terdapat antigen pada sel darah merah donor.

#### 4.6.3 Preparasi Spesimen

Spesimen simpan pada suhu 4°C selama 2-3 jam agar serum dan sel darah terpisah. Setelah itu serum *disentifuge* pada 3000 rpm selama 5 menit. Kemudian serum dan sel darah terpisah, serum diambil dan ditempatkan pada *eppendorf*. *Eppendorf* diberi label baru sesuai dengan kode spesimen, tanggal pengambilan dan nomor spesimen. Setelah semua spesimen telah dipreparasi maka serum disimpan pada suhu -80 °C. Pada saat akan dilakukan penelitian spesimen *dithawing* terlebih dahulu.

#### 4.6.4 Prosedur Penelitian

##### 4.6.4.1 Preparasi *Red Blood Cell* Ayam

Eritrosit yang digunakan dalam uji HA dan HI adalah eritrosit ayam yang diambil langsung dari vena *Brachialis* sebanyak 3 ml dengan menggunakan spuit. Darah dimasukkan ke dalam tabung yang berisi EDTA. Darah yang sudah tercampur dengan EDTA dipindahkan ke dalam tabung *conical* 15 ml dan ditambahkan PBS sebanyak 10 ml untuk proses pencucian. Selanjutnya di sentrifuge 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan lagi PBS lagi dengan volume yang sama dan disentrifuge lagi. Kegiatan ini diulang sampai tiga kali dan didapatkan supernatan yang jernih (eritrosit ayam 100%). Kemudian dibuat suspensi eritrosit 50% yang akan dipergunakan pada *treatment* sampel dengan mengambil eritrosit ayam dan PBS dengan jumlah volume yang sama. Pembuatan suspensi eritrosit dengan konsentrasi 0,5% dibuat dengan mengambil eritrosit konsentrasi 100% sebanyak 50  $\mu$ l dan dimasukkan ke dalam 9950  $\mu$ l PBS steril.

##### 4.6.4.2 Uji Hemaglutinasi (HA) Mikroteknik

Uji HA mikroteknik digunakan untuk mengetahui titer antigen dan retitrasi antigen. Metode uji HA yang dilakukan adalah dengan cara yaitu mengisi lubang pada mikroplate berbentuk "V" (A2-A12 dan B2-B12) dengan PBS sebanyak 50 $\mu$ l. Kemudian pada lubang A1 dimasukkan 100  $\mu$ l antigen dan pada lubang B1 dimasukkan 100  $\mu$ l PBS yang digunakan sebagai kontrol eritrosit. Selanjutnya dilakukan pengenceran secara serial dengan cara mengambil 50  $\mu$ l

dari lubang pertama kemudian dilanjutkan ke lubang berikutnya, demikian seterusnya sampai lubang akhir, lalu sisa 50  $\mu$ l dibuang. Semua lubang (A dan B) diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50  $\mu$ l 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 (*diffuse*) 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 pada pengenceran adalah antigen yang memiliki titer 4HA Unit/ 25  $\mu$ l.

#### 4.6.4.3 Uji Retitrasi Antigen 4HA Unit/ 0,025 ml

Pengujian ketepatan pengenceran perlu dilakukan retitrasi dengan metode yang sama seperti pada uji HA di atas dengan menggunakan antigen yang telah diencerkan. Retitrasi dilakukan dengan cara yaitu mengisi lubang pada mikroplate berbentuk "V" (A2-A6 dan D2-D6) dengan PBS sebanyak 50  $\mu$ l. Selanjutnya antigen yang telah diencerkan sebanyak 100  $\mu$ l antigen dimasukkan ke dalam lubang A1-C1, kecuali lubang D1 dimasukkan 100  $\mu$ l PBS yang digunakan sebagai kontrol eritrosit. kemudian dilakukan pengenceran secara serial dengan cara mengambil 50  $\mu$ l dari lubang pertama kemudian dilanjutkan ke lubang berikutnya, demikian seterusnya sampai lubang akhir, lalu sisa 50  $\mu$ l dibuang. Semua lubang diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50  $\mu$ l dan dicampur dengan menggunakan *mechanical vibrator* lalu diinkubasi pada suhu

ruangan (22-25 °C) selama 30-60 menit. Selanjutnya titer retitrasi antigen dibaca. Bila pengenceran pada uji HA tepat, maka pada lubang 1-2 (A-B) akan terjadi aglutinasi.

#### 4.6.4.4 Perlakuan Serum

Sebelum dilakukan pengujian, serum harus diberi *Receptor Destroying Enzyme* (RDE) untuk menghilangkan substansi non spesifik dari sampel serum yang mampu mengaglutinasi eritrosit. Serum diambil 50 µl dan dimasukkan ke dalam *ependorf* serta ditambahkan RDE dengan perbandingan 1:3 sebanyak 150 µl. Kemudian dicampur dengan menggunakan *vorteks mixer* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-20 jam dengan *dry bath incubator*. Setelah itu, serum yang telah diberi RDE dipanaskan dengan suhu 56°C selama 30-60 menit yang bertujuan untuk menghentikan kerja RDE. Kemudian ditambahkan 25 µl *Red Blood Cell* (RBC) ayam 50% ke dalam serum dan RDE. Setelah itu dilakukan pencampuran dengan menggunakan *vorteks mixer* 4-5 kali. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan selama 60 menit sambil dilakukan pencampuran kembali dengan *vorteks mixer* setiap 20 menit. Kemudian serum disentrifus pada 2000 rpm selama 10 menit, dan diambil supernatan kira-kira sebanyak 200 µl dan jangan sampai RBC tercampur.

#### 4.6.4.5 Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik

Uji hambatan aglutinasi adalah pemeriksaan serologis yang digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik virus *Avian influenza* sub tipe H5.

Spesimen yang diperiksa adalah serum manusia yang berasal dari pendonor di PMI Surabaya yang telah diambil sebelumnya.

Pada uji HI menggunakan *microplate* berbentuk "U". Metode uji HI yang digunakan yaitu dengan memasukkan 25 µl PBS ke baris B-H (B1-H12) dan 25 µl serum ke baris A (A1-A12 dan B1-B12) kemudian dilakukan pengenceran serial dengan cara memindahkan 25 µl dari baris B ke baris C, demikian seterusnya hingga baris G, buang sisa 25 µl, kecuali baris H (H1-H12) ditambahkan serum 25 µl sebagai kontrol serum. Isi semua lubang *mikroplate* dengan antigen standar sebanyak 25 µl, kecuali pada baris H (H1-H12). Pada lubang H tidak diberi antigen di dalamnya, sehingga eritrosit akan mengendap. Setelah penambahan antigen, isi *mikroplate* di campur dengan *mechanical vibrator* selama 10 detik kemudian inkubasi pada suhu ruangan (22-25 °C) selama 30 menit. Setelah diinkubasi, semua lubang diisi dengan eritrosit ayam 0,5% sebanyak 50 µl lalu dicampur dengan *mechanical vibrator* dan inkubasi kembali selama 30-60 menit pada suhu ruangan kemudian baca titer HI. Uji HI dinyatakan positif bila terdapat endapan eritrosit berbentuk titik ditengah lubang.

#### 4.6.4.6 Inokulasi Sel MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) Pada 48 Well

##### *Tissue Culture Plate*

Sel dalam *flasks* dicuci dengan 10 ml PBS (*Phosphat Buffer Saline*) sebanyak 2 kali. Sel kembali di cuci dengan PBS dan 0,5 ml *Trypsin-EDTA* serta *flasks* digoyang sehingga sel terbilas. Tambahkan ± 5 tetes *Trypsin-EDTA* dan inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 10 menit, sampai sel terlepas,

kemudian diamati di bawah mikroskop. Sel ditambahkan *Trypsin-EDTA* sebanyak 5 ml dilewatkan ke dinding *flasks*. Suspensi sel dipindahkan ke dalam *conical* dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *growth medium*, selanjutnya dicampur dengan baik sampai sel tidak menggumpal. Masukkan suspensi sel setiap lubang *48 well plate* sebanyak 50  $\mu$ l dan sisanya dimasukkan ke dalam *flasks* baru. Selanjutnya ditambahkan dengan *growth medium* sebanyak 50  $\mu$ l. Kemudian lihat di mikroskop, apabila sel menggumpal maka *plate* digoyang-goyang sampai sel terpisah. Inkubasi pada suhu 37 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 3 hari atau sampai sel *confluent monolayer*.

#### 4.6.4.7 Uji TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose 50*)

TCID<sub>50</sub> digunakan untuk mengetahui titer antigen virus dengan melihat kemampuan virus menginfeksi 50% sel kultur. Persiapkan *48 well plate* setelah sel *confluent monolayer*, maka *growth medium* dibuang. Lakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali secara hati-hati dan pencucian terakhir didiamkan sebentar. Ambil PBS dari *48 well plate* dari konsentrasi tertinggi sampai yang terendah dan terakhir dibuang. Kemudian *48 well plate* diberi tanda dengan angka pengenceran 10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>. Kemudian dilakukan TCID<sub>50</sub> dengan mempersiapkan 7 buah *microtube* tandai dengan 10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>. Masukkan PBS sebanyak 500  $\mu$ l masing-masing ke dalam *microtube* 10<sup>-1</sup>-10<sup>-7</sup>. Tambahkan 100 virus ke dalam *microtube* 10<sup>-1</sup> dan dilakukan pengenceran serial. Setelah itu masukkan pengenceran virus sebanyak 100  $\mu$ l tiap lubang yang sesuai pengenceran pada *48 well plate* dan di mulai dari atas ke bawah. Kolom terakhir seluruh lubang diisi dengan PBS



sebanyak 100  $\mu$ l sebagai kontrol negatif. Inkubasi pada suhu 37°C 5% CO<sub>2</sub> selama 60 menit, setiap 20 menit *plate* di goyang. Siapkan campuran *maintenance medium* dengan *TPCK trypsin* (tiap 1 *plate* membutuhkan kira-kira 5 ml *maintenance medium*). Kemudian setelah inkubasi ambil larutan pengenceran virus dan PBS dari semua lubang dimulai dari kontrol negatif terlebih dahulu sampai ke konsentrasi tertinggi. Tambahkan *maintenance medium* sebanyak 100  $\mu$ l tiap lubang. Inkubasi pada suhu 37°C 5% CO<sub>2</sub> selama 3-4 hari dan periksa adanya CPE (*Cytopathic Effect*) setiap hari. Setelah 4 hari pindahkan *medium* dari seluruh lubang dimulai dari kontrol negatif terlebih dahulu sampai ke konsentrasi tertinggi. Lakukan fiksasi sel dengan memasukkan 10% formalin 100  $\mu$ l dan inkubasi dengan suhu ruangan selama 30-60 menit. Selanjutnya ambil formalin dari semua lubang dan dicuci dibawah air mengalir secara hati-hati. Lakukan pengecatan sel dengan memberikan *crystal violet* sebanyak 1 tetes dan di tunggu selama 5 menit, kemudian seluruh lubang dicuci dibawah air mengalir. Setelah *plate* kering, lakukan penghitungan TCID<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus *Reed and Muench*.

#### 4.6.4.8 Uji Netralisasi Virus (*Virus Neutralization Assay*)

##### a. Inokulasi MDCK Sel Pada 96 Well Tissue Culture Plate

Sel dalam *flasks* setelah mengalami *confluent monolayer*, dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) sebanyak 2 kali. Sel kembali di cuci dengan PBS dan *Trypsin-EDTA* serta *flasks* digoyang sampai sel terbilas. Tambahkan  $\pm$  5 tetes *Trypsin-EDTA* dan inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> sampai sel terlepas,

kemudian diamati di bawah mikroskop. Sel ditambahkan *Trypsin-EDTA* sebanyak 5 ml dilewatkan ke dinding *flasks*. Suspensi sel disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *growth medium* sebanyak  $\pm$  10 ml, selanjutnya dicampur dengan baik sampai sel tidak menggumpal. Masukkan suspensi sel setiap *96 well plate* 25  $\mu$ l dan sisanya dimasukkan ke dalam *flasks* baru. Selanjutnya *plate* diisi dengan *growth medium* sebanyak 100  $\mu$ l. Kemudian lihat di mikroskop, apabila sel menggumpal maka *plate* digoyang-goyang sampai sel terpisah. Inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 18-24 jam.

#### **b. Perlakuan Spesimen Serum**

Serum yang akan diperiksa terlebih dahulu dipindahkan ke *ependorf* dan dibuat rangkap empat dan inaktivasi dengan memanaskan dengan suhu 56°C selama 30 menit. Persiapkan *microtiter plate* dan masukkan 60  $\mu$ l *virus growth medium* (VGM) ke semua lubang *plate*. Tambahkan kembali 48  $\mu$ l VGM ke baris A (lubang A1-A11). Masukkan serum ke-1 masing-masing lubang 12  $\mu$ l pada baris A (A1-A4), selanjutnya serum ke-2 pada baris A (A5-A8) (1 *plate* hanya berisi 2 spesimen serum). Kemudian dilakukan pengenceran serial dengan cara memindahkan 60  $\mu$ l dari baris A ke baris B, demikian seterusnya hingga baris H, buang sisa 60  $\mu$ l. Kemudian *microtiter plate* dipergunakan untuk *back titration virus*.

### c. *Back Titration Virus*

Virus dilakukan pengenceran 100 TCID<sub>50</sub> menjadi 50 µl (200 TCID<sub>50</sub> /100 µl) dengan *virus growth medium* (VGM) kira-kira 8 ml / *plate*. Sebelum dimasukkan ke *plate* suspensi virus disaring untuk menghindarkan dari protein yang akan mengganggu pada uji netralisasi. Masukkan 60 µl pengenceran virus ke setiap lubang kecuali semua lubang baris H (sebagai kontrol sel), pada lubang baris H diisi VGM 60 µl. Kemudian dilakukan *back titration* dengan mempersiapkan 8 buah *ependorf* tandai dengan baris A-H. Masukkan VGM sebanyak 300 µl ke dalam *ependorf* B-H, setelah itu tambahkan 438 µl dari pengenceran virus ke dalam *ependorf* A. Lakukan pengenceran serial dengan cara memindahkan 138 µl dari *ependorf* A ke *ependorf* B, demikian seterusnya hingga *ependorf* H. Hasil pengenceran ini merupakan pengenceran serial  $\frac{1}{2} \log_{10}$  dari virus. Masukkan VGM sebanyak 60 µl *microtiter plate* ke semua lubang pada A9-A12. Kemudian pindahkan 60 µl *back titration* virus dari *ependorf* dengan tanda baris yang sesuai (A9-A12, B9-B12 dst). Goyang *microtiter plate* dengan baik campuran serum (antibodi) dan virus dan inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 2 jam.

### d. *Inokulasi Back Titration Virus Pada 96 Well Plate*

*Growth medium* pada *96 well plate* dibuang dan dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) sebanyak 2 kali. Setelah inkubasi selesai, pindahkan campuran serum dan virus dari *microtiter plate* ke *96 well plate* sebanyak 100 µl tiap-tiap lubang dengan menggunakan pipet *multi channel* dan setiap

memindahkan menggunakan *tips* pipet yang berbeda. Inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 2 jam. Campuran serum-virus dibuang kemudian sel dicuci dengan *maintenance medium* sebanyak 250 µl dan dibuang. Seluruh lubang *96 well plate* diisi dengan *maintenance medium* sebanyak 200 µl. Inkubasi pada suhu 35-36 °C 5% CO<sub>2</sub> selama 3-4 hari. Setelah 4 hari, lakukan fiksasi dengan memasukkan 10% formalin sebanyak 3-4 tetes dan inkubasi dengan suhu ruangan selama 30-60 menit. Selanjutnya ambil formalin dari semua lubang dan dicuci dibawah air mengalir secara hati-hati. Lakukan pengecatan dengan memberikan *crystal violet* sebanyak 1 tetes dan di tunggu selama 5 menit, kemudian seluruh lubang dicuci dibawah air mengalir. Setelah *microtiter plate* kering, lakukan pembacaan apabila pada *back titration virus* 50% atau lebih dari setengah sel yang diinokulasikan sudah terlihat CPE (*Cytopathic Effect*).

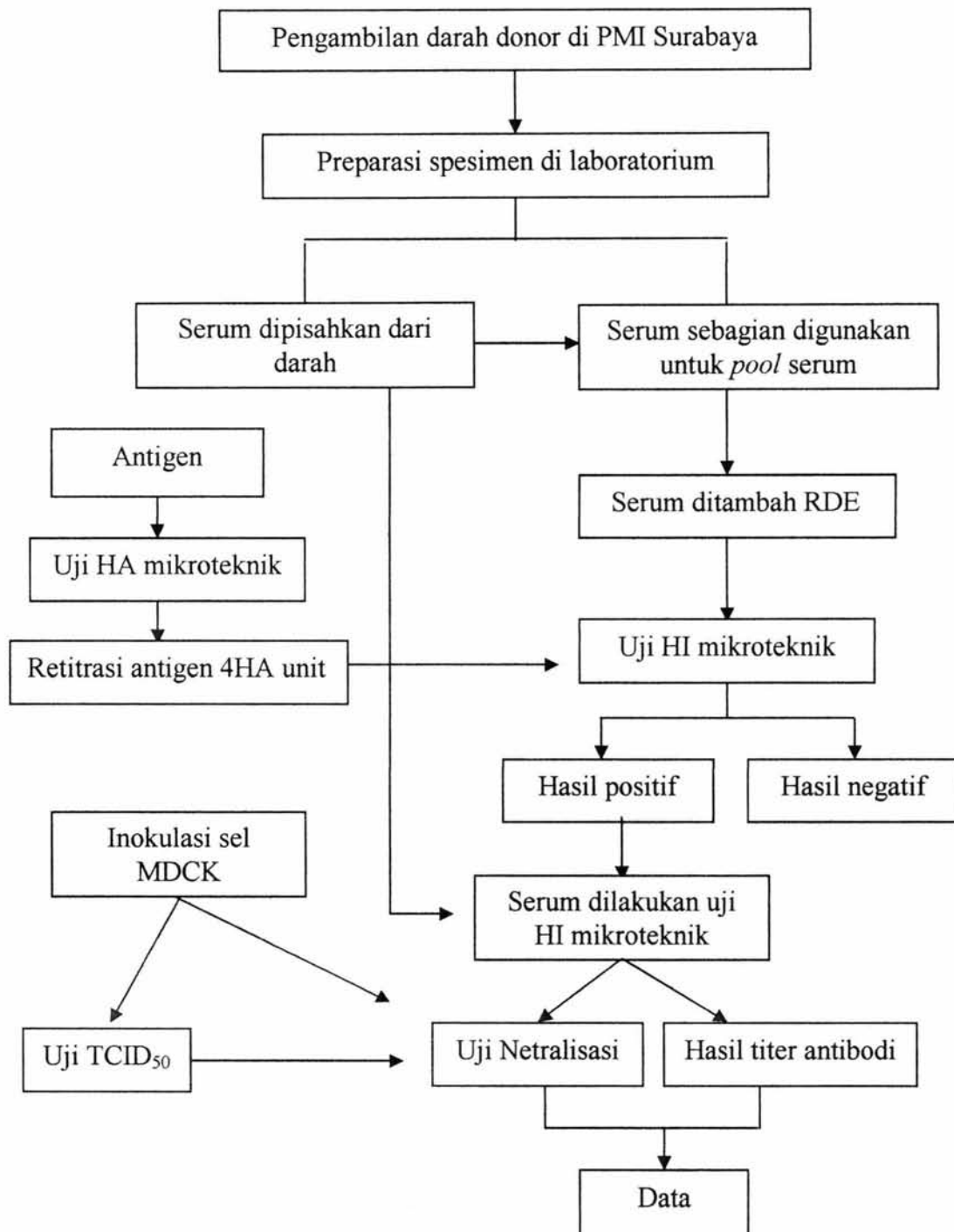
#### **e. Analisis Data**

Pengenceran tertinggi antibodi yang masih mampu menetralsir virus dengan cara menghambat pembentukan CPE (*Cytopathic Effect*) minimal 2 lubang dari 4 lubang dari titer antibodi-virus.

#### **4.6.5 Pengumpulan Data**

Data disajikan dalam bentuk deskriptif berupa titer antibodi terhadap virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya.

#### 4.7 Kerangka Operasional Penelitian



Skema 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

**BAB 5**  
**HASIL PENELITIAN**

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Palang Merah Indonesia (PMI) Surabaya

Usaha transfusi darah adalah merupakan bagian dari tugas pemerintah di bidang pelayanan kesehatan masyarakat dan merupakan suatu bentuk pertolongan yang sangat berharga kepada umat manusia (PP 18/1980). Oleh sebab itu berdasarkan kebijakan nasional maka pelayanan transfusi darah harus dilakukan secara aman dan sesuai standar. UTD Palang Merah Indonesia (PMI) Surabaya merupakan salah satu tempat akses pelayanan darah secara terstandar di setiap propinsi/ kabupaten/ kota. UTD PMI mempunyai tugas pokok dan fungsi sesuai unsur-unsur terkait dalam pelayanan transfusi darah, salah satunya sebagai pelaksana penyediaan darah transfusi yang aman, berkualitas dan efektif, serta sesuai standar, mulai dari rekrutmen dan seleksi donor, pengambilan darah, uji saring terhadap infeksi menular lewat transfusi darah, pemisahan komponen darah, penyimpanan sementara sampai pada pendistribusiannya ke bank darah rumah sakit (BDRS) (Depkes, 2008).

Pada UTD PMI rekrutmen donor darah dilakukan dengan bantuan lembaga/institusi seperti Perhimpunan Donor darah Indonesia (PDDI), lembaga pemerintah atau swasta yang mendukung penuh upaya motivator donor menjadi donor sukarela. Selain itu darah yang diperoleh dari calon donor/sukarelawan yang berasal dari populasi masyarakat beresiko rendah serta melalui prosedur seleksi donor yang ketat.



Gambar 5.1 Lokasi Pengambilan Sampel Darah Donor di UTD PMI Surabaya

## 5.2 Hasil Penelitian

### 5.2.1 Data Darah Donor PMI Surabaya

Hasil deskriptif data penelitian ini untuk mengetahui prevalensi dan titer antibodi virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya. Pengambilan sampel darah donor dilakukan mulai bulan Oktober sampai dengan bulan November 2008 di PMI Surabaya. Jumlah sampel darah donor diperoleh sebanyak 773 spesimen darah. Data sampel darah donor yang digolongkan berdasarkan golongan darahnya dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Data Sampel Darah Donor Digolongkan Berdasarkan Golongan Darah

Golongan Darah	Jumlah Sampel (darah donor)	Persentase (%)
A	136	17,59 %
B	240	31,05 %
AB	49	6,34 %
O	348	45,02 %
<b>Total</b>	<b>773</b>	<b>100%</b>



### 5.2.2 Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) Mikroteknik

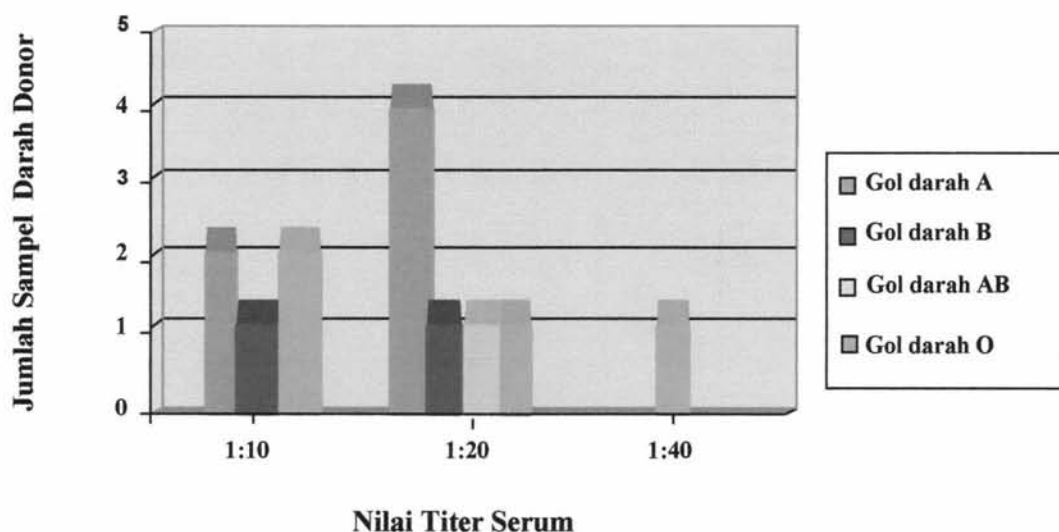
Sebelum dilakukan uji HI mikroteknik dilakukan uji Hemaglutinasinya (HA). Uji HA digunakan untuk mengetahui titer antigen. Antigennya berupa virus *Avian influenza* dengan strain A /Chicken /Indonesia /114 /2008 (H5N1). Pada uji HA didapatkan titer 1:64. Hasil uji HA ini kemudian dilanjutkan dengan uji HI mikroteknik. Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI) merupakan pemeriksaan serologis untuk mendeteksi adanya antibodi virus *Avian influenza* subtype H5. Pada tabel berikut hasil darah donor yang positif terhadap uji HI.

Tabel 5.2 Data Darah Donor Yang Positif Terhadap Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

No	Tanggal Pengambilan	Kode Sampel	Golongan Darah	Uji HI (Titer)
1	15 November 2008	H0810558	A	1:10
2	15 November 2008	H0810559	A	1:10
3	13 November 2008	H0810527	A	1:20
4	17 November 2008	H0810561	A	1:20
5	28 November 2008	H0810760	A	1:20
6	21 Oktober 2008	H0810192	A	1:20
7	15 November 2008	H0810555	B	1:10
8	17 November 2008	H0810562	B	1:20
9	21 Oktober 2008	H0810193	AB	1:20
10	29 Oktober 2008	H0810316	O	1:10
11	15 November 2008	H0810554	O	1:10
12	13 November 2008	H0810526	O	1:20
13	28 Oktober 2008	H0810289	O	1:40

Berdasarkan standar WHO (2002) hasil uji HI dikatakan positif terdapat antibodi virus *Avian influenza* apabila titernya  $\geq 1:80$ , tetapi seseorang yang asimtomatik atau pernah terinfeksi virus *Avian influenza* serta belum terdeteksi penyebaran virus di suatu tempat/daerah, memungkinkan terdeteksi adanya antibodi dengan uji HI (WHO, 2002).

Pada hasil uji HI mikroteknik dari 773 darah donor didapatkan sebanyak 13 darah donor yang memiliki antibodi sub tipe H5 dan 760 darah donor yang tidak memiliki antibodi sub tipe H5 terhadap uji HI. Hasil uji HI terendah dengan titer serum 1:10 sampai dengan titer serum 1:40. Berikut jumlah darah donor yang memiliki antibodi terhadap uji HI berdasarkan titer antibodi dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Grafik 5.1 Jumlah Sampel Darah Donor Dengan Menggunakan Uji HI Terhadap Virus *Avian Influenza* Sub tipe H5 Berdasarkan Titer Antibodi

Pada grafik 5.1 dapat terlihat bahwa darah donor yang tidak memiliki antibodi terhadap virus *Avian influenza* sub tipe H5 sebesar 760 orang, sedangkan jumlah sampel yang mempunyai kecenderungan dengan antibodi titer rendah yaitu 1:10 untuk golongan darah A sebanyak 2 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, dan golongan darah O sebanyak 2 orang. Uji HI dengan titer 1:20, golongan darah A sebanyak 4 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, golongan darah AB sebanyak 1 orang dan golongan darah O sebanyak 1 orang, sedangkan titer 1:40 hanya 1 orang dengan golongan darah O.

### 5.2.3 Hasil Uji TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose 50*)

Setelah dilakukan inokulasi sel pada MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) dan sel sudah *confluent monolayer* maka penelitian ini diteruskan dengan melakukan uji TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose 50*) pada virus *Avian influenza strain A /Chicken /Indonesia /114/2008 (H5N1)*.

Uji TCID<sub>50</sub> digunakan untuk mengetahui titer antigen virus yang mampu menginfeksi 50% sel dengan terlihat CPE (*Cytopathic Effect*). Penghitungan TCID<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus *Reed and Muench*. Hasil penghitungan TCID<sub>50</sub> kemudian akan digunakan untuk perhitungan *back titration virus* pada uji netralisasi.

Tabel 5.3 Penghitungan Pengenceran Virus dengan Rumus *Reed and Muench*

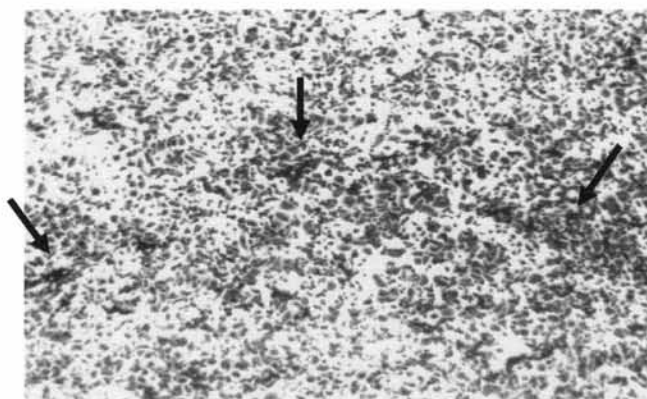
Pengenceran	$-10^{-1}$	$-10^{-2}$	$-10^{-3}$	$-10^{-4}$	$-10^{-5}$	$-10^{-6}$	$-10^{-7}$	(-) PBS
Virus	-	-	-	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+	+
% sel mati	100	100	70	0	0	0	0	0
	-	-	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+	+
% sel mati	100	100	30	0	0	0	0	0

Keterangan : (-) Sel yang mati ; (+) sel yang hidup

1. *Proportionate Distance* (PD) =  $\frac{100\% - 50\%}{(100 - 0)} = \frac{50}{100} = \frac{1}{2} = 0,5\%$
2. *Log lower* (pengenceran setelah 50%) =  $10^{-2}$  atau -2
3. PD + log lower = -2 + 0,5  
= -2,5
4. Log TCID<sub>50</sub> =  $10^{-2,5}$  atau  $3,1623 \times 10^{-3}$  / 50  $\mu$ l  
atau TCID<sub>50</sub> =  $63,246 \times 10^4$  / ml

TCID<sub>50</sub> A /Chicken/Indonesia/114/2008 H5N1 sebesar  $63,246 \times 10^4$  /ml merupakan hasil pengenceran virus yang dapat membunuh sedikitnya 50% sel MDCK.

Hasil uji TCID<sub>50</sub> pada sel MDCK terlihat mengalami CPE (*Cytopathic Effect*) akibat virus *Avian influenza* H5N1. Pada hari ketiga setelah di inkubasi, menunjukkan bahwa hampir seluruh sel mengkerut dan tidak terlihat inti selnya serta tidak mampu menyerap pewarnaan *crystal violet* (tanda panah) seperti pada gambar 5.2 di bawah ini :



Gambar 5.2 Hasil Uji TCID<sub>50</sub> Pada A /*Chicken*/Indonesia/114/2008 H5N1

#### 5.2.4 Hasil Uji Netralisasi

Metode netralisasi merupakan ‘*gold standard*’ untuk mendeteksi antibodi virus *Avian influenza* H5N1 (Uyeki, 2008). Uji netralisasi berguna untuk mengetahui adanya antibodi spesifik terhadap virus *Avian influenza* pada manusia maupun hewan. Hasil positif pada uji netralisasi, diindikasikan dengan adanya antibodi spesifik yang mampu menetralkan virus *Avian influenza* pada sel MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*) (WHO, 2002).

Hasil pengujian netralisasi dikatakan negatif apabila di dalam serum tidak terdapat antibodi dan sel MDCK mengalami CPE (*Cytopathic Effect*)

sedangkan apabila uji netralisasi positif maka terdapat adanya antibodi dalam serum dan sel tidak mengalami CPE (*Cytopathic Effect*). 13 sampel darah donor dari uji HI kemudian dilanjutkan dengan pengujian netralisasi. Hasil analisa uji netralisasi sebagai berikut :

Tabel 5.4 Hasil Darah Donor Terhadap Virus *Avian Influenza* Subtipe H5N1 Dengan Uji Netralisasi

No	Kode Sampel	Golongan Darah	Uji HI (Titer)	Uji Netralisasi (Titer)
1	H0810558	A	1:10	Negatif
2	H0810559	A	1:10	Negatif
3	H0810527	A	1:20	Negatif
4	H0810760	A	1:20	Negatif
5	H0810561	A	1:20	Negatif
6	H0810192	A	1:20	Negatif
7	H0810555	B	1:10	Negatif
8	H0810562	B	1:20	Negatif
9	H0810193	AB	1:20	Negatif
10	H0810316	O	1:10	Negatif
11	H0810554	O	1:10	Negatif
12	H0810526	O	1:20	Negatif
13	H0810289	O	1:40	Negatif

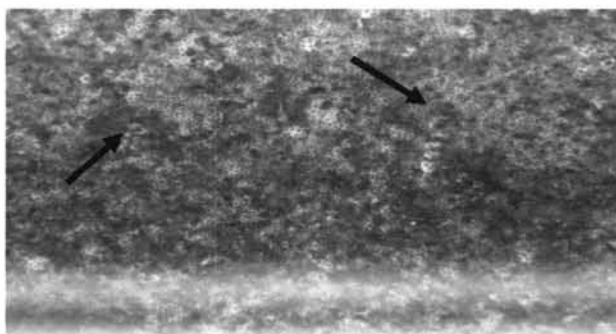
Analisa uji netralisasi terhadap 13 darah donor, didapatkan seluruh sampel hasilnya negatif. Pada uji netralisasi negatif terlihat sel MDCK mengalami CPE (*Cytopathic Effect*) seperti yang terlihat di bawah ini.



Gambar 5.3 Hasil Uji Netralisasi Negatif Pada Sel MDCK

Pada gambar 5.3, sel-sel MDCK mengalami apoptosis oleh karena di dalam serum darah donor tidak terdapat antibodi spesifik sehingga tidak dapat menetralkan virus *Avian influenza* H5N1. Sel MDCK yang mengalami CPE (*Cytopathic Effect*) terlihat dengan adanya sel-selnya yang mengkerut, tidak terlihat inti sel dan sebagian selnya lisis selain itu sel tidak mampu menyerap pewarnaan *crystal violet*.

Hal ini berbeda dengan uji netralisasi positif pada gambar 5.4, yang menunjukkan adanya antibodi spesifik dalam serum yang mampu menetralkan virus *Avian influenza* H5N1 sehingga sel MDCK tidak mengalami CPE (*Cytopathic Effect*). Sel-sel tersebut terlihat normal dan mampu menyerap pewarnaan *crystal violet* dengan baik.



Gambar 5.4 Hasil Uji Netralisasi Positif Pada Sel MDCK

Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa dengan pengujian HI terdapat 13 darah donor yang memiliki kecenderungan dengan antibodi titer rendah terhadap virus *Avian influenza* sub tipe H5. Pada uji netralisasi dari 13 darah donor tidak terdapat antibodi yang spesifik terhadap virus *Avian influenza* H5N1. Pada hasil pengujian netralisasi terlihat sel MDCK mengalami CPE (*Cytopathic Effect*), hal ini disebabkan karena antibodi yang terdapat dalam serum darah donor tidak mampu menetralkan virus *Avian influenza* H5N1.



**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pada bab ini berisi tentang pembahasan hasil penelitian yang sudah ditulis sebelumnya pada bab 5 secara sistimatis. Pengujian Penelitian ini dilakukan di BSL-3 Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga Surabaya. Berdasarkan hasil terhadap uji hambatan hemaglutinasi (HI) diketahui prevalensi secara keseluruhan sebesar 0,776% darah donor golongan darah A yang memiliki antibodi terhadap *Avian influenza* subtipe H5 (6 darah donor golongan darah A), 0,258% darah donor golongan darah B memiliki antibodi terhadap *Avian influenza* subtipe H5 (2 darah donor golongan darah B), 0,129% darah donor golongan darah AB memiliki antibodi terhadap *Avian influenza* subtipe H5 (1 darah donor golongan darah AB), dan 0,517% darah donor golongan darah O memiliki antibodi terhadap *Avian influenza* subtipe H5 (4 darah donor golongan darah O).

Hasil pengukuran titer antibodi pada 13 sampel darah donor dengan menggunakan uji HI antara 1:10, 1:20 dan 1:40 yaitu 1:10 untuk golongan darah A sebanyak 2 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, dan golongan darah O sebanyak 2 orang. Antibodi dengan titer 1:20, golongan darah A sebanyak 4 orang, golongan darah B sebanyak 1 orang, golongan darah AB sebanyak 1 orang dan golongan darah O sebanyak 1 orang, sedangkan titer 1:40 hanya 1 orang dengan golongan darah O.

Hal ini menunjukkan adanya antibodi terhadap virus *Avian influenza* pada darah donor di PMI Surabaya yang selama ini deteksi terhadap virus *Avian influenza* pada darah donor belum pernah dilakukan karena kemungkinan pendonor berpotensi menularkan virus *Avian influenza* melalui darah atau produk darah dapat terjadi. Adanya hubungan antara virus *Avian influenza* dalam darah donor dengan golongan darah sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian.

Pada penelitian ini darah donor yang diperoleh dari calon donor/sukarelawan merupakan populasi dari masyarakat yang beresiko rendah terhadap infeksi virus *Avian influenza* H5N1, hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Alamudi, *et.al* (2008) yang populasinya berasal dari pedagang unggas yang kemungkinan memiliki resiko tinggi terinfeksi oleh virus *Avian influenza* H5N1.

Adanya virus *Avian influenza* dalam darah donor bersesuaian dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Khakpour *et.al* (1969) bahwa telah ditemukan virus *Avian influenza* dalam darah orang dengan tanpa gejala (asimptomatik).

Antibodi merupakan komponen utama respon imun spesifik untuk melindungi dari virus influenza. Glikoprotein virus *Avian influenza* berupa hemagglutinin (H) merupakan tempat perlekatan dengan reseptor permukaan sel *host* dan protein ini dapat menimbulkan respon imun berupa target awal dalam pembentukan antibodi (Yen HL and Peiris, 2009). Hemagglutinin (H) disamping menentukan infektivitas dari virus influenza juga dapat memacu timbulnya respon imun dalam *host* karena bersifat antigenik dan imunogenik. Antibodi yang terbentuk berperan penting dalam melindungi dari infeksi virus dan menginduksi

antibodi untuk menetralkan virus. Antibodi ini akan menghambat virus sebelum masuk ke dalam sel pada awal infeksi maupun virus keluar dari sel yang terinfeksi dengan cara mengikat virus tersebut kemudian melakukan *uncoating* pada virus. (Treanor, 2004 ; Hunt, 2006 ; Abbas, 2007).

Berdasarkan struktur asam amino yang menyusun di tempat pembelahan (*cleavage site*) gen hemagglutinin (H) pada *Avian influenza* dapat dibedakan virus yang virulen dan virus yang avirulen. Virus *Avian influenza* H5N1 merupakan virus yang virulen memiliki beberapa asam amino sehingga dikategorikan sebagai *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Adanya poli asam amino pada regio *cleavage site* merupakan target dari *protease* dan plasmin yang dapat menyebabkan penyebaran virus ke seluruh tubuh secara sistemik dan meningkatkan virulensi (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Pengujian dengan menggunakan *Hemagglutination Inhibition* (HI), dan *neutralization* merupakan metode serologis yang digunakan dalam mendeteksi adanya virus *Avian influenza*. Reaksi hambatan aglutinasi (HI) dapat membantu diagnosis laboratorium dalam melakukan identifikasi virus sedangkan uji netralisasi merupakan '*gold standard*' untuk mendeteksi antibodi virus *Avian influenza* H5N1 (De Jong *et al*, 2006 ; Uyeki, 2008). Kedua metode serologis ini penting dalam melakukan studi epidemiologi dan surveilans *Avian influenza* terhadap antibodi (WHO, 2005 ; Ali *et al*, 2007). Studi seroepidemiologi digunakan untuk kepentingan dalam menentukan penularan dan faktor resiko yang berhubungan dengan infeksi virus *Avian influenza* H5N1 pada manusia (Rowe, 1999).

Ditemukannya darah donor yang mengandung antibodi dengan uji HI menunjukkan bahwa pendonor tersebut pernah terpapar oleh *Avian influenza*, tetapi tidak diketahui apakah pendonor tersebut belum memasuki fase akut setelah mendapatkan infeksi primer. Hal ini kemungkinan menyebabkan pada saat spesimen darah diambil, pendonor dalam keadaan antibodi belum terbentuk sehingga titer antibodinya rendah. Menurut FAO (2006) standar WHO untuk investigasi dan monitoring virus *Avian influenza* masa inkubasi setelah infeksi adalah 7 hari. Dugaan ini diperkuat dengan penelitian yang dilakukan Rowe *et al* (1999) yang menggunakan serum kurang dari 7 hari setelah infeksi awal dan didapatkan titer antibodinya rendah yaitu kurang dari 20. Pada uji HI untuk mendeteksi antibodi virus *Avian influenza* subtipe H5, serum yang digunakan lebih dari 14 hari oleh karena kemungkinan mendapatkan hasil yang positif lebih besar daripada mendeteksi antibodi dalam serum setelah infeksi primer kurang dari 7 hari.

Pada penelitian ini, dalam serum darah donor tidak ditemukan antibodi spesifik terhadap virus *Avian influenza* H5N1 dengan menggunakan uji netralisasi. Hal ini dimungkinkan karena pendonor yang menyumbangkan darahnya dalam keadaan kurang dari 7 hari setelah infeksi awal. Sebaliknya apabila serum darah donor dideteksi lebih dari 14 hari setelah infeksi atau lebih, kemungkinan didapatkan antibodi positif. Pernyataan ini dibuktikan dengan hasil penelitian dengan uji netralisasi yang dilakukan Katz *et al* (1999) yang mendapatkan titer antibodi positif sebesar 80 – 2560 dari serum yang diperoleh dari pasien dewasa yang sudah lebih dari 14 hari mengalami gejala klinis dan titer antibodi positif

lebih dari 640 dari serum yang berasal dari anak-anak dan orang dewasa yang diambil lebih dari 20 hari setelah mengalami gejala klinis.

Menurut De Jong *et al* (2006) tidak terdeteksinya antibodi dalam serum dengan menggunakan uji HI dapat disebabkan beberapa faktor antara lain pada beberapa virus *Avian influenza* imunogenitasnya rendah sehingga dengan uji HI dapat mendeteksi, sensitifitas rendah dalam mendeteksi antibodi dengan titer rendah serta antibodi yang terbentuk mempunyai aviditas yang rendah. Ini menegaskan bahwa dengan menggunakan uji netralisasi merupakan metode serologis yang dianjurkan untuk mendeteksi antibodi spesifik virus *Avian influenza* H5N1 dalam serum orang dewasa karena lebih sensitif dan spesifik dibanding dengan uji HI. Kelebihan lain dari uji netralisasi lebih sensitif dalam mendeteksi virus influenza tipe A dan B pada manusia dan mampu mendeteksi antibodi sub tipe H5 dalam serum anak-anak pada fase akut yaitu serum yang diambil lebih dari 7 hari setelah infeksi awal atau pada fase *convalescent* yaitu serum yang diperoleh setelah lebih dari 14 hari mengalami gejala klinis (Rowe *et al*, 1999 ; De Jong *et al*, 2006). Menurut Rowe *et al* (1999) pada uji netralisasi kurang spesifik dalam mendeteksi antibodi dalam serum pada orang yang usianya lebih dari 60 tahun, hal ini kemungkinan disebabkan adanya *immunocompromised* oleh karena usia seseorang yang sudah lanjut memungkinkan terjadi penurunan terhadap sistem imunitasnya. Penelitian yang dilakukan Katz *et al* (1999) wanita yang menderita SLE (*Systemic Lupus Erythematosus*) juga tidak terdeteksi antibodinya dengan uji netralisasi.

Darah donor yang mempunyai antibodi menunjukkan adanya penularan virus *Avian influenza* ke manusia dari unggas yang terinfeksi yang dapat terjadi melalui kontak langsung atau dari faktor lingkungan yang terkontaminasi, namun apabila tidak ada kontak dengan unggas yang terinfeksi maka terdapat kemungkinan kontak fisik secara langsung dengan penderita yang dapat menyebabkan tertularnya virus *Avian influenza* H5N1 antar manusia (Katz *et al*, 1999 ; Harner *and* Werner, 2006 ; Kamps *and* Reyes Teran, 2006 ; WHO, 2008).

Terdeteksinya darah donor yang memiliki kecenderungan dengan antibodi titer rendah terhadap virus *Avian influenza* subtipe H5 dan tidak mempunyai antibodi yang spesifik terhadap virus *Avian influenza* H5N1, hal ini dimungkinkan karena beberapa faktor antara lain serum darah donor yang diperoleh dari pendonor yang telah mengalami gejala infeksi kurang dari 7 hari. Keterbatasan data pendonor juga merupakan faktor kendala sehingga tidak dapat mensurvei lebih lanjut pendonor yang memiliki antibodi virus *Avian influenza*.

**BAB 7**  
**PENUTUP**



## **BAB 7**

### **PENUTUP**

#### **7.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat antibodi terhadap virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor sehat di Surabaya sebanyak 13 sampel
2. Titer antibodi terhadap *Avian influenza* subtipe H5 yang positif antara titer 1:10, 1:20 dan 1:40
3. Tidak ditemukan antibodi yang dapat menetralisasi efek sitopatik virus *Avian influenza* H5N1 pada serum darah donor sehat.

#### **7.2. Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi adanya virus *Avian influenza* dari subtipe lain.
2. Perlu penelitian dalam mendeteksi virus *Avian influenza* H5N1 dengan menggunakan metode ELISA atau PCR
3. Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut adanya hubungan antara virus *Avian influenza* pada darah donor dengan golongan darah.
4. Diharapkan adanya kerjasama dengan Palang Merah Indonesia (PMI) untuk surveilans dan monitoring terhadap adanya virus *Avian influenza* H5N1 pada darah donor.

## DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- AABB Interorganizational Task Force on pandemic Influenza and The Blood Supply, 2006. *Pandemic Influenza Planning, Efforts to Ensure a safe, Available Blood Supply*. <http://www.dhs.gov/interweb/assetlibrary/NRP/FullText.pdf>.
- Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S., 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. 6<sup>TH</sup> Edition. International Edition.
- Alamudi M.Y, Reviany V.N, Yamaoka M, Nidom CA, Woelansari ED, Ginting ET, Sinya K, Muramoto Y, Takano R, Kawaoka Y., 2008. *H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza viruses serosurvey of Poultry Workers in Indonesia*. Asia Afrika Research Forum (AARF) Hokkaido 2008.
- Ali WH, Kheir SAM, and 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.
- APHIS news, 2004. *Highly Patogenic Avian Influenza*. [www. Aphis, usda. Gov/avianinfluenza4](http://www.Aphis.usda.Gov/avianinfluenza4) abstract APHIS news. htm.
- Asmara W, 2007. *Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian Avian Influenza dan Flu Burung*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta 12 Maret 2007
- Asmara ,W. 2005. *Mutasi dan rearsorsi genetic, shift dan drift antigen virus AI serta pengaruhnya pada patogenisitas dan spesifitas hospes*. Prosiding Seminar dan Diskusi Interaktif Flu Burung, 21-28. Medika Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
- Behrens G. and Stoll M., 2006. *Pathogenesis and Immunology of Avian Influenza A (H5N1)*. Bernd Sebastian Kamps, Christian Hoffmann and Wolfgang Preiser.
- Cambridge University Press, 2001. Expert Review in Molecular Medicine : Replication Cycle of an Influenza Virus. <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- Capua I, Mutinelli F, Campisi M, Dalla P, M. Ferre N and Manca G, 2000. *Italian Avian Influenza Epidemic*. Int. Poultry Production 8, 15-17.
- Capua I and Maragon S, 2006. *Control of Avian influenza in Poultry*. Emerging Infectious Diseases. Vol 123, No 9, Sept 2006.

- CDC, 2004. *Questions and Answers About Avian Influenza (Bird Flu) and Avian Influenza A (H5N1) Virus*. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC, 2004. *Up date on Avian Influenza A (H5N1)*. <http://www.cdc.gov/flu/Avian/profesional/han081304.htm>.
- CDC, 2006. *Avian Influenza A Virus Infections of Human*. <http://www.cdc.gov/flu/Avian/profesional/protect-guid.htm>.
- Centre for Food Security and Public Health (CFSPH), 2007. *Highly Pathogenic Avian Influenza*. Iowa State University.
- Contreras M, 2000. *Petunjuk Penting Transfusi (ABC of Transfusion)*. EGC. Edisi Kedua.
- Chutinimitkul S, Bhattarakosol P, Srisuratanon S, et al, 2006. *H5N1 Influenza A Virus and Infected Human Plasma*. *Emerg. Infect Dis* 2006, :12:1041-3.
- De Jong, M.D, Hien T.T, Farrar J., 2004. *Avian influenza – a Challenge to Global Health Care Structures*. *N.Engl. J.Med.* 2004;351:2363-5.
- De Jong, M.D dan Hien T.T., 2006. *Review Avian Influenza A (H5N1)*. *Journal Of Clinical Virology* 35 pp 2-13
- Depkes, 2006. *Avian Influenza – Situation in Indonesia*
- Depkes, 2008. *Modul Pelatihan Cash Program Petugas Teknis Transfusi Darah Bagi Petugas UTDRS*.
- Dybing JK., Schultz S-Cherry, Swayne DE., Suarez DL. and Perdue ML., 2000. *Distinct Pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 Viruses in Mice Compared to That of Other Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses*. *Journal of Virology*. South East Poultry Research Laboratory. Georgia.
- Donateli, L., Campitelli, L., and Trani, L., 2001. *Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian Poultry*, *J. Gen. Virol.* 82 : 623-630
- Dwiyanto R, 2008. *Deteksi antibodi Avian Influenza H5N1 Pada Kucing Jalanan (Felis silvestris catus) di Wilayah Semarang*. Skripsi FKH Unair.
- Ernawati R., Rahardjo AP, Sianita N, Rahmahani J, Rantam FA, Tjahyaningsih W dan Suwarno. 2004. *Petunjuk Praktikum Pemeriksaan Virologik dan Serologik*. Laboratorium Virologi dan Imunologi. FKH Unair. Surabaya.

- 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/diseases/cards/expertconsult.pdf>
- Garcia Sastre A and Palese P, 2002. *Influenza Vaccines : Present and Future*. J. Clin. Invest. 110:9-13 (2002). doi : 10.1172/JCI1200215999.
- Gürtler, L. 2006. *Virology of Human Influenza*. Eds : Kamps, Hoffmann and Preiser. Flying Publisher. <http://www.influenzareport.com>.
- Hayden F. and Croisier A., 2005. *Transmission of Avian Influenza Viruses to and between Humans*. Journal of Infectious Diseases 2005;192:1311–1314
- Hourfar M.K, Themann A, Eickmann M, Puthavathana P, Laue T, Seifried E and Schmidt M, 2007. *Blood Screening for Influenza*. Jour. Emerging Infectious Diseases Vol 13, No 7–Juli 2007, [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid).
- Hoffman E, Stech J, Leneva I, Krauss S, Scholtissek C, Chin P.S, Peiris M, Shortridge K.F, 2000. *Characterization of Influenza A Virus Gene Pool in Avian Species in Southern China : Was H6N1 a Derivative or a Precursor of H5N1?*. J. Virology 2000.p 6309-6315.
- Harner TC. and Werner O., 2006. *Avian Influenza*. N. Engl. J. Med. <http://www.influenzareport.com/Htm>.
- He Q, Velumany S, Du Q, Lim CW, Ng Kheong F, Donis R, Kwang J. 2007. *Detection of H5 Avian Influenza Viruses by Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using H5-Specific Monoclonal Antibody*. Clinical And Vaccine Immunology Vol.14 No5 pp 617-623
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. *Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses*. Clin. Microbiol. Rev.
- Hunt Margareth, 2006. *Virology - Influenza Virus (Orthomyxovirus)*. Chapter thirteen. Microbiology and Immunology on-line.
- Kamps BS and Reyes-Teran. 2006. *In Influenza Report*. Eds : Kamps, Hoffmann and Preiser. Flying Publisher. <http://www.influenzareport.com>.
- Khakpour M, Saidi A, Naficy K, 1969. *Proved Viraemia in Asian Influenza (Hong Kong Variant) During Incubation Period*. British Medical J., 1969, 4, 208-209.
- Kauffmann SHE, Sher A, Ahmed R, 2002. *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press. Pp 307-308, 247-255.

- Lee VJ, Fernandez GG, Chen MI, Lye D and Leo YS, 2006. *Influenza and The Pandemic Threat*. Review Article. Singapore Med J 2006; 47(6) : 463.
- Lupiani B and Reddy S. 2005. *Improved Diagnostic Tests For Avian Influenza Surveillance*. Proceedings of The Institute of Technologists. First Annual Food protection and Defence. Research Conference. November 3-4, 2005. Atlanta, Georgia.
- Malik Peiris J.S, De Jong M.D and Guan Yi, 2007. *Avian Influenza Virus (H5N1): A Treat to Human Health*. Clin Microbiol Rev. 2007 April; 20(2): 243–267. Martin V, Forman A and 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>
- Martin V, Forman A and 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>.
- Metreveli G, 2006. *Expression of Influenza Virus Protection and Adaptation*. Thesis. <http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-656-5/thesis.pdf>
- Mittelholzer CM, 2006. *Influenza Virus Protection and Adaptation*. Thesis. <http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-656-5/thesis.pdf>.
- Norris P, 2003. *Influenza Viremia in Blood Donors*. Blood Systems Research Institute and University of California, San Francisco.
- Notoatmodjo Soekidjo, 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Edisi Revisi
- OIE (World Organization for Animal Health). 2005. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chap 2.7.12. In: May 2005. [http://www.oie.int/eng/normes/manual/A\\_0037.htm](http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_0037.htm).
- PP18/1980. *Pelayanan Transfusi Darah*.
- Radji M. 2006. *Avian Influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan dan Penyebaran Pada Manusia*. Majalah Ilmu Kefarmasian Vol III No 2 hal 55-65
- Rahardjo J. dan Nidom CA., 2004. *Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya*. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka.
- Rantam F.A, 2005. *Virologi*. University Press. Surabaya.

- Reviany V.N, Yamaoka M, Nidom CA, Mubawadi T, Purwanto D, Ginting ET, Sinya K, Muramoto Y, Takano R, Kawaoka Y., 2008. *Surveillance of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza viruses in Indonesia*. Asia Afrika Research Forum (AARF) Hokkaido 2008.
- Rowe T, Robert A, Abernathy, Jean Hu-Primmer, William W.T, Xiuhua Lu, Wilina Lim, Keiji Fukuda, Nanci J.C, Jacqueline M.K, 1999. *Detection of Antibody To Avian Influenza A (H5N1) Virus in Human Serum By Using a Combination of Serologic Assays*. J.of Clinical Microbiology, April 1999, P: 937-943
- Saif and Espinoza, 2006. *Avian Influenza : An Internal Report for The College of Food, Agricultural and Environmental Science*
- Sandbuite M, Jimenez GS, Boon ACM, Smith LR, Treanor JJ. 2007. *Cross Reactive Neuraminidase Antibodies Afford Partial Protection against H5N1 in Mice and are present in Unexposed Humans*. Plos Medicine Vol 4 pp 0265-0272
- 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 and Alexander DJ, 2004. *Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile*. J. Emerging Infectious Diseases Vol.10, No.4, April 2004.
- Subbarao K and Joseph T, 2007. *Scientific barriers to Developing Vaccines Against Avian Influenza Virus*. *Nature Reviews Immunology*. Published Online 16 March 2007.
- Suzuki Y and Nei M, 2002. *Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes*. *Molecular Biology and Evolution* 19:501-509
- Suzuki Y, 2005. *Siaolobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses*. *Biol.Pharm.Bull.*28.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taunberger, J.K., Paulson, J.C. and Wilson, L.A. 2006. *Structure and receptor specificity of hemagglutinin from an H5N1 influenza virus*. *Science*, 312:404-10.
- Stoll M and Behrens G. 2006. *Pathogenesis and Immunology. Influenza report*.
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L. 2003. *Biology of avian influenza especially the change of low pathogenicity virus to high pathogenicity*. Proc.Latin American Poultry Congress.
- Swayne, D.E. 2004. *Avian influenza, vaccine and control*. *Poultry Sci.*83:79-81

- Tabbu, R. C. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangan Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral*. Kanisius. Yogyakarta. 238-343.
- Tamura S and Kurata T, 2004. *Defence Mechanism against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa*. Jpn. J. Infect, Dis.
- Thomas PG, Keating R, Husle-Post DJ and Doherti PC, 2006. *Pathogenesis. Cell-Mediated Protection in Influenza Infection*. <http://www.cdv.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1237.html>
- Thomson CI, Barclay WS, Zambon MC, Pickles RJ., 2006. *Infection of Human Airway Epithelium by Human and Avian Strains of Influenza A Virus*. J Virol. 2006 August 80(16): 8060–8068.
- Trampuz A.J, Prabhu M.R, Smith T.F, Baddour L.M, 2004. *Avian Influenza: A New Pandemic Threat?*. Mayo Clin Proc. 2004; 79:523-530.
- Treanor JJ, 2004. *Influenza virus*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone; 2060-2085.
- Tumpey, T.M., Suarez, D.L., Perkin, L., L., Senne, D.A., Lee, J.G., Lee, Y.J., Mo, L.P., H.W., and Swayne, D.E., 2002. *Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat*. J. Virol 76 (12):6344-6255
- US Department of Labor, 2004. *Avian Influenza Protecting Poultry Workers at Risk*. Occupational Safety and Health Administration Directorat of Science, Technology and Medicine. USA.
- Uyeki T.M, 2008. *Global Epidemiology of Human Infections with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Viruses*. Jour. Respirology 2008, 13:S2-S9.
- Webster RG and Hulse DJ, 2004. *Microbial Adaption and Change : Avian Influenza* Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23 (2),453-465.
- Whittaker G.R. 2001. *Intracellular Trafficking of Influenza Virus : Clinical Implications for Molecular Medicine*. Cambridge University Press.
- WHO, 2004. *WHO International Guidelines on Clinical Management of Humans Infected by Influenza A (H5N1)*. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/Guidelines\\_Clinical%20Management\\_H5N1\\_rev.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/Guidelines_Clinical%20Management_H5N1_rev.pdf)
- WHO, 2004. *WHO Manual on Animal Influenza Diagnostic and Surveillance*.



- WHO, 2005. *Recommended Laboratory Tests to Identify Avian Influenza A Virus in Specimen From Human*. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html)
- WHO, 2006. *Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans*. J. Emerging Infectious Diseases 2006, Vol 354(8):884.
- WHO, 2006. *Map: Indonesia, animal and Human H5N1 Outbreak*. <http://www.who.int>
- WHO, 2006. *Maintaining a Safe and Adequate Blood Supply in The Event of Pandemic Influenza*. Guidelines for National Blood Transfusion Services.
- WHO, 2007. *WHO Guidelines for Investigation of Human Cases of Avian Influenza A(H5N1)*. <http://www.who.int/csr/resources/publications/>
- WHO, 2007. *Recommendations and Laboratory Procedures for Detection of Avian Influenza A (H5N1) Virus in Specimens From Suspected Human Cases*. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>
- WHO, 2008. *Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Humans*. The New England Journal of Medicine 2008, Vol 358:261-273
- WHO, 2009. *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO (8 April 2008)* <http://www.who.int>
- Yamaoka M, Nidom CA, Reviany V.N, Alamudi M.Y, Ginting ET, Sinya K, Kawaoka Y., 2008. *Surveillance of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) viruses in Surabaya, 2008*. Hanoi 2008.
- Yen Ling-Hui and Peiris Malik J.S, 2009. *Mapping Antibody Epitopes of The Avian H5N1 Influenza Virus*. PloS Medicine, Vol.6 : April 2009
- Zainuddin M, 2000. *Metodologi Penelitian*. Surabaya

## LAMPIRAN



UNIVERSITAS AIRLANGGA  
LEMBAGA PENYAKIT TROPIS  
(INSTITUTE OF TROPICAL DISEASE)

8 September 2008

No. : 471 /J03.LPT/LL/2008  
Lamp. : -  
Hal : Permohonan Ijin Pengambilan Sampel  
Di PMI Cabang Surabaya

Kepada Yth.  
Ketua  
PMI Cabang Surabaya  
Jalan Embong Ploso  
Surabaya

Dengan hormat

Dalam rangka kegiatan penelitian Kelompok Studi Avian Influenza Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga, bersama ini kami mohon ijin untuk mendapatkan 1 (satu) ml sampel serum dari Healthy Blood Donor dan jika memungkinkan kami ingin mendapatkan sampel serum dari Healthy Blood Donor yang tersimpan sejak 5 tahun terakhir.

Maksud dari pengambilan sampel serum tersebut adalah untuk mengetahui adanya antibody terhadap virus Avian Influenza maupun Seasonal Influenza pada Healthy Blood Donor

Demikian permohonan ini kami sampaikan. Atas perhatian, bantuan dan kerjasamanya, kami sampaikan terima kasih.

Ketua,

Dr. Nasronuddin, dr., Sp.PD, K-PTI  
NIP. 140159073

Lampiran 2. Hasil Pemeriksaan Virus *Avian Influenza* H5N1 Pada Sampel Darah Donor Sehat PMI Surabaya Tgl 10 Oktober-29 November 2008

No	Tgl	Kode	Gol.	Uji	Uji
	Pengambilan	Sampel	Darah	HI	Netralisasi
1	10/10/2008	H0810001	O	NEGATIF	
2	10/10/2008	H0810002	O	NEGATIF	
3	10/10/2008	H0810003	O	NEGATIF	
4	10/10/2008	H0810004	O	NEGATIF	
5	10/10/2008	H0810005	AB	NEGATIF	
6	10/10/2008	H0810006	AB	NEGATIF	
7	10/10/2008	H0810007	O	NEGATIF	
8	10/10/2008	H0810008	B	NEGATIF	
9	10/10/2008	H0810009	O	NEGATIF	
10	10/10/2008	H0810010	O	NEGATIF	
11	10/10/2008	H0810011	O	NEGATIF	
12	10/10/2008	H0810012	B	NEGATIF	
13	10/10/2008	H0810013	B	NEGATIF	
14	10/10/2008	H0810014	B	NEGATIF	
15	10/10/2008	H0810015	B	NEGATIF	
16	10/10/2008	H0810016	O	NEGATIF	
17	10/10/2008	H0810017	B	NEGATIF	
18	10/10/2008	H0810018	O	NEGATIF	
19	10/10/2008	H0810019	AB	NEGATIF	
20	10/10/2008	H0810020	O	NEGATIF	
21	11/10/2008	H0810021	A	NEGATIF	
22	11/10/2008	H0810022	B	NEGATIF	
23	11/10/2008	H0810023	B	NEGATIF	
24	11/10/2008	H0810024	B	NEGATIF	
25	11/10/2008	H0810025	O	NEGATIF	
26	11/10/2008	H0810026	AB	NEGATIF	
27	11/10/2008	H0810027	O	NEGATIF	
28	11/10/2008	H0810028	O	NEGATIF	
29	11/10/2008	H0810029	O	NEGATIF	
30	11/10/2008	H0810030	B	NEGATIF	
31	11/10/2008	H0810031	B	NEGATIF	
32	11/10/2008	H0810032	B	NEGATIF	
33	11/10/2008	H0810033	B	NEGATIF	
34	11/10/2008	H0810034	B	NEGATIF	
35	11/10/2008	H0810035	B	NEGATIF	

36	11/10/2008	H0810036	O	NEGATIF	
37	11/10/2008	H0810037	O	NEGATIF	
38	12/10/2008	H0810038	O	NEGATIF	
39	12/10/2008	H0810039	A	NEGATIF	
40	12/10/2008	H0810040	B	NEGATIF	
41	12/10/2008	H0810041	B	NEGATIF	
42	12/10/2008	H0810042	O	NEGATIF	
43	12/10/2008	H0810043	O	NEGATIF	
44	12/10/2008	H0810044	A	NEGATIF	
45	12/10/2008	H0810045	B	NEGATIF	
46	12/10/2008	H0810046	B	NEGATIF	
47	13/10/2008	H0810047	O	NEGATIF	
48	13/10/2008	H0810048	AB	NEGATIF	
49	13/10/2008	H0810049	A	NEGATIF	
50	13/10/2008	H0810050	O	NEGATIF	
51	13/10/2008	H0810051	A	NEGATIF	
52	13/10/2008	H0810052	O	NEGATIF	
53	13/10/2008	H0810053	O	NEGATIF	
54	13/10/2008	H0810054	B	NEGATIF	
55	13/10/2008	H0810055	B	NEGATIF	
56	13/10/2008	H0810056	O	NEGATIF	
57	13/10/2008	H0810057	B	NEGATIF	
58	13/10/2008	H0810058	O	NEGATIF	
59	13/10/2008	H0810059	A	NEGATIF	
60	13/10/2008	H0810060	B	NEGATIF	
61	13/10/2008	H0810061	O	NEGATIF	
62	13/10/2008	H0810062	A	NEGATIF	
63	13/10/2008	H0810063	O	NEGATIF	
64	13/10/2008	H0810064	A	NEGATIF	
65	13/10/2008	H0810065	B	NEGATIF	
66	14/10/2008	H0810066	A	NEGATIF	
67	14/10/2008	H0810067	B	NEGATIF	
68	14/10/2008	H0810068	A	NEGATIF	
69	14/10/2008	H0810069	O	NEGATIF	
70	14/10/2008	H0810070	O	NEGATIF	
71	14/10/2008	H0810071	B	NEGATIF	
72	14/10/2008	H0810072	B	NEGATIF	
73	14/10/2008	H0810073	B	NEGATIF	
74	14/10/2008	H0810074	A	NEGATIF	
75	14/10/2008	H0810075	B	NEGATIF	
76	14/10/2008	H0810076	O	NEGATIF	

77	14/10/2008	H0810077	O	NEGATIF	
78	14/10/2008	H0810078	O	NEGATIF	
79	14/10/2008	H0810079	O	NEGATIF	
80	14/10/2008	H0810080	A	NEGATIF	
81	14/10/2008	H0810081	B	NEGATIF	
82	14/10/2008	H0810082	B	NEGATIF	
83	14/10/2008	H0810083	O	NEGATIF	
84	14/10/2008	H0810084	B	NEGATIF	
85	15/10/2008	H0810085	O	NEGATIF	
86	15/10/2008	H0810086	O	NEGATIF	
87	15/10/2008	H0810087	O	NEGATIF	
88	15/10/2008	H0810088	O	NEGATIF	
89	15/10/2008	H0810089	O	NEGATIF	
90	15/10/2008	H0810090	A	NEGATIF	
91	15/10/2008	H0810091	A	NEGATIF	
92	15/10/2008	H0810092	O	NEGATIF	
93	15/10/2008	H0810093	A	NEGATIF	
94	15/10/2008	H0810094	O	NEGATIF	
95	15/10/2008	H0810095	O	NEGATIF	
96	15/10/2008	H0810096	A	NEGATIF	
97	15/10/2008	H0810097	A	NEGATIF	
98	15/10/2008	H0810098	A	NEGATIF	
99	15/10/2008	H0810099	A	NEGATIF	
100	15/10/2008	H0810100	O	NEGATIF	
101	15/10/2008	H0810101	O	NEGATIF	
102	15/10/2008	H0810102	B	NEGATIF	
103	15/10/2008	H0810103	B	NEGATIF	
104	15/10/2008	H0810104	B	NEGATIF	
105	16/10/2008	H0810105	B	NEGATIF	
106	16/10/2008	H0810106	O	NEGATIF	
107	16/10/2008	H0810107	O	NEGATIF	
108	16/10/2008	H0810108	B	NEGATIF	
109	16/10/2008	H0810109	O	NEGATIF	
110	16/10/2008	H0810110	O	NEGATIF	
111	16/10/2008	H0810111	B	NEGATIF	
112	16/10/2008	H0810112	O	NEGATIF	
113	16/10/2008	H0810113	A	NEGATIF	
114	16/10/2008	H0810114	B	NEGATIF	
115	16/10/2008	H0810115	A	NEGATIF	
116	16/10/2008	H0810116	O	NEGATIF	
117	16/10/2008	H0810117	O	NEGATIF	

118	16/10/2008	H0810118	O	NEGATIF	
119	16/10/2008	H0810119	O	NEGATIF	
120	16/10/2008	H0810120	B	NEGATIF	
121	16/10/2008	H0810121	O	NEGATIF	
122	16/10/2008	H0810122	O	NEGATIF	
123	16/10/2008	H0810123	O	NEGATIF	
124	16/10/2008	H0810124	B	NEGATIF	
125	17/10/2008	H0810125	O	NEGATIF	
126	17/10/2008	H0810126	O	NEGATIF	
127	17/10/2008	H0810127	O	NEGATIF	
128	17/10/2008	H0810128	B	NEGATIF	
129	17/10/2008	H0810129	O	NEGATIF	
130	17/10/2008	H0810130	O	NEGATIF	
131	17/10/2008	H0810131	B	NEGATIF	
132	17/10/2008	H0810132	B	NEGATIF	
133	17/10/2008	H0810133	O	NEGATIF	
134	17/10/2008	H0810134	AB	NEGATIF	
135	17/10/2008	H0810135	O	NEGATIF	
136	17/10/2008	H0810136	B	NEGATIF	
137	17/10/2008	H0810137	A	NEGATIF	
138	17/10/2008	H0810138	O	NEGATIF	
139	17/10/2008	H0810139	O	NEGATIF	
140	17/10/2008	H0810140	O	NEGATIF	
141	17/10/2008	H0810141	A	NEGATIF	
142	17/10/2008	H0810142	O	NEGATIF	
143	17/10/2008	H0810143	AB	NEGATIF	
144	17/10/2008	H0810144	O	NEGATIF	
145	18/10/2008	H0810145	O	NEGATIF	
146	18/10/2008	H0810146	O	NEGATIF	
147	18/10/2008	H0810147	O	NEGATIF	
148	18/10/2008	H0810148	O	NEGATIF	
149	18/10/2008	H0810149	O	NEGATIF	
150	18/10/2008	H0810150	A	NEGATIF	
151	18/10/2008	H0810151	A	NEGATIF	
152	18/10/2008	H0810152	B	NEGATIF	
153	18/10/2008	H0810153	A	NEGATIF	
154	18/10/2008	H0810154	B	NEGATIF	
155	18/10/2008	H0810155	O	NEGATIF	
156	18/10/2008	H0810156	O	NEGATIF	
157	18/10/2008	H0810157	O	NEGATIF	
158	18/10/2008	H0810158	B	NEGATIF	

159	18/10/2008	H0810159	O	NEGATIF	
160	18/10/2008	H0810160	A	NEGATIF	
161	18/10/2008	H0810161	O	NEGATIF	
162	18/10/2008	H0810162	O	NEGATIF	
163	18/10/2008	H0810163	A	NEGATIF	
164	18/10/2008	H0810164	O	NEGATIF	
165	20/10/2008	H0810165	A	NEGATIF	
166	20/10/2008	H0810166	O	NEGATIF	
167	20/10/2008	H0810167	O	NEGATIF	
168	20/10/2008	H0810168	A	NEGATIF	
169	20/10/2008	H0810169	B	NEGATIF	
170	20/10/2008	H0810170	O	NEGATIF	
171	20/10/2008	H0810171	O	NEGATIF	
172	20/10/2008	H0810172	O	NEGATIF	
173	20/10/2008	H0810173	B	NEGATIF	
174	20/10/2008	H0810174	O	NEGATIF	
175	20/10/2008	H0810175	A	NEGATIF	
176	20/10/2008	H0810176	O	NEGATIF	
177	20/10/2008	H0810177	A	NEGATIF	
178	20/10/2008	H0810178	O	NEGATIF	
179	20/10/2008	H0810179	O	NEGATIF	
180	20/10/2008	H0810180	O	NEGATIF	
181	20/10/2008	H0810181	A	NEGATIF	
182	20/10/2008	H0810182	B	NEGATIF	
183	21/10/2008	H0810183	O	NEGATIF	
184	21/10/2008	H0810184	B	NEGATIF	
185	21/10/2008	H0810185	B	NEGATIF	
186	21/10/2008	H0810186	O	NEGATIF	
187	21/10/2008	H0810187	B	NEGATIF	
188	21/10/2008	H0810188	O	NEGATIF	
189	21/10/2008	H0810189	A	NEGATIF	
190	21/10/2008	H0810190	O	NEGATIF	
191	21/10/2008	H0810191	B	NEGATIF	
192	21/10/2008	H0810192	A	POSITIF 1:20	NEGATIF
193	21/10/2008	H0810193	AB	POSITIF 1:20	NEGATIF
194	21/10/2008	H0810194	A	NEGATIF	
195	21/10/2008	H0810195	B	NEGATIF	
196	21/10/2008	H0810196	O	NEGATIF	
197	21/10/2008	H0810197	A	NEGATIF	
198	21/10/2008	H0810198	AB	NEGATIF	
199	21/10/2008	H0810199	B	NEGATIF	



200	21/10/2008	H0810200	O	NEGATIF	
201	21/10/2008	H0810201	O	NEGATIF	
202	21/10/2008	H0810202	AB	NEGATIF	
203	22/10/2008	H0810203	O	NEGATIF	
204	22/10/2008	H0810204	O	NEGATIF	
205	22/10/2008	H0810205	A	NEGATIF	
206	22/10/2008	H0810206	AB	NEGATIF	
207	22/10/2008	H0810207	O	NEGATIF	
208	22/10/2008	H0810208	B	NEGATIF	
209	22/10/2008	H0810209	O	NEGATIF	
210	22/10/2008	H0810210	O	NEGATIF	
211	22/10/2008	H0810211	B	NEGATIF	
212	22/10/2008	H0810212	B	NEGATIF	
213	23/10/2008	H0810213	O	NEGATIF	
214	23/10/2008	H0810214	O	NEGATIF	
215	23/10/2008	H0810215	A	NEGATIF	
216	23/10/2008	H0810216	O	NEGATIF	
217	23/10/2008	H0810217	O	NEGATIF	
218	23/10/2008	H0810218	A	NEGATIF	
219	23/10/2008	H0810219	O	NEGATIF	
220	23/10/2008	H0810220	B	NEGATIF	
221	23/10/2008	H0810221	O	NEGATIF	
222	23/10/2008	H0810222	O	NEGATIF	
223	23/10/2008	H0810223	A	NEGATIF	
224	23/10/2008	H0810224	O	NEGATIF	
225	23/10/2008	H0810225	O	NEGATIF	
226	23/10/2008	H0810226	O	NEGATIF	
227	23/10/2008	H0810227	B	NEGATIF	
228	23/10/2008	H0810228	O	NEGATIF	
229	23/10/2008	H0810229	A	NEGATIF	
230	23/10/2008	H0810230	O	NEGATIF	
231	23/10/2008	H0810231	A	NEGATIF	
232	23/10/2008	H0810232	A	NEGATIF	
233	24/10/2008	H0810233	O	NEGATIF	
234	24/10/2008	H0810234	A	NEGATIF	
235	24/10/2008	H0810235	B	NEGATIF	
236	24/10/2008	H0810236	B	NEGATIF	
237	24/10/2008	H0810237	O	NEGATIF	
238	24/10/2008	H0810238	B	NEGATIF	
239	24/10/2008	H0810239	O	NEGATIF	
240	24/10/2008	H0810240	O	NEGATIF	

241	24/10/2008	H0810241	A	NEGATIF	
242	24/10/2008	H0810242	O	NEGATIF	
243	24/10/2008	H0810243	O	NEGATIF	
244	24/10/2008	H0810244	B	NEGATIF	
245	24/10/2008	H0810245	B	NEGATIF	
246	24/10/2008	H0810246	A	NEGATIF	
247	24/10/2008	H0810247	B	NEGATIF	
248	24/10/2008	H0810248	A	NEGATIF	
249	24/10/2008	H0810249	A	NEGATIF	
250	24/10/2008	H0810250	A	NEGATIF	
251	24/10/2008	H0810251	O	NEGATIF	
252	24/10/2008	H0810252	A	NEGATIF	
253	25/10/2008	H0810253	B	NEGATIF	
254	25/10/2008	H0810254	B	NEGATIF	
255	25/10/2008	H0810255	B	NEGATIF	
256	25/10/2008	H0810256	A	NEGATIF	
257	25/10/2008	H0810257	A	NEGATIF	
258	25/10/2008	H0810258	O	NEGATIF	
259	25/10/2008	H0810259	B	NEGATIF	
260	25/10/2008	H0810260	AB	NEGATIF	
261	25/10/2008	H0810261	O	NEGATIF	
262	25/10/2008	H0810262	A	NEGATIF	
263	25/10/2008	H0810263	B	NEGATIF	
264	25/10/2008	H0810264	O	NEGATIF	
265	25/10/2008	H0810265	A	NEGATIF	
266	25/10/2008	H0810266	B	NEGATIF	
267	25/10/2008	H0810267	O	NEGATIF	
268	25/10/2008	H0810268	B	NEGATIF	
269	25/10/2008	H0810269	A	NEGATIF	
270	25/10/2008	H0810270	B	NEGATIF	
271	27/10/2008	H0810271	O	NEGATIF	
272	27/10/2008	H0810272	B	NEGATIF	
273	27/10/2008	H0810273	O	NEGATIF	
274	27/10/2008	H0810274	A	NEGATIF	
275	27/10/2008	H0810275	B	NEGATIF	
276	27/10/2008	H0810276	A	NEGATIF	
277	27/10/2008	H0810277	A	NEGATIF	
278	27/10/2008	H0810278	B	NEGATIF	
279	27/10/2008	H0810279	A	NEGATIF	
280	27/10/2008	H0810280	O	NEGATIF	
281	27/10/2008	H0810281	AB	NEGATIF	

282	27/10/2008	H0810282	O	NEGATIF	
283	27/10/2008	H0810283	B	NEGATIF	
284	27/10/2008	H0810284	A	NEGATIF	
285	27/10/2008	H0810285	AB	NEGATIF	
286	27/10/2008	H0810286	B	NEGATIF	
287	28/10/2008	H0810287	A	NEGATIF	
288	28/10/2008	H0810288	O	NEGATIF	
289	28/10/2008	H0810289	O	POSITIF 1:40	NEGATIF
290	28/10/2008	H0810290	O	NEGATIF	
291	28/10/2008	H0810291	A	NEGATIF	
292	28/10/2008	H0810292	O	NEGATIF	
293	28/10/2008	H0810293	O	NEGATIF	
294	28/10/2008	H0810294	O	NEGATIF	
295	28/10/2008	H0810295	A	NEGATIF	
296	28/10/2008	H0810296	O	NEGATIF	
297	28/10/2008	H0810297	A	NEGATIF	
298	28/10/2008	H0810298	B	NEGATIF	
299	28/10/2008	H0810299	A	NEGATIF	
300	28/10/2008	H0810300	B	NEGATIF	
301	28/10/2008	H0810301	O	NEGATIF	
302	28/10/2008	H0810302	O	NEGATIF	
303	28/10/2008	H0810303	O	NEGATIF	
304	28/10/2008	H0810304	B	NEGATIF	
305	28/10/2008	H0810305	O	NEGATIF	
306	29/10/2008	H0810306	B	NEGATIF	
307	29/10/2008	H0810307	O	NEGATIF	
308	29/10/2008	H0810308	O	NEGATIF	
309	29/10/2008	H0810309	A	NEGATIF	
310	29/10/2008	H0810310	O	NEGATIF	
311	29/10/2008	H0810311	O	NEGATIF	
312	29/10/2008	H0810312	O	NEGATIF	
313	29/10/2008	H0810313	O	NEGATIF	
314	29/10/2008	H0810314	AB	NEGATIF	
315	29/10/2008	H0810315	O	NEGATIF	
316	29/10/2008	H0810316	O	POSITIF 1:10	NEGATIF
317	29/10/2008	H0810317	A	NEGATIF	
318	29/10/2008	H0810318	B	NEGATIF	
319	29/10/2008	H0810319	O	NEGATIF	
320	29/10/2008	H0810320	O	NEGATIF	
321	29/10/2008	H0810321	A	NEGATIF	
322	29/10/2008	H0810322	B	NEGATIF	

323	29/10/2008	H0810323	A	NEGATIF	
324	29/10/2008	H0810324	A	NEGATIF	
325	29/10/2008	H0810325	O	NEGATIF	
326	30/10/2008	H0810326	O	NEGATIF	
327	30/10/2008	H0810327	B	NEGATIF	
328	30/10/2008	H0810328	A	NEGATIF	
329	30/10/2008	H0810329	A	NEGATIF	
330	30/10/2008	H0810330	B	NEGATIF	
331	30/10/2008	H0810331	O	NEGATIF	
332	30/10/2008	H0810332	B	NEGATIF	
333	30/10/2008	H0810333	O	NEGATIF	
334	30/10/2008	H0810334	O	NEGATIF	
335	30/10/2008	H0810335	O	NEGATIF	
336	30/10/2008	H0810336	B	NEGATIF	
337	30/10/2008	H0810337	B	NEGATIF	
338	30/10/2008	H0810338	A	NEGATIF	
339	30/10/2008	H0810339	O	NEGATIF	
340	30/10/2008	H0810340	O	NEGATIF	
341	30/10/2008	H0810341	B	NEGATIF	
342	30/10/2008	H0810342	O	NEGATIF	
343	30/10/2008	H0810343	O	NEGATIF	
344	30/10/2008	H0810344	AB	NEGATIF	
345	30/10/2008	H0810345	O	NEGATIF	
346	31/10/2008	H0810346	B	NEGATIF	
347	31/10/2008	H0810347	O	NEGATIF	
348	31/10/2008	H0810348	O	NEGATIF	
349	31/10/2008	H0810349	O	NEGATIF	
350	31/10/2008	H0810350	O	NEGATIF	
351	31/10/2008	H0810351	O	NEGATIF	
352	31/10/2008	H0810352	O	NEGATIF	
353	31/10/2008	H0810353	O	NEGATIF	
354	31/10/2008	H0810354	O	NEGATIF	
355	31/10/2008	H0810355	O	NEGATIF	
356	31/10/2008	H0810356	O	NEGATIF	
357	31/10/2008	H0810357	B	NEGATIF	
358	31/10/2008	H0810358	B	NEGATIF	
359	31/10/2008	H0810359	O	NEGATIF	
360	31/10/2008	H0810360	B	NEGATIF	
361	31/10/2008	H0810361	B	NEGATIF	
362	31/10/2008	H0810362	O	NEGATIF	
363	31/10/2008	H0810363	B	NEGATIF	

364	31/10/2008	H0810364	O	NEGATIF	
365	01/11/2008	H0810365	B	NEGATIF	
366	01/11/2008	H0810366	O	NEGATIF	
367	01/11/2008	H0810367	B	NEGATIF	
368	01/11/2008	H0810368	O	NEGATIF	
369	01/11/2008	H0810369	B	NEGATIF	
370	01/11/2008	H0810370	AB	NEGATIF	
371	01/11/2008	H0810371	B	NEGATIF	
372	01/11/2008	H0810372	B	NEGATIF	
373	01/11/2008	H0810373	A	NEGATIF	
374	01/11/2008	H0810374	A	NEGATIF	
375	01/11/2008	H0810375	B	NEGATIF	
376	01/11/2008	H0810376	AB	NEGATIF	
377	01/11/2008	H0810377	A	NEGATIF	
378	01/11/2008	H0810378	O	NEGATIF	
379	01/11/2008	H0810379	A	NEGATIF	
380	01/11/2008	H0810380	O	NEGATIF	
381	01/11/2008	H0810381	O	NEGATIF	
382	01/11/2008	H0810382	O	NEGATIF	
383	01/11/2008	H0810383	O	NEGATIF	
384	01/11/2008	H0810384	O	NEGATIF	
385	03/11/2008	H0810385	O	NEGATIF	
386	03/11/2008	H0810386	O	NEGATIF	
387	03/11/2008	H0810387	O	NEGATIF	
388	03/11/2008	H0810388	A	NEGATIF	
389	03/11/2008	H0810389	O	NEGATIF	
390	03/11/2008	H0810390	AB	NEGATIF	
391	03/11/2008	H0810391	A	NEGATIF	
392	03/11/2008	H0810392	B	NEGATIF	
393	03/11/2008	H0810393	A	NEGATIF	
394	03/11/2008	H0810394	O	NEGATIF	
395	03/11/2008	H0810395	AB	NEGATIF	
396	03/11/2008	H0810396	AB	NEGATIF	
397	03/11/2008	H0810397	B	NEGATIF	
398	03/11/2008	H0810398	O	NEGATIF	
399	03/11/2008	H0810399	O	NEGATIF	
400	03/11/2008	H0810400	O	NEGATIF	
401	03/11/2008	H0810401	O	NEGATIF	
402	05/11/2008	H0810402	O	NEGATIF	
403	05/11/2008	H0810403	O	NEGATIF	
404	05/11/2008	H0810404	A	NEGATIF	

405	05/11/2008	H0810405	B	NEGATIF	
406	05/11/2008	H0810406	AB	NEGATIF	
407	05/11/2008	H0810407	B	NEGATIF	
408	05/11/2008	H0810408	O	NEGATIF	
409	05/11/2008	H0810409	B	NEGATIF	
410	06/11/2008	H0810410	B	NEGATIF	
411	06/11/2008	H0810411	A	NEGATIF	
412	06/11/2008	H0810412	A	NEGATIF	
413	06/11/2008	H0810413	A	NEGATIF	
414	06/11/2008	H0810414	O	NEGATIF	
415	06/11/2008	H0810415	AB	NEGATIF	
416	06/11/2008	H0810416	B	NEGATIF	
417	06/11/2008	H0810417	O	NEGATIF	
418	06/11/2008	H0810418	O	NEGATIF	
419	06/11/2008	H0810419	O	NEGATIF	
420	06/11/2008	H0810420	O	NEGATIF	
421	06/11/2008	H0810421	O	NEGATIF	
422	06/11/2008	H0810422	A	NEGATIF	
423	06/11/2008	H0810423	O	NEGATIF	
424	06/11/2008	H0810424	A	NEGATIF	
425	06/11/2008	H0810425	B	NEGATIF	
426	06/11/2008	H0810426	O	NEGATIF	
427	06/11/2008	H0810427	O	NEGATIF	
428	06/11/2008	H0810428	B	NEGATIF	
429	06/11/2008	H0810429	O	NEGATIF	
430	06/11/2008	H0810430	O	NEGATIF	
431	07/11/2008	H0810431	B	NEGATIF	
432	07/11/2008	H0810432	O	NEGATIF	
433	07/11/2008	H0810433	O	NEGATIF	
434	07/11/2008	H0810434	B	NEGATIF	
435	07/11/2008	H0810435	O	NEGATIF	
436	07/11/2008	H0810436	AB	NEGATIF	
437	07/11/2008	H0810437	B	NEGATIF	
438	07/11/2008	H0810438	O	NEGATIF	
439	07/11/2008	H0810439	B	NEGATIF	
440	07/11/2008	H0810440	AB	NEGATIF	
441	07/11/2008	H0810441	O	NEGATIF	
442	07/11/2008	H0810442	A	NEGATIF	
443	07/11/2008	H0810443	O	NEGATIF	
444	07/11/2008	H0810444	O	NEGATIF	
445	07/11/2008	H0810445	O	NEGATIF	

446	07/11/2008	H0810446	O	NEGATIF	
447	07/11/2008	H0810447	B	NEGATIF	
448	07/11/2008	H0810448	A	NEGATIF	
449	07/11/2008	H0810449	B	NEGATIF	
450	07/11/2008	H0810450	O	NEGATIF	
451	08/11/2008	H0810451	AB	NEGATIF	
452	08/11/2008	H0810452	O	NEGATIF	
453	08/11/2008	H0810453	O	NEGATIF	
454	08/11/2008	H0810454	B	NEGATIF	
455	08/11/2008	H0810455	A	NEGATIF	
456	08/11/2008	H0810456	A	NEGATIF	
457	08/11/2008	H0810457	B	NEGATIF	
458	08/11/2008	H0810458	B	NEGATIF	
459	08/11/2008	H0810459	B	NEGATIF	
460	08/11/2008	H0810460	O	NEGATIF	
461	08/11/2008	H0810461	AB	NEGATIF	
462	08/11/2008	H0810462	O	NEGATIF	
463	08/11/2008	H0810463	B	NEGATIF	
464	08/11/2008	H0810464	A	NEGATIF	
465	10/11/2008	H0810465	AB	NEGATIF	
466	10/11/2008	H0810466	B	NEGATIF	
467	10/11/2008	H0810467	O	NEGATIF	
468	10/11/2008	H0810468	O	NEGATIF	
469	10/11/2008	H0810469	B	NEGATIF	
470	10/11/2008	H0810470	B	NEGATIF	
471	10/11/2008	H0810471	B	NEGATIF	
472	10/11/2008	H0810472	AB	NEGATIF	
473	10/11/2008	H0810473	O	NEGATIF	
474	10/11/2008	H0810474	A	NEGATIF	
475	10/11/2008	H0810475	A	NEGATIF	
476	10/11/2008	H0810476	O	NEGATIF	
477	10/11/2008	H0810477	B	NEGATIF	
478	10/11/2008	H0810478	B	NEGATIF	
479	10/11/2008	H0810479	A	NEGATIF	
480	10/11/2008	H0810480	O	NEGATIF	
481	10/11/2008	H0810481	B	NEGATIF	
482	10/11/2008	H0810482	A	NEGATIF	
483	10/11/2008	H0810483	O	NEGATIF	
484	10/11/2008	H0810484	O	NEGATIF	
485	11/11/2008	H0810485	B	NEGATIF	
486	11/11/2008	H0810486	O	NEGATIF	

487	11/11/2008	H0810487	A	NEGATIF	
488	11/11/2008	H0810488	A	NEGATIF	
489	11/11/2008	H0810489	B	NEGATIF	
490	11/11/2008	H0810490	B	NEGATIF	
491	11/11/2008	H0810491	O	NEGATIF	
492	11/11/2008	H0810492	O	NEGATIF	
493	11/11/2008	H0810493	O	NEGATIF	
494	11/11/2008	H0810494	B	NEGATIF	
495	11/11/2008	H0810495	O	NEGATIF	
496	11/11/2008	H0810496	O	NEGATIF	
497	11/11/2008	H0810497	B	NEGATIF	
498	11/11/2008	H0810498	B	NEGATIF	
499	11/11/2008	H0810499	B	NEGATIF	
500	11/11/2008	H0810500	B	NEGATIF	
501	12/11/2008	H0810501	O	NEGATIF	
502	12/11/2008	H0810502	O	NEGATIF	
503	12/11/2008	H0810503	O	NEGATIF	
504	12/11/2008	H0810504	AB	NEGATIF	
505	12/11/2008	H0810505	B	NEGATIF	
506	12/11/2008	H0810506	A	NEGATIF	
507	12/11/2008	H0810507	O	NEGATIF	
508	12/11/2008	H0810508	O	NEGATIF	
509	12/11/2008	H0810509	A	NEGATIF	
510	12/11/2008	H0810510	B	NEGATIF	
511	12/11/2008	H0810511	B	NEGATIF	
512	12/11/2008	H0810512	B	NEGATIF	
513	12/11/2008	H0810513	O	NEGATIF	
514	12/11/2008	H0810514	B	NEGATIF	
515	12/11/2008	H0810515	B	NEGATIF	
516	12/11/2008	H0810516	O	NEGATIF	
517	12/11/2008	H0810517	O	NEGATIF	
518	12/11/2008	H0810518	B	NEGATIF	
519	12/11/2008	H0810519	O	NEGATIF	
520	12/11/2008	H0810520	B	NEGATIF	
521	13/11/2008	H0810521	O	NEGATIF	
522	13/11/2008	H0810522	O	NEGATIF	
523	13/11/2008	H0810523	B	NEGATIF	
524	13/11/2008	H0810524	O	NEGATIF	
525	13/11/2008	H0810525	O	NEGATIF	
526	13/11/2008	H0810526	O	POSITIF 1:20	NEGATIF
527	13/11/2008	H0810527	A	POSITIF 1:20	NEGATIF



528	13/11/2008	H0810528	O	NEGATIF	
529	13/11/2008	H0810529	O	NEGATIF	
530	13/11/2008	H0810530	B	NEGATIF	
531	13/11/2008	H0810531	A	NEGATIF	
532	13/11/2008	H0810532	O	NEGATIF	
533	13/11/2008	H0810533	O	NEGATIF	
534	13/11/2008	H0810534	B	NEGATIF	
535	13/11/2008	H0810535	O	NEGATIF	
536	13/11/2008	H0810536	AB	NEGATIF	
537	13/11/2008	H0810537	B	NEGATIF	
538	13/11/2008	H0810538	AB	NEGATIF	
539	13/11/2008	H0810539	O	NEGATIF	
540	13/11/2008	H0810540	A	NEGATIF	
541	15/11/2008	H0810541	O	NEGATIF	
542	15/11/2008	H0810542	AB	NEGATIF	
543	15/11/2008	H0810543	O	NEGATIF	
544	15/11/2008	H0810544	O	NEGATIF	
545	15/11/2008	H0810545	O	NEGATIF	
546	15/11/2008	H0810546	B	NEGATIF	
547	15/11/2008	H0810547	O	NEGATIF	
548	15/11/2008	H0810548	B	NEGATIF	
549	15/11/2008	H0810549	B	NEGATIF	
550	15/11/2008	H0810550	A	NEGATIF	
551	15/11/2008	H0810551	B	NEGATIF	
552	15/11/2008	H0810552	O	NEGATIF	
553	15/11/2008	H0810553	A	NEGATIF	
554	15/11/2008	H0810554	O	POSITIF 1:10	NEGATIF
555	15/11/2008	H0810555	B	POSITIF 1:10	NEGATIF
556	15/11/2008	H0810556	B	NEGATIF	
557	15/11/2008	H0810557	O	NEGATIF	
558	15/11/2008	H0810558	A	POSITIF 1:10	NEGATIF
559	15/11/2008	H0810559	A	POSITIF 1:10	NEGATIF
560	17/11/2008	H0810560	A	NEGATIF	
561	17/11/2008	H0810561	A	POSITIF 1:20	NEGATIF
562	17/11/2008	H0810562	B	POSITIF 1:20	NEGATIF
563	17/11/2008	H0810563	AB	NEGATIF	
564	17/11/2008	H0810564	O	NEGATIF	
565	17/11/2008	H0810565	B	NEGATIF	
566	17/11/2008	H0810566	O	NEGATIF	
567	17/11/2008	H0810567	O	NEGATIF	
568	17/11/2008	H0810568	B	NEGATIF	

569	17/11/2008	H0810569	AB	NEGATIF	
570	17/11/2008	H0810570	O	NEGATIF	
571	17/11/2008	H0810571	O	NEGATIF	
572	17/11/2008	H0810572	A	NEGATIF	
573	17/11/2008	H0810573	AB	NEGATIF	
574	17/11/2008	H0810574	B	NEGATIF	
575	17/11/2008	H0810575	O	NEGATIF	
576	17/11/2008	H0810576	B	NEGATIF	
577	17/11/2008	H0810577	B	NEGATIF	
578	17/11/2008	H0810578	B	NEGATIF	
579	17/11/2008	H0810579	B	NEGATIF	
580	17/11/2008	H0810580	A	NEGATIF	
581	18/11/2008	H0810581	B	NEGATIF	
582	18/11/2008	H0810582	AB	NEGATIF	
583	18/11/2008	H0810583	B	NEGATIF	
584	18/11/2008	H0810584	O	NEGATIF	
585	18/11/2008	H0810585	O	NEGATIF	
586	18/11/2008	H0810586	O	NEGATIF	
587	18/11/2008	H0810587	O	NEGATIF	
588	18/11/2008	H0810588	B	NEGATIF	
589	18/11/2008	H0810589	O	NEGATIF	
590	18/11/2008	H0810590	O	NEGATIF	
591	18/11/2008	H0810591	O	NEGATIF	
592	18/11/2008	H0810592	B	NEGATIF	
593	18/11/2008	H0810593	O	NEGATIF	
594	18/11/2008	H0810594	O	NEGATIF	
595	18/11/2008	H0810595	O	NEGATIF	
596	18/11/2008	H0810596	B	NEGATIF	
597	18/11/2008	H0810597	O	NEGATIF	
598	18/11/2008	H0810598	AB	NEGATIF	
599	18/11/2008	H0810599	O	NEGATIF	
600	18/11/2008	H0810600	O	NEGATIF	
601	19/11/2008	H0810601	AB	NEGATIF	
602	19/11/2008	H0810602	A	NEGATIF	
603	19/11/2008	H0810603	O	NEGATIF	
604	19/11/2008	H0810604	O	NEGATIF	
605	19/11/2008	H0810605	O	NEGATIF	
606	19/11/2008	H0810606	A	NEGATIF	
607	19/11/2008	H0810607	B	NEGATIF	
608	19/11/2008	H0810608	B	NEGATIF	
609	19/11/2008	H0810609	O	NEGATIF	

610	19/11/2008	H0810610	O	NEGATIF	
611	19/11/2008	H0810611	B	NEGATIF	
612	19/11/2008	H0810612	O	NEGATIF	
613	19/11/2008	H0810613	B	NEGATIF	
614	19/11/2008	H0810614	O	NEGATIF	
615	19/11/2008	H0810615	A	NEGATIF	
616	19/11/2008	H0810616	AB	NEGATIF	
617	19/11/2008	H0810617	A	NEGATIF	
618	19/11/2008	H0810618	A	NEGATIF	
619	19/11/2008	H0810619	O	NEGATIF	
620	20/11/2008	H0810620	A	NEGATIF	
621	20/11/2008	H0810621	AB	NEGATIF	
622	20/11/2008	H0810622	B	NEGATIF	
623	20/11/2008	H0810623	O	NEGATIF	
624	20/11/2008	H0810624	O	NEGATIF	
625	20/11/2008	H0810625	AB	NEGATIF	
626	20/11/2008	H0810626	B	NEGATIF	
627	20/11/2008	H0810627	B	NEGATIF	
628	20/11/2008	H0810628	B	NEGATIF	
629	20/11/2008	H0810629	B	NEGATIF	
630	20/11/2008	H0810630	O	NEGATIF	
631	20/11/2008	H0810631	B	NEGATIF	
632	20/11/2008	H0810632	B	NEGATIF	
633	20/11/2008	H0810633	O	NEGATIF	
634	20/11/2008	H0810634	B	NEGATIF	
635	20/11/2008	H0810635	O	NEGATIF	
636	20/11/2008	H0810636	O	NEGATIF	
637	20/11/2008	H0810637	O	NEGATIF	
638	20/11/2008	H0810638	B	NEGATIF	
639	21/11/2008	H0810639	A	NEGATIF	
640	21/11/2008	H0810640	B	NEGATIF	
641	21/11/2008	H0810641	O	NEGATIF	
642	21/11/2008	H0810642	B	NEGATIF	
643	21/11/2008	H0810643	A	NEGATIF	
644	21/11/2008	H0810644	O	NEGATIF	
645	21/11/2008	H0810645	O	NEGATIF	
646	21/11/2008	H0810646	A	NEGATIF	
647	21/11/2008	H0810647	B	NEGATIF	
648	21/11/2008	H0810648	B	NEGATIF	
649	21/11/2008	H0810649	B	NEGATIF	
650	21/11/2008	H0810650	B	NEGATIF	

651	21/11/2008	H0810651	O	NEGATIF	
652	21/11/2008	H0810652	O	NEGATIF	
653	21/11/2008	H0810653	B	NEGATIF	
654	21/11/2008	H0810654	O	NEGATIF	
655	21/11/2008	H0810655	B	NEGATIF	
656	21/11/2008	H0810656	B	NEGATIF	
657	21/11/2008	H0810657	B	NEGATIF	
658	21/11/2008	H0810658	A	NEGATIF	
659	22/11/2008	H0810659	O	NEGATIF	
660	22/11/2008	H0810660	B	NEGATIF	
661	22/11/2008	H0810661	B	NEGATIF	
662	22/11/2008	H0810662	A	NEGATIF	
663	22/11/2008	H0810663	O	NEGATIF	
664	22/11/2008	H0810664	O	NEGATIF	
665	22/11/2008	H0810665	O	NEGATIF	
666	22/11/2008	H0810666	O	NEGATIF	
667	22/11/2008	H0810667	AB	NEGATIF	
668	22/11/2008	H0810668	O	NEGATIF	
669	22/11/2008	H0810669	O	NEGATIF	
670	22/11/2008	H0810670	B	NEGATIF	
671	22/11/2008	H0810671	O	NEGATIF	
672	22/11/2008	H0810672	O	NEGATIF	
673	22/11/2008	H0810673	A	NEGATIF	
674	22/11/2008	H0810674	B	NEGATIF	
675	22/11/2008	H0810675	O	NEGATIF	
676	22/11/2008	H0810676	O	NEGATIF	
677	22/11/2008	H0810677	A	NEGATIF	
678	24/11/2008	H0810678	B	NEGATIF	
679	24/11/2008	H0810679	B	NEGATIF	
680	24/11/2008	H0810680	B	NEGATIF	
681	24/11/2008	H0810681	O	NEGATIF	
682	24/11/2008	H0810682	O	NEGATIF	
683	24/11/2008	H0810683	B	NEGATIF	
684	24/11/2008	H0810684	B	NEGATIF	
685	24/11/2008	H0810685	B	NEGATIF	
686	24/11/2008	H0810686	O	NEGATIF	
687	24/11/2008	H0810687	O	NEGATIF	
688	24/11/2008	H0810688	B	NEGATIF	
689	24/11/2008	H0810689	B	NEGATIF	
690	24/11/2008	H0810690	O	NEGATIF	
691	24/11/2008	H0810691	B	NEGATIF	

692	24/11/2008	H0810692	O	NEGATIF	
693	24/11/2008	H0810693	O	NEGATIF	
694	24/11/2008	H0810694	A	NEGATIF	
695	24/11/2008	H0810695	A	NEGATIF	
696	24/11/2008	H0810696	B	NEGATIF	
697	24/11/2008	H0810697	A	NEGATIF	
698	25/11/2008	H0810698	B	NEGATIF	
699	25/11/2008	H0810699	B	NEGATIF	
700	25/11/2008	H0810700	B	NEGATIF	
701	25/11/2008	H0810701	O	NEGATIF	
702	25/11/2008	H0810702	B	NEGATIF	
703	25/11/2008	H0810703	AB	NEGATIF	
704	25/11/2008	H0810704	O	NEGATIF	
705	25/11/2008	H0810705	B	NEGATIF	
706	25/11/2008	H0810706	B	NEGATIF	
707	25/11/2008	H0810707	A	NEGATIF	
708	25/11/2008	H0810708	O	NEGATIF	
709	25/11/2008	H0810709	O	NEGATIF	
710	25/11/2008	H0810710	A	NEGATIF	
711	25/11/2008	H0810711	B	NEGATIF	
712	25/11/2008	H0810712	O	NEGATIF	
713	25/11/2008	H0810713	B	NEGATIF	
714	25/11/2008	H0810714	O	NEGATIF	
715	25/11/2008	H0810715	AB	NEGATIF	
716	26/11/2008	H0810716	O	NEGATIF	
717	26/11/2008	H0810717	O	NEGATIF	
718	26/11/2008	H0810718	B	NEGATIF	
719	26/11/2008	H0810719	B	NEGATIF	
720	26/11/2008	H0810720	B	NEGATIF	
721	26/11/2008	H0810721	O	NEGATIF	
722	26/11/2008	H0810722	A	NEGATIF	
723	26/11/2008	H0810723	A	NEGATIF	
724	26/11/2008	H0810724	O	NEGATIF	
725	26/11/2008	H0810725	O	NEGATIF	
726	26/11/2008	H0810726	B	NEGATIF	
727	26/11/2008	H0810727	B	NEGATIF	
728	26/11/2008	H0810728	AB	NEGATIF	
729	26/11/2008	H0810729	O	NEGATIF	
730	26/11/2008	H0810730	B	NEGATIF	
731	26/11/2008	H0810731	O	NEGATIF	
732	26/11/2008	H0810732	AB	NEGATIF	

733	26/11/2008	H0810733	O	NEGATIF	
734	26/11/2008	H0810734	O	NEGATIF	
735	26/11/2008	H0810735	O	NEGATIF	
736	27/11/2008	H0810736	B	NEGATIF	
737	27/11/2008	H0810737	B	NEGATIF	
738	27/11/2008	H0810738	O	NEGATIF	
739	27/11/2008	H0810739	B	NEGATIF	
740	27/11/2008	H0810740	B	NEGATIF	
741	27/11/2008	H0810741	O	NEGATIF	
742	27/11/2008	H0810742	O	NEGATIF	
743	27/11/2008	H0810743	AB	NEGATIF	
744	27/11/2008	H0810744	O	NEGATIF	
745	27/11/2008	H0810745	O	NEGATIF	
746	27/11/2008	H0810746	B	NEGATIF	
747	27/11/2008	H0810747	B	NEGATIF	
748	27/11/2008	H0810748	A	NEGATIF	
749	28/11/2008	H0810749	O	NEGATIF	
750	28/11/2008	H0810750	O	NEGATIF	
751	28/11/2008	H0810751	B	NEGATIF	
752	28/11/2008	H0810752	B	NEGATIF	
753	28/11/2008	H0810753	O	NEGATIF	
754	28/11/2008	H0810754	O	NEGATIF	
755	28/11/2008	H0810755	B	NEGATIF	
756	28/11/2008	H0810756	A	NEGATIF	
757	28/11/2008	H0810757	AB	NEGATIF	
758	28/11/2008	H0810758	B	NEGATIF	
759	28/11/2008	H0810759	A	NEGATIF	
760	28/11/2008	H0810760	A	POSITIF 1:20	NEGATIF
761	28/11/2008	H0810761	A	NEGATIF	
762	28/11/2008	H0810762	O	NEGATIF	
763	28/11/2008	H0810763	B	NEGATIF	
764	28/11/2008	H0810764	B	NEGATIF	
765	28/11/2008	H0810765	O	NEGATIF	
766	28/11/2008	H0810766	B	NEGATIF	
767	29/11/2008	H0810767	O	NEGATIF	
768	29/11/2008	H0810768	B	NEGATIF	
769	29/11/2008	H0810769	B	NEGATIF	
770	29/11/2008	H0810770	B	NEGATIF	
771	29/11/2008	H0810771	B	NEGATIF	
772	29/11/2008	H0810772	B	NEGATIF	
773	29/11/2008	H0810773	O	NEGATIF	

## Lampiran 3. Pembuatan Reagen Penelitian

1. PBS (*Phosphat Buffer Saline*)

PBS (-)	9,6 gram
DW	
<hr/>	
Total	1000 ml

2. *Growth Medium*

10x MEM	0,1%
7,5% BSA	0,04%
7,5% NaHCO <sub>3</sub>	0,03%
MEM amino acid	0,02%
MEM vitamin	0,01%
L-glutamin	0,02%
Pen-strep	0,01%
DW	
<hr/>	
Total	1000 ml

3. *Maintenance Medium*

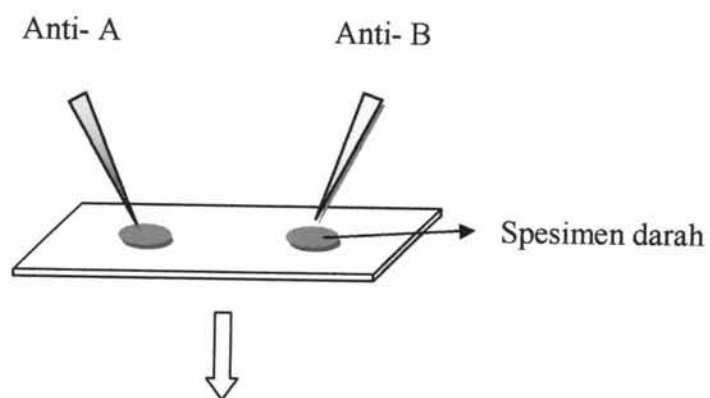
5% FCS/MEM	0,5%
10x MEM	0,05%
FCS	0,025%
7,5% NaHCO <sub>3</sub>	0,015%
MEM amino acid	0,01%
L-glutamin	0,01%
Pen-strep	0,005%
DW	
<hr/>	
Total	1000 ml

Lampiran 4. Prosedur Seleksi Donor Darah PMI Surabaya





Lampiran 5. Pemeriksaan Golongan Darah



**ABO Blood Reactions**

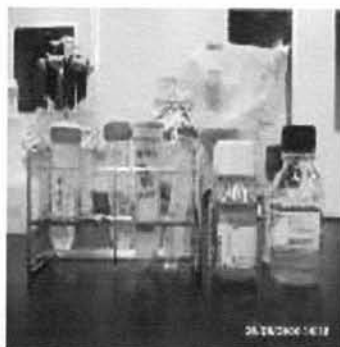
	Blood type				
	A	B	AB	O	
Anti-A					Anti-A
Anti-B					Anti-B

## Lampiran 6. Preparasi Spesimen dan Uji Netralisasi

### Preparasi Spesimen



### Uji Netralisasi



Lampiran 7. Hasil Uji HI Mikroteknik

