

AVIAN INFLUENZA

KK
KKA
TI. 07/11
Yun
i

TESIS

IDENTIFIKASI PROTEIN HEMAGLUTININ VIRUS AI SUBTIPE H5N1 SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN DIAGNOSTIK



RETINA YUNANI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**IDENTIFIKASI PROTEIN HEMAGLUTININ VIRUS AI SUBTIPE H5N1
SEBAGAI KANDIDAT ANTIGEN DIAGNOSTIK**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Immunologi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**RETINA YUNANI
NIM : 090610551 / M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

Telah diuji pada

Tanggal 15 Agustus 2008

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof Dr Fedik Abdul Rantam, drh

Anggota : 1. Dr Suwarno, drh, M.Si

2. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK.

3. Prof Dr Sri Hidajati Bayu Santoso, dr, DTM, MS, SpPar.

4. Dr Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga penelitian dan tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang tidak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Dr Suwarno, drh, M.Si selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, saran, bimbingan dan pengetahuan kepada penulis sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK, selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, saran dan nasehat dalam menyusun tesis ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui menteri Pendidikan dan Kebudayaan dengan pemberian program Beasiswa Unggulan, yang meringankan penulis dalam menjalani pendidikan pada Program Studi Magister Imunologi di Universitas Airlangga hingga selesai.

Dengan terselesaikannya tesis ini, perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih kepada :

Rektor Universitas Airlangga, Prof Dr Fasich, Apt, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama pendidikan Program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammmad Amin, dr, yang telah memberikan kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Studi Magister Imunologi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof Dr H.M.S. Wijadi, dr, SpTHT, atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti Program Magister, serta Ketua TKPPS, Prof Dr Harjanto, J.M, dr, AIF yang telah banyak membantu terselesaikannya pendidikan ini.

Ketua Program Studi Magister Imunologi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Sri Hidajati Bayu Setiono, dr, DTM, MS, SpPar, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan bimbingan, nasehat dan masukan kepada penulis pada saat pengerjaan tesis dan selama pendidikan di Program Pascasarjana dari awal hingga selesai.

Ketua penguji tesis, Prof Dr Fedik Abdul Rantam, drh, serta Dr Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes, selaku penguji tesis, yang telah memberikan banyak masukan sehingga tesis ini menjadi lebih baik.

Kepala Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof Dr Rahayu Ernawati, drh, MSc, yang telah mengizinkan penulis menggunakan fasilitas laboratorium.

Kepala Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga, Dr Nasronudin, dr, SpPD-KPTI, atas pemberian izin dalam menggunakan fasilitas di laboratorium Dengue Institute of Tropical Disease.

Bapak Kusnoto, drh, M.Si, selaku konsultan statistik, mbak Helen dan mas Erik selaku staf Laboratorium Dengue Institute of Tropical Disease, mas Heri selaku staf Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan dan dik Angga di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan yang telah banyak membantu dalam proses penelitian.

Para Dosen Program Studi Magister Imunologi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, atas ilmu yang diberikan selama menjalani pendidikan.

Teman satu angkatan, mbak Gunarti, terima kasih atas persahabatan serta kerjasamanya selama menjalani pendidikan dan penelitian di Program Studi Magister Imunologi Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga, penulis sampaikan kepada kedua orangtua, yaitu Bapak Umar Faruch dan Ibu Soetjikasih tercinta, adikku Ima, Indra dan Via. Keponakanku, Ridho dan Aulia, serta keluarga Ibu Azizah dan mas Abdul Rosid, yang telah banyak memberikan dukungan moril, materiil dan doa selama menjalani pendidikan pada Program Pascasarjana hingga selesai.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kehadiran Allah SWT semoga amal kebaikan yang tidak ternilai harganya tersebut, mendapat balasan yang setimpal sebagai amal yang baik disisi-Nya. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pihak-pihak yang memerlukan

Surabaya, Agustus 2008

Penulis

RINGKASAN

Identifikasi Protein Hemagglutinin Virus AI Subtipe H5N1 Sebagai Kandidat Antigen Diagnostik

Wabah Avian Influenza subtipe H5N1 pada unggas dan manusia telah terjadi sejak tahun 1997. Kejadian yang terbaru terjadi pada tahun 2003, dimana virus ini yang awalnya hanya menyerang unggas disepuluh negara di Asia kemudian menyebar luas sampai ke Eropa dan Afrika. Virus AI berasal dari *family Orthomyxoviridae*, determinan antigenik virus tersebut adalah protein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Berdasarkan antigenisitas kedua protein tersebut, didapatkan 16 subtipe protein HA yang berbeda dan juga 9 subtipe protein NA yang berbeda. Virus AI subtipe H5N1 merupakan virus yang tergolong *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang dapat menimbulkan kematian sampai dengan 100% dalam waktu 48 jam. Deteksi dini antigen ataupun antibodi dari subtipe tersebut akan memberikan kontribusi penting dalam penanggulangan penyakit AI. Protein HA virus AI subtipe H5N1 memiliki potensi untuk dijadikan sebagai kandidat antigen diagnostik, karena antigenisitasnya yang tinggi dan kemampuannya untuk mendeteksi reaksi silang HA subtipe lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul protein hemagglutinin serta antigenisitasnya apabila direaksikan dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9.

Langkah awal yang telah dilakukan dalam penelitian ini adalah mengkarakterisasi protein hemagglutinin virus AI subtipe H5N1 menggunakan metode SDS-PAGE, selanjutnya untuk mengetahui antigenisitas protein tersebut terhadap

antibodi anti H5N1 dilakukan Western Blotting dan yang terakhir adalah teknik *indirect* ELISA untuk mengetahui antigenisitas antara protein hemagglutinin dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9.

Hasil SDS-PAGE yang tampak pada gel adalah *band-band* protein HA, NP, NA, NS dan M1 dengan berat molekul berturut-turut 78 kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 27,9 kDa dan 16,9 kDa. Dengan menggunakan teknik Western Blotting, protein hemagglutinin (HA) telah dibuktikan antigenisitasnya setelah direaksikan dengan antibodi anti H5N1, dan yang terakhir adalah teknik *indirect* ELISA untuk menguji antigenisitas antara protein HA dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9, hasil pemeriksaannya yang dinyatakan dalam nilai *Optical Density* (OD) didapatkan kisaran berturut-turut 0,3280-0,4120; 0,1150-0,2870 dan 0,1360-0,3250, dari hasil *post hoc test* HSD diketahui bahwa antibodi anti H5N1 berinteraksi paling kuat dengan protein hemagglutinin

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa protein hemagglutinin virus AI sub tipe H5N1 bersifat antigenik terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 sehingga dapat dimanfaatkan sebagai kandidat antigen diagnostik.

SUMMARY

Identification of Hemagglutinin Protein of AI Virus H5N1 as A Candidate for Diagnostic Antigene

The outbreak of avian influenza of H5N1 subtype in poultry and human beings have occurred since 1997. The newest incidence occurred in 2003, when the virus, which at first only affected poultry in ten Asian countries and then spread through Europe and Africa. AI virus originates from the family *Orthomyxoviridae*. The antigenic determinant of that virus is the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. Based on the antigenicity of both proteins, there are 16 different subtypes of HA protein and 9 different subtypes of NA protein. The AI virus of H5N1 subtype is a virus belonging to Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) that may lead to 100% mortality in 48 hours. Early detection of antigen and antibody of those subtypes may provide important contribution in the eradication of AI disease. HA protein of AI virus H5N1 subtype has a potential to become a candidate for diagnostic antigene due its high antigenicity and its capability to detect cross reactivity with other HA subtypes.

The objectives of this study were to find the molecular weight of hemagglutinin protein and its antigenicity if being reacted with anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies.

The first step conducted in this study was to characterize hemagglutinin protein of AI virus H5N1 subtype using SDS-PAGE. Subsequently, to identify the antigenicity of the protein against anti-H5N1 we conducted Western Blotting test and, finally, we used indirect ELISA to find the antigenicity between hemagglutinin protein

and anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies.

The protein bands of HA, NP, NA, NS and M1 with molecular weights of 78 kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 27,9 kDa and 16,9 kDa were apparent in the gel as the result of SDS-PAGE. Using Western Blotting technique, the antigenicity of hemagglutinin (HA) protein has been proved after being reacted with anti-H5N1 antibody. Finally, indirect ELISA technique was used to test antigenicity between HA protein and anti-H5N1, anti H5N2 and anti H5N9 antibodies. The result of examination, which was stated in Optical Density (OD), revealed ranges as follows: 0.3280-0,4120; 0.1150-0,2870 and 0.1360-0,3250. From the result of HSD, it was found that anti-H5N1 antibody had the strongest interaction with hemagglutinin protein.

Based on this study, it can be concluded that hemagglutinin protein of AI virus H5N1 subtype is antigenic against anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies, so that it can be used as candidate for diagnostic antigene.

ABSTRACT**Identification of Hemagglutinin Protein of AI Virus H5N1 as A Candidate for Diagnostic Antigene**

The objectives of this study were to find the molecular weight of hemagglutinin protein and its antigenicity if being reacted with anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies.

The first step conducted in this study was to characterize hemagglutinin protein of AI virus H5N1 subtype using SDS-PAGE. Subsequently, to identify the antigenicity of the protein against anti-H5N1 we conducted Western Blotting test and, finally, we used indirect ELISA to find the antigenicity between hemagglutinin protein and anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies.

The protein bands of HA, NP, NA, NS and M1 with molecular weights of 78 kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 27,9 kDa and 16,9 kDa were apparent in the gel as the result of SDS-PAGE. Using Western Blotting technique, the antigenicity of hemagglutinin (HA) protein has been proved after being reacted with anti-H5N1 antibody. Finally, indirect ELISA technique was used to test antigenicity between HA protein and anti-H5N1, anti H5N2 and anti H5N9 antibodies. The result of examination, which was stated in Optical Density (OD), revealed ranges as follows: 0.3280-0,4120; 0.1150-0,2870 and 0.1360-0,3250. From the result of HSD, it was found that anti-H5N1 antibody had the strongest interaction with hemagglutinin protein.

Based on this study, it can be concluded that hemagglutinin protein of AI virus H5N1 subtype is antigenic against anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies, so that it can be used as candidate for diagnostic antigene.

Keywords: hemagglutinin, AI virus H5N1 subtype, ELISA

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	ix
Summary.....	xi
Absract.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
.BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan umum.....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4 Manfaat Hasil Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat teoritis.....	6
1.4.2 Manfaat praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Virus.....	7
2.2 Antigenitas Virus AI.....	8
2.3 Reseptor Virus AI.....	8
2.4 Hospes Alami.....	9
2.5 Patogenesis.....	10
2.6 Gejala Klinis.....	11

2.7 Patologi.....	12
2.8 Uji Laboratoris.....	12
2.9 Diferensial Diagnosis.....	13
2.10 Isolasi Virus pada TAB.....	14
2.11 Transmisi Virus AI.....	15
2.12 Replikasi Virus.....	17
2.13 Respons Imun.....	19
2.14 Hemaglutinin.....	20
2.15 Vaksin.....	21
2.16 SDS – PAGE.....	23
2.17 Western Blotting.....	24
2.18 Indirect ELISA.....	25
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN..	26
3.1 Kerangka Konseptual.....	26
3.2 Alur Kerangka Konseptual.....	28
BAB 4 MATERI DAN METODE.....	29
4.1 Jenis Penelitian.....	29
4.2 Definisi Operasional Penelitian.....	29
4.3 Prosedur Pengumpulan Data.....	30
4.4 Sampel Virus.....	30
4.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	31
4.5.1 Tempat penelitian.....	31
4.5.2 Waktu penelitian.....	31
4.6 Bahan Penelitian.....	31
4.7 Alat Penelitian.....	32
4.8 Hewan Coba.....	32
4.9 Perbanyak Virus AI pada TAB.....	32
4.10 Uji HA.....	33
4.11 Pengukuran Titer Virus.....	33
4.12 Pembuatan Vaksin Inaktif Virus AI.....	34
4.13 Pembuatan Antibodi anti H5NI Virus AI.....	35
4.14 Persiapan Sampel Protein.....	35
4.15 SDS – PAGE.....	35
4.16 Western Blotting.....	36

4.17 Perhitungan Berat Molekul Antigen Protein.....	38
4.18 Elusi.....	38
4.19 Indirect ELISA.....	39
4.20 Analisis Data.....	40
BAB 5 ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN.....	42
5.1 Data Penelitian.....	42
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian.....	43
5.2.1 Perbanyakkan virus AI sub tipe H5NI.....	43
5.2.2 Pembuatan antibodi poliklonal.....	44
5.2.3 Hasil SDS – PAGE.....	45
5.2.4 Hasil western blotting.....	47
5.2.5 Hasil elusi.....	48
5.2.6 Hasil ELISA.....	48
BAB 6 PEMBAHASAN.....	51
BAB 7 PENUTUP.....	58
7.1 Kesimpulan.....	58
7.2 Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil penghitungan <i>Egg Infective Dose 50</i> (EID ₅₀) virus AI Subtipe H5N1	44
Tabel 5.2 Nilai Rf(x) dan berat molekul (log y Da) sampel.....	46
Tabel 5.3 Nilai rata-rata OD protein HA virus AI subtipe H5N1 dengan antibodi anti H5N1 anti H5N2 dan anti H5N9	49
Tabel 5.4 Rata-rata nilai OD kekuatan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 terhadap protein HA virus AI subtipe H5N1 dan tingkat notasinya	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur virus AI dan komponen proteinnnya	7
Gambar 2.2 Transmisi virus AI	16
Gambar 2.3 Replikasi virus AI	17
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian	28
Gambar 4.1 Skema kerangka operasional penelitian	41
Gambar 5.1 Hasil identifikasi protein virus AI sub tipe H5N1 isolat Blitar dengan teknik SDS-PAGE. Kolom 1-5 merupakan pengenceran virus berturut-turut, 1:10; 1:20; 1: 40; 1:80; 1:80. M: Marker....	46
Gambar 5.2 Hasil identifikasi protein virus AI sub tipe H5N1 dengan teknik Western Blotting. Kolom 1-3 merupakan sampel virus dengan pengenceran 1:10. M: Marker.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Cara Kerja SDS-PAGE	64
Lampiran 2. Cara Kerja Western Blotting	66
Lampiran 3. Cara Kerja Elusi	67
Lampiran 4. Cara Kerja ELISA	68
Lampiran 5. Uji regresi antara nilai $R_f(x)$ dan berat molekul ($\log y$ Da) untuk menentukan berat molekul protein virus AI subtipe H5N1.....	69
lampiran 6. Penghitungan OD dan <i>post hoc test</i> HSD	72

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APS	: <i>Ammonium persulfat</i>
AP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
DIVA	: <i>Differentiate Infected from Vaccinated Animals</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EID ₅₀	: <i>Egg Infective Dose</i> ₅₀
HA	: <i>Hemagglutinin</i>
HI	: <i>Hemagglutination Inhibition</i>
HPAI	: <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>
HSD	: <i>Honestly Significant Difference</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
kDa	: <i>Kilo Dalton</i>
LPAI	: <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>
M	: <i>matrix</i>
NA	: <i>neuraminidase</i>
NP	: <i>nucleoprotein</i>
NS	: <i>non-structural</i>
PA	: <i>polymerase acidic</i>
p-NPP	: <i>Para-Nitrophenil phosphate</i>
PB1	: <i>Polymerase basic-1</i>
PB2	: <i>polymerase basic-2</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>

OD	: <i>Optical Density</i>
Rf	: <i>Retardation factor</i>
rpm	: <i>Rotation per minute</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamid Gel Electrophoresis</i>
TAB	: <i>Telur Ayam Berembrio</i>
TBS Tween	: <i>Tris Buffer Saline Tween</i>
Temed	: <i>N,N,N,N-Tetra Methyl Diamine</i>
Tris-HCl	: <i>Tris-Hidroxy-aminomethane-chloride</i>

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SUPERVISOR

BAB 1 PENDAHULUAN



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Wabah avian influenza (AI) H5N1 pada beberapa kejadian yang terjadi sejak tahun 1997, berpotensi menyebabkan terjadinya pandemi pada unggas dan manusia sehingga menimbulkan kematian yang tinggi. Wabah H5N1 pada unggas yang terjadi pada akhir tahun 2003, mulanya hanya terjadi pada sepuluh negara Asia, tetapi setelah itu menyebar sampai ke Eropa dan Afrika (WHO, 2006).

Virus AI adalah virus RNA yang termasuk ke dalam *family Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus influenza tipe A ini dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia termasuk manusia. Virus AI tipe A tersusun atas 8 segmen gen yang menyandi 10 macam protein, yaitu *polymerase basic-2* (PB2), *polymerase basic-1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), *hemagglutinin* (HA), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (NA), *matrix* (M) dan *non-structural* (NS). Masing-masing segmen menyandi satu macam protein, kecuali segmen M menyandi protein M1 dan M2 serta segmen NS menyandi protein NS1 dan NS2. Berat molekul protein berturut-turut adalah: 87, 96, 85, 77, 50-60, 48-63, 24, 15, 26 dan 12 kDa (Suzuki and Nei, 2002).

Hasil analisis antigenik dan filogenetik virus avian influenza H5N1, mengindikasikan virus tersebut mengalami evolusi menjadi subtype yang berbeda. Perubahan genetik dan antigenik terjadi pada virus H5N1 yang diisolasi mulai tahun 1997 sampai dengan 2005. Perbedaan antigenik antara beberapa virus influenza dapat diidentifikasi menggunakan antiserum ferret yang telah diinfeksi dengan uji *hemagglutination inhibition* (HA_i) (Suguitan, 2006). Virus influenza A dibagi menjadi

beberapa subtipe berdasarkan antigenisitas kedua glikoprotein permukaannya, yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Saat ini virus avian influenza diklasifikasikan menjadi 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA (Subbarao and Murphy, 2006).

Protein HA dan NA adalah target utama yang mampu menimbulkan respon imun yang protektif. Protein NA memiliki struktur tetramerik yang terdapat pada permukaan luar sel serta memiliki ekor sitoplasmik. NA bertindak sebagai enzim, yang memecah *sialic acid* dari molekul HA, molekul NA dan dari glikoprotein dan glikolipid permukaan sel. Protein NA juga dapat bertindak sebagai *antigenic site* penting, sehingga memungkinkan virus untuk masuk pada lapisan mucin epitel saluran pernafasan. Protein NA membawa residu beberapa asam amino yang jika terjadi mutasi pada asam-asam amino tersebut maka dapat menyebabkan virus resisten terhadap inhibitor neuraminidase. Sementara itu protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M1 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma sel tropisme. Di lain pihak, protein M2 bersama dengan protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al*, 2002). Peran protein NS1 adalah menekan respon interferon pada sel yang terinfeksi virus sehingga virus dapat terus diproduksi. Protein NS2 dapat melekat pada protein M1, fungsi protein NS2 adalah membantu transport RNP yang baru saja disintesis dari nukleus menuju sitoplasma untuk mempercepat produksi virus (Gurtler, 2006).

Dari beberapa protein virus avian influenza yang disebutkan diatas, protein HA adalah antigen virus influenza yang paling utama. Hemagglutinin adalah

glikoprotein yang mempunyai 2 dari 3 tempat glikosilasi. Memiliki paling sedikit 5 *domain antigenic* yang terdapat pada permukaan luar. Protein HA bertindak sebagai reseptor yang berikatan dengan *sialic acid (N-acetyl-Neuraminic Acid)* dan menginduksi masuknya permukaan virus pada saat fusi dengan membran sel. *Antigenic site* protein HA terdapat pada kepala molekul, kaki molekul HA masuk pada lapisan lipid, sedangkan badan molekul memiliki domain fusiogenik yang diperlukan pada saat fusi membran, ketika virus menginfeksi sel baru. Pada pH rendah, peptida yang mengalami fusi berubah ke posisi bagian dalam. Protein HA membentuk struktur trimer, beberapa trimer membentuk pori-pori yang berfungsi pada saat fusi. Dari data analisis genetik dan antigenik protein HA pada virus influenza A H3N2 yang menyerang manusia, diketahui bahwa perubahan 2 atau lebih asam amino pada 2 atau lebih tempat ikatan antibodi pada protein HA, memungkinkan virus untuk dapat menghindar terhadap netralisasi antibodi (Wilson and Cox, 1990).

Mutasi yang terjadi pada *antigenic site* akan mengurangi atau menghambat ikatannya dengan *neutralizing antibodies*, sehingga dapat menyebabkan subtype baru menyebar pada populasi yang belum memiliki kekebalan. Fenomena tersebut disebut dengan *antigenic drift*. Respons imun terhadap HA *antigenic site* diikuti dengan produksi *neutralizing antibody* (Gurtler, 2006).

Variasi antigen dapat membatasi penggunaan reagen yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus. Sturm-Ramirez (2004) menemukan bahwa sebagian besar virus H5N1 tahun 2001 dan 2002 di Hongkong tidak dapat dideteksi menggunakan referensi reagen H5 yang sudah digunakan. Begitu juga dengan antibodi monoklonal yang digunakan sebagai reagen diagnostik untuk virus H5N1 pada saat wabah tahun

1997, sudah tidak dapat digunakan lagi untuk uji HI pada virus H5N1 tahun 2001 dan 2002. Oleh karena itu disarankan reagen untuk uji diagnostik perlu untuk diperbarui.

Terdapat beberapa uji diagnostik yang digunakan untuk mendeteksi virus AI tipe A. Deteksi antigen dengan cara cepat membutuhkan waktu 15-30 menit. Deteksi antigen tipe cepat lainnya adalah *immunofluorescence assay* yang sudah digunakan secara luas, sensitif serta dapat digunakan pada spesimen klinis atau kultur sel. Prosedur lain yang digunakan adalah kultur virus yang membutuhkan waktu 2-10 hari. ELISA spesifik HA adalah tes deteksi antigen. Pengujiannya memerlukan pemurnian pada antigen yang akan digunakan, tes tersebut mampu untuk mendeteksi reaksi silang pada HA subtipe lain (Strurm-Ramirez, 2004), karena kemampuannya itu maka protein HA berpotensi untuk digunakan sebagai antigen untuk uji diagnostik (Nwe *et al*, 2006).

Protein merupakan komponen virus yang berperan penting dalam menentukan antigenitas virus. Oleh karena itu peneliti melakukan karakterisasi virus AI subtipe H5N1 menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis*) yang dapat memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya (Albert *et al*, 1994), lalu dilanjutkan dengan Western Blotting dimana protein-protein tersebut direaksikan dengan antibodi anti AI subtipe H5N1, sehingga diketahui protein antigeniknya, dan yang terakhir adalah uji *indirect* ELISA untuk mengetahui antigenisitas protein hemaglutinin terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9, yang dapat diharapkan membantu dalam pengembangan antigen diagnostik kit untuk penanggulangan wabah AI.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapakah berat molekul protein hemaglutinin virus AI subtipe H5N1 isolat Blitar?
2. Apakah protein hemaglutinin merupakan protein yang antigenik?
3. Apakah terdapat perbedaan antigenisitas protein hemaglutinin terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan mengidentifikasi protein hemaglutinin virus AI subtipe H5N1 yang dapat digunakan sebagai kandidat antigen diagnostik.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui berat molekul protein hemaglutinin virus AI subtipe H5N1 isolat Blitar.
2. Mengetahui antigenisitas protein hemaglutinin.
3. Mengetahui perbedaan antigenisitas protein hemaglutinin terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9

1.4. Manfaat Hasil Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Karakterisasi protein hemaglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 isolat Blitar (BI/03/Ind) dapat menambah informasi mengenai virus AI subtipe H5N1 isolat Indonesia

1.4.2 Manfaat praktis

Untuk pengembangan kajian penelitian dalam rangka pemberantasan penyakit avian influenza, khususnya penggunaan protein hemaglutinin sebagai kandidat antigen diagnostik.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

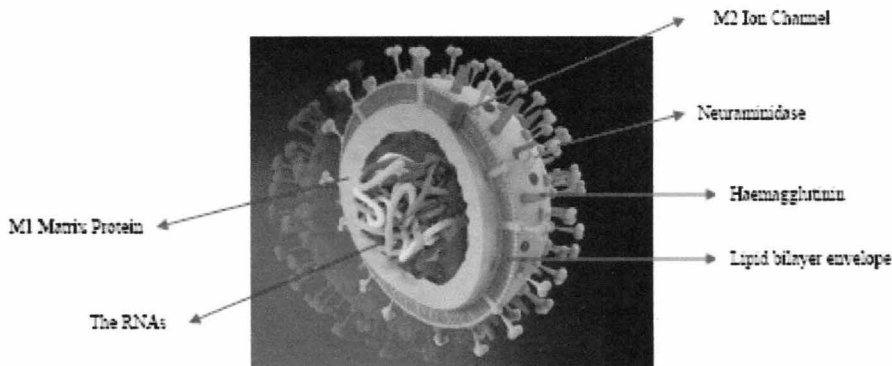
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus

Virus influenza termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*, virus ini berbentuk sferis, berdiameter 120 nm, membentuk amplop, tergolong dalam virus bergenom ss-RNA, permukaan pertikel virus diselubungi oleh hemagglutinin dan neuraminidase. Virus influenza diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C berdasarkan pada perbedaan antigenisitas nukleoprotein dan matriks. Virus avian influenza termasuk dalam tipe A (Sidoronko dan Reichl, 2005).

Genom virus influenza A dan B terdiri atas 8 segmen yang terpisah yang diselubungi protein *nucleocapsid*, menyatu membentuk ribonukleoprotein (RNP). Masing-masing segmen mengkode protein fungsional penting, yaitu: protein *polymerase* B2 (PB2), protein *polymerase* B1 (PB1), protein *polymerase* A (PA), hemagglutinin (HA atau H), protein *nucleocapsid* (NP), neuraminidase (NA atau N), protein matriks (M): M1 menyusun matriks, pada virus influenza A, M2 bertindak sebagai *ion channel pump* untuk menurunkan atau mempertahankan pH endosom dan protein non-struktural (NS), dimana fungsinya belum diketahui (Gurtler, 2006).



Gambar 2.1 Struktur virus AI dan komponen proteinnya (Mac Kenzie, 2006)

PB2, PB1 dan PA membentuk *RNA polymerase* yang bertanggung jawab untuk replikasi dan transkripsi. *RNA polymerase* memiliki aktivitas endonuklease dan terhubung pada RNP. Protein NS1 dan NS2 berfungsi sebagai regulator yang meningkatkan sintesis komponen viral pada sel yang terinfeksi. Amplop virus adalah membran *lipid bilayer* yang berasal dari sel pemroduksi virus, memiliki tonjolan-tonjolan yang dibentuk oleh protein HA, NA dan M2. *Lipid bilayer* menyelubungi matriks yang dibentuk oleh protein M1 (Gurtler, 2006).

2.2 Antigenitas virus AI

Determinan antigenik utama virus AI A dan B adalah protein hemagglutinin (H atau HA) dan neuraminidase (N atau NA). Protein HA dan NA adalah glikoprotein transmembran yang mampu menentukan sub tipe spesifik virus AI, serta mampu untuk menimbulkan respons imun yang sangat protektif, tetapi sebagian menimbulkan reaksi silang dengan sub tipe yang berbeda. Antigenitas glikoprotein virus influenza A dikelompokkan menjadi 16 sub tipe hemagglutinin (H1-H16) dan 9 sub tipe neuramidase (N1-N9). Pengelompokan tersebut diperkuat secara filogenik melalui analisis nukleotida dan juga dapat dilihat dari sisi berkurangnya rangkaian asam amino gen HA dan NA (Fouchier *et al*, 2005).

2.3 Reseptor virus AI

Virus avian influenza umumnya menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap $\alpha 2-3$ sialic acid. $\alpha 2-3$ sialic acid merupakan reseptor yang mendominasi jaringan epitel endodermis intestinal dan paru-paru pada burung yang menjadi target virus tersebut. Sebaliknya virus influenza pada manusia umumnya berhubungan dengan $\alpha 2-$

6 yang mendominasi sel epitel tidak bersilia pada saluran pernafasan manusia. Predileksi pada reseptor-reseptor tersebut mencegah transmisi virus dari unggas ke manusia (Suzuki *et al*, 2000). Baru-baru ini ditemukan bahwa sel epitel bersilia pada trakea manusia membawa reseptor yang menyerupai reseptor unggas, dalam jumlah yang tidak banyak (Matrosovitch *et al*, 2004), dan juga sel epitel pada ayam membawa reseptor tipe manusia dalam jumlah yang juga tidak banyak. Hal tersebut yang menjelaskan mengapa manusia tidak sepenuhnya sukar untuk disembuhkan terhadap infeksi virus beberapa strain unggas. Babi dan burung puyuh, memiliki kedua tipe reseptor tersebut dalam jumlah besar. Diduga spesies-spesies tersebut *mixing vessel* strain avian dan manusia (Ito *et al*, 1998)

2.4 Hospes Alami

Unggas liar yang hidup di air, terutama Ordo *Anseriformes* (itik dan angsa) dan *Charadriiformes* (burung camar dan burung-burung yang hidup di pantai) adalah pembawa beberapa sub tipe virus influenza A, sehingga otomatis menjadi reservoir alami semua virus influenza A (Widjaja *et al*, 2004). Semua spesies burung rentan terhadap serangan AI, beberapa unggas domestik seperti ayam, kalkun dan burung puyuh juga dikenal mudah terserang.

Hospes dan virus selalu dalam keadaan yang seimbang, hal tersebut dapat diamati dengan tidak munculnya gejala klinis serta virus tetap bisa bereplikasi. Virus diekskresikan diatas $10^{8.7} \times 50\%$ *egg-infective dose* (EID₅₀) per gram feses (Webster, 1998). Ketika ditransmisikan kepada unggas yang peka, gejalanya bisa timbul tetapi ringan. Virus tersebut disebut sebagai *low pathogenic influenza virus* (LPAIV) yang pada umumnya menimbulkan penurunan produksi telur pada ayam layer dan

penurunan berat badan pada ayam broiler (Capua *et al*, 2001). Subtipe H5 dan H7 berpotensi untuk mengalami mutasi menjadi bentuk *highly pathogenic* setelah adanya transmisi dan adaptasi pada unggas yang menjadi hospes barunya. Munculnya bentuk *highly pathogenic* pada subtipe H5 dan H7 belum pernah diamati pada burung liar (Webster, 1998), tetapi sekali HPAIV muncul pada unggas domestik, maka virus dapat ditransmisikan secara horizontal dari unggas ke populasi burung liar. Kepekaan burung liar terhadap HPAIV bergantung pada spesies, umur dan strain virusnya.

2.5 Patogenesis

Umumnya virus AI subtipe H5 dan H7 terdapat dalam hospes alami dalam bentuk *low pathogenic*. Dari reservoir tersebut, virus menyebar dalam beberapa cara ke peternakan, kemudian masuk pada hewan yang rentan dan bermutasi menjadi bentuk *highly pathogenic* (Rohm *et al*, 1995). Pada penelitian rangkaian nukleotida menunjukkan bahwa sebagian besar HPAIV saling berbagi gen HA, sehingga hal tersebut dapat digunakan sebagai *marker* virulensi pada unggas (Perdue and Suarez 2000).

Virion influenza A harus memasukkan protein HA yang telah diproses secara endoproteolitik dari precursor HA menjadi HA_{1,2} dimer, supaya infeksi. N terminus subunit HA₂ yang baru saja terbentuk memiliki peptide fusogenik yang banyak mengandung banyak domain lipofilik (Skehel *et al*, 2001). Domain tersebut penting selama proses fusi virus dengan membran lisosomal karena memungkinkan terjadinya proses penetrasi segmen genom virus kedalam sitoplasma sel host. Tempat pembelahan HA *low pathogenic* virus terdiri atas 2 asam amino basic pada posisi -1/-4 (H5) dan -1/-3 (H7) (Wood *et al*, 1993), tempat ini dapat diakses oleh *tissue-specific*

trypsin-like protease yang diekspresikan oleh epitel sel saluran pernafasan dan gastrointestinal, oleh karena itu replikasi virus yang tergolong LPAI sebagian besar terikat pada tempat tersebut yang merupakan hospes alaminya, hal tersebut berlawanan dengan HPAI virus (Capua *et al*, 2000).

2.6 Gejala Klinis

Masa inkubasi avian influenza umumnya beberapa hari (jarang diatas 21 hari), tergantung karakteristik isolat, dosis inokulasi, spesies dan umur burung, Gejala klinis avian influenza pada burung bervariasi dan gejalanya kurang begitu spesifik (Elber *et al*, 2005) karena itu diagnosis yang berdasarkan gejala klinis tidak memungkinkan.

Gejala yang mengikuti infeksi *low pathogenic avian influenza virus* adalah bulu menjadi kusut, menurunnya produksi telur atau turunnya berat badan diikuti gangguan pernafasan ringan. Beberapa strain *low pathogenic* seperti H9N2 melakukan replikasi pada unggas, sehingga menimbulkan gejala klinis yang parah sampai kematian. Pada bentuk *highly pathogenic* ditandai dengan timbulnya gejala yang terjadi secara tiba-tiba dan berat disusul dengan kematian yang mencapai 100% dalam waktu 48 jam (Swayne and Suarez, 2000).

Pada industri perunggasan, penurunan konsumsi air dan makanan bisa sebagai sinyal adanya penyakit sistemik. Pada peternakan ayam petelur terjadi penurunan produksi telur. Burung yang terinfeksi HPAI terlihat lesu, mobilitasnya berkurang, muncul gejala oedem, bagian kepala mengalami kerontokan bulu, jengger, pial dan kaki berwarna kebiruan, diare kehijauan dan pernafasan tidak wajar. Pada ayam petelur gejala yang muncul adalah kerabang telur menjadi lunak sampai terhentinya aktivitas bertelur seiring dengan meningkatnya perkembangan penyakit. Gejala syaraf

termasuk *tremor*, *torticolis* dan ataksia terjadi pada spesies yang tidak begitu rentan seperti pada itik dan angsa (Kwon *et al*, 2005).

2.7 Patologi

Burung yang mati karena penyakit yang akut menunjukkan dehidrasi dan kongesti pada *viscera* dan otot. Pada burung yang mati setelah penyakit berjalan dalam waktu yang agak lama, terlihat adanya *ptechiae* dan hemoragi diseluruh badan terutama pada laring, trakea, proventrikulus dan lemak epicardial, foci nekrotik berwarna kuning dan abu-abu pada limpa, hepar, ginjal dan paru-paru, kantung udara berisi eksudat, limpa membesar dan hemoragis. Pada HPAI secara histologis ditandai dengan gangguan vascular sampai oedem, hemoragis dan *perivascular cuffing* terutama pada myocardium, limpa, paru-paru, otak dan pial. Otak mengalami gliosis, proliferasi vascular dan degenerasi neuronal (NADIS, 2006).

2.8 Uji Laboratoris

Banyak faktor yang perlu diperhatikan dalam memutuskan uji yang akan digunakan. Sensitivitas, spesifitas, waktu dan biaya harus menjadi pertimbangan. RT-PCR umumnya lebih sensitif daripada uji serologis dan kultur. Kombinasi RT-PCR dengan uji serologis umumnya lebih sensitif (Zambon, 2001). Sensitivitas kultur lebih banyak tergantung pada masing-masing laboratorium yang digunakan untuk pemeriksaan. Uji serologis tidak semahal RT-PCR, selain itu uji serologis sangat berguna untuk mendiagnosa pasien yang baru saja terinfeksi, tetapi diagnosa serologis tidak peka untuk deteksi akut. Uji serologis digunakan untuk deteksi antibodi yang spesifik terhadap virus influenza di dalam serum (atau cairan tubuh yang lain), uji ini

dapat mendeteksi total antibodi atau kelas antibodi (IgG, IgA atau IgM). Teknik uji serologis yang berbeda dapat digunakan untuk diagnosa influenza, yaitu antara lain, *hemagglutination inhibition* (HI), *complement fixation* (CF), *enzyme immunoassay* (EIA) dan *indirect immunofluorescent*. Uji laboratoris dengan metode kultur memakan banyak waktu tetapi teknik ini mampu mendiagnosa dalam waktu 48-72 jam.

Teknik *enzyme immunoassay* (EIA) dapat digunakan untuk *bedside testing* sedangkan *direct immunofluorescence* memungkinkan preparasi *slide* pada klinik-klinik. *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*(RT-PCR) digunakan pada laboratorium dengan fasilitas yang dilengkapi untuk pelaksanaan metode tersebut beserta personel yang terlatih. Metode-metode tersebut dapat mendeteksi baik influenza A dan B atau membedakan antara keduanya. Satu-satunya metode yang dapat membedakan diantara beberapa sub tipe berdasarkan hemagglutinin dan neuraminidasenya adalah RT-PCR (Zyl, 2006).

2.9 Diferensial Diagnosis

Penyakit avian influenza harus dibedakan dari penyakit yang memiliki gejala klinis dan patologis yang sama yaitu antara lain pada penyakit *Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease* (VVND), *Mycoplasmosis*, *Acute fowl cholera*, *Infectious laryngotracheitis*, *infectious coryza*, *infectious bronchitis*, *pulmonary aspergillosis*, *chlamydiosis*. Pada umumnya terdapat kesamaan tanda-tanda klinis terutama antara *Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease* (VVND) dan *highly pathogenic avian influenza*(HPAI). Hal ini termasuk pembengkakan kepala dan pial, kematian mendadak, penurunan produksi telur, *nervous*, tanda-tanda yang terjadi pada

enterik dan saluran respiratorius. Lesi meliputi hemoragi dan nekrosis pada saluran gastrointestinal dan saluran respiratorius. Karena HPAI berdampak pada kondisi sosio ekonomik dan kesehatan masyarakat, maka disarankan selalu waspada terhadap gejala-gejala yang menunjukkan gangguan pernafasan, gangguan pada sistem syaraf, diare, penurunan produksi telur dan kematian tinggi pada peternakan (NADIS, 2006).

2.10 Isolasi virus pada Telur Ayam Berembrio (TAB)

Sebagai pengganti hewan percobaan dan perbenihan jaringan dapat digunakan TAB untuk isolasi dan identifikasi dari berbagai virus serta produksi vaksin seperti halnya pada *New Castle Disease*, *Infectious Bronchitis*, *Infectious Laryngotracheitis*, *Avian Influenza*, *Fowl Pox*, *Infectious Bursal Disease* dan *Swine Influenza*. Di dalam TAB, virus dapat hidup pada beberapa bagian dari telur, tergantung dari sifat virus. Umur TAB yang digunakan tergantung pada tempat inokulasi dan sifat virus. Perlu diperhatikan bahwa TAB harus berasal dari induk yang sehat, tidak pernah divaksin dan tidak pernah tertular penyakit atau *specific pathogen free* (SPF). Sebelum TAB diinokulasikan, harus dilakukan pemeriksaan terlebih dahulu untuk mengetahui apakah embrio dalam TAB masih hidup. Hal ini dilakukan dengan cara meneropong telur didepan lampu (*candling*). Pada embrio yang masih hidup, tampak embrio bergerak dan pembuluh darah terlihat dengan jelas, sedangkan pada embrio yang mati, pembuluh darah tidak tampak dengan jelas. Bahan pemeriksaan untuk virus pada umumnya terdapat dalam bentuk cairan tubuh atau jaringan tubuh. Untuk dapat diinokulasikan, virus harus dalam bentuk cairan; oleh karena itu bahan pemeriksaan yang berupa jaringan tubuh harus digerus terlebih dahulu dan supernatannya digunakan sebagai suspensi virus. Untuk pertumbuhan virus pada TAB, maka

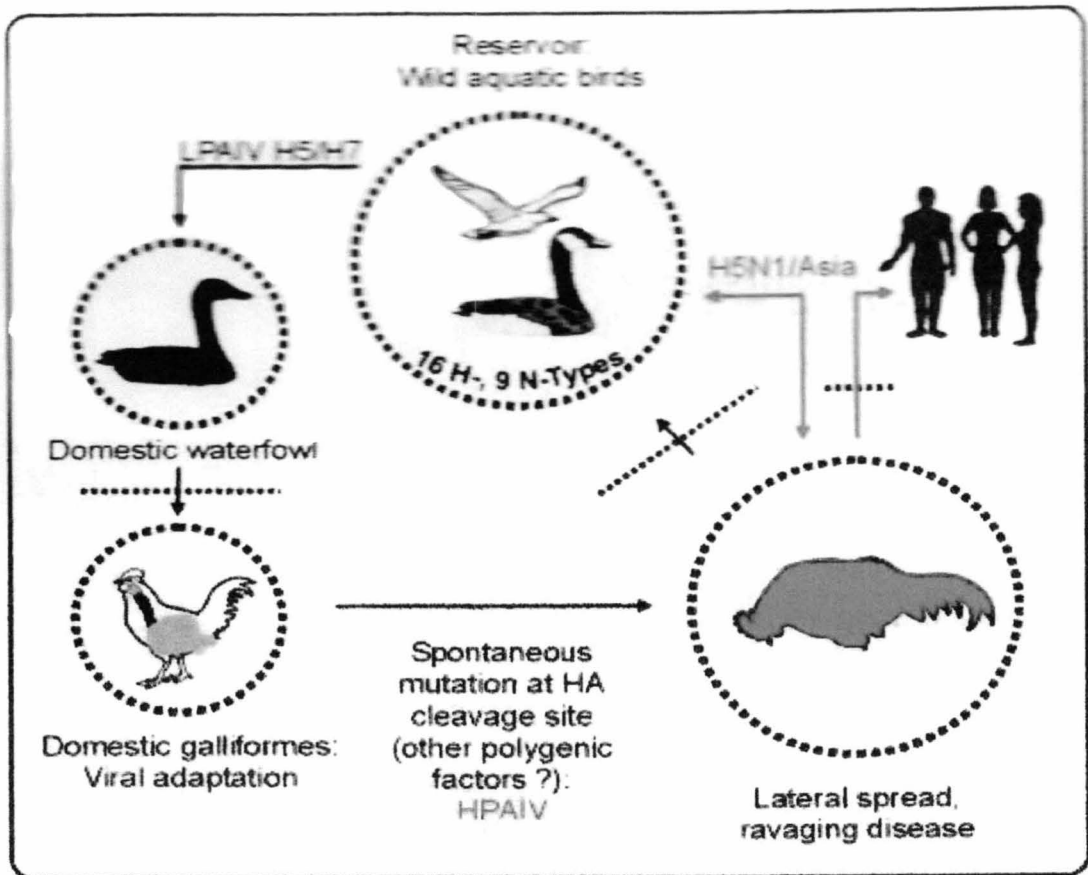
suspensi virus atau suspensi jaringan yang diduga mengandung virus diinokulasikan ke dalam TAB. Rute inokulasi dan jenis virus serta umur embrio sangat menentukan pertumbuhan virus dalam TAB (Ernawati dkk, 2007).

Kebanyakan virus avian influenza dapat tumbuh pada telur ayam berembrio (TAB) sedangkan beberapa virus manusia dan babi tidak dapat tumbuh dengan baik pada telur, terutama apabila diinokulasikan pada cairan alantois (WHO, 2005). Spesimen diinokulasikan pada *amnion cavity* telur ayam berembrio yang berumur 10-12 hari. Virus dapat dipanen 3 hari setelah inkubasi. Isolasi virus pada TAB digunakan untuk memperbanyak virus, cara ini merupakan sistem kultur yang sensitif (Zyl, 2006).

2.11 Transmisi virus AI

Rute penularan AI dapat terjadi secara langsung ataupun tidak langsung. Pada burung, virus avian influenza tersebar melalui rute *fecal-oral*. Virus avian influenza bereplikasi pada jaringan epitel intestinal burung kemudian dikeluarkan melalui kloaka 2-14 hari setelah infeksi (Lu and Castro, 2004). Burung yang terinfeksi mengeluarkan virus melalui fesesnya ke air, hewan-hewan lain akan mengalami infeksi apabila meminum air yang terkontaminasi tersebut (Lai and McPhilips, 1999). Virus cukup stabil di dalam air, tetapi infektivitasnya akan bertahan lebih lama di dalam temperatur yang lebih dingin. Virus aktif dapat hidup kembali setelah 220 hari berada pada suhu 180°C dan setelah 90 hari berada pada suhu 26°C didalam air yang terkontaminasi. Infektifitas berkurang dengan bertambahnya kadar garam dan pH (Stallknecht *et al*, 1990). Pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa virus juga dapat tetap aktif di dalam kolam meskipun membeku selama musim dingin serta dapat

bertindak sebagai sumber penularan pada unggas air (Ito *et al*, 1995). Unggas domestik beresiko tertular apabila menggunakan kolam yang sama dengan unggas air.



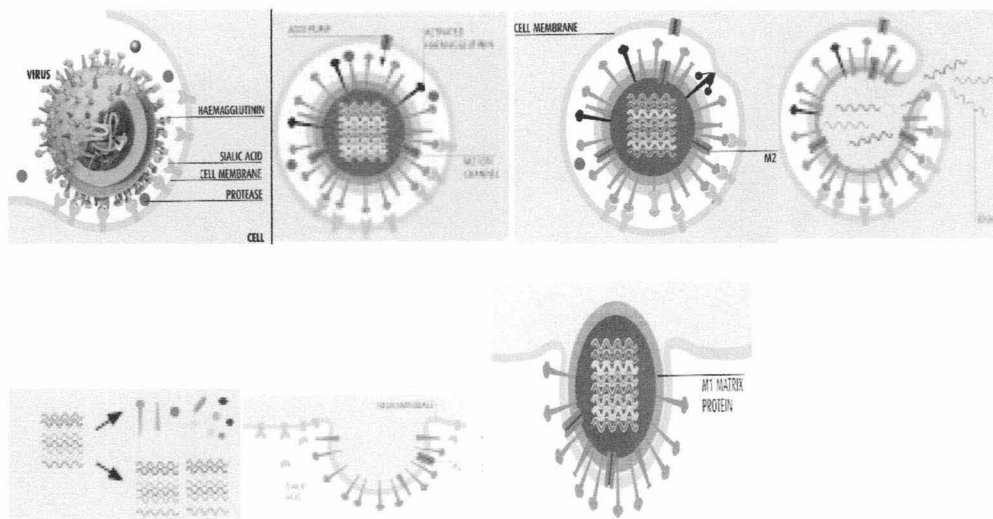
Gambar2.2 Transmisi virus AI

Kontaminasi sumber air juga dapat terjadi melalui tanah yang terkontaminasi, kemudian diserap oleh air tanah sehingga bisa mengenai sumber air atau bisa juga melalui pupuk yang berasal dari kotoran ternak yang terinfeksi. Virus pada kotoran ayam (*Gallus domesticus*) yang terinfeksi menjadi inaktif setelah seminggu karena panas dari proses fermentasi, pH lingkungan, pengeringan atau kombinasi faktor-faktor tersebut diatas. Feses yang mengering kemudian debunya diterbangkan oleh

angin sehingga dapat menginfeksi hewan secara oral dan melalui saluran pernafasan (Clark and Hill, 2006)

2.12 Replikasi virus

Replikasi terjadi melalui serangkaian proses yaitu :



Gambar 2.3 Replikasi virus AI (Mac Kenzie, 2006)

a. Absorpsi virus

Virus influenza berikatan dengan permukaan sel hospes melalui ikatan *sialic acid* host dengan hemagglutinin (HA) virus. Hubungan *sialic acid* dengan *penultimate galactose* $\alpha_{2,3}$ (pada burung) atau $\alpha_{2,6}$ (pada manusia) menentukan spesifitas hospesnya.

b. Masuknya virus

Setelah berikatan, virus ditelan oleh sel melalui reseptor *clathrin-coated* yang memperantarai proses endositosis. Ketika diinternalisasi, molekul *clathrin* dibebaskan kemudian vesikelnya menyelubungi virus sehingga masuk dalam endosom. Isi vesikel dicerna dengan menurunkan pH didalam fagosom.

c. *Uncoating virus*

Penurunan pH berhenti ketika protein M2 menginduksi fusi peptida HA. Fusi HA dengan membran vesikel diikuti dengan pembebasan ribonukleoprotein (RNP) ke sitoplasma. *Influx* ion dari endosom ke partikel virus menyebabkan diskoneksi protein virus yang berbeda. Protein M1 mengalami agregasi, RNP tidak lagi melekat pada kompleks protein M1.

d. Sintesis RNA viral dan protein viral

RNP ditransport menuju nukleus, dimana kompleks polymerase berikatan dengan RNA viral. RNP memecah RNA viral dengan aktivitas endonukleasenya, RNA kemudian mengalami elongasi. Produksi RNA viral dibatasi oleh NP. Keduanya kemudian ditransport menuju sitoplasma dimana protein viral akan diproduksi pada ribosom. Bagian dari mRNA viral dipotong oleh enzim sel sehingga akhirnya protein viral seperti M1 dan NS2 dapat disintesis. Beberapa protein viral yang baru saja disintesis ditransport ke nukleus untuk berikatan dengan RNA viral sehingga membentuk RNP. Protein viral lain yang baru saja disintesis diproses di endoplasmic reticulum dan apparatus golgi untuk proses glikosilasi. Protein-protein tersebut kemudian ditransport ke membran sel dan melekat pada *lipid bilayer*. Apabila protein yang berada pada membran plasma telah mencapai konsentrasi cukup, partikel virus dimunculkan pada membran untuk segera dikeluarkan.

e. Pelepasan virus

Gambar yang dihasilkan dari teknik immunohistologi menunjukkan bahwa foci sel pemroduksi virus berkumpul pada permukaan mukosa saluran penafasan, usus dan lapisan endothelial myocardium dan otak. Didalam

sekresi nasal, jutaan partikel virus dikeluarkan, tiap 0,1 μ l partikel aerosol berisi lebih dari 100 partikel virus (Gurtler, 2006).

2.13 Respons imun

Influenza menyebabkan infeksi akut pada hospes sehingga mengaktifkan sistem imun. Respon yang muncul di awal adalah respon imun alami, termasuk didalamnya pengeluaran sitokin (IFN α/β), *influx* netrofilgranulosit atau sel natural killer (NK) (Mandelboim, 2001). Aktivasi sel bertanggung jawab atas awal munculnya gejala klinis akut. Respon imun alami adalah prasyarat penting untuk membangkitkan respon imun adaptif, pertama, untuk membatasi replikasi virus dan masuknya antigen. Kedua, respon imun adaptif diaktifkan oleh molekul *costimulator* yang diinduksi sel-sel sistem imun alami selama interaksi dengan virus. Virus influenza memberikan sinyal pada protein *non structural 1* (NS1) untuk menghindarkan diri dari respon IFN α/β , selain itu NS1 menyembunyikan RNA virus dengan tujuan menghindarkan pengenalan molekul berbahaya oleh sensor seluler yang dapat memicu pelepasan IFN α/β (Garcia-Sastre *et al*, 2005).

Respons imun adaptif membutuhkan beberapa hari untuk menjadi efektif dalam membantu mengatasi penyebaran virus, mengeradikasi virus dan menimbulkan respon memori pada sel yang terkena sehingga menjadi resisten terhadap infeksi oleh virus yang sama. Proteksi silang dalam beberapa subtipe influenza jarang diamati dan infeksi oleh subtipe lain tidak menginduksi proteksi (Treanor *et al*, 2006). Infeksi influenza menginduksi antibodi sistemik dan lokal (imunitas humoral) dan juga respon sel T sitotoksik (imunitas seluler). Masing-

masing penting untuk penyembuhan dari infeksi akut dan resisten terhadap reinfeksi.

2.14 Hemagglutinin

Haemagglutinin memainkan peran yang penting pada patogenesis influenza. HA adalah salah satu determinan antigenik yang penting yang dapat dikenali oleh *neutralizing antibody* hospes, rentan mengalami pembelahan oleh protease hospes serta menentukan jaringan mana yang bisa digunakan oleh virus influenza untuk bereplikasi. HA adalah polipeptida yang terdiri dari 550 asam amino yang membentuk homotrimer (*spike*) pada eksterior partikel virus influenza. HA yang mulai muncul, langsung menuju membran sel hospes yang terinfeksi, menempel melalui region transmembran dan terminus. Pada saat itu HA disebut HA₀, yaitu HA yang belum mencapai modifikasi akhir yang memiliki kemampuan untuk melakukan aktivitas biologis. Selanjutnya terjadi pembelahan pada region spesifik oleh enzim hospes, menghasilkan 2 subunit, HA₁ dan HA₂, yang dihubungkan jembatan disulfide. Pembelahan HA₀ terjadi didekat tempat masuknya HA pada membran virus (Zambon, 1999).

Ketika HA telah mengalami modifikasi tahap akhir dan digabungkan dalam partikel virus yang baru dirakit, HA sudah dapat difungsikan untuk melekat, masuk dan fusi pada sel hospes. Perlekatan HA pada sel hospes adalah pada residu terminal *sialic acid*. Proses selanjutnya adalah masuk ke dalam sel. Virus yang masuk kedalam endosom, kemudian mengalami asidifikasi oleh *proton pump* sel, pada pH antara 5 sampai 6, selanjutnya protein HA mengalami perubahan konformasi yang *irreversible* sehingga menampakkan terminal N pada domain

HA₂. Dengan ditampakkannya terminal N, protein HA sudah mampu untuk melakukan fusi membran virus dengan membran sel hospes untuk dimulainya aktivasi replikasi virus (Zambon, 1999).

2.15 Vaksin

Beberapa konsep vaksin yang berbeda telah dikembangkan, yaitu antara lain: vaksin virus inaktif, vaksin virus utuh dengan *adjuvant* yang pemberiannya dengan cara disuntikkan dan vaksin virus hidup attenuasi melalui *spray* nasal. Vaksin inaktif homolog, dapat menginduksi perlindungan yang lebih baik tapi tidak dapat membedakan secara serologis vaksin untuk burung yang terinfeksi, sebaliknya vaksin inaktif heterolog dapat digunakan sebagai vaksin *marker* ketika vaksin virus mengekspresikan HA yang sama tetapi dengan subtipe NA yang berbeda, dibandingkan dengan virus lapangan (contohnya vaksin H5N9 vs H5N2 HPAI). Dengan mendeteksi antibodi spesifik subtipe NA, maka vaksin ini dapat membedakan burung yang telah divaksin dan burung yang terinfeksi (Catolii, 2003). Tetapi metode ini kurang sensitif. Teknologi *reverse genetic* akan sangat membantu dalam memproduksi vaksin, baik untuk hewan dan manusia dengan kombinasi HxNy yang diinginkan sesuai latar belakang genetiknya. Saat ini vaksin inaktif heterolog digunakan dilapangan pada daerah yang terkena H5N1 di Asia Tenggara, Mexico, Pakistan dan Italia utara (Swayne *et al*, 2001). Vaksin rekombinan menggunakan virus hidup yang mengekspresikan gen H5 atau H7, karena merupakan vaksin virus hidup, aplikasinya melalui penyemprotan. Penggunaan vaksin rekombinan yang mengekspresikan protein HA atau vaksinasi

DNA menggunakan plasmid yang mengekspresikan HA telah dibuktikan secara eksperimental keberhasilannya (Crawford *et al*, 1999).

Vaksin influenza menggunakan baik virus inaktif ataupun virus hidup yang diatenuasi saat ini sedang dikembangkan. *Seed* virus untuk vaksin inaktif menggunakan subtipe H5, H7 dan H9 (Hehme *et al*, 2005). Menurut hasil pengamatan vaksin inaktif yang menggunakan subtipe H5 dan H9 kurang imunogenik dibandingkan subtipe H1 dan H5.

Beberapa pertimbangan penting untuk perkembangan vaksin mengikuti interaksi antara virus influenza dan hospes. Pertama, virus influenza bereplikasi secara cepat pada sel hospes. Titer puncak tercapai sebelum respons imun diperantarai sel muncul atau sebelum adanya sel-sel memori yang dapat membatasi replikasi. Oleh karena itu tujuan utama vaksinasi influenza adalah meningkatkan pembentukan antibodi yang dapat memperkecil replikasi. Kedua, influenza adalah infeksi saluran pernafasan, antibodi yang diinduksi oleh vaksin dapat membatasi replikasi pada saluran pernafasan bagian atas dan bawah. Pemberian vaksin virus hidup atenuasi secara intranasal dapat menginduksi respons antibodi sistemik dan mukosal. Antibodi mukosal lebih efektif dibandingkan antibodi sistemik, karena dapat membantu membatasi replikasi virus influenza pada traktus respiratorius bagian atas. Sebaliknya pemberian vaksin inaktif parenteral dapat menginduksi antibodi yang bisa membatasi replikasi virus pada saluran pernafasan bagian bawah. Oleh karena itu vaksin inaktif efektif untuk mencegah beberapa penyakit dan komplikasi influenza tetapi tidak seefektif vaksin virus hidup atenuasi dalam memproteksi saluran respiratorius bagian atas.

Ketiga, kemampuan virus untuk menghindarkan diri dari deteksi sistem imun dan kurangnya epitop yang menyimpan HA yang mampu menginduksi antibodi protektif atau *neutralizing antibody* yang mampu bereaksi silang, adalah tantangan tersendiri pada usaha pengembangan vaksin. Keempat, vaksin inaktif dibutuhkan untuk meningkatkan titer antibodi yang protektif pada individu yang belum pernah terinfeksi. Vaksin virus hidup yang diatenuasi lebih efektif dibandingkan vaksin inaktif pada individu yang belum pernah terinfeksi (Subbarao *et al*, 2006).

2.16 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyarilamid Gel Electrophoresis*)

SDS-PAGE dianggap sebagai prosedur yang lebih baik dibanding metode analisis yang terdahulu, karena dapat digunakan untuk memisahkan jenis-jenis protein menurut ukuran serta dapat memperoleh informasi mengenai berat molekul dan komposisi subunit pada suatu kompleks protein (Alberts *et al*, 1994).

Metode ini diperkenalkan pada pertengahan 1960an, bahan yang digunakan adalah gel poliakrilamid dengan strukturnya yang saling silang sebagai matriks lembam yang harus dilalui oleh protein-protein. Gel tersebut biasanya disiapkan langsung sebelum digunakan dengan cara polimerisasi dari monomer-monomernya, ukuran poli gel dapat diatur sedemikian rupa sehingga cukup kecil untuk menghambat migrasi molekul-molekul yang diminati. Protein-protein itu sendiri tidak sekedar dilarutkan dalam air tetapi dicampur dengan semacam detergen yang bermuatan sangat negatif, yaitu natrium dodecil sulfat atau SDS, karena detergen ini mengikatkan diri dengan bagian-bagian yang hidrofobik pada molekul-molekul protein, sehingga protein-protein tersebut menguraikan lipatan-

lipatannya menjadi rantai-rantai polipeptida yang memanjang, maka setiap molekul protein terbebas dari molekul-molekul lipid dan membuatnya larut secara bebas dalam larutan detergen (Alberts *et al*, 1994).

Molekul-molekul protein bermigrasi kearah elektroda positif apabila mengalami tegangan listrik. Protein-protein lebih besar, dengan muatan yang juga lebih besar akan mengalami gaya listrik yang lebih besar sekaligus gaya tarik yang lebih besar pula, Di dalam jalinan gel poliakrilamid yang bertindak sebagai penyaring molekul, protein-protein besar mengalami hambatan yang jauh lebih besar dibandingkan protein-protein kecil, akibatnya dalam suatu campuran yang kompleks protein-protein saling terpisah membentuk pita-pita yang tersusun menurut berat molekul setiap protein (Alberts *et al*, 1994).

2.17 Western Blotting

Metode ini dilakukan setelah semua protein yang terpisah-pisah dalam gel poliakrilamid dipindahkan pada sehelai kertas nitroselulosa (dengan cara *blotting*). Sebuah protein tertentu dapat diidentifikasi pada gel semacam itu dengan mencampur semua protein dengan antibodi yang digandengkan dengan isotop radioaktif, dengan enzim atau zat warna berpendar. Protein-protein yang besar dengan mudah dapat terdeteksi melauai pewarnaan gel dengan zat warna biru Coomasie, sedangkan protein-protein kecil dideteksi melauai perlakuan dengan zat warna perak (Alberts *et al*, 1994).

2.18 Indirect ELISA

Model ini banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini sudah banyak dipasarkan dan mudah dibeli dipasaran. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi hanya saja dari segi biaya sedikit lebih besar. Hal ini disebabkan karena model ini memerlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti immunoglobulin yang akan dideteksi. Misalnya yang akan dideteksi adalah IgG maka diperlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti IgG. Hasil dari uji ini lebih spesifik dibandingkan dengan *direct* ELISA. Model ini sering digunakan secara rutin untuk diagnosis antigen maupun antibodi (Rantam, 2003).

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

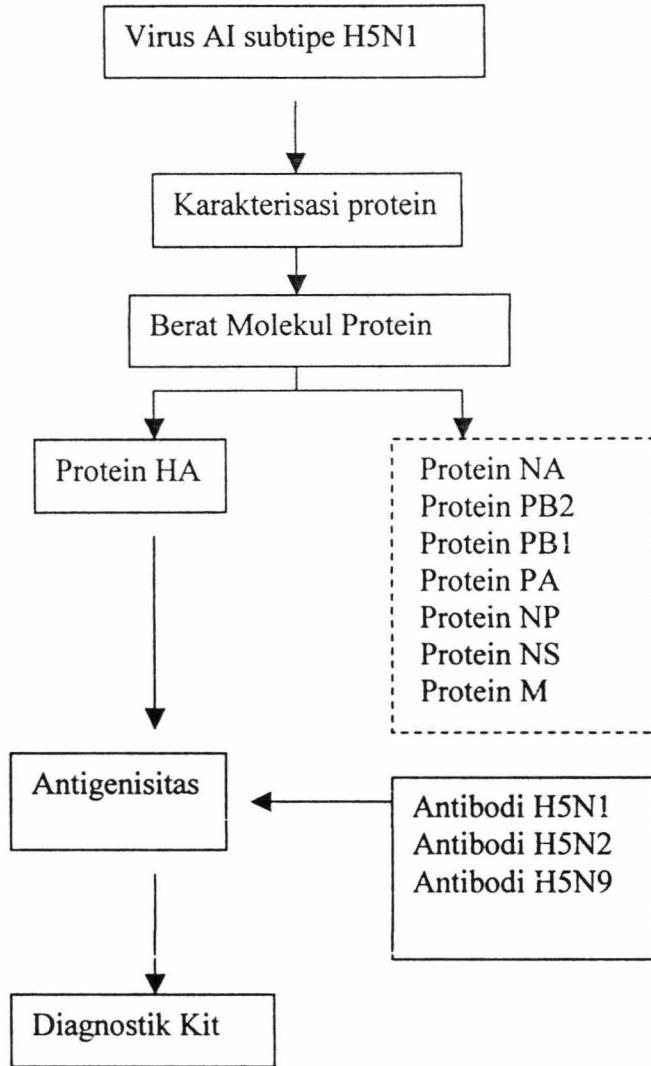
BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN****3.1 Kerangka Konseptual**

Sejak tahun 2003 virus AI sub tipe H5N1 menjadi wabah pada perunggasan di Asia Tenggara. Virus AI merupakan virus influenza tipe A yang berasal dari *family Orthomyxoviridae*, determinan antigenik virus tersebut adalah protein hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Berdasarkan antigenisitas kedua protein tersebut, didapatkan 16 sub tipe protein HA yang berbeda dan juga 9 sub tipe protein NA yang berbeda. Virus AI sub tipe H5N1 merupakan virus yang tergolong *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang dapat menimbulkan kematian sampai dengan 100%. Deteksi dini antigen ataupun antibodi dari sub tipe tersebut akan memberikan kontribusi penting dalam penanggulangan penyakit AI. Karakterisasi protein dan beberapa metode untuk menentukan antigenisitas protein yang akan digunakan sebagai kandidat antigen diagnostik sangat perlu dilakukan. Protein HA yang merupakan reseptor virus yang mampu berikatan dengan *sialic acid* sel hospes serta menginduksi masuknya permukaan virus pada membran sel hospes, merupakan suatu determinan antigenik yang penting yang dapat dikenali oleh *neutralizing antibody* sel hospes. Protein HA memiliki potensi untuk dijadikan antigen diagnostik, menggunakan teknik ELISA, kemampuannya dapat dibuktikan bahwa protein HA mampu untuk mendeteksi antibodi dan reaksi silang pada HA sub tipe lain.

Tahapan awal isolasi protein HA adalah karakterisasi virus AI sub tipe H5N1 menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memisahkan protein virus berdasarkan berat molekulnya, selanjutnya Western Blotting untuk menentukan antigenisitas

protein HA, dan yang terakhir adalah teknik *indirect* ELISA untuk menguji antigenisitas antara protein HA dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan H5N9. Mengingat banyaknya subtipe pada virus AI diharapkan protein HA dapat menjadi antigen diagnostik yang memiliki jangkauan luas dalam mengenali antibodi-antibodi dari subtipe lain.

3.2 Alur Kerangka Konseptual



Keterangan : _____ dilakukan
 - - - - - tidak dilakukan

Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

BAB 4
MATERI DAN METODE

BAB 4**MATERI DAN METODE****4.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris yang bertujuan guna mendapatkan protein antigenik dengan cara melakukan isolasi dan karakterisasi protein hemaglutinin serta untuk mengetahui antigenisitas antara protein hemaglutinin virus AI subtipe H5N1 dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9.

4.2 Definisi Operasional Penelitian**a. Virus AI subtipe H5N1**

Virus AI tergolong virus ssRNA yang termasuk kedalam *family Orthomyxoviridae*. Virus AI adalah penyebab influenza pada berbagai spesies unggas dan mamalia termasuk manusia.

b. Protein HA

HA adalah salah satu determinan antigenik yang penting yang dapat dikenali oleh *neutralizing antibody* hospes. Protein HA bertindak sebagai reseptor yang berikatan dengan sialic acid (*N-acetyl-neuraminic-acid*) dan menginduksi masuknya permukaan virus pada saat fusi dengan membran sel.

c. Antibodi anti H5N1

Antibodi ini dibuat dengan cara menyuntikkan suspensi virus AI subtipe H5N1 pada kelinci, antibodi anti H5N1 merupakan antibodi poliklonal yaitu antibodi yang tidak spesifik terhadap satu macam epitop.

d. Antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9

Antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 diperoleh dari hasil vaksinasi pada itik yang divaksin dengan menggunakan vaksin virus AI subtipe H5N1, H5N2 dan H5N9.

4.3 Prosedur pengumpulan data

Pengumpulan dan pencatatan data dilakukan pada saat perbanyakan virus pada TAB, uji HA, pengukuran titer virus, pembuatan antibodi anti H5N1 dan penghitungan kadar protein. Pada isolasi dan karakterisasi protein hemaglutinin hasilnya dinyatakan dalam Berat Molekul (BM), sedangkan hasil dari ELISA yang didapatkan dinyatakan berupa nilai *Optical Density* (OD).

4.4 Sampel virus

Virus AI subtipe H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Virologi dan Imunologi, Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Virus berasal dari *swab tracheal* dan cloacal atau internal organ (paru, trachea, limpa, ginjal, otak atau pankreas) dari wabah AI di Blitar tersebut, diisolasi pada telur ayam berembrio (TAB) dan telur itik berembrio (TIB) dengan pengamatan selama tujuh hari. Setelah pengamatan selesai, baik TAB dan TIB yang mati atau tetap hidup selama pengamatan diuji melawan antibodi anti-H5N1 dengan uji HI. Cairan alantois dari TAB dan TIB yang positif terdapat virus AI kemudian dipanen dan disimpan dalam 4°C sampai digunakan peneliti.

4.5 Waktu dan tempat penelitian

4.5.1 Tempat penelitian

Karakterisasi protein hemagglutinin virus AI subtipe H5N1 dilakukan di *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga. Uji antigenisitas antara protein hemagglutinin dan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 menggunakan teknik ELISA dilakukan di Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan April-Agustus 2008, meliputi :

1. Perbanyak virus : 1 bulan
2. Pembuatan antibodi poliklonal : 1,5 bulan
3. Karakterisasi protein virus : 2 bulan
4. Tes antigenisitas : 2 hari

4.6 Bahan Penelitian

Telur Ayam Berembrio (TAB) berumur 10 hari, selotip, suspensi protein hemagglutinin virus AI subtipe H5N1 dan virus AI subtipe H5N1 (BI/Ind/03), PZ, eritrosit ayam 0,5%, Triton X-100 2%, asam sitrat 2,5% pH 4, *Bis-acrylamid*, Tris, SDS, Temed, Ammonium persulfat, Glycerol, Glycine, *Coomasie Brilliant Blue*, *Marker* protein (produksi Fermentas), Asam sitrat 10%. Membran nitroselulose, *Marker* Rainbow (produksi Fermentas), Kertas *Whatman*, Glycine, TBS Tween 0,05%, *Bovine Serum Albumin*, Antibodi polivalen, *konjugat anti-itik IgG Alkalin phosphatase*, *konjugat anti-rabbit IgG Alkalin phosphatase* Substrat p-NPP, western blue, 0,05M Sodium Acetat Buffer, H₂O₂, *complete freund adjuvant* dan *incomplete*

4.7 Alat Penelitian

Lampu peneropong, pensil, bor, *sput*, almari es, *incubator*, *Microplate* bentuk (v) atau (u), *yellow tip*, Spektrofotometer UV-1601 merek Shimatsu, *Incubator shaker*, Ultracentrifus merek Beckman TMLE-80K produksi AS, *Waterbath*, *Refrigerated centrifuge* merek Hitachi tipe Himac SCR 20 B, *Ultrasonic homogenizer* tipe 4710 series, produksi Cole-Parmer instrument Co. Chicago Illinois, *Shaker* model VRN-2000, Cetakan dan *chamber* untuk SDS merek Biometra, *Power supply* merek Bio-Rad, *Shaker* GFL, *Blotter* merek Biometra, *Cutter*, Plastik selofan.

4.8 Hewan Coba

Kelinci berumur 5 bulan sebanyak 3 ekor, dengan rincian, kelinci jantan sebanyak 1 ekor dan kelinci betina sebanyak 2 ekor. Kelinci tersebut diperoleh dari pasar di jalan Semarang, Surabaya.

4.9 Perbanyakkan virus AI pada TAB

Umur TAB yang digunakan adalah yang berumur 10 hari, dengan bantuan lampu peneropong, antara ruang hawa dan isi telur diberi tanda menggunakan pensil. Kulit telur pada daerah ruang hawa (3-5 mm dari tanda batas ruang hawa) dibuat lubang dengan bor/paku. Melalui lubang paku, jarum spuit dimasukkan sedalam ± 1 cm sejajar sumbu panjang telur, kemudian suspensi virus AI (Bl/Ind/03, berasal dari Blitar) disuntikkan pada cairan allantois sebanyak 0,1 ml, setelah disuntik, lubang paku ditutup dengan selotip. Telur dieramkan pada suhu 37°C selama 48 jam atau lebih dengan posisi vertical (ruang hawa sebelah atas). Pengamatan dilakukan setiap hari, apabila embrio mati lebih dari 24 jam atau jika terdapat embrio yang masih

hidup sampai akhir pengamatan, maka telur dimasukkan dalam almari es untuk pengamatan, selanjutnya daerah ruang hawa dipecah untuk melakukan pengujian terhadap cairan alantois.

4.10 Uji HA

Untuk mengetahui titer virus dilakukan uji hemagglutinasi (HA), tiap-tiap lubang *microplate* diisi dengan 0,025 ml PZ mulai dari lubang 1-6 dari baris 1-4, kemudian diisi dengan virus AI subtype H5N1 0,025 ml, selanjutnya antigen dan PZ dicampurkan menggunakan pipet, setelah itu dipindahkan ke baris selanjutnya, Proses pencampuran dilakukan dengan cara yang sama seperti pada baris pertama sampai baris ke empat. Selanjutnya semua lubang diisi dengan PZ 0,025 ml. Terakhir, semua lubang diisi dengan 0,05 ml eritrosit ayam 0,5%. *Microplate* diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit. Hasil aglutinasi sempurna (100%) apabila aglutinasi terlihat jelas berupa lapisan eritrosit secara merata (*diffuse*) pada dasar sumuran dan penjernihan dari cairan bagian atas tanpa terjadinya pengendapan eritrosit berbentuk titik ditengah sumuran, kemudian dilakukan pembacaan titer. Titer antigen adalah jumlah terkecil dari pengenceran tertinggi yang masih mampu menunjukkan reaksi aglutinasi.

4.11 Pengukuran titer virus

Masing-masing dari 10 buah tabung *venoject* diisi dengan PZ yang mengandung antibiotik yaitu Penicillin dan Streptomycin sebanyak 4,5 ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran virus dengan cara mengambil 0,5 ml larutan virus, lalu dimasukkan kedalam tabung 1 yang berisi 4,5 ml PZ dan antibiotik, suspensi

virus didalam larutan PZ yang mengandung antibiotik dihomogenisasikan menggunakan *vortex mixer*, selanjutnya diambil 0,5 ml dari tabung 1 kemudian dimasukkan kedalam tabung 2 dan dihomogenisasikan, cara yang sama dilakukan seperti di atas, pada tabung 3 hingga 10.

Tiap-tiap tabung pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} diambil 0,1 ml lalu diinokulasikan pada cairan alantois TAB. Masing-masing pengenceran menggunakan 5 butir TAB, sehingga untuk 10 pengenceran dibutuhkan 50 butir TAB. Pengamatan terhadap TAB dilakukan setiap hari, meliputi pengamatan TAB yang mati ataupun yang hidup. Embrio yang mati dimasukkan kedalam lemari es. Di akhir pengamatan, embrio yang masih hidup dimasukkan ke dalam lemari es untuk mematikan embrio yang masih hidup. Setelah itu dilakukan uji serologis dengan menggunakan uji HA untuk mengetahui apakah embrio terinfeksi virus AI H5N1 dengan melihat adanya reaksi agluinasi. Hasil uji HA digunakan untuk menghitung titer virus (EID_{50}) dengan metode Reed and Muench.

4.12 Pembuatan vaksin inaktif virus AI subtipe H5N1

Virus AI subtipe H5N1 diinaktivasi terlebih dahulu menggunakan formalin 0,1%. Suspensi virus diambil sebanyak 3 ml, kemudian ditambahkan *complete freund adjuvant* (CFA) dalam jumlah yang sama banyak, kemudian divortex selama 30 menit. Untuk penyuntikkan kedua dan selanjutnya menggunakan *incomplete freund adjuvane* (IFA).

4.13 Pembuatan antibodi anti H5N1 virus AI

Antibodi anti H5N1 dibuat dengan cara menyuntikkan suspensi virus AI sub tipe H5N1 dengan dosis 1 cc secara *sub cutan* pada kelinci sebanyak 3 kali dengan interval waktu 2 minggu. Pemanenan dilakukan 2 minggu setelah penyuntikkan terakhir. Pengambilan darah dilakukan melalui *vena auricularis* sebanyak 5 ml. Darah selanjutnya disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 1500 rpm, kemudian serum yang terkumpul disimpan di *freezer*.

4.14 Persiapan sampel protein

Protein yang telah terpresipitasi diambil 100µl, kemudian dicampur dengan RSB (*Reducing Sample Buffer*) sebanyak 100µl, ke dalam *eppendorf*. RSB mengandung indikator. Selanjutnya dilakukan denaturasi protein dengan cara memanaskan campuran tersebut pada suhu 42°C selama 1 jam.

4.15 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamid Gel Electrophoresis*)

a. Mencetak *separating/main gel*

Langkah awal membuat *running gel* 12% yaitu dengan mencampurkan: *akrilamid*, *Tris HCl* pH 8,8, SDS 10%, *aquadest*, *temed*, APS 10% sampai homogen. Campuran dituang dalam *plate* yang sebelumnya telah disiapkan. Dibiarkan selama 25 menit hingga terbentuk gel.

b. Membuat *stacking gel*

Membuat *stacking gel* 12% dengan menambahkan: *akrilamid*, 1M *tris HCl* pH 6,8, SDS 10%, *aquadest*, *temed*, APS 10%. Kemudian *stacking gel* tersebut dimasukkan dalam cetakan *running gel* sampai penuh. *Comb* dimasukkan

kedalam *stacking gel* dan diinkubasikan selama 25 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* memadat. Langkah terakhir yaitu *comb* dilepaskan dan dibersihkan, serta *stacking gel* dicuci dengan *Electrophoresis buffer* satu kali.

c. *Electrophoresis*

Tahap ini dimulai dengan memasukkan agar *comb* kedalam bio rad lalu dituangi *Electrophoresis buffer*. Sampel dan marker yang telah dibuat dimasukkan dalam lubang gel *comb* dan gelembung udara dihilangkan. Anoda dihubungkan dengan reservoir bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir atas, *power supply* dihidupkan pada 125V, arus listrik sebesar 40mA tiap gelnya. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru dari penanda $\pm 0,5$ cm dari batas bawah plat gel.

d. Pewarnaan dan pencucian gel

Pewarnaan (*staining*) gel dilakukan dengan merendam gel dalam larutan untuk *staining* yang terdiri atas campuran *commasie brilliant blue R-250*, *methanol* 50%, *acetic acid glacial* 10% dan *aquadest*, selama 1 jam. Selanjutnya penghilangan warna (*destaining*) dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *acetic acid* 10% selama 1 hari.

4.16 Western Blotting

a. Semi dry electrophoresis

Pertama-tama hasil SDS-PAGE tanpa dilakukan pencucian dan pewarnaan ditransfer ke membran nitroselulosa. Cara mentransfer dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap pertama yaitu dengan cara memotong kertas *Whatman* dan membran nitroselulosa sama besar dengan gel, kemudian merendamnya

selama kurang lebih 40 menit dalam *transfer buffer*, yang dibuat dengan cara mencampurkan *tris*, *glysin*, *methanol* dan *aquadest*. Tahap kedua pada anode *elektroblotting transfer apparatus* diletakkan secara berturut-turut, 5 lembar kertas *Whatman*, 1 lembar membran nitroselulosa, gel, 1 lembar membran nitroselulosa, 5 lembar kertas *Whatman*. Setelah tersusun rapi dan dipastikan sudah tidak terdapat gelembung udara, dilanjutkan dengan memasang katode dan menghubungkannya dengan aliran listrik dengan voltase kurang atau sama dengan 125 volt, 40mA selama 1-2 jam. Tahap akhir mengambil membran nitroselulosa dari alat tersebut.

b. Immunoblotting

Diawali dengan mencuci membran nitroselulosa kedalam larutan *Trans Buffer Salin* dan 0,05% *Tween 20*, yang dibuat dengan cara mencampurkan *Tris* dan 0,05% *Tween 20*, dengan pH 7,4. Pencucian dilakukan sebanyak 5 kali, masing-masing 10 menit. Kemudian untuk memblok protein yang tidak spesifik, membran nitroselulosa dimasukkan dalam larutan *Trans Buffer Salin* (TBS) 0,05% ditambah *Bovine Serum Albumin* (BSA) 10% selama 1 jam pada temperature ruangan. Setelah itu dilakukan pencucian dengan TBS dan 0,05% *Tween 20* sebanyak 5 kali masing-masing 10 menit. Langkah selanjutnya memasukkan membran nitroselulosa dalam larutan antibodi primer (serum kelinci yang mengandung antibodi terhadap virus AI sub tipe H5N1) dalam TBS dan BSA 1% dengan perbandingan 1:100, inkubasi selama 1 jam pada temperatur ruangan. Setelah itu dilakukan pencucian dengan TBS dan 0,05% *Tween 20*, sebanyak 5 kali masing-masing selama 10 menit. Tahap berikutnya membran nitroselulosa dimasukkan dalam larutan antibodi sekunder *IgG (anti)*

rabbit berlabel alkalin phosphatase (konjugat), dalam TBS dan BSA 1% dengan perbandingan 1:1000 selama 1 jam dalam temperatur ruangan, selanjutnya mencuci membran nitroselulosa dengan larutan TBS dan 0,05% Tween 20 selama 10 menit sebanyak 5 kali. Tahap akhir adalah pewarnaan penambahan substrat *western blue* sebanyak 10 cc, kemudian diletakkan pada *shaker* sampai terlihat pita (*band*). Reaksi dihentikan dengan mencelupkan membrane nitroselulosa kedalam *aquadest*. Hasil proses ini sudah dapat untuk menentukan protein yang antigenik.

4.17 Penghitungan berat molekul antigen protein

Berat molekul antigen protein dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari marker dan masing-masing pita (*band*), dengan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat asal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat asal}}$$

Selanjutnya kurva standar dibuat dengan menentukan Rf pada garis x dan log marker pada garis y. Berat molekul protein ditentukan dengan cara mengkonversikan data nilai Rf dan berat molekul protein standar.

4.18 Elusi

Dari elektroforesis (seperti dalam rangkaian SDS-PAGE) akan diperoleh hasil gambaran protein berupa *band* yang mempunyai berat molekul tertentu. *Band* yang muncul di semua reaksi protein antigenik dengan antibodi poliklonal, dipotong dan dielusi. Hasilnya ialah protein yang mempunyai berat molekul sesuai yang dikehendaki.

4.19 Indirect ELISA

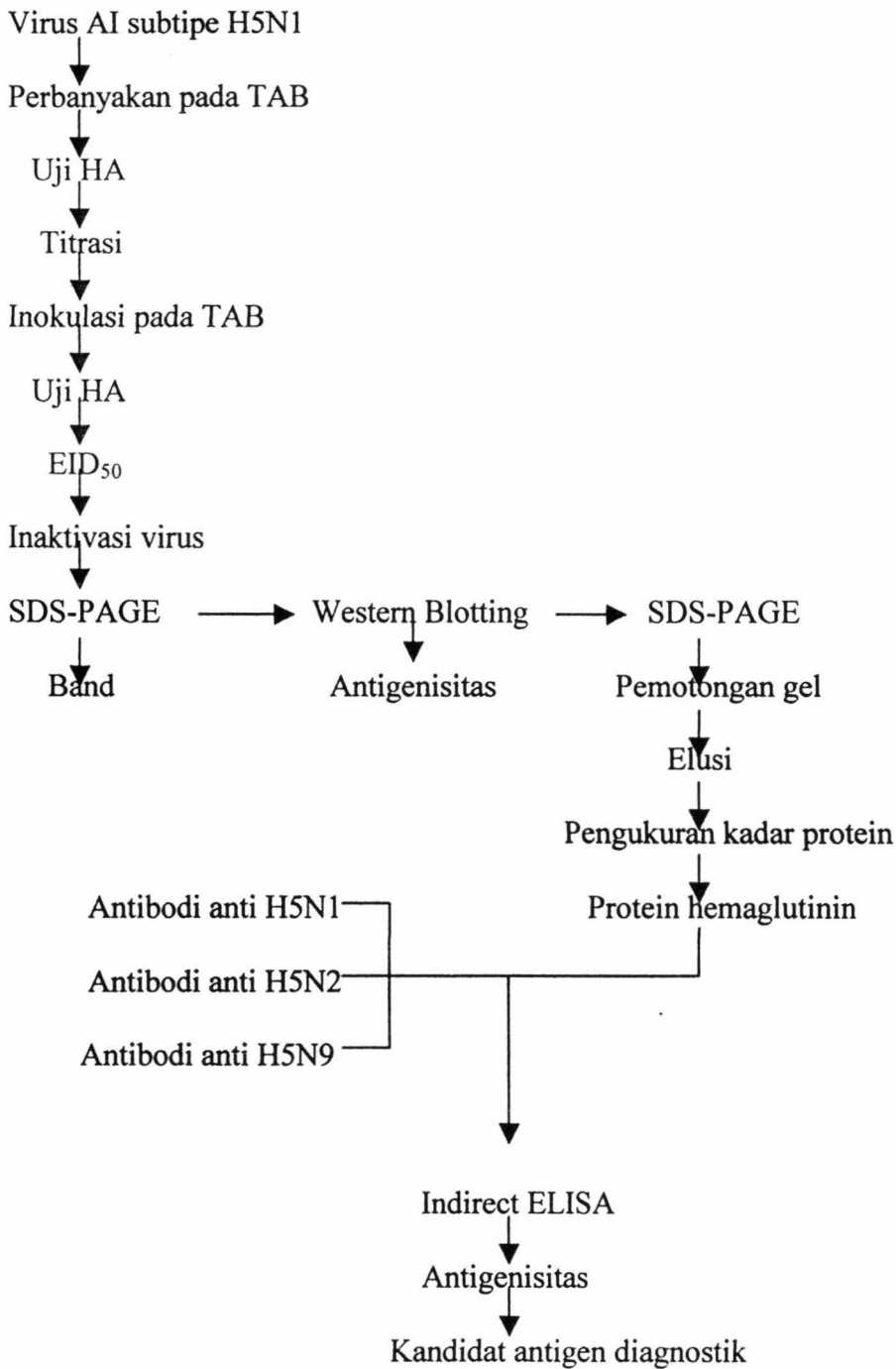
Teknik ELISA diawali dengan melakukan *coating* antigen. Antigen yang digunakan adalah protein HA sebanyak 47 µg/ml. Pertama-tama, antigen yang telah diencerkan didalam 5 ml *buffer coating*, dimasukkan sebanyak 100µl ke dalam tiap sumuran *microplate* selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C (dalam lemari es selama satu malam). Keesokan harinya, *microplate* dikeluarkan dari lemari es untuk kemudian dicuci menggunakan *buffer washing* sebanyak tiga kali dengan cara mengisikan 200 µl pada tiap sumurannya. Setelah tahap pencucian, tiap sumuran *microplate* diisi dengan *Blocking Buffer* 4% selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, isi mikroplate dibuang dan dicuci dengan *buffer washing* sebanyak 3 kali.

Proses selanjutnya adalah penambahan antibodi anti H5N1 sebanyak 100µl yang telah diencerkan 1:100 pada sumuran A1-A5 dan E1-E5, antibodi anti H5N2 pada sumuran B1-B5 dan F1-F5, antibodi anti H5N9 pada sumuran C1-C5 dan G1-G5, kontrol pada sumuran D1-D5 dan H1-H5. PBS pada A6-H6, kemudian *microplate* diinkubasi selama 1 jam. Setelah itu dicuci dengan *buffer washing* sebanyak 3 kali. *Konjugat anti-chicken IgG Alkalin phosphatase* dengan konsentrasi 1/4000 ditambahkan ke dalam 10 ml *blocking buffer* 4% selanjutnya diisikan pada tiap sumuran sebanyak 100 µl. *Microplate* kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Tahapan akhirnya adalah melarutkan substrat p-NPP dengan *buffer substrat* kemudian diisikan pada tiap sumuran *microplate* sebanyak 100 µl. *Microplate* diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit, tiap 5 menit dilihat perubahannya. Hasil dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 415nm.

4.20 Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian observasional laboratorik. Data dari hasil isolasi dan karakterisasi protein melalui SDS-PAGE dan Western blotting dianalisis menggunakan regresi, dengan cara menghitung nilai *Retardation factor* (Rf) dan mencari persamaan garis untuk menghitung berat molekul protein AI subtipe H5N1, sedangkan data ELISA dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan nilai rata-rata OD protein hemagglutinin dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9, *post hoc* HSD digunakan untuk mengetahui notasi kekuatan antibodi ketika berikatan dengan protein antigenik.

4.1 Skema Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Skema Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5 **ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN**

BAB 5**ANALISIS DAN HASIL PENELITIAN****5.1 Data Penelitian**

Pencatatan data penelitian disusun sebagai berikut:

Tahap pertama adalah perbanyak virus dengan cara menginokulasikan virus AI sub tipe H5N1 (BI/Ind/03) pada TAB, setelah embrio pada TAB mati, cairan alantoisnya diuji HA untuk mengetahui titer virus tertinggi. Titer tertinggi dititrasi dalam beberapa pengenceran, kemudian tiap-tiap pengenceran diinokulasikan pada TAB, dalam beberapa hari embrio didalam TAB akan mati, cairan alantoisnya diuji kembali menggunakan uji HA, hasil yang diperoleh digunakan untuk mengetahui *egg infective dose 50* (EID₅₀) menggunakan metode penghitungan Reed and Muench.

Tahap kedua adalah pembuatan antibodi poliklonal. Stok virus titer tertinggi diinaktivasi terlebih dahulu dan ditambahkan adjuvan, setelah itu disuntikkan pada kelinci sebanyak 3 kali interval 2 minggu, 2 minggu setelah penyuntikkan terakhir, dilakukan pengambilan darah untuk memperoleh serumnya.

Tahap ketiga adalah karakterisasi protein virus menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul protein serta metode Western Blotting untuk mengkarakterisasi protein antigenik.

Tahap kelima adalah menguji antigenisitas antara protein HA dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N3, menggunakan metode *indirect* ELISA.

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

5.2.1 Perbanyak virus AI sub tipe H5N1

Untuk mendapatkan sediaan virus dalam jumlah yang cukup peneliti melakukan perbanyak virus AI sub tipe H5N1 (BI/Ind/03) pada media TAB. Virus diinokulasikan sebanyak 0,1 ml. Pasca inokulasi virus, perkembangan hidup dan mati embrio yang terdapat dalam TAB harus diamati setiap harinya. Dalam waktu kurang dari 4 hari, embrio yang terdapat didalam TAB sudah mati sehingga cairan alantoisnya dapat digunakan untuk uji HA. Uji HA adalah metode untuk mengukur titer virus yang memiliki hemaglutinin sehingga apabila direaksikan dengan eritrosit akan terjadi hemaglutinasi. Dari hasil uji HA pada cairan alantois TAB didapatkan titer tertinggi 2^8 . Langkah selanjutnya adalah melakukan titrasi dari stok virus titer tertinggi yang telah didapatkan, dengan beberapa pengenceran yaitu mulai dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-10} . Masing-masing pengenceran diinokulasikan sebanyak 0,1 ml pada TAB. Sehari setelah inokulasi, dilakukan *candling* untuk mengamati hidup matinya embrio. Pada hari pertama setelah inokulasi, diketahui bahwa TAB yang diinokulasi virus dengan pengenceran 10^{-1} telah mati semua. Pada hari kedua, embrio yang mati adalah pada TAB yang diinokulasi virus dengan pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} ; 10^{-4} dan sebagian 10^{-5} . Pada hari ketiga yang mati adalah embrio pada TAB dengan pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan sebagian 10^{-5} sedangkan sisanya yaitu 10^{-9} , 10^{-10} pada hari keempat. Dilakukan uji HA kembali pada masing-masing pengenceran, selanjutnya hasil yang didapatkan digunakan untuk menghitung *egg infective dose 50* (EID_{50}), menggunakan metode Reed and Muench didapatkan hasil sebesar $10^{8,5}$ EID_{50} . Dilakukan pemanenan pada TAB yang memiliki titer tertinggi dan digunakan sebagai stok virus.

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan *Egg Infective Dose*₅₀ (EID₅₀) virus AI subtype H5N1

Pengenceran Virus	HA(+)	HA (-)	Σ (+)	Σ (-)	Rasio (+)	%
10 ⁻¹	5	0	35	0	35/35	100
10 ⁻²	5	0	30	0	30/30	100
10 ⁻³	5	0	25	0	25/25	100
10 ⁻⁴	5	0	20	0	20/20	100
10 ⁻⁵	5	0	15	0	15/15	100
10 ⁻⁶	5	0	10	0	10/10	100
10 ⁻⁷	3	2	5	2	5/7	71,4
10 ⁻⁸	2	3	2	5	2/7	28,6
10 ⁻⁹	0	5	0	10	0/10	0
10 ⁻¹⁰	0	5	0	15	0/15	0

$$PD = \frac{71,4 - 50}{71,4 - 28,6}$$

$$= 0,5$$

Keterangan:

PD : *Proportional Distance*DEP : *Dilution End Point*

$$50\% \text{ DEP} = 10^{-7-0,5} = 10^{-7,5}$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-7,5} \times 10^{-1} \text{ ml} = 10^{-8,5}$$

$$\text{Titer } 10^{8,5} \text{ EID}_{50}/\text{ml}$$

5.2.2 Pembuatan antibodi poliklonal

Untuk membuat antibodi poliklonal yang akan digunakan pada saat pengerjaan Western Blotting, peneliti terlebih dahulu harus melakukan inaktivasi stok virus dengan menambahkan formalin 0,1%, selanjutnya stok virus yang telah diinaktivasi

ditambahkan *complete freund adjuvan* dalam jumlah yang sama banyak, kemudian *divortex* selama 30 menit, untuk menghasilkan vaksin inaktif. Vaksin diaplikasikan secara intramuscular sebanyak 1 ml, 2 minggu kemudian *dibooster* menggunakan *incomplete freund adjuvan*, dilakukan *booster* 2 kali, 2 minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah. Darah yang telah membeku disentrifus dengan kecepatan 1500rpm selama 10 menit untuk memisahkan sel darah dan serumnya. Serum yang didapatkan sebanyak 15 ml tersebut mengandung antibodi anti H5N1, serum kemudian disimpan di *freezer*.

5.2.3 Hasil SDS-PAGE

Dari hasil karakterisasi protein menggunakan metode SDS-PAGE didapatkan protein virus AI sub tipe H5N1 dengan berat molekul 78kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 37,6 kDa; 27,9 kDa dan 16,9 kDa.

Berat molekul antigen dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita (*band*) dengan rumus seperti dibawah :

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

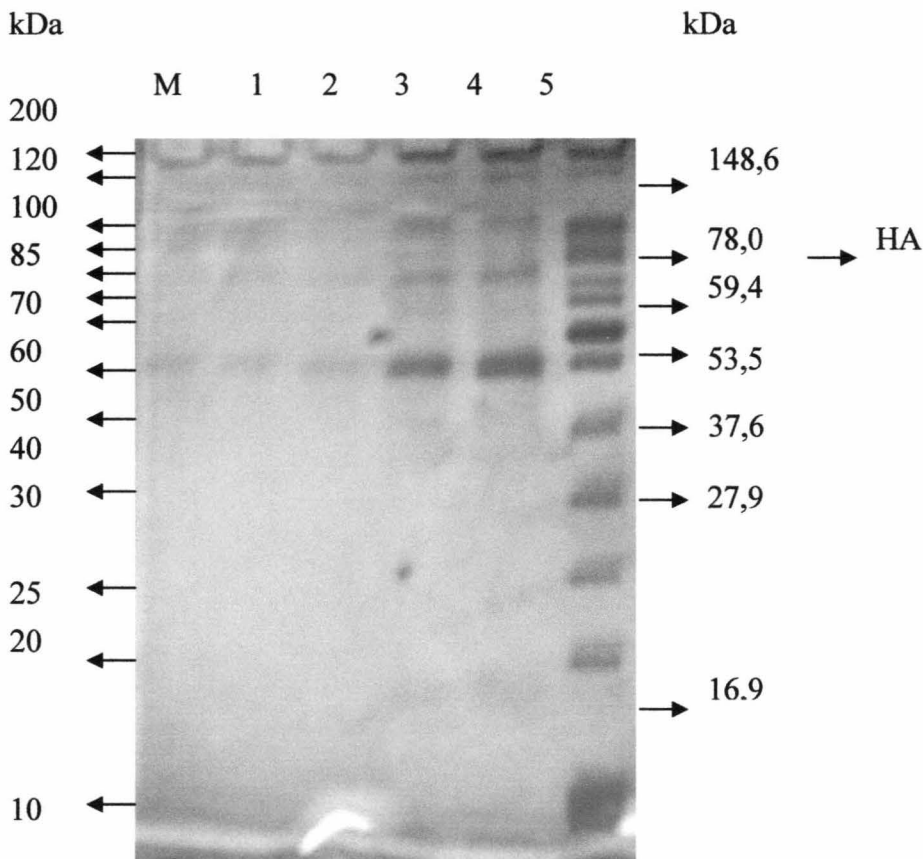
Dan dari koefisien regresi untuk mendapatkan persamaan garis:

$$Y=5,663-5,867x + 8,985x^2 - 4,993x^3$$

Dari hasil Rf dan persamaan garis tersebut diatas dapat digunakan untuk menghitung berat molekul sampel yang hasilnya dapat dilihat pada tabel dibawah ini

Tabel 5.2 Nilai Rf(x) dan Berat Molekul (log y Da) Sampel

Jarak sampel	Rf	log y Da	y Da	y kDa
10,0	0,088	5,211	162554,8	162,6
19,5	0,173	4,892	77983,0	78,0
24,0	0,212	4,774	59429,2	59,4
26,0	0,230	4,728	53456,4	53,5
34,0	0,301	4,575	37583,7	37,6
44,0	0,389	4,446	27925,4	27,9
82,0	0,726	4,229	16943,3	16,9

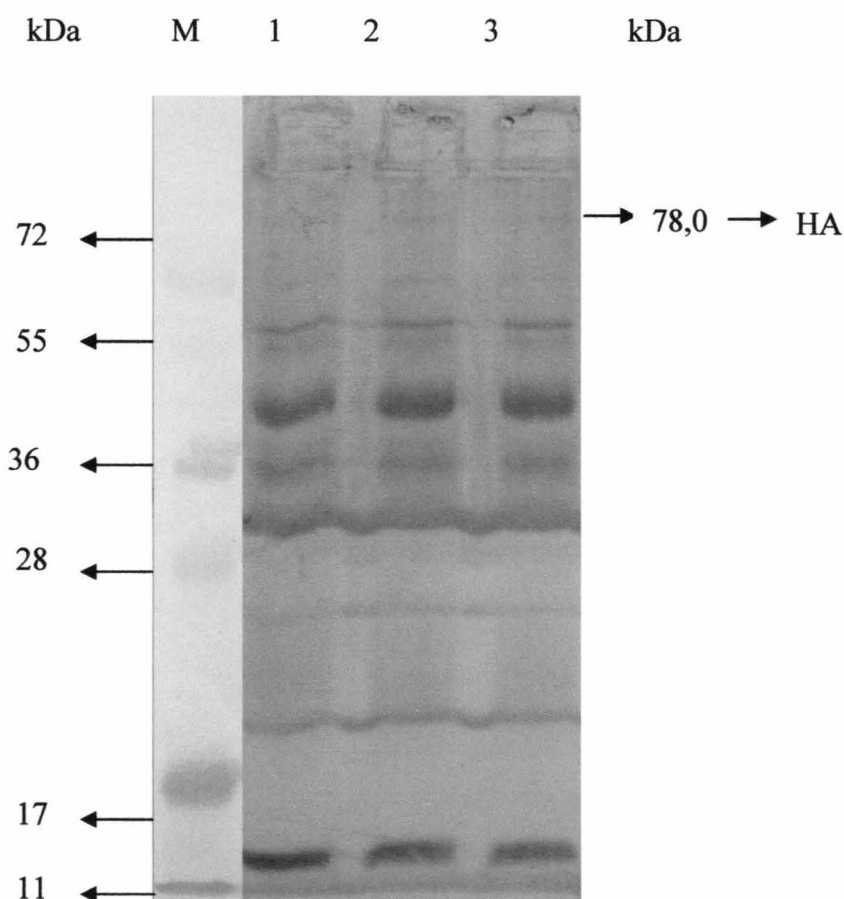


Gambar 5.1 Hasil identifikasi protein virus AI subtipe H5N1 isolat Blitar dengan teknik SDS-PAGE. Kolom 1-5 merupakan pengenceran virus berturut-turut, 1:10; 1:20; 1: 40; 1:80; 1:80. M: Marker.

Hasil identifikasi protein virus AI subtipe H5N1 isolat Blitar dengan teknik SDS-PAGE. Protein virus HA terdapat pada band dengan berat molekul 78 kDa.

5.2.4 Hasil Western Blotting

Western Blotting digunakan untuk mengetahui apakah karakterisasi protein hasil SDS-PAGE yang berupa *band-band* dengan berat molekul tertentu, memiliki antigenisitas apabila direaksikan dengan antibodi poliklonal yang didapat dari serum kelinci yang divaksinasi inaktif dengan virus AI sub tipe H5N1. Hasil analisis Western Blotting dapat diamati pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Hasil identifikasi protein virus AI sub tipe H5N1 dengan teknik Western Blotting. Kolom 1-3 merupakan sampel virus dengan pengenceran 1:10. M: Marker.

Dari hasil Western Blotting didapatkan band protein HA dengan berat molekul 78 kDa. Protein HA, sebagai protein yang akan diaplikasikan pada uji selanjutnya

terbukti antigenik, dengan kemampuannya untuk berikatan dengan antibodi anti H5N1 pada membran nitroselulosa.

5.2.5 Hasil Elusi

Protein HA dapat diisolasi melalui proses elusi . Tahap awalnya adalah *running* antigen menggunakan metode SDS-PAGE. Selanjutnya dilakukan pemotongan gel pada berat molekul yang diinginkan, gel dimasukkan pada plastik *cellophane* dan diberi PBS, setelah proses elektroforesis, cairan di dalam plastik dikoleksi karena merupakan suspensi protein HA. Dari penghitungan kadar protein HA diperoleh hasil sebesar 0,1078mg/dl. Sebelum ELISA dimulai protein HA yang diperoleh dari proses elusi harus diukur kadarnya terlebih karena akan digunakan pada saat *coating* antigen.

5.2.6 Hasil ELISA

Uji ini digunakan untuk mengetahui antigenisitas protein HA terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9. Berdasarkan kadar protein yang telah diketahui, antigen yang digunakan untuk proses coating sebanyak 47 µg/ml. Hasil ELISA diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 415 nm dan hasilnya dinyatakan dengan nilai Optical Density (OD)

Tabel 5.3 Nilai Rata-rata OD Protein HA Virus AI Subtipe H5N1 Dengan Antibodi Anti H5N1, Anti H5N2 dan Anti H5N9

Antibodi	Protein HA		
	Rata-rata	Cut off	Hasil
H5N1	0.3838	0,1926	+
H5N2	0,2642	0,1926	+
H5N9	0,2126	0,1926	+
Kontrol	0,0963		

Hasil pegujian antigenisitas protein hemaglutinin virus AI subtipe H5N1 terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dan kontrol negatif menggunakan teknik *indirect* ELISA, didapatkan rata-rata nilai OD berturut-turut 0,3838; 0,2642; 0,2126; 0,0963. Cut off value nilai OD yang merupakan 2x rata-rata serum negatif, didapatkan hasil sebesar 0,1926. Dari hasil cut off value dapat dilihat bahwa, nilai rata-rata OD antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 menunjukkan hasil positif .

Dari *post hoc test* HSD, dapat diketahui notasi dari kekuatan antibodi ketika berikatan dengan protein antigenik. Hasil *post hoc test* dapat dilihat pada Tabel 5.4

Tabel 5.4 Rata-rata Nilai OD Kekuatan Antibodi Anti H5N1, AntiH5N2 dan Anti H5N9 Terhadap Protein HA Virus AI Subtipe H5N1 dan Tingkat Notasinya

Antibodi	Rata-rata
H5N1	0,3838 ^c
H5N2	0,2642 ^b
H5N9	0,2126 ^b
Kontrol	0,0963 ^a

Keterangan urutan notasi dari lemah ke kuat : a-b-c

Hasil *post hoc test* HSD, didapatkan protein hemaglutinin bereaksi paling kuat terhadap antibodi anti H5N1, diikuti oleh antibodi anti H5N2 dan H5N9, kemudian kontrol negatif. Hasil analisis dengan menggunakan uji Anova pada taraf 5%, menunjukkan bahwa perbedaan interaksi antara protein hemaglutinin dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan H5N9 sangat bermakna ($p\alpha < 0,05$).

BAB 6 PEMBAHASAN

BAB 6**PEMBAHASAN**

Pada tahun 1997 wabah flu burung yang disebabkan oleh virus AI subtipe H5N1 menyerang peternakan unggas di Hongkong, setelah itu virus tersebut pada tahun 2002 ditemukan pada unggas air dan spesies burung yang lain (Sturm-Ramirez, 2004). Virus AI subtipe H5N1 yang awalnya terdapat di Asia, sejak tahun 2003 virus yang termasuk *highly pathogenic avian influenza* ini telah menimbulkan wabah di lebih dari 54 negara (Subarao *et al*, 2006). Wabah influenza telah menjadi *issue* yang begitu menyita perhatian dunia. Ketika pandemi itu terjadi, sebuah uji diagnostik yang cepat dan akurat sangat dibutuhkan keberadaannya. Beberapa uji diagnostik telah dikembangkan sejak virus influenza dapat dikarakterisasi pada tahun 1933 (Webster, 1998). Ketika terdapat kejadian AI, WHO merekomendasikan beberapa uji laboratoris (WHO, 2005). Berbicara tentang uji yang akan digunakan otomatis juga berkenaan dengan komponen yang akan digunakan untuk uji tersebut, dalam hal ini protein HA menggunakan uji ELISA dapat digunakan sebagai antigen pada uji diagnostik, karena kemampuannya untuk mendeteksi reaksi silang pada HA yang berbeda subtipe (Rowe *et al*, 1999). Oleh karena itu peneliti melakukan isolasi HA pada virus AI subtipe H5N1 untuk diuji kemampuannya dalam mendeteksi serum dari subtipe HA yang berbeda.

Virus AI subtipe H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari wabah AI di kabupaten Blitar. Virus diinokulasikan pada TAB yang berumur 10 hari. Sebelum bidang virologi mengambil alih teknik kultur sel, telur ayam bertunas paling cocok untuk kultivasi virus. Sampai sekarang masih terdapat beberapa virus yang masih menggunakan metode ini karena mempunyai daya afinitas yang tinggi pada

jaringan ayam, seperti pada *Orthopoxvirus* yang diinokulasikan pada selaput korioalantois sedangkan pada virus influenza dan *New Castle Disease*, virus diinokulasikan di ruang alantois (Rantam, 2005).

Begitu diinokulasikan pada TAB, virus mengalami pertumbuhan dalam temperatur 35-37°C, hingga mencapai puncaknya 36-72 jam pasca inokulasi. Beberapa virus menyebabkan kematian embrio dengan dengan lesi internal, kulit berwarna merah gelap karena *ptechiae*, hemoragi dan kongesti otot. Rute inkubasi, jenis virus serta umur embrio menentukan pertumbuhan virus di dalam TAB, menurut WHO (2005) virus dalam jumlah banyak dapat dipanen 3 hari setelah inkubasi, dalam penelitian ini embrio pada TAB mati kurang dari 4 hari. Dari hasil uji HA pada cairan alantois didapatkan titer virus sebesar 2^8 . Suspensi virus titer tertinggi kemudian dititrasi mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-10} untuk diinokulasikan pada TAB, setelah embrio mati, cairan alantoisnya kembali diuji HA untuk penghitungan *Egg Infective Dose* 50 (EID $_{50}$) menggunakan metode Reed and Muench didapatkan hasil sebesar $10^{8,5}$ EID $_{50}$. Virus tertingginya dikoleksi sebagai stok virus.

Stok virus yang didapat digunakan untuk membuat antibodi poliklonal. Virus AI sub tipe H5N1 diinaktivasi terlebih dahulu menggunakan formalin 0,1%, kemudian ditambahkan *complete freund adjuvan*, kemudian disuntikkan pada kelinci sehingga kelinci akan membentuk antibodi anti H5N1. Inaktivasi virus dilakukan untuk mengeliminir kemampuan virus dalam menimbulkan penyakit namun tidak merusakkan antigen protektifnya (Roitt, 2002), sedangkan penambahan *adjuvan* pada suspensi virus AI yang diinaktivasi akan meningkatkan imunogenisitas antigen. Karena langsung diproses oleh *Antigen Presenting Cell* sehingga berdampak pada meningkatnya respon imun hospes (Janeway, 1999). Pada imunisasi pertama *adjuvan*

yang ditambahkan adalah *complete adjuvan*, *complete adjuvan* mengandung bakteri yang dapat meningkatkan respon imun, untuk *booster* yang digunakan adalah *incomplete adjuvan*. Kelinci diimunisasi sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Dua minggu setelah penyuntikan terakhir dilakukan pengambilan darah untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi anti H5N1. Titer antibodi yang tinggi didapatkan 10 hari setelah booster ke-2. Respon imun pada kelinci yang diinduksi oleh virus AI sub tipe H5N1 yang memiliki banyak epitop memerlukan pengaktifan limfosit untuk berdiferensiasi menjadi bermacam-macam limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan masing-masing limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespon antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifitas yang berbeda. Oleh karena itu antibodi yang dihasilkan oleh kelinci setelah diimunisasi dengan virus AI sub tipe H5N1 adalah antibodi poliklonal .

Teknik SDS-PAGE diaplikasikan untuk mengkarakterisasi virus AI sub tipe H5N1. Pada SDS-PAGE protein dielektroforesis dalam detergen ionik yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Detergen ini akan mengikat amino sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein-SDS kompleks bermigrasi melalui poliakrilamid tergantung berat molekulnya. Poliakrilamid adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul antara 500-250.000 dalton. Selama proses *Polyacrilamid Gel Electrophoresis* (PAGE), protein dipisahkan dengan cara bermigrasi melalui matrik tiga dimensi secara elektrik (Rantam, 2003). Hasil yang terlihat pada gel adalah setelah proses SDS-PAGE selesai adalah *band-band* dengan berat molekul 78 kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 27,9 kDa dan 16,9 kDa. Jenis protein yang berhasil dikarakterisasi dapat diketahui berdasarkan

berat molekulnya. Menurut Suzuki and Nei (2002), berat molekul protein HA, NP, NS dan M1 berturut-turut adalah 77kDa; 50-60 kDa; 26 kDa dan 15 kDa. Menurut Suwarno dkk (2007) berat molekul protein NA adalah 53,5 kDa.

Dari data berat molekul diatas, *band* yang terlihat pada gel hasil karakterisasi virus AI subtype H5N1 dengan berat molekul 78 kDa; 59,4 kDa; 53,5 kDa; 27,9 kDa dan 16,9 kDa berturut-turut adalah protein HA, NP, NA, NS dan M1. Sedikit perbedaan berat molekul temuan Suzuki and Nei dengan penelitian ini bisa disebabkan karena banyak faktor, antara lain karena virus AI yang digunakan meskipun sama subtipe H5N1 sendiri memiliki *clade* ataupun isolat yang berbeda, faktor teknis pada waktu pengerjaan *running* seperti kekuatan ionik, pH *buffer*, input power, medium penyangga atau matriks yang digunakan dapat mempengaruhi hasil yang didapatkan, tetapi keterpautannya tidak terlalu jauh.

Proses selanjutnya adalah analisis dengan teknik Western Blotting yaitu teknik yang digunakan untuk mentransfer zona separasi protein dari gel hasil elektroforesis ke matriks membran nitroselulosa. Matriks inilah yang akan mengikat molekul yang akan ditransfer sehingga menjadi *immobil* (Sumitro dkk, 1996). Pada analisis menggunakan Western Blotting menunjukkan bahwa antibodi anti H5N1 dari kelinci dapat berikatan dengan protein HA, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein HA adalah protein yang antigenik.

Western Blotting terdiri atas 2 proses, pertama adalah *semy-dry electrophoresis*, kedua adalah immunoblotting. Immunoblotting merupakan aplikasi yang spesifik dari teknik blotting protein dengan memanfaatkan interaksi antigen dan antibodi sebagai cara deteksi protein yang telah dipindahkan ke atas kertas membran setelah elektroforesis (Burgess, 1995). Teknik tersebut memungkinkan deteksi protein

dengan sensitivitas tinggi karena protein dipisahkan dalam volume lebih kecil. Keuntungan teknik ini adalah lebih cepat, efisiensi pemindahannya tinggi dan beberapa gel dapat dipindahkan dalam waktu yang sama (Burnette, 1981).

Untuk mendapatkan protein HA yang akan diaplikasikan pada uji ELISA, maka dilakukan pemotongan gel protein HA untuk kemudian dielusi, selanjutnya protein yang didapatkan diukur kadar proteinnya, hasil yang didapatkan sebesar 1,078 μ g/dl. Hasil kadar protein yang didapatkan digunakan sebagai dasar penghitungan protein HA yang akan digunakan untuk *coating antigen* pada uji *indirect* ELISA.

Hasil uji *indirect* ELISA yang dinyatakan berupa nilai OD menunjukkan bahwa reaksi antara protein HA dengan antibodi anti H5N1 memiliki nilai OD yang berkisar antara 0,3280-0,4120, antibodi anti H5N2 berkisar antara 0,1150-0,2870 pada antibodi anti H5N9 berkisar antara 0,1360-0,3250 dan pada kontrol negatif berkisar antara 0,0845-0,1165. Dari penghitungan nilai *cut off value* yang didapatkan, menunjukkan antibodi-antibodi tersebut bereaksi positif terhadap protein hemaglutinin sedangkan dari hasil *post hoc test* HSD diketahui notasi kekuatan interaksi protein hemaglutinin dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dan kontrol negatif, mulai dari yang lemah sampai yang paling kuat berturut-turut adalah kontrol negatif, H5N2 dan H5N9 yang memiliki notasi yang sama, kemudian H5N1. Hasil uji Anova taraf taraf 5%, menunjukkan bahwa perbedaan interaksi antara protein hemaglutinin dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan H5N9 sangat bermakna ($p\alpha < 0,05$).

Antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil dari vaksinasi itik menggunakan vaksin H5N1, H5N2

dan H5N9, yang ketika terjadi *outbreak* HPAI (H5N1) di Indonesia pada tahun 2003, industri peternakan mengimpor vaksin AI inaktif heterolog tersebut dari Eropa, Amerika dan Mexico (Claassen *et al*, 2007). Protein HA yang sama akan menstimulasi imunitas aktif, perbedaan pada protein NA akan menghasilkan produksi antibodi yang berbeda sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi serum unggas yang telah divaksin dan serum unggas yang terinfeksi (Jones, 2007).

Pada influenza tipe B dan C yang masing-masing terdiri dari hanya 1 subtipe, maka pada influenza tipe A yang terdiri dari 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA yang berbeda, deteksi dan pembedaan antibodi pada serumnya dapat menggunakan teknik ELISA. Teknik ELISA mampu mendeteksi spesifitas subtipe virus AI, karena mampu untuk membedakan antibodi dari 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA virus AI tipe A yang berbeda, selain itu dapat juga dimanfaatkan pada DIVA (*Differentiate Infected From Vaccinated Animals*) Strategy yaitu strategi untuk membedakan hewan yang terinfeksi dan yang telah divaksinasi (ARAMIS, 2008), Teknik ELISA mampu untuk menskrining antibodi dalam skala besar, dalam waktu cepat, efisien serta dapat mendeteksi antibodi pada awal infeksi (satu minggu setelah infeksi). Deteksi dini flu burung diperlukan karena, pertama, deteksi yang lebih awal dan akurat dapat menentukan penggunaan antibodi dan terapinya, kedua, mampu untuk membatasi penyebaran penyakit flu burung dan yang ketiga adalah mengurangi kemungkinan timbulnya *antigenic shift*.

Variasi antigen dapat membatasi penggunaan reagen yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus. Strurm-Ramirez (2004) menemukan bahwa sebagian besar virus H5N1 tahun 2001 dan 2002 di Hongkong tidak dapat dideteksi menggunakan referensi reagen H5 yang sudah digunakan. Begitu juga dengan antibodi *monoclonal*

yang digunakan sebagai reagen diagnostik untuk virus H5N1 pada saat wabah tahun 1997, sudah tidak dapat digunakan lagi untuk uji HI pada virus H5N1 tahun 2001 dan 2002. Oleh karena itu disarankan reagen untuk uji diagnostik perlu untuk diperbarui.

ELISA spesifik HA adalah uji deteksi antigen. Pengujiannya memerlukan pemurnian pada antigen yang akan digunakan, uji tersebut mampu untuk mendeteksi reaksi silang pada HA subtipe lain (Strurm-Ramirez, 2004), karena kemampuannya itu maka protein HA berpotensi untuk digunakan sebagai antigen untuk uji diagnostik (Nwe *et al*, 2006).

BAB 7
PENUTUP

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Protein hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 isolat Blitar memiliki berat molekul 78 kDa.
2. Protein hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 isolat Blitar bersifat antigenik.
3. Terdapat perbedaan antigenisitas protein hemagglutinin terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9, protein hemagglutinin memiliki antigenisitas tertinggi terhadap antibodi anti H5N1, diikuti oleh antibodi anti H5N2 dan anti H5N9

7.2 Saran

Berdasarkan antigenisitas protein hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 yang tinggi setelah direaksikan dengan antibodi anti H5N1, diikuti terhadap antibodi anti H5N2 dan anti H5N9, maka dalam hal ini protein hemagglutinin virus AI subtipe H5N1 memungkinkan untuk dijadikan kandidat antigen diagnostik.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Biology molekuler sel*. Edisi kedua. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- ARAMIS. 2008. Development of a universally applicable ELISA based on recombinant HA and NA antigens for the detection and differentiation of influenza virus antibodies animal and human sera. *Veterinary Virology*. University Zurich
- Burgess GW. 1995. *Teknologi ELISA Dalam diagnosis dan penelitian*. Gadjah Mada University Press.
- Burnette WN. 1981. "Western Blotting" Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein. *Anal. Biochem*. 112: 195-203.
- Capua I., Mutinelli I, Marangon S, Alexander DJ. 2000. H7N1 Avian influenza in Italy (1999-2000) in intensively reared chicken and turkeys. *Av Pathol*; 29: 537-43.
- Capua I and Mutinelli F. 2001. Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken. In: Capua I, Mutinelli F. (eds.), *A Colour Atlas and Text on Avian Influenza*, Papi Editore, Bologna, pp. 13-20.
- Cattoli G, Terregino C, Brasola V, Rodriguez JF, Capua I. 2003. Development and preliminary validation of an ad hoc N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. *Avian Dis*; 47: Suppl: 1062-2
- Claassen, IJTM, Jahja EJ, Sahesti A, Farida A, Balk F, Bouma A. 2007. PD50 Experiments demonstrate that avian influenza vaccines used in Indonesia differ greatly in protective capacity. An OIE/FAO/IZSVe scientific conference. Verona, Italy.
- Clark L and Hall J. 2006. Avian Influenza in wild birds: Status as reservoirs and risks to humans and agriculture. *Ornithological Monograph Volume (2006)*, No: 60; 3-29.
- Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A. 1999. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 And H7 subtype. *Vaccine*; 17: 2265-74.
- Elbers AR., Koch G, Bouma A. 2005. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. *Avian Pathol*; 34: 181-7.

- Ernawati R., Rahardjo AP, Sianita N, Rahmahani J, Rantam FA, Suwarno. 2007. Petunjuk praktikum pemeriksaan virologik dan serologic. Laboratorium Virology dan Imunologi Bagian Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Fouchier RAM, Munster V, Wallenstens A, Bestenbroer TM, Hersfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, and Osterhaus ADME. 2005. Characterization of novel Influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained black-headed gulls. *J virol* 79 (5): 2814-2822.
- Garcia-Sastre A., Egorov A, Matassov D. 1998. Influenza A virus lacking the NS gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*; 252: 324-330.
- Gürtler L. 2006. Virology of Human Influenza. In: Influenza Report. Flying Publisher, Wuppertal.
- Hehme N, Engelman H, Kunzel W, Neumier E and Sanger R. 2002. Pandemic preparedness: Lesson learnt from H2N2 and H9N2 candidate vaccines. *Med. Microbiol. Immunol. (Berf.)* 191, 203-208.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*; 72: 7367-73.
- Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. 1995. Perpetuation of Influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol.* 140, 1163-1172.
- Janeway CA, Travers P, Walport M and Capra JD. 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. Fourth Edition. Garland Publishing. USA.
- Jones PGH. 2007. Current availability of vaccines including vaccine banks. International Federation for Animal Health (IFAH). Belgium.
- Kwon YK, John SJ, Kim MC, Sung HW, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Kim JH. 2005. Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. *Avian Pathol*; 34: 367-70.
- Lai ACK and McPhillips AM. 1999. Isolation of avian influenza viruses in central Oklahoma. *Journal of the Oklahoma State Medical Association* 92: 565-567.
- Lu H and Castro AE. 2004. Evaluation of the infectivity, length of infection and immune response of a low-pathogenicity H7N2 avian influenza virus in specific pathogen free chicken. *Avian Diseases* 48: 263-270.
- Mackenzie D. 2006. The bird flu threat. *New Scientist* 7 January: i-viii.

- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*; 409: 1055-60.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 4620-4
- National Disease Information System (NADIS). 2006. Comprehensive and differentiated action plan for the surveillance and control of Highly Pathogenic Avian Influenza in Nigeria. Federal Department of livestock and pets control services. Federal Republic of Nigeria.
- Nwe N, Qigai H, Sudarat D, Qingyun D, Ivanus M, Yukoi L, James F, Lynn S, Jimmy. 2006. Ekspression of hemagglutinin protein of avian influenza virus H5N1 in baculo virus/ insect significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology*, 6:16.
- Perdue ML, Suarez DL. 2000. Structural features of the Avian Influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol*; 74: 77-86.
- Rantam FA. 2003. Metode imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rantam FA. 2005. Virologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Reid AH, Fanning TG, Janeczewski TA, McCall S, and Taubenberger JK. 2002. Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus matrix gene segmen. *J Virol* 76: 10717-10723.
- Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG. 1995. Do hemagglutinin genes of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses constitute unique phylogenetic lineages?. *Virology*; 209: 664-70.
- Roitt I. 2002. Imunology. Ed 8. Widya Medika. Jakarta.
- Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ. and Katz JM. (1999) Detection of antibody to avianinfluenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (4): 937-943.
- Sidorenko Y, Reichl U. 2004. Structured model of Influenza Virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng*; 88: 1-14.
- Skehel JJ, Cross K, Steinhauer D, Wiley DC. 2001. Influenza fusion peptides. *Biochem Soc Trans*; 209: 623-6.
- Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. 1990. Persistence of Avian Influenza viruses in water. *Avian Dis*.

- Sturm-Ramirez KM., Ellis T, Bousfield B. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol*; 78: 4892-901.
- Subbarao K and Murph R. 2006. Development of effective vaccines againts pandemic Influenza. *Immunity*: 24; 5-9.
- Suguitan, AL Jr, McAuliffe J, Mills KL, Jin H, Duke G. 2006. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccine provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PloS Med* 3: e360.
- Sumitro BS, S. Rahayu, Fatchiyah., Widyarti S, dan Arumningtyas EL. 1996. Kursus teknik-teknik dasar analisis protein dan DNA. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suwarno, Rahardjo AP, Sianita N. 2006. Karakterisasi protein neuraminidase virus avian influenza sebagai antigen diagnostik untuk penentu sub tipe H5N1. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
- Suzuki Y and Nei M 2002. Origin and evolution of influenza virus haemagglutinin genes. *Mol Biol. Evol* 19: 501-509.
- Swayne DE and Suarez DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*; 19: 463-8.
- Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, Rowe T, Wolff M 2006. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine *N Engl J med*; 354: 1343-51.
- Webster RG. 1998. Influenza: An emerging disease. *Emerg Infect Dis*; 4: 436-41.
- WHO. 2005. Geographical spread of H5N1 Avian Influenza in birds-update 28.
- WHO.2006.Cumulative number of confirmed human cases of Avian Influenza A (H5N1) WHO.
- Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. 2004. Matrix gene of Influenza A viruses isolated From wild aquatic birds:Ecology and emergence of Influenza A viruses. *J Virol*: 78: 8771-9.
- Wolson LA and Cox NJ. 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 737-771.
- Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. 1993.Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7subtypes. *Arch Virol*; 130: 209-17.

Zambon MC. 1999. Epidemiology and pathogenesis of Influenza. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44. Tonic B, 3-9.

Zambon M, Hays J, Webster A, Newman R, Keene O. 2001. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. *Arch Intern Med*; 161: 2116-22.

Zyl, VG. 2006. Laboratory findings. *Influenza Report*.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara Kerja SDS-PAGE

1. Pembuatan *Separating Gel*

Bahan:

-	<i>Acrilamid</i> 12%	2,5 ml
-	<i>Tris HCl</i> pH 8,8	1,2 ml
-	SDS 10%	1,2 ml
-	<i>Aquadest</i>	1,1 ml
-	<i>Temed</i>	5 μ l
-	APS	30 μ l

2. *Separating gel* dimasukkan melalui dinding kaca sampai ± 1 cm dari batas atas.

3. Menambahkan *butanol* sebanyak 1 ml.

4. *Separating gel* dibiarkan sampai membeku (± 25 menit)

5. Pembuatan *Stacking gel*

Bahan :

-	<i>Acrilamid</i> 12%	0,33 ml
-	<i>Tris HCl</i> pH 8,8	0,4 ml
-	SDS 10%	0,4 ml
-	<i>Aquadest</i>	0,87 ml
-	<i>Temed</i>	4 μ l
-	APS	10 μ l

7. Mempersiapkan sampel yang telah dicampur dengan *Laemmly buffer*, kemudian dipanaskan pada suhu 42°C selama 1 jam.

Bahan *Laemmly buffer* :

-	<i>Tris HCl</i> pH 6,8	0,6 ml
-	<i>Gliserol</i> 50%	5 ml
-	SDS 10%	2 ml
-	<i>2-Mercaptoethanol</i>	0,5 ml
-	H ₂ O	0,9 ml

8. *Butanol* dibuang apabila gel telah membeku, kemudian dibersihkan dengan kertas saring.

9. *Stacking gel* yang telah dibuat dituangkan, lalu comb dimasukkan selanjutnya ditunggu sampai gel membeku.

10. *Comb* diambil dan dibersihkan dari sisa gel pada cetakan menggunakan E. Buffer.

Bahan E. Buffer :

-	<i>Tris Base</i>	3,29 g
-	<i>Glycine</i>	14,4 g
-	SDS	1 g
-	<i>Aquades</i>	ad. 1 lt

- pH 8,3

11. Cetakan gel diambil kemudian dimasukkan pada alat Bio-Rad (elektroforesis).
12. Sampel dan marker dimasukkan pada tiap sumuran *comb*.
13. Listrik dipasang pada 125 V, 40 mA.
14. Sampel yang berwarna biru ditunggu sampai turun, kemudian alat dimatikan dan gel diambil dari cetakannya.
15. Gel dimasukkan dalam petridish dan direndam dalam larutan *Coomasie Blue*.
Bahan *Coomasie blue* :

-	<i>Coomasie blue</i>	0,025 g
-	<i>Metanol</i>	40 ml
-	<i>Acetic acid</i>	10 ml
-	<i>Aquadest</i>	ad. 100 ml
16. Warna dihilangkan dengan cara merendamnya pada larutan *acetic acid* 10% selama 1 hari.

Lampiran 2. Cara Kerja Western Blotting

1. Melakukan *running* sampel dengan teknik SDS-PAGE, tanpa tahap pencucian.
2. Membuat *transfer buffer* sebanyak 3 liter.
Bahan *transfer buffer*:

-	<i>Tris</i>	1,515 g
-	<i>Glysin</i>	7,2 g
-	<i>Methanol</i>	100ml
-	<i>Aquadest</i>	ad. 500 ml
3. Gel dikeluarkan dari cetakan kemudian dicuci dengan *transfer buffer*.
Bahan *trans buffer saline*:

-	<i>Tris</i>	1,515 g
-	<i>NaCl</i>	11,68 g
-	<i>Aquadest</i>	1 L
4. Menyiapkan *membran nitroselulose* dan kertas *Whatman*, selanjutnya kertas *Whatman* direndam dalam *transfer buffer*.
5. Kertas *Whatman* sebanyak 5 lembar disusun rapi, lalu diletakkan di atasnya *membran nitroselulose*, gel, serta kertas *Whatman* sekali lagi sebanyak 5 lembar, kemudian diletakkan pada alat *blotter*, hindari adanya gelembung udara.
6. Alat kemudian dihidupkan pada 125 V, 40 mA selama beberapa jam.
7. *Membran nitroselulose* dikeluarkan dari alat *blotter*, kemudian diblok dengan BSA 10% dalam TBS Tween 0,05%, setelah itu diletakkan pada alat *shaker* selama 1 jam.
8. *Membran nitroselulose* dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali, masing-masing selama 10 menit.
9. Penambahan antibodi primer dengan pengenceran 1:100 didalam *buffer*, diletakkan pada alat *shaker* selama 1 jam.
10. Mencuci *membran nitroselulose*, seperti pada langkah no.8.
11. Penambahan antibodi sekunder/*konjugat anti rabbit IgG Alkalin Phosphatase* pada pengenceran 1:1000, diletakkan pada alat *shaker* selama 1 jam.
12. Mencuci *membran nitroselulose*, seperti pada langkah no.8.
13. Penambahan *substrat western blue* sebanyak 10 cc, kemudian diletakkan pada alat *shaker*, sampai terlihat pita.
14. Reaksi dihentikan dengan mencelupkan *membran nitroselulose* dalam *aquades*.

Lampiran 3. Cara kerja Elusi

1. Melakukan *running* sampel dengan teknik SDS-PAGE, tanpa tahap pencucian.
2. Gel dipotong sesuai dengan berat molekul yang diinginkan.
3. Plastik *selofan* dipotong sepanjang ± 10 cm, ujung bagian bawahnya diikat dengan benang.
3. Potongan gel tersebut dimasukkan kedalam plastik *selofan*.
4. Plastik *selofan* diisi dengan larutan PBS sebanyak 2 ml.
5. Ujung plastik *selofan* bagian atas diikat dengan benang.
6. Plastik *selofan* dimasukkan di dalam elektroforesa yang telah diisi dengan *E. Buffer* sampai ± 1 cm dari batas atas.
7. Plastik selofan diletakkan dalam posisi melintang dari katode ke anode.
8. Alat dinyalakan pada 150V, 40 mA selama 3 jam.
9. Cairan yang terdapat didalam plastik selofan diambil, kemudian dimasukkan ke dalam *eppendorf*, lalu disimpan pada suhu -20°C .

Lampiran 4. Cara Kerja ELISA

1. *Coating* antigen dilakukan dengan menambahkan protein HA sebanyak 47 µg/ml pada 50 ml *coating buffer*, kemudian masukkan pada tiap-tiap sumuran *microplate* sebanyak 100 µl.
2. *Microplate* diinkubasi pada suhu 4°C, semalam.
3. *Microplate* dicuci sebanyak 3 kali menggunakan *washing buffer*, masing-masing sumuran sebanyak 200 µl Pencucian *microplate* seperti pada langkah no. 3.

Bahan *washing buffer* :

- NaCl	2,25 g
- Tween 20	250 µl
- Aquadest	250 ml

4. Penambahan *blocking buffer* 4% masing-masing sumuran sebanyak 100 µl.

Bahan *blocking buffer* :

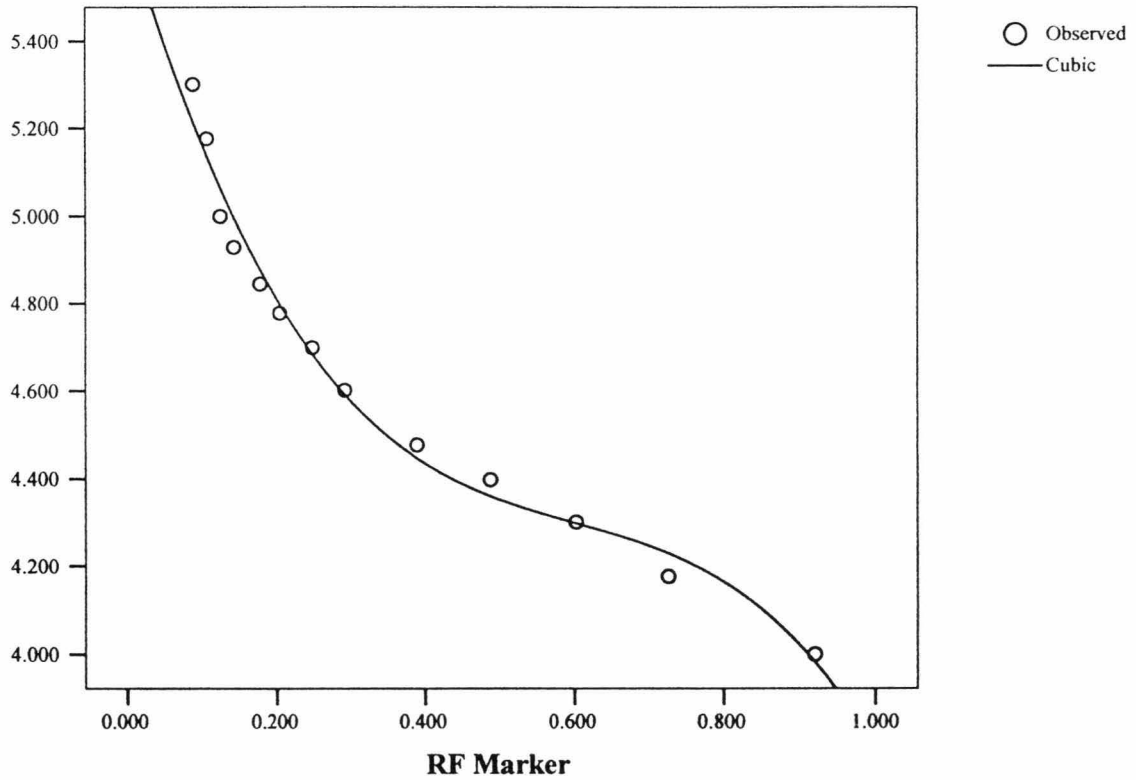
- PBS-Tween	40 ml
- Creamer	1,6 g

5. Pencucian *microplate* seperti pada langkah no. 3.
6. Penamahan antibodi yang telah diencerkan 1:100, masing-masing sumuran sebanyak 100 µl, kecuali pada sumuran PBS, kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37 °C.
7. Pencucian *microplate* seperti pada langkah no. 3.
8. Penambahan *konjugat anti itik IgG Alkalin Phosphatase* dengan pengenceran 1/4000 sebanyak 100 µl pada tiap sumuran, kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37 °C.
9. Pencucian *microplate* seperti pada langkah no. 3.
10. Penambahan *substrat p-NPP* sebanyak 100 µl pada tiap sumuran.
11. Hasil reaksi dibaca menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 415 nm.

Lampiran. 5 Uji regresi antara nilai Rf (x) dan berat molekul (log y Da) untuk menentukan berat molekul protein virus AI subtype H5N1

Jarak sampel	Rf	log y Da	y Da	y kDa
10,0	0,088	5,211	162554,8	162,6
19,5	0,173	4,892	77983,0	78,0
24,0	0,212	4,774	59429,2	59,4
26,0	0,230	4,728	53456,4	53,5
34,0	0,301	4,575	37583,7	37,6
44,0	0,389	4,446	27925,4	27,9
82,0	0,726	4,229	16943,3	16,9

Jarak Marker	Rf	BM (y kDa)	BM (y Da)	log y (Da)
10,0	0,106	200	200000	5,301
11,0	0,117	150	150000	5,176
12,0	0,128	120	120000	5,079
15,0	0,160	100	100000	5,000
16,0	0,170	85	85000	4,929
21,0	0,223	70	70000	4,845
22,5	0,239	60	60000	4,778
27,0	0,287	50	50000	4,699
31,0	0,330	40	40000	4,602
42,0	0,447	30	30000	4,477
49,0	0,521	25	25000	4,398
57,0	0,606	20	20000	4,301
70,0	0,745	15	15000	4,176
90,0	0,957	10	10000	4,000

Curve Fit**Log BM (Da) Marker**

$$Y = 5.663 - 5.867x + 8.985x^2 - 4.993x^3$$

Cubic**Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.993	.986	.981	.053

The independent variable is RF Marker.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.793	3	.598	212.128	.000
Residual	.025	9	.003		
Total	1.818	12			

The independent variable is RF Marker.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
RF Marker	-5.867	.728	-3.982	-8.060	.000
RF Marker ** 2	8.985	1.719	5.872	5.227	.001
RF Marker ** 3	-4.993	1.148	-2.910	-4.347	.002
(Constant)	5.663	.079		71.262	.000

Lampiran 6. Penghitungan OD dan post hoc HSD**Summarize****Case Summaries^a**

			HA OD	
Antigen	N1	1	.4120	
		2	.3840	
		3	.3850	
		4	.3280	
		5	.4100	
		Total	Sum	1.9190
			Mean	.383800
			Std. Deviation	.0338999
	N2	1	.2730	
		2	.2870	
		3	.3820	
		4	.2640	
		5	.1150	
		Total	Sum	1.3210
			Mean	.264200
		Std. Deviation	.0958316	
N9	1	.1360		
	2	.1790		
	3	.2560		
	4	.1670		
	5	.3250		
	Total	Sum	1.0630	
		Mean	.212600	
		Std. Deviation	.0768004	
K	1	.1025		
	2	.0845		
	3	.1165		
	4	.0845		
	5	.0935		
	Total	Sum	.4815	
		Mean	.096300	
		Std. Deviation	.0135351	
Total	Sum		4.7845	
	Mean		.239225	
	Std. Deviation		.1211715	

a. Limited to first 100 cases.

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		N1 HA	N2 HA	N9 HA	K HA
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.38380	.26420	.21260	.09630
	Std. Deviation	.033900	.095832	.076800	.013535
Most Extreme Differences	Absolute	.302	.299	.269	.208
	Positive	.203	.206	.269	.208
	Negative	-.302	-.299	-.159	-.192
Kolmogorov-Smirnov Z		.676	.669	.602	.466
Asymp. Sig. (2-tailed)		.751	.762	.862	.982

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

HA OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
N1	5	.383800	.0338999	.0151605	.3280	.4120
N2	5	.264200	.0958316	.0428572	.1150	.3820
N9	5	.212600	.0768004	.0343462	.1360	.3250
K	5	.096300	.0135351	.0060531	.0845	.1165
Total	20	.239225	.1211715	.0270948	.0845	.4120

Test of Homogeneity of Variances

HA OD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.170	3	16	.131

ANOVA

HA OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.213	3	.071	17.327	.000
Within Groups	.066	16	.004		
Total	.279	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HA OD

Tukey HSD

(I) Antigen	(J) Antigen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N1	N2	.1196000*	.0405147	.042	.003687	.235513
	N9	.1712000*	.0405147	.003	.055287	.287113
	K	.2875000*	.0405147	.000	.171587	.403413
N2	N1	-.1196000*	.0405147	.042	-.235513	-.003687
	N9	.0516000	.0405147	.592	-.064313	.167513
	K	.1679000*	.0405147	.004	.051987	.283813
N9	N1	-.1712000*	.0405147	.003	-.287113	-.055287
	N2	-.0516000	.0405147	.592	-.167513	.064313
	K	.1163000*	.0405147	.049	.000387	.232213
K	N1	-.2875000*	.0405147	.000	-.403413	-.171587
	N2	-.1679000*	.0405147	.004	-.283813	-.051987
	N9	-.1163000*	.0405147	.049	-.232213	-.000387

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

HA OD

Tukey HSD^a

Antigen	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
K	5	.096300		
N9	5		.212600	
N2	5		.264200	
N1	5			.383800
Sig.		1.000	.592	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.