

KE
KKA
TKD. 24/11
Moe
P

TESIS

**PROFIL PROTEIN ANTIGENIK *SEED* VIRUS
VAKSIN *ORF* PADA
SDS PAGE DAN *WESTERN BLOTTING***



MOEHAMMAD MOECHROM

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

TESIS

**PROFIL PROTEIN ANTIGENIK *SEED* VIRUS
VAKSIN *ORF* PADA
SDS PAGE DAN *WESTERN BLOTTING***

**Moehammad Moechrom
NIM. 090515531 M**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**PROFIL PROTEIN ANTIGENIK *SEED* VIRUS
VAKSIN *ORF* PADA
SDS PAGE DAN *WESTERN BLOTTING***

TESIS

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

Oleh :

**Moehammad Moechrom
NIM. 090515531 M**

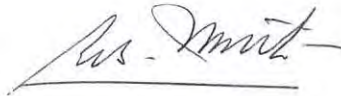
**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PASCASARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 6 Agustus 2007

Lembar pengesahan

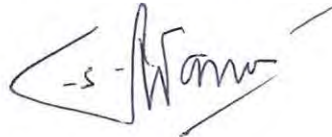
**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL : 3 Juli 2007**

**Oleh
Pembimbing Ketua**



**Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK
NIP : 130 676 011**

Pembimbing



**Dr Suwarno, drh, MS
NIP : 131 836 994**

**Mengetahui
Ketua Program Studi**



**Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD
NIP : 130 541 984**

Telah diuji pada

Tanggal 6 Agustus 2007

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr Rahaju Ernawati, drh, MSc

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

2. Dr Suwarno, drh, MS

3. Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK

4. Budiono, dr, MKes

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

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan pertama adalah Alhamdulillah, segala puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan petunjukNya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul **PROFIL PROTEIN ANTIGENIK SEED VIRUS VAKSIN ORF PADA SDS PAGE DAN WESTERN BLOTTING**. Selain itu penulis banyak menerima bantuan dan dukungan, untuk selayaknyalah saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK selaku dosen dan pembimbing pertama yang telah membimbing penulis, memotivasi dan selalu menyediakan waktu untuk memberikan informasi dan arahan yang sangat berguna, sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.
2. Dr Suwarno, drh, MSi selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa meluangkan waktu untuk membimbing dalam tehnik biologi molekuler dan juga motivasinya yang menyegarkan.
3. Harry Besar Sosiawan, drh, SU sebagai Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya atas pemberian fasilitas penelitian dan dukungan kepada penulis selama melakukan tugas pendidikan program magister.
4. Darmawan, drh, MSi sebagai mantan Plh. Kepala Pusat Veterinaria Farma Surabaya, sekarang sebagai Kepala Bidang Produksi Aneka Vaksin, atas dukungan kepada penulis selama melakukan tugas pendidikan program magister.

5. Dr Aulani'am drh, DESS sebagai kepala Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Unibraw yang telah memfasilitasi keperluan bahan dan sarana laboratorium dalam menunjang penelitian.
6. Seluruh staf, karyawan dan karyawan bidan Bidang Produksi Vaksin PMK dan Instalasi Kandang Hewan Percobaan, atas bantuannya dalam memelihara hewan percobaan.
7. Semua pihak yang tidak mungkin penulis sebut satu persatu, dan tidak lupa kepada seluruh keluarga, atas dorongan, saran-saran dan bantuan terhadap pelaksanaan penelitian dan penulisannya sampai selesai.

Penulis sadar, bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari pihak manapun sangat diharapkan.

Akhirnya penulis berharap, semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi masyarakat umumnya dan dunia ilmu pada khususnya.

Surabaya, 6 Agustus 2007

Penulis

RINGKASAN

Profil Protein Antigenik *Seed* Virus Vaksin *Orf* pada *SDS PAGE* dan *Western Blotting*

Penyakit *Orf* (“Bengorar”) yang disebabkan oleh virus *Orf* masih sering terjadi di beberapa daerah peternakan kambing dan domba di Indonesia. Vaksin untuk melindungi penyakit *Orf* telah diproduksi oleh Pusvetma dari isolat lokal (Merakkurak, Tuban), akan tetapi profil antigenisitasnya belum dipelajari.

Penelitian tentang fraksi protein antigenik *seed* virus vaksin *Orf* dilakukan dengan uji *SDS PAGE*, *Dot Blotting* dan *Western Blotting*. Uji *SDS PAGE* telah menghasilkan 11 pita, dengan masing-masing berat molekul (BM) fraksi protein *seed* virus vaksin *Orf* (208.9, 120.2, 77.6, 69.2, 57.5, 51.3, 46.7, 33.1, 31.6, 17.4 dan 10.2 kDa). Dengan uji *Dot Blotting* menghasilkan reaksi positif baik dengan serum antibodi kambing maupun domba. Sedangkan dengan uji *Western Blotting* menghasilkan 6 pita, dengan masing-masing BM fraksi protein *seed* virus vaksin *Orf* (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6, 10.2 kDa) dengan serum antibodi kambing dan menghasilkan 5 pita BM (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 10.2 kDa) dengan serum antibodi domba.

Terdeteksinya fraksi protein BM 33.1 kDa adalah merupakan ciri protein antigenik virus *Orf*. Sedangkan BM fraksi protein-protein antigenik yang lain (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6, 10.2 kDa) kemungkinan merupakan sifat virus *Orf* isolat Merakkurak yang beda dengan isolat lain.

Fraksi protein BM 11.6 kDa merupakan hal yang menarik, karena tidak terdeteksi di uji *SDS PAGE*, maupun *Western Blotting* yang menggunakan serum

antibodi domba. Untuk itu perlu diadakan penelitian lebih lanjut sifat antigenik virus *Orf* isolat Merakkurak dengan hewan yang secara genetik dekat hubungannya dengan kambing maupun domba (misalnya : kancil, rusa, menjangan) untuk melindungi hewan tersebut; maupun dengan hewan percobaan (misalnya: mencit, tikus putih, marmot, kelinci) untuk peningkatan proses pengujian vaksin. Adanya perbedaan BM fraksi protein-protein antigenik virus *Orf* dengan macam-macam uji, menarik pula untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka metode/cara diagnosa virus *Orf*.

Adanya perbedaan BM fraksi protein-protein antigenik virus *Orf* dengan macam-macam uji, menarik pula untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka pembuatan vaksin sub unit yang dapat melindungi hewan terhadap seluruh strain virus *Orf*.

SUMMARY

The Profile of Protein Antigenic of the Seed Virus of the *Orf* Vaccine on the SDS PAGE and Western Blotting

"Bengoran " known as *Orf* disease, that caused by *Orf* virus is still often occur in sheep and goat breeding in some area in Indonesia. The best method to prevent the disease is vaccination. Pusvetma as the government institution has produced the vaccines which is made by a local isolate of *Orf* virus from Merakkurak, Tuban.

The research is intended to explore the profile of protein antigenic of the seed virus of the vaccine from Pusvetma. The method of the test were carried out by SDS PAGE, Dot Blotting and Western Blotting. The result of SDS PAGE test of protein were obtained 11 ribbons and some various of molecule weight (MW). The range of the MW were 208.9, 120.2, 77.6, 69.2, 57.5, 51.3, 46.7, 33.1, 31.6, 17.4 and 10.2 kDa.

By the Dot Blotting test, the protein had a positive reaction against antibody of sheep and goat; while by Western Blotting test, the protein profile of the seed virus showed 6 ribbons and had 208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6 and 10.2 kDa against antibody of goat. It also showed 5 ribbons and had 208.9, 77.6, 57.5, 33.1 and 10.2 kDa against antibody of sheep.

Based on the result of the test, the protein of both sheep and goat had 33,1 kDa of MW which form a characterization of *Orf* virus. While the other figures of the MW might be the characteristic of the isolate of *Orf* virus from Merakkurak. In

this case, there is an interesting thing on the figure of 11.6 kDa of MW against antibody of goat but not against antibody of sheep. It could be a consideration on the other research in the characterization of *Orf* virus antigenic from Merakkurak isolate that the protein antigenic reaction closed genetic relationship to sheep or goats such as deer, antelope and chevrot to protect the animals; even the animal test such as mice, *Cavia cobaya* and rabbit in order to increase the process of the assay of the vaccines.

The differences of the MW of antigenic protein of Or/virus is also interesting to be explored in order to methode of the diagnose the disease and to produce the sub unit vaccines.

ABSTRACT

The Profile of Protein Antigenic of the Seed Virus of the *Orf* Vaccine on the SDS PAGE and Western Blotting

The protein antigenic of the seed of the *Orf* vaccines produce by Pusvetma has not know yet. The research is intended to explore the profile of protein antigenic of the seed virus of the *Orf* vaccine from Pusvetma. The method of the test were carried out by SDS PAGE, Dot Blotting and Western Blotting. The result of SDS PAGE test of protein were obtained 11 ribbons and some various of molecule weight (MW). The range of the MW were 208.9,120.2, 77.6,69.2, 57.5, 51.3,46.7, 33.1,31.6,17.4 and 10.2 kDa.

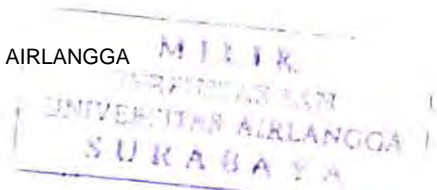
By Dot Blotting test, the protein had a positive reaction against antibody of sheep and goat; and by Western Blotting test, the protein profile of the seed virus showed 6 ribbons had 208.9, 77.6, 57.5, 33.1,11.6 and 10.2 kDa against antibody of goat. It also showed 5 ribbons and had 208.9, 77.6, 57.5, 33.1 and 10.2 kDa against antibody of sheep.

The difference of the MW 11,6 kDa of antigenic protein of *Orf* virus from Merakkurak isolate on reaction against goat and sheep antibody by Western Blotting test is interesting to be explored in order to method of the diagnose of *Orf* disease; to produce the new vaccines have protecting to the animal have closed genetic relationship to sheep or goats such as deer, antelope and chevrot; and to increase the process of the assay of the vaccines.

Key words : *Orf* virus, SDS PAGE, Western Blotting, Antigenic protein

DAFTAR SINGKATAN

Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
AGP	: <i>Agar Gel Precipitation</i>
BM	: Berat Molekul
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CDC	: <i>Center Diseases Control</i>
CFT	: <i>Complement Fixation Test</i>
CPE	: <i>Cytopathogenic Effect</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ds	: <i>Double stranded</i>
Elisa	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAT	: <i>Flourescence Antibody Technique</i>
FBS	: <i>Foetal Bovine Serum</i>
ID	: <i>Infectious Dose</i>
IL	: Interleukin
INF	: Interferon
kbp	: <i>Kilo Base Pair</i>
kDa	: Kilo Dalton
MW	: <i>Molecule weight</i>
NC	: <i>Nitro Cellulose</i>
nm	: Nano Meter (10^{-6} Meter)
ng	: Nano Gram (10^{-6} Gram)
OPD	: <i>Orthophenylenediamine</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBST	: <i>Phosphate Buffer Saline Tween</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pusvetma	: Pusat Veterinaria Farma
Rf	: <i>Retardation Factor</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
SDS PAGE	: <i>Sodium Dedocyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAB	: Telur Ayam Berembrio
TBS	: <i>Tris Buffer Solution</i>
TC	: <i>Tissue Culture</i>
Temed	: <i>Tetramethylenediamine</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosing Factor</i>
μL	: <i>Micro Litre (10^{-3} Litre)</i>
μg	: <i>Micro Gram (10^{-3} Gram)</i>



DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Abstract	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1 : PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat teoritis	5
1.4.2 Manfaat praktis	5
BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penyakit <i>Orf</i>	6
2.2 Virus <i>Orf</i>	9
2.3 Patogenesis Penyakit <i>Orf</i>	12

2.4	Diagnosis, Pencegahan, Pengendalian & Pemberantasan Penyakit <i>Orf</i>	16
2.5	Vaksin <i>Orf</i>	18
2.6	Protein Antigenik Virus <i>Orf</i>	19
2.7	Respons Immunogenik Vaksin <i>Orf</i>	21
BAB 3 :	METODE PENELITIAN	22
3.1	Rancangan Penelitian	22
3.2	Bahan dan Alat Penelitian	22
3.2.1	Bahan penelitian	22
3.2.2	Alat penelitian	23
3.3	Prosedur Penelitian	23
3.3.1	Pembiakan dan persiapan <i>seed virus vaksin Orf</i>	23
3.3.2	<i>SDS PAGE</i>	24
3.3.3	<i>Dot Blotting</i>	26
3.3.4.	<i>Western Blotting</i>	27
3.4	Metode Pengumpulan Data	28
3.3	Kerangka Operasional Penelitian	29
BAB 4 :	HASIL PENELITIAN	30
BAB 5 :	PEMBAHASAN	33
BAB 6 ;	PENUTUP	37
6.1	Kesimpulan	37
6.2	Saran	37
DAFTAR PUSTAKA		39

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Jenis-jenis virus <i>Pox</i> yang dapat menginfeksi manusia.	7
Tabel 2.2 : Bentuk, Ukuran dan Peralatan virus-virus <i>Pox</i> (termasuk virus <i>Orf</i>) yang digunakan untuk menginfeksi induk semang (<i>host</i>).	9
Tabel 4.1 : Hasil Pita BM Fraksi Protein Virus <i>Orf</i> dengan <i>SDS PAGE</i> dan <i>Western Blotting</i> (kDa).	32
Tabel 5.1 : Perbandingan Hasil Pita BM Fraksi Protein virus <i>Orf</i> dengan <i>SDS PAGE</i> dan <i>Western Blotting</i> (kDa) antara Penulis dan Peneliti Lain.	35

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : A. Penyakit <i>Orf</i> pada domba. B. Lepuh bernanah . disebabkan oleh virus <i>Orf</i> pada ibu jari manusia.	8
Gambar 2.2 : Foto-foto negative stain dan gambar skematik beberapa virus Pox (A. virus <i>Orthopox</i> : <i>Cowpox</i>, <i>Monkeypox</i>, <i>Vaccinia & Variola</i>), (B. virus <i>Parapox</i> : <i>Orf</i>, <i>Bovine popular stomatitis</i>, <i>Pseudocowpox</i>, <i>Sealpox</i>), (C. virus <i>Yatapox</i> : <i>Tanapox</i>, <i>Yabapox</i>), (D. gambar skematik stuktur virus <i>Vaccinia</i>), (E. gambar skematik struktur virus <i>Orf</i>).	11
Gambar 2.3 : Diagram ilustrasi dari siklus replikasi virus <i>Vaccinia</i> (satu familia dengan virus <i>Orf</i>).	14
Gambar 3.1 : Kerangka Operasional Penelitian.	29
Gambar 4.1 : Hasil <i>SDS PAGE seed</i> virus vaksin <i>Orf</i> dan Marker.	30
Gambar 4.2 : Hasil <i>Dot Blotting seed</i> virus vaksin <i>Orf</i> dengan serum kambing dan domba.	31
Gambar 4.3 : Hasil <i>Western Blotting seed</i> virus vaksin <i>Orf</i> dengan serum kambing dan domba.	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Cara Menghitung Konsentrasi Protein <i>Seed</i> Virus Vaksin <i>Orf</i>.	44
Lampiran 2 : Cara Menghitung BM Fraksi Protein <i>Seed</i> Virus Vaksin <i>Orf</i> pada uji SDS PAGE.	44
Lampiran 3 : Cara Menghitung BM Fraksi Protein Antigenik <i>Seed</i> Virus Vaksin <i>Orf</i> pada uji <i>Western Blotting</i>.	46
Lampiran 4 : Media dan Bufer-bufer yang Digunakan.	48
4.1 Media Eagle.	48
4.2 Komposisi Larutan pada Elektroforesis SDS PAGE.	49
4.3 Komposisi Larutan pada <i>Dot Blotting</i>	51



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah.

Penyakit *Orf* telah dikenal di Eropa sejak pertengahan abad ke 15 dan sekarang tersebar di seluruh dunia. Penyakit ini mempunyai arti ekonomi yang cukup penting, karena dapat mengakibatkan penurunan berat badan serta kematian terutama pada anak domba dan kambing akibat kesulitan untuk makan dan minum ; di samping mempunyai arti Kesehatan Masyarakat Veteriner, karena dapat menulari manusia (CDC, 2006).

Penyakit *Orf* mempunyai penyebaran hampir di seluruh dunia, dan sampai sekarang masih ada laporan tentang kejadiannya, baik pada hewan maupun pada manusia. Di Indonesia, *Orf* pertama kali ada dilaporkan oleh Bubberman dan Kraneveld pada tahun 1931. Pada tahun 1979, penyakit ini dilaporkan di Yogyakarta, Kudus (Jawa Tengah), Banyuwangi (Jawa Timur), Pasaman (Sumatera Barat), Karangasem, Negara (Bali), Makasar (Sulawesi Selatan) dan Medan (Sumatera Utara); dan sampai sekarangpun masih sering ditemukan, meskipun tidak dilaporkan secara resmi (Ditkeswan, 1981).

Di Amerika Serikat (USA), sampai tahun 2005, kejadian yang serupa juga masih dilaporkan baik pada hewan dan manusia. Kejadian biasanya berkaitan dengan saat pemotongan bulu dan penyembelihan domba atau kambing untuk dikonsumsi, dan saat persediaan makanan hewan sulit, sehingga hewan mencari



tanam-tanaman yang berduri yang mengakibatkan hewan terluka dan terinfeksi virus *Orf*. Meski kejadian *Orf* pada laporan CDC (*Central Disease Control*) rendah, tetapi menurut beberapa praktisi lapangan kejadian sesungguhnya lebih tinggi dan tidak dilaporkan karena sifat penyakit yang mudah ditangani dengan tingkat kesembuhan yang baik. Prevalensi pada manusia terutama lebih sering terjadi pada lelaki dewasa yang berkaitan dengan pekerjaan -sebagai peternak- .(CDC, 2006; Lutwick, 2006; McInnes 2006).

Di Indonesia penyakit *Orf* ini mempunyai arti ekonomis penting pada peternakan kambing dan atau domba rakyat. Karena ternak ini biasanya merupakan usaha sampingan petani kecil dan sekaligus sebagai bentuk investasi yang siap dialihkan menjadi uang secara cepat bila dibutuhkan (Adjid dan Ronohardjo, 1978)

Sifat penyakit yang cepat menyebar (angka morbiditas 80-95 % dalam populasi), dan menimbulkan kesulitan pada hewan penderita untuk makan dan minum, maka kondisi penderita akan cepat turun, dan kalau tidak cepat diobati/ditangani, maka tidak jarang berakibat kondisi penderita tambah turun (lemah, kurus), terutama jira terjadi infeksi sekunder dan berubah menjadi komplikasi berupa demam, limfangitis, limfadenopati, *toxic erythema*, *erythema multiforme*, *erupsi vesicularis* yang menyebar di kulit dan mukosa, mengingat kondisi kandang pada petani kecil. Dan jira keadaan telah demikian biasanya berakhir dengan kematian (angka mortalitas 0-5 %). (Ditkeswan, 1981; Hawayek, 2007)

Pemberantasan dapat dilakukan melalui beberapa tindakan. Pengobatan, pengisolasian hewan sakit dan vaksinasi dapat dilakukan dalam rangka mencegah penyakit *Orf*. Pengobatan, cukup mudah dilakukan dengan mengerok luka yang terbentuk kemudian mengoleskan iodium di bekas kerokan; dan suntikan antibiotika dilakukan untuk mencegah infeksi sekunder. Akan tetapi karena tingginya morbiditas *Orf* dan perbandingan antara harga obat dengan hewan yang tinggi, maka tindakan pengobatan tidak ekonomis. Pengisolasian terhadap hewan sakit dari kandang juga dapat dilakukan, tetapi karena biasanya penderita sudah mencemari kandangnya dengan virus, maka kasus *Orf* berikutnya sering terjadi, meski hewan yang sakit telah dikeluarkan dari kandang. (Ditkeswan, 1981). Untuk itu tindakan pemberantasan yang terbaik adalah dengan melakukan pencegahan dengan vaksinasi dengan vaksin yang berasal dari *seed* virus yang homolog (Buddle, *et al*, 1984a; Moens, *et al*, 1989) secara massal untuk daerah tertular; sedangkan untuk daerah yang masih bebas, vaksinasi sebaiknya tidak dilakukan, karena akan mencemari lingkungan dengan *scab*/keropeng hasil vaksinasi (CDC, 2006). Berdasarkan hal itu Pusvetma mulai tahun 1993, telah memproduksi vaksin *Orf* dengan menggunakan *seed* virus lokal (Moechrom, 1992)

Vaksin *Orf* produksi Pusvetma telah dipakai di daerah Makasar, Medan, Yogyakarta. Akan tetapi karena belum dipelajari lebih lanjut sifat antigenik dari *seed* virus untuk vaksin; padahal pengetahuan tentang sifat antigenik ini penting untuk mengetahui hubungan antigenik antar strain dari virus *Orf* (Sinha, *et al*, 1986; Khatri, *et al*, 2001; Inoshima, *et al*, 2002).

Pengetahuan tentang protein antigenik dari pada *seed virus* yang dipakai untuk vaksinasi dikaitkan dengan kemungkinan adanya keluhan tentang kekebalan yang ditimbulkan dari vaksinasi. Buddle, *et al* (1984a) pernah menemukan kegagalan vaksinasi, akibat rendahnya kekebalan yang ditimbulkan vaksinasi tersebut pada uji tantang (*Challenge test*). Pye (1990) juga pernah menemukan variasi hasil vaksinasi *Orf*, ada yang yang dapat melindungi dan ada yang kurang melindungi pada hewan coba pada uji tantang (*Challenge test*). Buddle *et al* (1984a) dan Pye (1990) ternyata menemukan perbedaan protein antigenik antara *seed virus* yang digunakan untuk vaksin. McKeever *et. al* (1987) juga menemukan hal yang sama.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah yang dapat diajukan adalah :

Berapakah berat molekul (BM) fraksi protein yang bersifat antigenik dari seed virus vaksin Orf yang digunakan produksi di Pusvetma ?.

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui respons antigenisitas vaksin *Orf* pada kambing dan domba.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah mengetahui berat molekul (BM) fraksi protein yang bersifat antigenik dari *seed* virus vaksin *Orf* yang digunakan produksi di Pusvetma.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini dapat mengetahui adanya reaksi antigenik pada kambing dan domba yang divaksin *Orf* produksi Pusvetma

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan merupakan langkah awal untuk meningkatkan kualitas vaksin *Orf* dengan memproduksi vaksin dari bagian virus yang bersifat antigenik. (misalnya : vaksin sub unit).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit *Orf*

Orf atau disebut juga dengan beberapa nama lain, yaitu *Contagious pustular dermatitis*; *Infectious pustular dermatitis*, *Contagious ecthyma*; *Infectious Ecthyma*; *Sore mouth disease*; *Scabby mouth disease*; *Infectious labial dermatitis*; *Infectious peristomatitis*; Bengoran; Dakangan, adalah suatu penyakit yang sangat menular pada domba dan kambing –terutama pada yang berusia muda-, disebabkan oleh virus *Orf* yang merupakan salah satu anggota dari genus *Parapoxvirus* Subfamilia *Chordopoxviridae*, familia *Poxviridae*, terutama menyerang pada kulit bibir dan sekitarnya (Rowson, *et al* 1987). Renshaw and Dodd (1978) dan Subba Rao *et al* (1984) menemukan bahwa secara serologis ada hubungan antigenik antara *Sheep Pox*, *Goat Pox* dan *Orf*. Penyakit ini umumnya menyerang hewan muda di samping dapat pula menulari manusia (Ditkeswan, 1981; CDC, 2006; Hawayek, 2007). (Tabel 2.1)

Masa inkubasi berlangsung kurang lebih 2 hari. Gejala klinik pada hewan yang menderita penyakit ini antara lain ialah terjadi peradangan pada kulit sekitar mulut, kelopak mata, alat genital, ambing pada hewan yang sedang menyusui dan *medial* kaki, pada tempat yang jarang ditumbuhi bulu. selanjutnya peradangan ini berubah menjadi eritema, lepuh-lepuh memipih dan berubah warna agak keunguan dan dapat mengeluarkan cairan, lalu membentuk kerak-kerak yang akan mengelupas setelah 1-2 minggu kemudian. Pada selaput

lendir yang terserang, tidak terjadi pergerakan. Apabila lesi tersebut hebat, maka pada bibir yang terserang terdapat kelainan yang menyerupai bunga kool (Fenner, 2002; Klein and Tryland, 2005; CDC, 2006) (Gambar 2.1).

Tabel 2.1: Jenis-jenis virus *Pox* yang dapat menginfeksi manusia (Fenner, 2002)

Genus	Species	Distribution	Reservoir	Disease in humans
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Variola virus</i>	Was worldwide	Humans (before 1977)	Smallpox, a specifically human, generalized disease
	<i>Monkeypox virus</i>	Central and West Africa	Squirrels, monkeys	Smallpox-like disease; a zoonosis
	<i>Vaccinia virus</i>	Worldwide	Laboratory virus	Used for smallpox vaccination, localized lesion
	<i>Buffalopox virus</i> (variant of <i>vaccinia virus</i>)	India (Egypt, Indonesia)	Buffaloes, rodents	Localized pustular skin lesions
	<i>Cowpox virus</i>	Europe, western Asia	Wild rodents	Localized pustular skin lesions; a rare zoonosis
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>	Worldwide	Sheep	Localized nodular skin lesions; a rare zoonosis
	<i>Bovine papular stomatitis virus</i>	Worldwide	Cattle	Localized nodular skin lesions; a rare zoonosis
	<i>Pseudocowpox virus</i>	Worldwide	Cows	Localized nodular skin lesions; a rare zoonosis
	<i>Sealpox virus</i>	Worldwide	Seals	Localized nodular skin lesions; a rare zoonosis
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanapoxvirus</i>	Tropical Africa	Unknown	Localized nodular skin lesions; a rare zoonosis
	<i>Yatapoxvirus</i>	West Africa	Unknown, possibly monkeys	Localized nodular skin lesions; rare accidental infections
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	Worldwide	Humans	Few or many nodular lesions, worse in AIDS cases

Kalau tidak ada infeksi sekunder, lesi-lesi ini biasanya menyembuh setelah penyakit tersebut berlangsung 4 minggu (Ditkeswan, 1981; Lyttle *at al*, 1994; CDC, 2006; Lutwick, 2006; McInnes, 2006). Pada hewan muda, keadaan ini sangat mengganggu, sehingga dapat menimbulkan kematian, karena kesulitan makan dan minum. Selain itu, adanya infeksi sekunder akan memperhebat derajat keparahan penyakit (Ditkeswan, 1981).

Pada manusia, gejala penyakit ini berupa lepuh-lepuh pada tangan dan lengan lalu berubah menjadi pustula, terkadang agak kabur dengan bentuk anthrax

lefidir yang teresang, tidak terjadi pergerakan. Apabila lesi tersebut tidak maka pada bibir yang teresang terdapat belain yang menyempai bunga kool (Ponnet, 2002; Klein and Ughand, 2002; CDC, 2006) (Gambar 2.1).

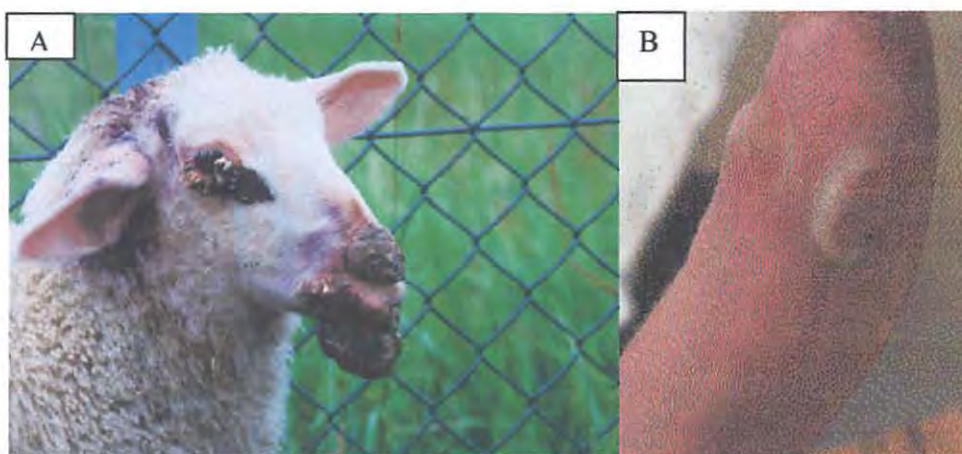
Tabel 2.1: Jenis-jenis virus Fox yang dapat menginfeksi manusia (Ponnet, 2002)

Jenis Virus	Gejala	Penyakit
Herpes Simplex Virus (HSV-1)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di sekitar mulut yang dapat berkembang menjadi bisul.	Herpes labialis
Herpes Simplex Virus (HSV-2)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di sekitar alat kelamin yang dapat berkembang menjadi bisul.	Herpes genitalis
Varicella-Zoster Virus (VZV)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di seluruh tubuh yang dapat berkembang menjadi cacar air.	Varicella (cacar air)
Epstein-Barr Virus (EBV)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di seluruh tubuh yang dapat berkembang menjadi demam berdarah.	Demam berdarah
Cytomegalovirus (CMV)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di seluruh tubuh yang dapat berkembang menjadi demam berdarah.	Demam berdarah
Human Herpesvirus 8 (HHV-8)	Gejala awal berupa demam, nyeri otot, dan pembengkakan kelenjar getah bening. Setelah itu, muncul lesi-lesi di seluruh tubuh yang dapat berkembang menjadi demam berdarah.	Demam berdarah

Kelainan tidak ada infeksi sekunder, lesi-lesi ini biasanya menyempai seluruh penyakit tersebut berlangsung 4 minggu (Dikoeswari, 1981; Little w.w, 1991; CDC, 2006; Lawick, 2006; Ponnet, 2006). Pada hewan muda, kelainan ini sangat mengganggu, sehingga dapat menimbulkan kematian, karena kesulitan makan dan minum. Selain itu, adanya infeksi sekunder akan memperhebat gejala keparahan penyakit (Dikoeswari, 1981).

Pada manusia, gejala penyakit ini berupa lepuh-lepuh pada tangan dan lengan lalu berubah menjadi pustula, terkadang agak kapur dengan bentuk satirax

kulit (Gambar 2.1). Lesi ini, kemudian mengering serta mengeras setelah 4-5 minggu (Ditkeswan, 1981; Lutwick, 2006; McInnes, 2006). Komplikasi dapat terjadi berupa, demam, limfangitis, limfadenopati, infeksi sekunder; dan pada pasien yang Imunodefisiensi (limfoma, dalam terapi dengan obat konkoman sitotoksik, *congenital T-cell deficiency*) lesi-lesi dapat menjadi besar. Tetapi kematian karenanya belum pernah dilaporkan (Lutwick, 2006).



Gambar 2.1 : A. Penyakit *Orf* pada domba. (Gokce, *et al*, 2005). B. Lepuh bernanah disebabkan oleh virus *Orf* pada jari jempol manusia (CDC, 2006).

Pada bedah bangkai, tidak terlihat adanya kelainan-kelainan menyolok pada alat tubuh bagian dalam kecuali kelainan-kelainan pada kulit. Bahan pemeriksaan berupa keropeng kulit yang disertai jaringan di bawahnya, diawetkan dalam gliserin NaCl faali 1:1 untuk pemeriksaan virologik, dan dalam formalin 10% untuk keperluan pemeriksaan histopatologik (CDC, 2006).

Diagnosis biasanya dapat dilakukan berdasarkan gejala klinis yang ditimbulkan. Akan tetapi untuk ketepatan dan kecepatan diagnosis dilakukan dengan memakai mikroskop elektron dari lepuh kulit terjangkit. Skarifikasi/

pencacaran pada kulit anak domba dengan suspensi keropeng akan menghasilkan penyakit yang serupa dengan penyakit asal (Ditkeswan, 1981; CDC, 2006; Lutwick, 2006; McInnes, 2006).

Penyakit yang mirip dengan *Orf* adalah cacar pada domba (*Sheep Pox*) dan cacar kambing (*Goat Pox*). Pada penyakit cacar, lesi biasanya mulai dengan haemoragik dan terjadi pada kulit bagian luar serta ada tendensi meluas ke seluruh tubuh, termasuk ke organ-organ tubuh bagian dalam. Dengan mikroskop elektron, kedua jenis virus tadi dapat dibedakan (Ditkeswan, 1981; Lutwick, 2006).

Pada cacar kambing, lesi yang terjadi tidak separah seperti pada cacar domba dan lebih mirip *Orf*. Di samping itu virus cacar dapat ditanam pada *CAM* (*Chorio Alantois Membrane*), sedangkan virus *Orf* umumnya tidak dapat tumbuh (Brooks et al *et al*, 2005; CDC, 2006).

2.2 Virus *Orf*

Virus *Orf* berbentuk bulat lonjong seperti kepompong ulat sutera, berukuran 160-190 x 250-300 nm. Strukturnya dari dalam keluar terdiri dari Nukleoprotein yang diselimuti oleh *core membrane*. *Core membrane* dilindungi oleh *lateral body*, kesemuanya diselimuti oleh *outer membrane*. *Outer membrane* dilekati *surface tubule* yang berupa garis-garis spiral tertutup yang bersilangan. Garis-garis ini berukuran 10-20 x 1000 nm menempel di seluruh permukaan membran *virion*. Dan lapisan terluar adalah *envelope*

(Nagington, *et al*, 1964; Porterfield, 1989; Fenner, 2002) (Gambar 2.2 dan Tabel 2.2).

Genom virus *Orf* berupa *double stranded DNA (dsDNA) linear* sepanjang 130-135 kbp, kandungan Guanin + Cytosin (G+C) nya sebesar 63 % yang pada bagian terminalnya mengandung bagian yang ber*Cross-links analogous* dengan virus *Vaccinia* (Ballassu and Robinson, 1987; Porterfield, 1989; Fenner, 2002). Fragmen DNA di bagian *internal* daripada genom menunjukkan *cross-hybridization* antar spesies dalam genus *Parapox*; tetapi bagian *terminalnya cross-hybridization* hanya terjadi pada spesies yang spesifik (Fenner, *et al*, 1995; Fenner, 2002).

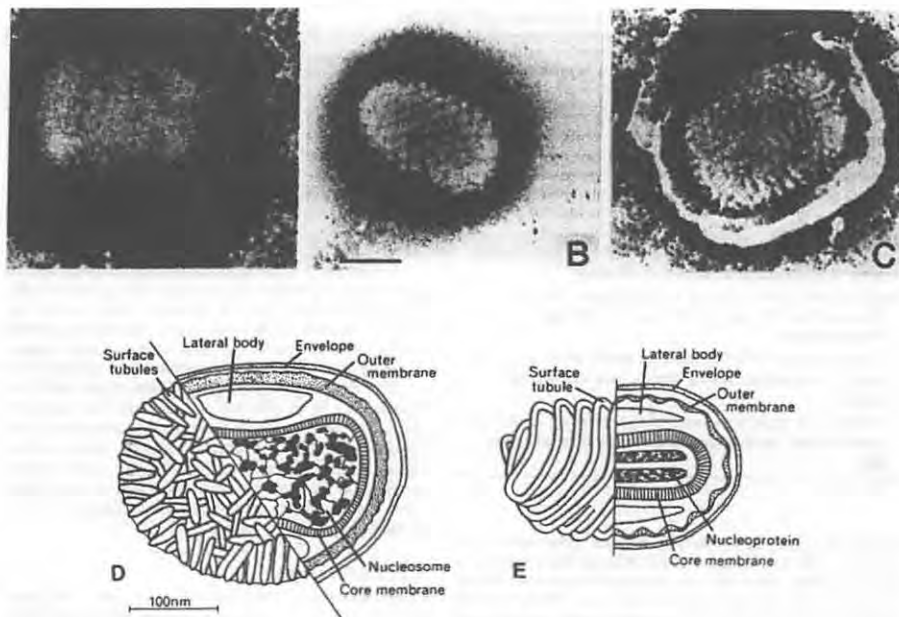
Virus *Orf* dapat ditumbuhkan dalam biakan sel *fibroblast* domba, sel testis domba dan sapi serta ginjal janin sapi dan kambing yang menimbulkan *CPE (Cyto Pathogenic Effect)* dengan ciri sel yang mempunyai badan inklusi. Badan inklusi ini berbentuk bintik-bintik asidofilik para-nuklear dan basofilik pada sel primer (Pospischil and Bachmann, 1980).

Virus *Orf* dapat ditumbuhkan pada biakan jaringan (*Tissue culture/TC*) sel kulit, sel otot domba, sel testis domba dan sapi serta ginjal janin sapi dan kambing. Pada telur ayam berembryo (TAB) biasanya tidak ada pertumbuhan (Plowright, *et al*, 1957; Traykova and Agrinova, 1985; Porterfield, 1989; Fenner, 2002).

Virus ini sangat tahan chloroform, pengaruh udara luar dan kekeringan, dia dapat hidup di luar sel selama beberapa bulan serta dapat hidup beberapa tahun

pada keropeng kulit. Pada suhu kamar, virus ini dapat tahan selama 15 tahun. Pada suhu 56-60⁰ C virus rusak dalam 1 jam. (Fenner, 2002; Porterfield, 1989). Virus ini tidak mempunyai hemaglutinin. Bagian antigeniknya larut di air. Virus *Orf* dapat diketahui dengan *Complement Fixation Test* (CFT) (McDonald, 1961; Porterfield, 1989) dan *Agar Gel Precipitation* (AGP) (Adjid dan Ronohardjo, 1978), *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) (Adjid and Daniels, 1992; Gokce, *et al*, 2005), *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (McInnes, 2006; Nitsche, *et al*, 2006).

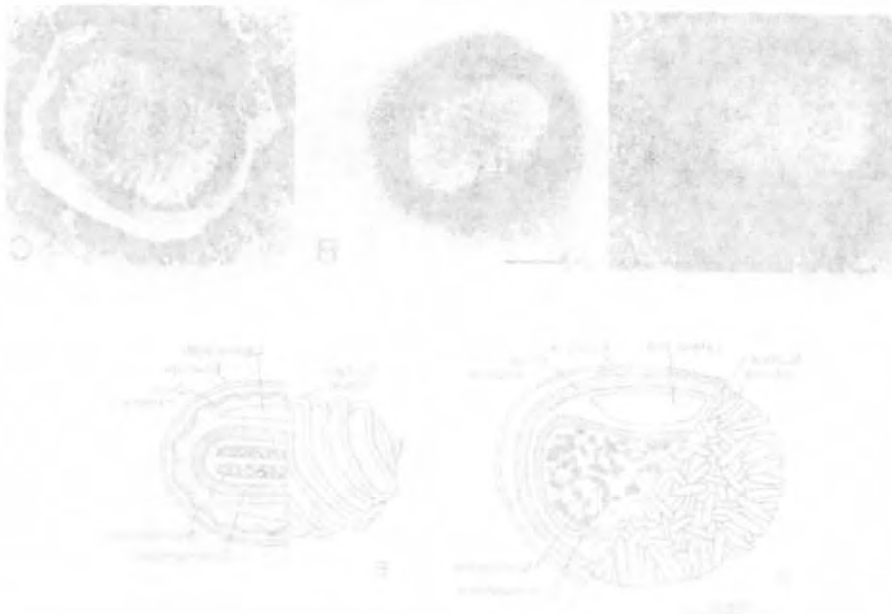
Hewan-hewan, yang sembuh dari penyakit ini, mempunyai kekebalan yang berlangsung lama dan infeksi ulang dapat terjadi lagi (Savory, *et al*, 2000).



Gambar 2.2 : Foto-foto negative stain dan gambar skematik beberapa virus Pox (A. virus *Orthopox* : Cowpox, Monkeypox, Vaccinia & Variola), (B. virus *Parapox* : Orf, Bovine popular stomatitis, Pseudocowpox, Sealpox), (C. virus *Yatapox* : Tanapox, Yabapox), (D. gambar skematik struktur virus *Vaccinia*), (E. gambar skematik struktur virus *Orf*) (Fenner, 2002, p 361 dari Fenner and Nakano, 1988).

pada kempeng kulit. Pada suhu kamar, virus ini dapat tahan selama 12 tahun pada suhu 20-60°C virus rusak dalam 1 jam. (Fenner, 2002; Portetfeld, 1989). Virus ini tidak mempunyai hemaglutinin. Bagian antigeniknya jatuh di virus Oy dapat diketahui dengan Complement Fixation Test (CFT) (McDonald, 1961; Portetfeld, 1989) dan juga Gel Precipitation (AGP) (Adji dan Konrad, 1978), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Adji and Tanaka, 1992; Gokce, et al, 2005), Polymerase Chain Reaction (PCR) (McInnes, 2006; Nitsche, et al, 2006).

Hewan-hewan yang serupai dari penyakit ini mempunyai kekebalan yang berlangsung lama dan infeksi ulang dapat terjadi lagi (Zavory, et al, 2000).



Gambar 2.2 : Foto foto negative elektron dan gambar skematis beberapa virus. (A) Virus Chikungunya; (B) Virus Dengue; (C) Virus Ebola; (D) Gambar skematis struktur virus falciparum; (E) Gambar skematis struktur virus Oy (Fenner, 2002, p. 161 dari Fenner and Nakano, 1988).

Inang rentan utama adalah kambing dan domba, tetapi dapat juga menyerang rusa, menjangan dan manusia. Penyakit ini menimbulkan kekebalan yang berjangka waktu lama, oleh karenanya pada daerah-daerah enzootik, penyakit ini ditemukan pada hewan-hewan muda, sedangkan di daerah-daerah yang baru pertama kali diserang, penyakit ini ditemukan pada hewan segala umur (CDC, 2006; McInnes, 2006).

Tabel 2.2 : Bentuk, Ukuran dan Peralatan virus-virus *Pox* (termasuk virus *Orf*) yang digunakan untuk menginfeksi induk semang (*host*) (Fenner, 2002)

<p><i>Of the eight genera in the family Poxviridae, members of the genera Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Yatapoxvirus, and Molluscipoxvirus infect humans</i></p> <p><i>For most genera, the virion is brick shaped with rounded corners, 250 by 200 by 200 nm, with an irregular arrangement of tubules on the outer membrane, which is sometimes surrounded by an envelope; for Parapoxvirus, the virion is ovoid, 260 by 160 nm, with a regular spiral arrangement of the "tubule" on the outer membrane</i></p> <p><i>There is a complex internal structure, with core, lateral bodies, outer membrane, and sometimes an envelope</i></p> <p><i>Linear dsDNA, 170 to 250 kbp (Orthopoxvirus), 130 kbp (Parapoxvirus); 145 kbp (Yatapoxvirus), or 190 kbp (Molluscipoxvirus)</i></p> <p><i>The virion contains RNA polymerase, transcription factor, poly(A) polymerase, capping enzyme, and methylating enzymes</i></p> <p><i>For cytoplasmic replication, enveloped particles are released by exocytosis and nonenveloped particles are released by cell lysis</i></p>

2.3 Patogenesis Penyakit *Orf*

Cara penularan terjadi melalui kontak, melalui luka-luka kulit waktu menyusui, kontak kelamin, atau kontak dengan bahan-bahan yang mengandung virus penyakit ini (CDC, 2006; Lutwick, 2006; McInnes, 2006). Penularan pada manusia juga terjadi melalui kontak dengan hewan yang sakit atau bahan-bahan yang tercemar oleh penyakit ini (CDC, 2006; Lutwick, 2006).

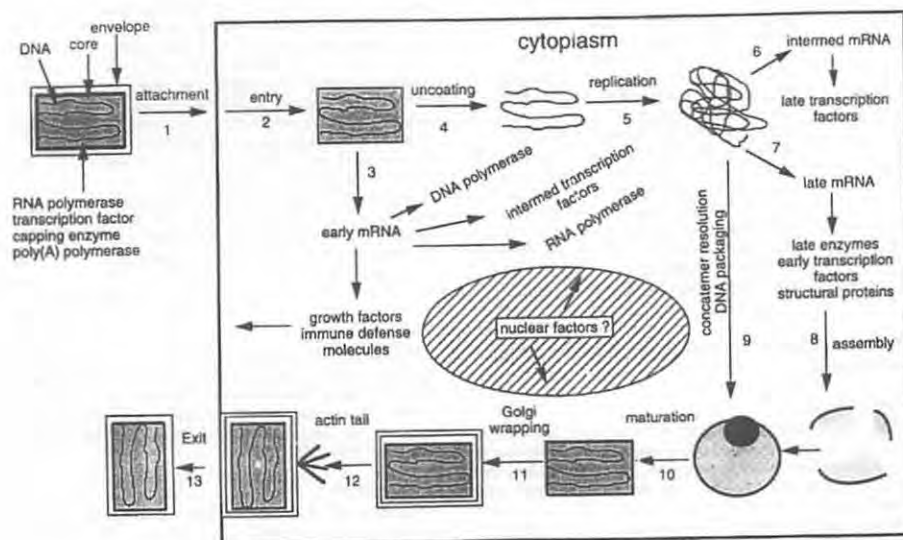
Replikasi golongan virus ini terjadi sepenuhnya di sitoplasma. Virus mempunyai satu lusinan kode enzim-enzim yang digunakan dalam transkripsi dan replikasi daripada genom virus. Beberapa enzim itu dibawah oleh *virion* nya sendiri (termasuk *DNA-dependent RNA polymerase*, *Poly (A) polymerase*, *capping enzyme*, *Methylating enzymes* dan transkripsi faktor) (Fenner, 2002).

Setelah *virion* berfusi ke plasma membran atau melalui endositosis, virus utuh dikeluarkan (*release*) ke sitoplasma sel inang. Transkripsi dimulai oleh *enzyme transcriptase* virus, sedangkan fungsi *capped* dan *polyadenylated mRNAs* keduanya diproduksi beberapa menit setelah infeksi. Polipeptida-polipeptida diproduksi melalui translasi daripada banyak *mRNAs Complete* dari bentuk umum virus (*uncoating-virus/ naked-virus*), lalu transkripsi dari sekitar 100 gen “awal”, kemudian didistribusikan melalui genom, hal ini terjadi sebelum sintesa DNA virus dimulai. Protein-protein awal, termasuk *DNA polymerase*, *Thymidine kinase* dan beberapa enzim lagi disaratkan untuk replikasi genom. Transkripsi polipeptida-polipeptida oleh gen awal ini erat kaitannya dengan faktor pertumbuhan epidermis dan faktor pertumbuhan transformasi. Produksi faktor pertumbuhan yang homolog dengan faktor pertumbuhan epidermis oleh sel-sel terinfeksi virus dapat menimbulkan penyakit proliferasif yang disebabkan oleh anggota virus *Pox* lainnya (*Fibroma Shope*, *Tumor Yaba*, virus *Molluscum contagiosum*) (Fenner, et al, 1995; Fenner, 2002; Brooks et al, 2005).

Bersamaan dengan proses replikasi DNA, terjadi pembentukan yang dramatik dalam ekspresi gen. Transkripsi daripada “*intermediate*” dan “*late*”

gen-gen dikontrol oleh pengikatan yang spesifik dari protein-protein virus sebagai promotor dari sekuen selanjutnya (Fenner, 2002).

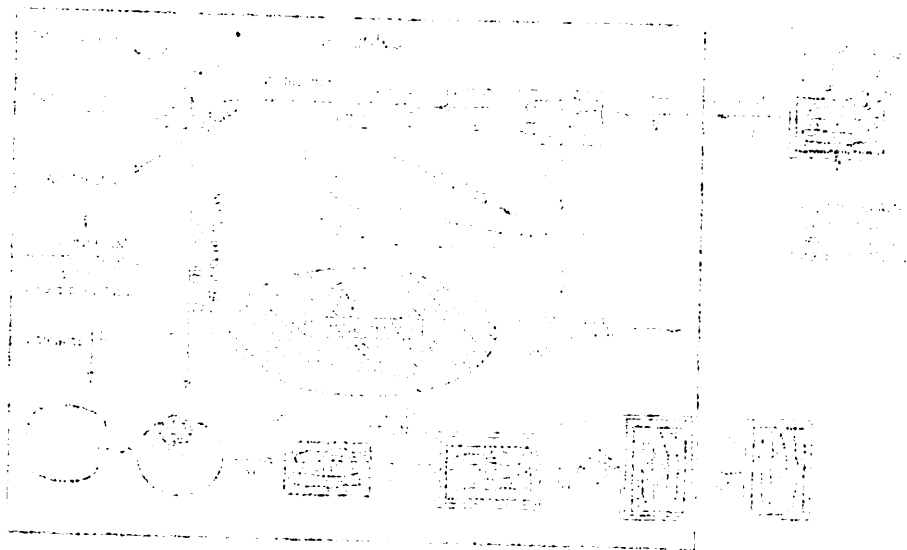
Perakitan *virion* terjadi di sekitar sitoplasma, dimana partikel-partikel *spherical immature* dapat dilihat dengan elektron mikroskop. Dua lapisan luar yang jadi membran luar dari *virion* serta deferensiasi *core membrane* virus dan *lateral bodies* terjadi bersama juga di sini. Partikel yang telah *mature* pindah ke badan golgi, lalu terbentuklah *envelope*, lalu dikeluarkan dari sel inang melalui *exocytosis* ; tetapi kebanyakan virus tak berenvelope saat dikeluarkan bersamaan dengan pecahnya sel inang. Yang berenvelope maupun yang tidak sama-sama infeksius, akan tetapi yang berenvelope berperan penting pada penyebaran virion ke lain individu/ penderita (Fenner, *et al*, 1995; Fenner, 2002; Brooks et al, 2005) (Gambar 2.3)



Gambar 2.3 : Diagram ilustrasi dari siklus replikasi virus *Vaccinia* (satu familia dengan virus *Orf*) (Fenner, 2002 dari Moss, 2001).

gen-gen dikontrol oleh pengikatan yang spesifik dari protein-protein virus sebagai protein dari sekuen selulanya (Fenner, 2002).

Praktik *in vivo* terjadi di sekitar selaput dimana *particle-particle* *system* ini mampu dapat dilihat dengan elektron mikroskop. Dua lapisan luar yang jadi membran luar dari *in vivo* serta defenensi *core* membran virus dan *in vivo* *boiler* terjadi bersama juga di sini. *Particle* yang telah *in vivo* ke dalam *golgi* lalu terbentuk *envelope* lalu dikeluarkan dari sel inang melalui *cytoplast* ; tetapi kebanyakan virus tak *envelope* saat dikeluarkan bersamaan dengan pecahnya sel inang. Yang *envelope* manapun yang tidak sama-sama infeksi akan tetapi yang *envelope* berperan penting pada penyebaran virus ke lain individu penderita (Fenner, et al, 1992; Fenner, 2002; Brooks et al, 2002) (Gambar 2.3)



Gambar 2.3 : Diagram ilustrasi dari siklus replikasi virus *Infectio* (atau familia dengan virus *Cy*) (Fenner, 2002 dan Moss, 2001).

Beberapa kode gene untuk beberapa protein virus ini disekresi dari sel-sel yang terinfeksi. Sekret ini meningkatkan respons inang terhadap adanya infeksi. Beberapa dari protein-protein *immunosupresive* ini disekresi oleh *mimics* dari ikatan-ikatan *host* (*host ligands*) atau regulator-regulator (*virokines*). Protein-protein *immunosupresive* adalah homolog-homolog dari *epidermal growth factor*, *complement regulatory protein* dan *virokines* yang menyeimbangkan reaksi resistensi terhadap interferon. Sedangkan protein-protein *immunosupresive* yang lain (*viroceptors*) mereka adalah homolog-homolog dari *cellular cytokine receptors*, seperti *tumor necrosis factor/TNF α* , *interleukin/IL-1* dan *γ -interferon/INF receptors*. Efek daripada virokines ini pada eksperimen pada *Myxoma* pada kelinci Eropah (*Wild European rabbit*), terlihat menurunkan virulensi virus; akan tetapi virulensi akan pulih kembali jika virus diattenuasikan lagi di host asal (kelinci Eropa) (Fenner, 2002).

Semua familia virus *Pox* pada vertebrata dapat mereaktivasi virus *Pox* vertebrata lainnya yang terinaktivasi oleh panas. Hal ini mungkin karena virus yang inaktif oleh panas menyediakan *template* (cetakan), sedangkan virus yang mereaktivasi menyediakan enzim-enzim untuk transkripsi. karena enzim *RNA polymerase* labil terhadap panas. sehingga virus yang terpanasi itu tak dapat melepas selubung tahap kedua. Proses ini disebut reaktivasi nongenetik (Brooks et al, 2005; Rantam, 2005).

Replikasi DNA terjadi 2-6 jam setelah infeksi, yaitu setelah terjadi pelepasan selubung kedua. *DNA polymerase* dan *Thymidine kinase* berperan di sini. Proses ini membutuhkan banyak protein sel inang. Proses terjadi di

sitoplasma; yang bila dilihat di bawah mikroskop, daerah inilah yang menunjukkan gambaran badan inklusi. Jumlah badan inklusi seimbang dengan penggandaan infeksi. Hal ini menimbulkan dugaan, bahwa setiap partikel infeksius dapat menginduksi suatu badan inklusi sebagai “pabrik“ daripada virus. Tingginya angka rekombinasi homolog terjadi pada sel-sel yang terinfeksi virus *Pox*; hal ini digunakan untuk mengembangkan dan membuat peta mutasi secara eksperimental (Savory, *et al*, 2000; Brooks *et al*, 2005).

Beberapa gen virus *Pox* menyerupai gen-gen mamalia yang berkaitan dengan protein penghambat pertahanan inang (*TNF-receptor*, γ -*INF-receptor*, *IL-1-receptor* yang berikatan dengan *complement*). Pengubah pertahanan yang dikode virus *Pox* ini diperkirakan melawan jaringan *complement* dan *cytokine* yang penting dalam respons inang terhadap infeksi virus, sehingga memungkinkan replikasi virus bertambah dan memudahkan penularan virus. Inilah salah satu cara *escape mekanisme* virus familia ini terhadap sistem pertahanan tubuh (Deane *et al*, 2000; Mercer *et al*, 2002; Brooks *et al*, 2005). Untuk itu meskipun secara teoritis kekebalan akibat vaksinasi penyakit *Orf* dapat berlangsung lama, tetapi sangat dianjurkan untuk melakukan vaksinasi setiap tahun sekali (Moechrom, 1992)

2.4 Diagnosis, Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit *Orf*

Diagnosis dengan melihat gejala klinis yang ditimbulkan. Tetapi kadang agak mirip dengan *Sheep Pox* dan *Goat Pox* dan virus-virus *Chordopox* yang lain, maka sebaiknya dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan melihat

bentuk virus di bawah elektron mikroskop. Akan tetapi cara ini tidak mudah dilakukan untuk kondisi Indonesia karena terbatasnya alat dan dana (Adjid dan Ronohardjo, 1978). Cara diagnosis lain dapat juga dilakukan secara serologik di antaranya dengan Agar Gel Presipitasi (AGP), *Complement Fixation Test* (CFT) (Macdonald, 1961), *Flourescence Antibody Technic* (FAT) (Chubb and Couch, 1985), dan *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Untuk uji tersebut di atas, digunakan suspensi material yang diperiksa, sebagai antigen (Cottral, 1978; Anonimous 1981; Fenner, 2002; Lutwick 2006). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) juga dapat dilakukan (Fenner, 2002; Lutwick 2006; McInnes, 2006; Nitsche, *et al*, 2006).

Pencegahan penyakit ini dapat memakai autovaksin pada daerah-daerah enzootik. Vaksin ini dibuat dari keropeng kulit yang menderita, dibuat tepung halus dan disuspensikan menjadi 1% dalam 50% gliserin. Vaksinasi pada hewan muda dilakukan berupa pencacaran kulit, diadakan pada kulit di daerah sebelah dalam paha (*inguinal*), sedangkan pada hewan dewasa dilakukan di sekitar leher beberapa minggu sebelum masa penyusuan (CDC, 2006).

Anak domba biasanya divaksinasi pada umur 1 bulan dan divaksinasi ulang pada umur 2-3 bulan agar kekebalan yang diperoleh maksimal. Reaksi setempat timbul 7 hari pasca vaksinasi dan kekebalan berlangsung selama 8-28 bulan. Hewan di daerah endemik sebaiknya divaksinasi setiap tahun. Vaksin harus diperlakukan hati-hati agar tidak menginfeksi tangan sedangkan botol, peralatan dan bekas-bekas vaksinasi harus segera dibakar atau didesinfeksi agar tidak mengkontaminasi tanah atau tempat diadakan vaksinasi (Ditkeswan,

1981; Robinson, 1983; CDC, 2006). Pada daerah yang belum dijangkiti penyakit ini, tidak dianjurkan mengadakan vaksinasi (Ditkeswan, 1981).

Pengendalian penyakit dengan melakukan pengasingan terhadap hewan yang menunjukkan gejala sakit dengan segera dari hewan yang sehat agar perluasan penyakitnya dapat dibatasi. di samping hal tersebut tempat penggembalaan yang tertulari sebaiknya tidak dipakai lagi untuk jangka waktu lama, mengingat bahwa virus *Orf* masih dapat hidup beberapa bulan di udara luar (Porterfield, 1989; CDC, 2006).

Pemberantasan dapat dilakukan dengan cara pada daerah sekitar terjangkit segera diberi vaksinasi masal, agar penyakitnya dapat dikendalikan dan tidak menjalar lebih luas. Hewan yang mati akibat penyakit ini segera dibakar atau dikubur dalam (Ditkeswan, 1981; CDC, 2006).

2.5 Vaksin *Orf*

Vaksin adalah suatu bahan yang dibuat dari bibit penyakit (mikroba : virus, bakteri, protozoa) yang dilemahkan bagian-bagian struktur tertentu dengan tetap menjaga struktur mikroba yang menimbulkan kekebalan (Kresno, 2001).

Di Pusvetma vaksin *Orf* telah dibuat mulai tahun 1993. Pembuatan masih menggunakan cara produksi seperti di *Binder Veterinary Vaccines* (1982), yaitu dengan penanaman virus pada hewan peka (kambing dan domba). Setelah masa inkubasi 4-5 hari virus dipanen dengan mengambil keropeng/*scab* lembab yang terbentuk dari kulit kambing dan domba. Keropeng lalu diproses menjadi vaksin. (British Veterinary Codex, 1965; Binder Veterinary Vaccines, 1982;

Moechrom, 1992). Sedangkan cara pengujiannya menurut standar British Pharmacopoea (1977) beserta suplemennya.

Pembuatan vaksin *Orf* dari biakan *tissue culture* juga telah diusahakan oleh beberapa peneliti; akan tetapi hasilnya masih ada perbedaan pendapat terhadap potensi pengebalannya (*Immun potency*). Buddle, *et al* (1984b) mendapatkan kegagalan dari hasil vaksinasi *Orf* dari virus yang dibiakan pada *tissue culture*. Mayr, *et al* (1981) mendapatkan hasil yang sebaliknya. Tetapi yang jelas Mayr, *et al* mendapatkan vaksin yang baik itu setelah mengadaptasikan virus pada *tissue culture* 65 pasasi/lintasan dengan titer virus lebih dari $10^{6.5}$ TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose*) per ml. Pye (1990) juga telah membuat vaksin *Orf* dari virus yang diadaptasikan di *tissue culture* akan tetapi daya perlindungan terhadap uji tantang (*Challenge test*) kurang kuat; dan Zarnke *et al*, (1985) juga menemukan kambing gunung yang terjangkit *Orf* kembali setelah divaksin dengan vaksin yang virusnya diadaptasikan di *tissue culture*. Untuk itu pembuatan vaksin *Orf* di Pusvetma masih menggunakan kambing dan domba sebagai biakan virus (Moechrom, 1992).

Yang tidak kalah pentingnya adalah vaksin *Orf* yang dipakai virusnya harus sesuai dengan strain yang beredar/ada di daerah yang akan divaksinasi (Buddle, *et al*, 1984a; Moens, *et al*, 1989; Pye, 1990)

2.6 Protein Antigenik virus *Orf*

Protein antigenik adalah suatu protein asing, yang bila dimasukkan ke dalam tubuh host/induk semang, tubuh akan menolaknya. Protein imunogenik

adalah protein asing, yang bila dimasukkan ke dalam tubuh host/induk semang ia dapat menimbulkan reaksi kekebalan/imun baik humoral, selular maupun keduanya (Kresno, 2001). Protein itu dapat berasal dari mikroba (dalam hal ini virus *Orf*). Dia juga mencatat beberapa faktor yang menentukan imunogenisitas suatu bahan, yaitu (a) Nilai keasingan bahan terhadap tubuh host, (b) Ukuran molekul bahan tersebut (biasanya > 100 kDa), (c) Kekomplekan susunan molekul bahan, (d) Cara masuk dan jumlah bahan yang masuk, dan (e) Faktor genetik *host*.

Menurut Buddle, *et al* (1984a), dari 4 isolat virus *Orf* asal New Zealand, dengan *SDS PAGE* 12 % didapatkan pita protein yang dominan adalah berbobot 24, 31, 45 dan 75 kDa. Sedangkan Khatri, *et al* (2001) dari 2 isolat asal India, dengan *SDS PAGE* 12 % juga mendapatkan beberapa pita protein, yaitu, 107, 100, 92, 81, 68, 65, 60, 53, 43, 36, 35, 32, 29, 27, 23, 21, dan 14 kDa (dari virus *Orf* yang dimurnikan) ; dan 152, 123, 92, 85, 68, 53, 47, 43, 38, 23 dan 21 kDa (dari protein virus *Orf* yang dilarutkan).

Dari banyak pita ini kemudian Khatri *et al* (2001) melanjutkan dengan *western blotting*, maka dihasilkan pita 116, 92, 81, 68, 65, 60, 53, 49, 38, 29, 23, 21, 14 kDa (dari virus *Orf* yang dimurnikan) ; dan 123, 92, 85, 68, 53, 47, 43, 38, 23, 21 kDa (dari protein virus *Orf* yang dilarutkan). Dan dia berkesimpulan bahwa *western blotting* lebih peka untuk mendeteksi protein-protein dari virus *Orf*

2.7 Respons Immunogenik Vaksin *Orf*

Respons imunogenik adalah respons dari host/inang yang dimasuki bahan imunogen. Dalam penelitian ini yang bertindak sebagai host adalah kambing ; dan imunogen nya adalah vaksin *Orf* produk Pusvetma. Serum antibodi yang dihasilkan dari vaksinasi ini digunakan untuk reaksi antigenik pada *Dot Blotting* dan *Western Blotting*.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional, karena berusaha mengetahui protein (dengan berat) berapa sajakah yang terkandung dalam seed virus vaksin *Orf* Pusvetma; dan dari protein itu mana yang bersifat antigenik.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian.

1. Media *Eagle* steril (Lampiran 4.1).
2. Seed virus *Orf* isolat Merakkurak, Tuban tahun 1991 yang dibiakkan di *Tissue culture* dari testis bayi kambing.
3. Vaksin *Orf* produksi Pusvetma No. Batch : 0706 masa kadaluarsa 09/2007
4. Kambing dan domba berumur di bawah 6 bulan yang divaksin *Orf* dan *dibooster* 2 kali dengan interval 2 minggu.
5. Serum kambing dan domba yang diambil pada 3 minggu pasca *booster* ke 2.
6. Bahan-bahan untuk *SDS PAGE* (Lampiran 4.2).
7. Bahan-bahan untuk *Dot Blotting* (Lampiran 4.3).
8. Bahan-bahan untuk *Western Blotting* (Lampiran 4.2 dan 4.3).

3.2.2 Alat Penelitian.

1. Sartorius Filter Holder diaeter 22,5 cm.
2. Botol Roux untuk 15 cc media.
3. Botol Universal volume 25 cc.
4. Botol serum volume 2,5-10 cc.
5. Spuit volume 1-10 cc.
6. Pipet volume 1-10 cc.
7. Micripipet volume 5-200 μ L dan *fintipnya*.
8. Waterbath dan Incobator.
9. Sonicator dan Shaker.
10. Ajustable Refrigerated centrifuge.
11. Freezer dan Refrigerator.
12. Gel Elektroforesis.
13. Dot Blotter dan Western Blotter.
14. Voltameter dan Timer.
15. Scanner dan Computer.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembiakan dan persiapan *seed* virus vaksin *Orf*

Pembiakan virus untuk diuji *SDS PAGE*, *Dot* dan *Western Blotting* dilakukan pada *primary tissue culture* testis bayi kambing yang mempunyai kepadatan (*confluency*) 75 – 80 %. *Tissue culture* yang ada di botol roux 15 ml

dicuci 3 kali dengan PBS⁽⁻⁾ 37° C . Kemudian 1 ml *seed* virus yang mempunyai titer 10⁴/ml TCID₅₀ diteteskan ke *tissue culture* dan diadaptasikan pada 37° C selama 1 jam, baru kemudian 15 ml media *Eagle* yang mengandung *foetal bovine serum (FBS)* 2 % ditambahkan ke dalam botol roux. Botol roux ditutup dan diinkubasikan sampai 48 jam pada 37° C. Perkembang-biakan virus diperiksa setiap 6 jam. Jika *cyto pathogenic effect (CPE)* terjadi pada 50 % dari *tissue culture*, virus dipanen dengan cara mencair-bekukan (*Freezing-thawing*) 3 kali. Media ditampung dan disentrifuse 2.500 g untuk mengendapkan sel-sel yang rusak (*debris cells*), supernatan disimpan pada -20° s/d -80° C dan endapan dibuang (Moechrom, 1992).

Supernatan dikonsentrasi dengan menambahkan etanol 96 % dengan pelahan dalam suhu 4° C sambil diaduk pelan. Larutan lalu disentrifuse dingin 10.000 g selama 10 menit dan supernatan dibuang dan pellet yang mengendap/menempel di dasar tabung diresuspensi dengan PBS⁽⁻⁾ dingin sebanyak 2 kali volume pellet. Konsentrat inilah yang siap digunakan untuk *SDS PAGE*, *Dot Blotting*, *Western Blotting* dan juga *ELISA* (Aulani'am, 2005).

3.3.2 *SDS PAGE*.

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). Campuran *separating gel* dimasukkan hati-hati ke dalam plate (tempat lapisan gel) menggunakan mikropipet. Dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel.

Berikutnya *stacking gel* (3 %) dituang di atas *separating gel* (12 %) sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. Didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. Selanjutnya plate dipasang pada alat elektroforesis, berikutnya buffer dituangkan pada bejana elektroforesis.

Sejumlah 10 μL sampel isolat protein ditambah 10 μL Tris-HCl + 20 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*), dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 100° C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 20 μL untuk tiap sumur. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* (comasie blue) selama 30-60 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis difoto.

Membandingkan ukuran hasil elektroforesis sampel dengan marker protein, maka penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

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

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y . Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

3.3.3 *Dot Blotting.*

Menurut Aulani'am (2005) cara *Dot Blotting* adalah sebagai berikut : 20 µl antigen protein *Orf* diencerkan dalam PBS⁽⁻⁾ sodium azida (NaN₃) 1% dengan perbandingan (1:4), lalu diteteskan pada membran nitroselulosa (NC) yang telah dibasahi PBS⁽⁻⁾ yang terangkai pada alat *Dot Blotter*. Antigen protein *Orf* didegas/dipindah ke membran dengan melistriki 30 menit.

Membran plus antigen protein *Orf* diblocking dengan *Blocking buffer* (PBST yang mengandung *Skim milk* 5 %), selama 1 jam pada suhu kamar, *Blocking buffer* dibuang, lalu dicuci dengan PBST (PBS⁽⁻⁾ yang mengandung 0,05 % Tween 20) selama 3 x 3 menit. Kemudian diinkubasi pada 37° C dalam serum/antibodi primer (serum kambing/domba yang divaksinasi) yang telah diencerkan 1:200 dalam *Blocking buffer* selama 2 jam sambil digoyang.

Membran plus kompleks Ag-Ab I dicuci dengan PBST selama 3 x 3 menit. Kemudian diinkubasi pada 37° C dalam antibodi sekunder (*Rabbit Anti goat* atau *sheep IgG Peroxidase (AP) Conjugated*) yang telah diencerkan 1:2500 dalam *Blocking buffer* steril selama 1 jam sambil digoyang.

Membran plus kompleks Ag-Ab I-Ab II (*AP Conjugated*) dicuci dengan PBST selama 3 x 3 menit. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam substrat Ortho phenilene diamine (OPD) selama 30 menit sambil digoyang

(dalam ruang gelap). Proses dihentikan dengan menambahkan aquades. Lalu membran dikeringkan dan dilihat ada noda/warna atau tidak. Jika ada berarti ada reaksi antigenik antara antigen protein *Orf* dengan antibodi kambing/domba yang divaksinasi.

3.3.4 *Western Blotting*.

Menurut Aulani'am (2005) cara *Western Blotting* adalah sebagai berikut : Gel hasil *SDS PAGE* yang ada pita-pita fraksi proteinnya dicuci dengan aquades. Membran nitro cellulosa (NC) direndam dalam PBS. Kemudian dalam tempat yang terpisah-pisah, dalam waktu yang bersamaan membran NC, Gel dan Spon kertas saring direndam dalam *Blot buffer*. Kemudian disusun dalam blotter dengan susunan dari atas ke bawah, *Black side*/bagian atas blotter, 6 lembar spon kertas saring, Gel, Membran NC, 9 lembar spon kertas saring, *Red side*/Bagian bawah blotter.

Untuk mentransfer antigen fraksi protein *Orf*. Voltage dengan lama blotting diatur menurut konstanta 300. Jika digunakan 25 volt, maka lama blotting adalah 12 jam (300:25); jika 50 volt maka lama blotting 6 jam. Suhu diatur pada 4° C

Membran plus fraksi protein *Orf* yang telah dipindahkan dari Gel diblocking dengan *Blocking buffer* (PBST yang mengandung *Skim milk* 5 %), selama 1 jam pada 37° C, *Blocking buffer* dibuang, lalu dicuci dengan PBST (PBS⁽⁻⁾ yang mengandung 0,05 % Tween 20) selama 3 x 5 menit. Kemudian diinkubasi pada 4° C dalam serum/antibodi primer (serum kambing/domba

yang divaksinasi) yang telah diencerkan 1:200 dalam Blocking buffer selama 12 jam sambil digoyang

Membran plus kompleks Ag-Ab I dicuci dengan PBST selama 3 x 5 menit. Kemudian diinkubasi pada 37° C dalam antibodi sekunder (*Rabbit Anti goat* atau *sheep IgG Peroxidase (AP) Conjugated*) yang telah diencerkan 1:2500 dalam *Blocking buffer* steril selama 1 jam sambil digoyang

Membran plus kompleks Ag-Ab I-Ab II (*AP Conjugated*) dicuci dengan PBST selama 4 x 5 menit. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam *substrat Ortho Phenilene Diamine (OPD)* selama 30 menit pada suhu kamar sambil digoyang (dalam ruang gelap). Reaksi dihentikan dengan menambahkan aquades. Lalu membran dikeringkan dan dilihat ada pita warna atau tidak. Jika ada berarti ada reaksi antigenik antara antigen fraksi protein *Orf* dengan antibodi kambing/domba yang divaksinasi.

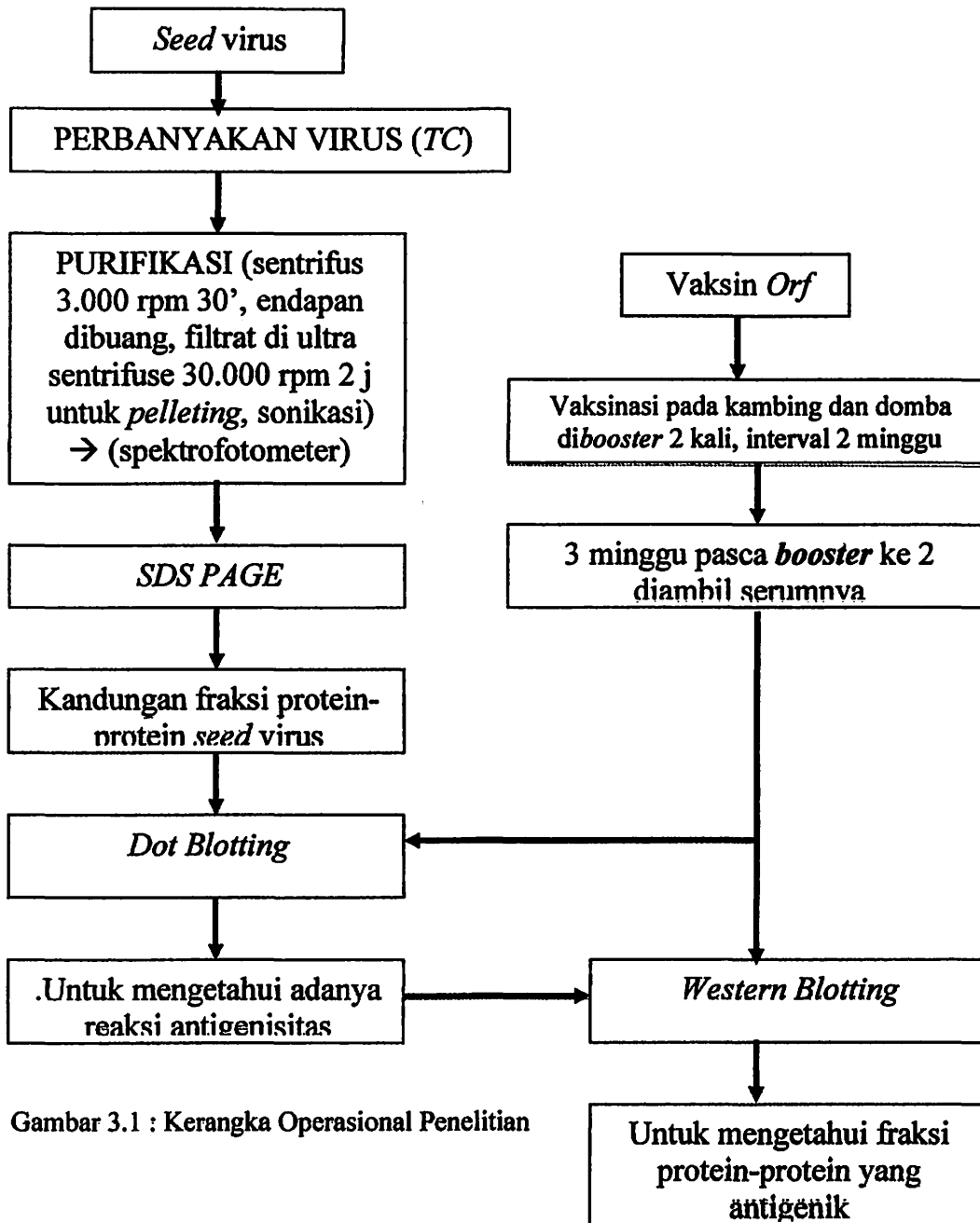
Kemudian dengan membandingkan ukuran hasil *Western Blotting* sampel dengan marker protein, maka penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai *Rf (Retardation factor)* dari masing-masing pita fraksi protein antigenik seed virus vaksin *Orf*. (Lampiran 3).

3.4 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data untuk penelitian ukuran (kDa) fraksi protein antigenik seed virus vaksin *Orf* diambil langsung dari data hasil uji berat molekul fraksi protein seed virus vaksin *Orf* itu pada uji *SDS PAGE*, dan data hasil uji berat

molekul fraksi protein antigenik *seed* virus vaksin *Orf* itu pada uji *Western Blotting* (Atmaja, 1992).

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



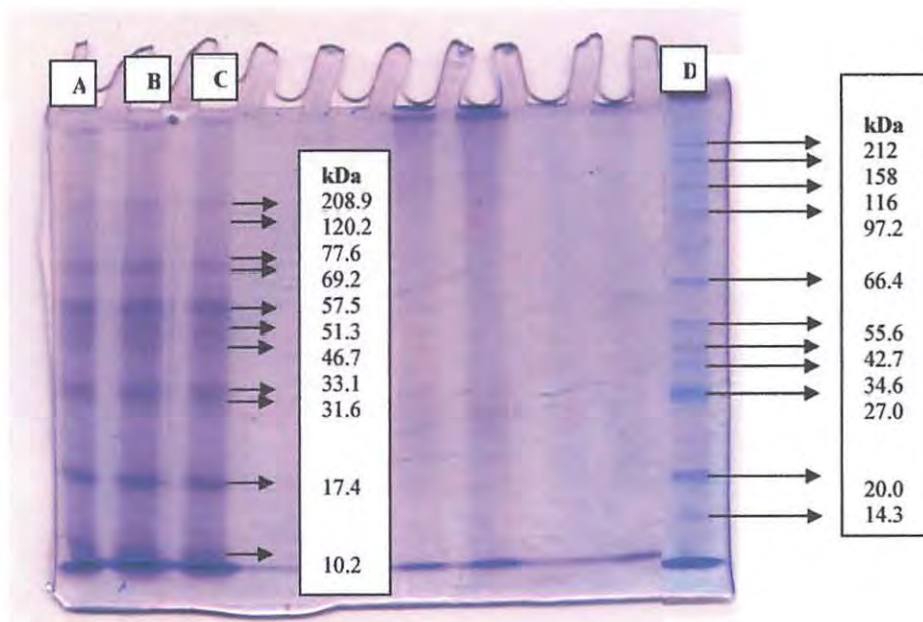
Gambar 3.1 : Kerangka Operasional Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Dari hasil perbanyakan virus didapat 60 ml *seed* virus vaksin *Orf* yang ditanam pada *primary tissue culture* testis bayi kambing dengan titer $10^{5.1}$ TC ID₅₀ per ml. *Seed* virus vaksin *Orf* kemudian dilakukan *pelleting*, dan diperoleh kandungan protein nya 262 µg per ml (Lampiran 1). Dari protein *seed* virus vaksin *Orf* itu kemudian di buat untuk SDS PAGE, Dot dan Western Blotting.

Hasil SDS PAGE didapat pita-pita protein yang mempunyai berat molekul 208.9, 120.2, 77.6, 69.2, 57.5, 51.3, 46.7, 33.1, 31.6, 17.4 dan 10.2 kDa. (Gambar 4.1 dan Lampiran 1).

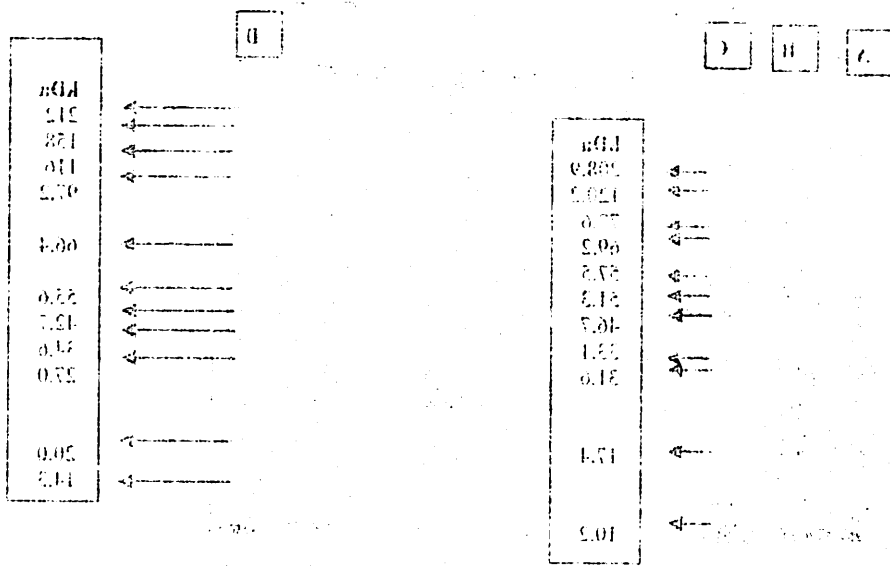


Gambar 4.1 : SDS PAGE *seed* virus vaksin *Orf* (A,B,C) dan Marker (D).

BAB 4

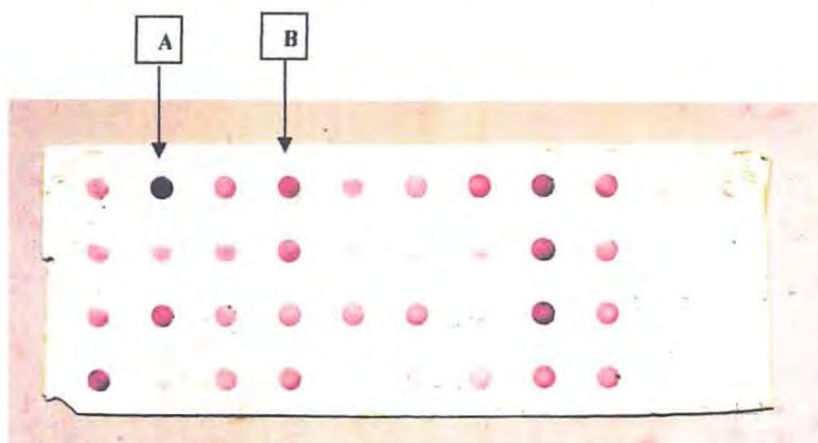
HASIL PENELITIAN

Dari hasil perbandingan virus didapat 60 ml seras virus vaksin (%) yang digunakan pada budaya tissue culture hasil samping dengan titer $10^{2.1}$ TC ID₅₀ per ml. Seras virus vaksin (%) kemudian dilakukan pewarnaan dan diperoleh kandungan proteinnya 263 µg per ml (lampiran 1). Dari protein seras virus vaksin (%) ini kemudian di buat untuk SDS PAGE, Dot dan Western Blotting. Hasil SDS PAGE didapat protein yang mempunyai berat molekul 208,9, 120,2, 77,6, 69,2, 27,2, 21,3, 16,7, 33,1, 31,6, 17,4 dan 10,2 kDa. (Gambar 4.1 dan lampiran 1).

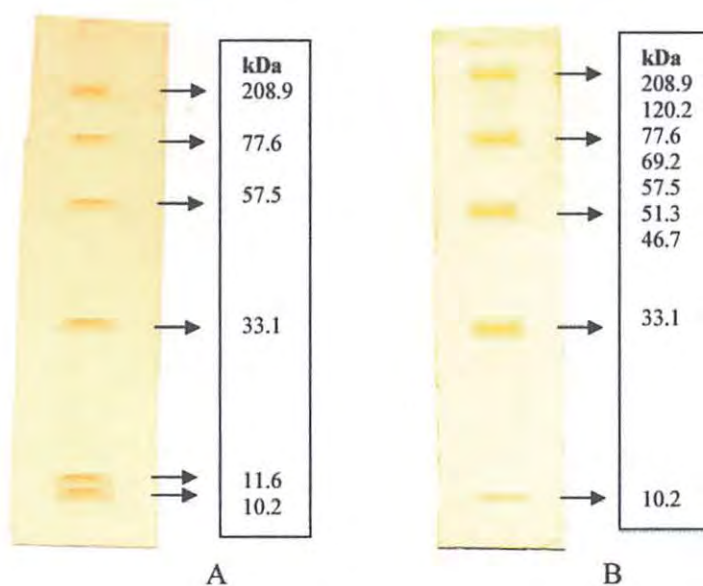


Gambar 4.1 : SDS PAGE seras virus vaksin (%) (A,B,C) dan Zinkra (D).

Dot Blotting menghasilkan reaksi antigenik yang positif antara *seed* virus vaksin *Orf* dengan serum kambing maupun domba, hal ini dapat dilihat dari titik/noda tua/gelap pada kolom A dan B (Gambar 4.2)

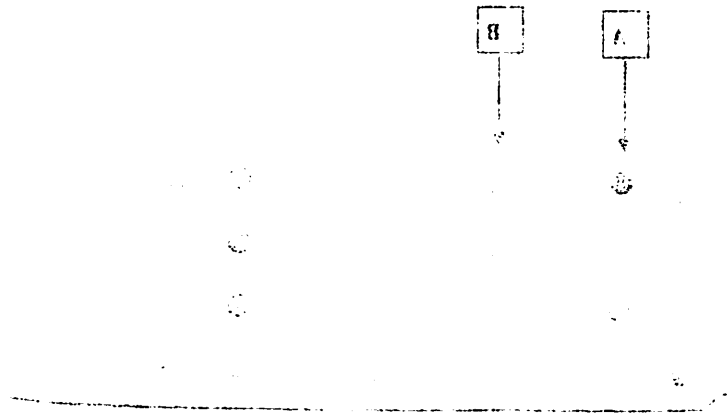


Gambar 4.2 : Hasil *Dot Blotting* *seed* virus vaksin *Orf* dengan serum kambing (kolom A) dan domba (kolom B). Yang menunjukkan warna tua/gelap berarti positif, sedang yang bewarna muda/cerah berarti negative.

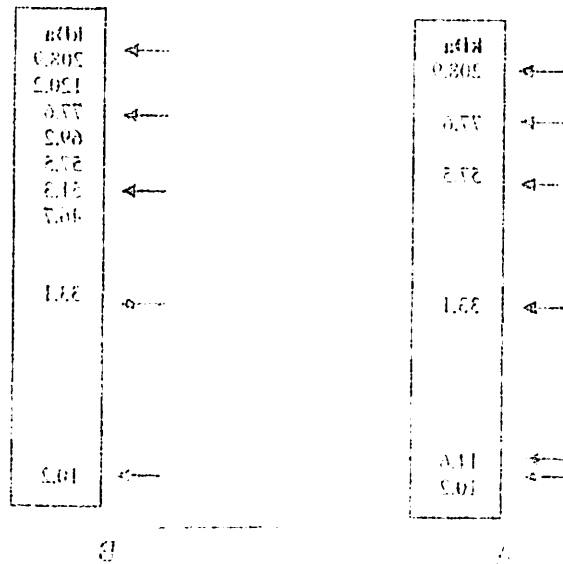


Gambar 4.3 : Hasil *Western Blotting* *seed* virus vaksin *Orf* dengan serum kambing (A) dan dengan serum domba (B).

Dot Blotting menghasilkan reaksi antigenik yang positif antara serum vaksin (V) dengan serum kambing donor, hal ini dapat dilihat dari titikoda tercapai pada kolom A dan B (Gambar 4.2)



Gambar 4.2 : Hasil Dot Blotting serum vaksin (V) dengan serum kambing (kolom A) dan donor (kolom B). Yang menunjukkan warna tercapai berarti positif sedang yang berwarna mada berarti berarti negative.



Gambar 4.2 : Hasil Western Blotting serum vaksin (V) dengan serum kambing (A) dan dengan serum donor (B).

Western Blotting menghasilkan reaksi antigenik yang positif antara *seed* virus vaksin *Orf* dengan serum kambing maupun domba, hal ini dapat dilihat dari pita-oranye tua pada kedua kertas nitro-cellulose.

Pada kertas A, di mana serum kambing direaksikan terbentuk 6 pita yang masing-masing mempunyai BM 208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6, 10.2 kDa; sedangkan pada kertas B di mana serum domba direaksikan terbentuk 5 pita, yang masing-masing mempunyai BM 208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 10.2 kDa (Gambar 4.3).. Secara singkat hasil *SDS PAGE* dan *Western Blotting* tercantum pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 : Hasil Pita BM Fraksi Protein Virus *Orf* dengan *SDS PAGE* dan *Western Blotting* (kDa).

SDS PAGE		Western Blotting	
Kambing	Domba	Kambing	Domba
208.9	208.9	208.9	208.9
120.2	120.2		
77.6	77.6	77.6	77.6
69.2	69.2		
57.5	57.5	57.5	57.5
51.3	51.3		
46.7	46.7		
33.1	33.1	33.1	33.1
31.6	31.6		
17.4	17.4		
		11.6	
10.2	10.2	10.2	10.2
11 pita	11 pita	6 pita	5 pita

11 bits	11 bits	0 bits	0 bits
10's	10's	10's	10's
11's	11's	11's	
31's	31's		
33's	33's	33's	33's
46's	46's		
21's	21's		
22's	22's	22's	22's
20's	20's		
11's	11's	11's	11's
150's	150's		
508's	508's	508's	508's
Kumpulan	Donor	Kumpulan	Donor
SDS PAGE		Western Blotting	

(KID)

dengan SDS PAGE dan Western Blotting

Gambar 4.1 : Hasil Uji BM Fiksasi Protein Virus (V)

Hasil SDS PAGE dan Western Blotting tercantum pada tabel 4.1.

menunjukkan BM 508'd, 11's, 22's, 33't, 10's KID (Gambar 4.2). Secara singkat
 kelas B di mana serum donor diresaksikan terhadap 2 bita yang masing-masing
 masing menunjukkan BM 508'd, 11's, 22's, 33't, 11's, 10's KID; sedangkan pada
 pada kelas A, di mana serum kambing diresaksikan terhadap 0 bita yang masing-
 masing menunjukkan pada kelas mikro-organisme.

Virus vaksin (V) dengan serum kambing maupun donor, hal ini dapat dilihat dari

Western Blotting menunjukkan hasil antigenik yang positif antara lain

BAB 5

PEMBAHASAN

Dari hasil *SDS PAGE* yang telah dilakukan ternyata menemukan 11 pita berat molekul (BM) fraksi protein *seed* virus vaksin *Orf* (208.9, 120.2, 77.6, 69.2, 57.5, 51.3, 46.7, 33.1, 31.6, 17.4 dan 10.2 kDa) dari sebelas pita itu ada beberapa pita yang menonjol/dominan, yaitu pita 10.2, 17.4, 46.7 dan 57.5 kDa. Kalau dibanding dengan hasil dari peneliti lain, jumlah ini lebih sedikit. Khatri *et al* (2001) mendapatkan sampai 18 pita (125,107, 100, 92, 81, 68, 65, 60, 53,43, 38, 35, 32, 29, 27, 23, 21, dan 14 kDa) dari virus *Orf* yang dimurnikan. Buddle *et al* (1984a) medapatkan pita BM fraksi protein sampai 31 pita dari ke 4 isolat virus *Orf*, dengan pita yang menonjol/dominan adalah pita 24, 31,45 dan 75 kDa.

Hasil pengujian yang dilakukan dengan *SDS PAGE* kemudian dilanjutkan dengan melakukan *Dot Blotting*. Uji ini dapat digunakan untuk uji awal sebelum melakukan uji *Western Blotting*. Karena jika pada *Dot Blotting* tidak ditemukan hasil yang positif, maka hampir dapat dipastikan pada *Western Blotting* juga akan berhasil negatif (Aulani'am, 2005). Dan karena hasil *Dot Blotting* positif, maka uji dilanjutkan dengan melakukan *Western Blotting*.

Hasil dari *Western Blotting* menunjukkan ada 6 pita BM fraksi protein *seed* virus vaksin *Orf* pada reaksinya dengan serum kambing hasil vaksinasi (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6, 10.2 kDa); sedang yang dengan serum domba dihasilkan 5 pita (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 10.2 kDa). Jadi ada 1 perbedaan pita, BM 11.6 kDa.

Peneliti lain (Khatri *et al*, 2001) menghasilkan 13 pita BM fraksi protein virus *Orf* yang dimurnikan (116,92, 81, 68, 65, 60, 53, 49, 38, 29, 23, 21, 14 kDa) pada *Western Blotting* yang dilakukannya. (Tabel 5.1). Sedangkan Buddle *et al* (1984a) tidak menggunakan untuk menganalisa hubungan antara BM fraksi protein virus *Orf* dengan reaksi antigeniknya, tetapi menggunakan uji Netralisasi Virus (*Virus Neutralisation Test/VNT*).

Khatri *et al* (2001) menyimpulkan dari penelitiannya, bahwa tidak semua fraksi protein virus *Orf* yang dapat terdeteksi pada uji *SDS PAGE* merupakan fraksi protein virus *Orf* yang antigenik. Hal ini selaras dengan yang penulis dapatkan pada penelitian. Akan tetapi baik dalam jumlah pita BM fraksi protein virus *Orf* maupun BMnya virus *Orf* sendiri antara penulis dan Khatri *et al* (2001) dan Buddle *et al* (1984a) terlihat ada perbedaan.

Kalau dilihat dari kedekatan BM masing-masing virus *Orf* pada uji *SDS PAGE*; dan virus *Orf* yang antigenik pada uji *Western Blotting*, antara Khatri *et al* (2001) dengan penulis ada beberapa yang dekat BMnya. (Tabel 5.1). Selain itu penulis menemukan kejadian bahwa ada pita BM fraksi protein virus *Orf* yang tak terdeteksi pada uji *SDS PAGE*, tetapi pada uji *Western Blotting* terdeteksi, yaitu BM 11.6 kDa dari fraksi protein virus *Orf* yang antigenik. Khatri *et al* (2001) menemukan hal tersebut pada BM 116 dan 49 kDa dari fraksi protein virus *Orf* yang antigenik. Hal ini menurut Harlow and Lane tahun 1988 seperti yang dicatat oleh Khatri *et al* (2001), karena *Western Blotting* lebih peka daripada *SDS PAGE*, sebab dapat mendeteksi fraksi protein seberat 1 ng, sedangkan *SDS PAGE* cuma dapat mendeteksi fraksi protein seberat 100-500 ng.

Tabel 5.1 : Perbandingan Hasil Pita BM Fraksi Protein Virus *Orf* dengan *SDS PAGE* dan *Western Blotting* (kDa) antara Penulis dengan Peneliti yang lain.

SDS PAGE		Western Blotting			
A		B	A		B
Kambing	Domba	Domba	Kambing	Domba	Domba
208.9	208.9		208.9	208.9	
		125			
120.2	120.2				116
		107			
		100			
		92			92
77.6	77.6	81	77.6	77.6	81
69.2	69.2	68			
		65			
57.5	57.5	60	57.5	57.5	
51.3	51.3	53			
					49
46.7	46.7	43			
		38			38
33.1	33.1	35	33.1	33.1	
31.6	31.6	32			
		29			29
		27			
		23			23
		21			21
17.4	17.4	14			14
			11.6		
10.2	10.2		10.2	10.2	
11 pita	11 pita	18 pita	6 pita	5 pita	13 pita

Keterangan : Kolom A : Hasil yang didapat penulis
 Kolom B : Hasil yang didapat Khatri *et al* (2001)

Meskipun dari tabel 5.1 antara hasil penulis dengan peneliti lain (Khatri *et al*, 2001) ada kedekatan dan kemiripan pita-pita fraksi protein virus *Orf* (pada *SDS PAGE*) dan pita-pita fraksi protein antigenik virus (pada *Western Blotting*), tetapi kesamaan yang persis dari masing-masing pita itu tidak ada. Sehingga

Tabel 2.1 : Perbandingan Hasil Uji BM Fraksi Protein Virus (V) dengan SDS PAGE dan Western Blotting (KB) antara Penulis dengan Peneliti yang lain.

SDS PAGE		Western Blotting	
A	B	A	B
Kamling Domba	Kamling Domba	Kamling Domba	Kamling Domba
208.9	208.9	208.9	208.9
150.2	150.2	119	119
	107		
	100		
	92		92
77.6	77.6	77.6	77.6
69.2	69.2		
	68		
57.8	57.8	57.8	57.8
51.3	51.3		
	48.7		49
	38		38
33.1	33.1	33.1	33.1
31.9	31.9		
	29		29
	27		
	23		23
	21		21
17.4	17.4		14
		11.9	
10.2	10.2	10.2	10.2
11 pita	18 pita	2 pita	13 pita

Keterangan : Kolom A : Hasil yang didapat penulis
 Kolom B : Hasil yang didapat Khari et al (2001)

Meskipun dari tabel 2.1 antara hasil penulis dengan peneliti lain (Khari et al, 2001) ada kekekatan dan kemiripan pita-pita fraksi protein virus (V) (pada SDS PAGE) dan pita-pita fraksi protein antigenik virus (pada Western Blotting), tetapi kesamaan yang persis dari masing-masing pita itu tidak ada. Sehingga

kemungkinan strain virus yang diteliti oleh penulis dengan Khatri *et al*, (2001) berbeda, mengingat letak geografi dan iklim yang berbeda.

Dikaitkan dengan fungsi masing fraksi protein antigenik dari familia virus *Pox* (dimana *Orf* merupakan salah satu spesiesnya), Buddle *et al* (1984a) setuju dengan peneliti-peneliti lain yaitu Esposito *et al* tahun 1977, Arita and Tagaya tahun 1980; bahwa fraksi protein yang digunakan untuk membedakan spesies virus familia *Pox* adalah berada pada kisaran berat 30-40 kDa. Dan fraksi protein inilah yang menyusun struktur *surface tubule* (pipa permukaan) (Gambar 2.2). Dari hasil penelitian ini, bahwa kemungkinan fraksi protein itu adalah yang yang mempunyai BM 34,7 kDa yang terdeteksi pada reaksi dengan serum kambing maupun domba (Pospischil and Bachmann, 1980).

Fraksi protein antigenik *seed* virus vaksin *Orf* yang mempunyai BM 77.6, 57.5 kDa, maka kemungkinan itu merupakan bagian antigenik yang menyusun *core membrane* dan atau *lateral body* dari virus *Orf*. Sedangkan yang mempunyai BM 11.6,10.2 kDa, kemungkinan berupa bagian dari *outer membrane* dan atau *envelope* virus *Orf*. (Gambar 2.2) (Pospischil and Bachmann, 1980; Buddle *et al*, 1984a; Khatri *et al*, 2001; Fenner, 2002). Tetapi adanya perbedaan pada jumlah fraksi protein antigenik dari satu isolat virus *Orf* yang dikenali oleh antibodi dari serum kambing (6 pita) dan serum domba (5 pita) adalah sesuatu yang menarik untuk diteliti lebih lanjut.

BAB 6

PENUTUP

6.1 KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian adalah sebagai berikut:

1. Fraksi protein *seed* virus vaksin *Orf* yang terdeteksi pada uji *SDS PAGE* ada 11, yaitu fraksi protein yang mempunyai BM 208.9, 120.2, 77.6, 69.2, 57.5, 51.3, 46.7, 33.1, 31.6, 17.4 dan 10.2 kDa.
2. Dari 11 macam BM fraksi protein di atas yang bersifat antigenik adalah yang dapat dikenali oleh antibodi serum kambing ada 6 (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 11.6, 10.2 kDa), sedang yang dikenali oleh antibodi serum domba ada 5 (208.9, 77.6, 57.5, 33.1, 10.2 kDa):

6.2 SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan kesimpulannya, maka dapat diajukan saran-saran sebagai berikut:

1. Penelitian terhadap jumlah fraksi protein antigenik pada *seed* virus vaksin *Orf* dapat dilanjutkan dengan menggunakan hewan-hewan lain, baik yang dekat hubungannya genetisnya dengan kambing maupun domba (misalnya : kancil, rusa, kijang) untuk melindungi hewan tersebut; maupun hewan-hewan percobaan (misalnya : mencit, tikus putih, marmot, kelinci) untuk peningkatan proses pengujian vaksin.

2. Penggunaan fraksi protein mempunyai BM 30 - 40 kDa dapat diteliti penggunaannya baik sebagai vaksin sub unit maupun sebagai bahan diagnosa untuk membedakan virus-virus dalam familia *Poxviridae*.
3. Perlu diteliti isolat-isolat virus *Orf* dari kejadian yang ada di lapangan, apakah ada perbedaan antigeniknya dengan yang digunakan sebagai *seed* vaksin

DAFTAR PUSTAKA

- Adjid A, Ronohardjo P, 1978, Uji Agar Gel, Presipitasi (AGP) untuk Mendeteksi Penyakit *Orf*, Penyakit Hewan, Vol. XIX, 32, II: 84-7.
- Adjid RMA, Daniels PW, 1992, Development of Indirect Elisa and It's Application for Detection Antibodies to *Contangious Ecthyma Virus*, Paper on Elisa Applications in Veterinary Science Seminar, Bogor, July 27th -28th, 18 pp.
- Atmaja LYS, 1992, Statistik Deskriptif dalam Praktek, Cet II, Penerbitan Universitas Atma Jaya, Yogyakarta, hlm 169-224.
- Aulanni'am, 2005, Protein & Analisisnya, Citra Mentari Group, Malang, hlm 13-17, 29-32, 47-52, 65-91.
- Ballasu TC, Robinson AJ, 1987, *Orf* virus Replication in Bovine Testis Cell; Kinetics of Viral DNA Polypeptide, and Infection Virus Production and Analysis of Virion Polypeptide, Arch Virol 97: 267-81.
- Baratawidjaja KG, 2004, Imunologi Dasar, Edisi VI, Balai Penerbitan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hlm 73-89, 153-170, 271-274, 317-322.
- Binder Veterinary Vaccines, 1982, Scabby Mouth Vaccine, 5th Edition, 14 pp.
- British Veterinary Codex, 1965, The Pharmaceutical Press, London, pp 464-5.
- British Pharmacopoea, 1977, (Veterinary Supplement), Her Majesty's Stationary, London, pp 121, 168.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, 2005, Jawetz, Melnick & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku 2, (Terjemahan Nani Widorini), 22nd Ed, Salemba Medica, Jakarta, hlm 112-137.
- Buddle BM, Dellers R.W, Schurig GG, 1984a, Heterogenecity of *Contangious Ecthyma Virus* Isolates, Am J Vet Res Vol 45, No 1: 75-9.
- Buddle BM, Dellers RW, Schurig GG, 1984b, *Contangious Ecthyma Virus* - Vaccine Failures, Am J Vet Res Vol 45, No 1: 263-6.
- CDC, 2006, *Orf Virus* Infection in Humans New York, Illinois, California and Tennessee, 2004 – 2005, Central Diseases Control, MMWR Weekly, Jan, 27, 2006/55 (03): 65-8.

- Chubb R, Couch A, 1985, Detection of Antigen by Fluorescence in *Orf* Virus Lesions in Sheep, *The Vet Rec* May 18: 546-7.
- Cottral GE (Editor), 1978, *Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology*, Comstock. Publ. Assoc. A Div. of Cornell University, Ithaca, London, pp 272-81.
- Deane D, McInnes CJ, Percival A, Wood A, Thomson J, Lear A, Gilray J, Fleming S, Mercer A, Haig D, 2000, *Orf* Virus Encodes a Novel Secreted Protein Inhibitor of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-2, *J of Virol* Vol 74, No 3:1313-20.
- Ditkeswan, 1981, *Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular*, Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta, hlm 46-51.
- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO, , 1995, *Virologi Veteriner (Veterinary Virology)*, Cet I, (Terjemahan DK Harya Putra), IKIP Semarang Press, hlm 89-188, 257-280, 397-416.
- Fenner F, 2002, *Poxviruses*, dalam Richman, DD, Whitley RJ, Hayden FG (Editor), 2002, *Clinical Virology*, 2nd Ed, ASM Press, Washington DC. pp 359-74.
- Gokce HI, Genc O, Gokce G, 2005, Sero-prevalence of *Contagious Ecthyma* in Lambs and Human in Kars, Turkey, *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 95-101.
- Hawayek LH, 2007, *Orf*, dalam <http://www.emedicine.com/cgi.bin/foxweb> download 3 Februari 2007.
- Inoshima Y, Shimizu S, Minamoto N, Hirai K, Sentsui H, 1999, Use of Protein in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Screening for Antibodies against *Parapoxvirus* in Wild Animals in Japan, *Clin and Diag Lab Immunol* Vol 6, No 3: 388-91.
- Inoshima Y, Murakami K, Wu D, Sentsui H, 2002, Characterization of *Parapoxvirus* Circulating among Wild Japanese Serows (*Capricornis crispus*), *Microbiol Immunol*, 46 (8): 583-7.
- Khatri M, Chad P, Batra SK, Western Blot Analysis of Structural and Soluble Protein *Contagious Pustular Dermatitits* Virus, 2001, *Israel Vet Med Assoc*, Vol 56 (3): 1-7.
- Klein J. Tryland M, 2005, Characterization of *parapoxviruses* isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*), *Virol J* 2:79 dalam <http://www.virology.com/content/2/1/79>.

- Kresno SB, 2001, *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Edisi IV, Balai Penerbitan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hlm 14-17, 112-128, 178-180.
- Lateef Z, Fleming S, Halliday G, Faulkner L, Mercer A, Baird M, 2003, *Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation antigen presentation and migration of murine dendritic cells*, *J of Virol*, Vol 68, No 4: 86-105.
- Lutwick LI, 2006, *Parapoxviruses*, dalam <http://www.eMedicine-Parapoxviruses> article by Larry I Lutwick MD.html download 21 Desember 2006.
- Lyttle DJ, Frazer KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ, 1994, *Homolog of Vascular Endothelial Growth Factor Are Encoded by the Poxvirus Orf Virus*, *J of Virol*, Vol 68, No 1: 84-92.
- Macdonald A, 1961, *Complement-Fixation Test in the Diagnosis of Pustular Dermatitis Infection in Man*, *J Path.* 63: 758-61.
- Mayr A, Herlyn M, Mahnel H, Danco A, Zach A, Bostedt H, 1981, *Bekämpfung des Ecthyma Contagiosum (Pustular Dermatitis) der schafe mit Einem Neuen Parenteral Zellkultur-Lebendimpfstoff*, *Zbl Vet Med B* 28: 535-52.
- McInnes C, 2006, *Orf Virus and Other Parapoxviruses that in Animals and Man*, dalam <http://www.MRI - Virology - Orf virus and other parapoxviruses.htm> download 21 Desember 2006.
- McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ, 1987, *A Qualitative and Quantitative Assesment of the Humoral Antibody Response of the Sheep of Orf Virus Infection*, *Vet Microbiol*, 15: 229-41.
- Mercer AA, Wise LM, Scagliarini A, McInnes CJ, Buttner M, Rziha HJ, McCaughan CA, Fleming SB, Ueda N, Nettleton PF, 2002, *Vascular Endothelial Growth Factor Encoded by Orf Virus Show Surprising Sequence Variation but have Conserved, Functionally Relevant Structure*, *J Gener Virol*, 83: 2845-55.
- Moechrom M, 1992, *Percobaan Pembuatan Vaksin Orf*, Makalah dipresentasikan pada Kongres PDHI VII, Surabaya 17-20 September, 8 hlm.
- Moens U, Wold I, Mathiesen SD, Jorgensen T, Sorensen D, Traavik T, 1989, *Parapoxvirus Papillomatosis in The Muskoxen (Ovibus muscatus), Genetical Differences between The Virus Causing New Outbreak in the Vaccinated Herd, The Vaccine Virus and a Local Orf Virus*, *Acta Vet Scand*, 31: 17-25.

- Nagington J, Newton AA, Horne RW, 1964, The Structure of *Orf* Virus, *Viol* 23: 461-72.
- Nitsche A, Buttner M, Wilhelm S, Pauli G, Meyer H, 2006, Real-Time PCR Detection of *Parapoxvirus* DNA, *Clin Chemis* 52, No 2: 316-9
- Plowright W, Witcomb MA, Ferris, RD, 1959, Studies with The Strain of *Contangious Pustular Dermatitis* Virus in Tissue Culture, *Arch Ges Virusforsch* 9: 407-8.
- Porterfield JS (Edit), 1989, Andrewes' Viruses of Vertebrates, 5th Ed, Bailliere Tindall, London – Philadelphia – Toronto – Sidney – Tokyo, pp 406-7.
- Pospischil A, Bachmann FA, 1980, Nuclear Changes in Cells Infected with *Parapoxviruses*, *Stomatitis Papulosa* and *Orf* ; An in Vivo and in Vitro Ultrastructural Study, *J Gen Virol* 47: 113-21.
- Pye D, 1990, Vaccination of Sheep with Cell Culture Grown *Orf* Virus, *Austrl Vet J* 67, 5: 182-6.
- Rantam FA, 2005, Cet I, *Virologi*, Airlangga University Press, Surabaya. hlm 29, 78, 146, 154.
- Renshaw HW, Dodd AG, 1978, Serologis and Cross-Immunity Studies with *Contangious Ecthyma* and *Goat Pox* Virus Isolates from the Western United States, *Arch of Virol* 56: 201-10.
- Robinson AJ, Ballassu TC, 1981, *Contangious Pustular Dermatitis (Orf)*, Commenwealth Bureau of Animal Health, *The Vet Bull* 51: 771-82.
- Robinson AJ, 1983, Prevalence of *Contangious Pustular Dermatitis (Orf)* in Six Milli ons Lambs at Slaughter ; Three Years Study, *New Zealand Vet J* 31: 161-3.
- Rowson KEK, Rees TAL, Mahy BWJ, 1987, A Dictionary of Virology, Blackwell Scientific Publication, Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbaorne, pp 154-5.
- Savory LJ, Stacker SA, Fleming SB, Niven BE, Mercer AA, 2000, Viral Vascular Endothelial Growth Factor Plays a Critical Role in *Orf* Virus Infection, *J. of Virol*, Vol 74, No 22: 10699-706.
- Sinha OP, Soman JP, Verma BB, 1986, Isolation and Experimental Host Range Studies of *Contangious Ecthyma* Virus, *Indian J Anim Sci* 56 (9): 937-9.

SubbaRao MV, Malik BS, Sharma SN, 1984, Antigenic Relationships Among Sheep Pox, Goat Pox and Contangious Pustular Dermatitits Viruses, Acta Virol 28: 380-7.

Traykova M, Agrinova R, 1985, Adsorption of *Ecthyma Contangious* Virus to Cultured Calf Testis, Acta Virol 30: 75-80.

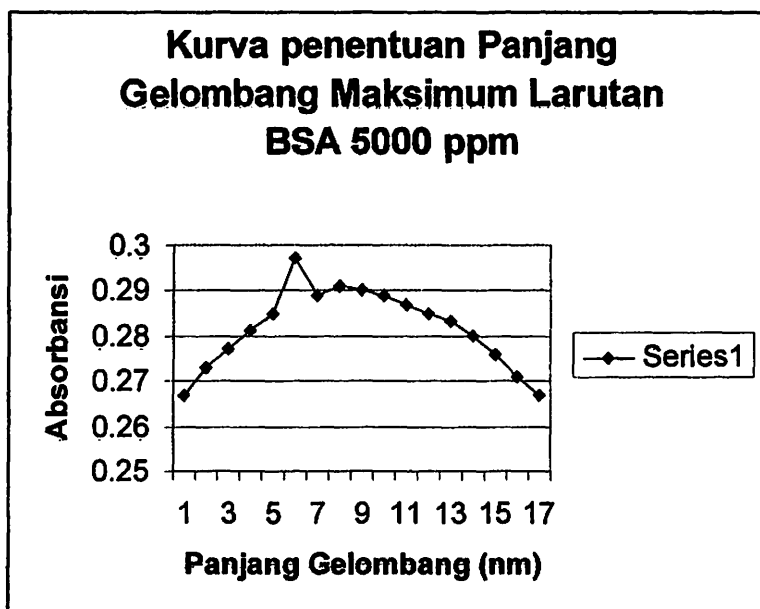
Zarnke RL, Dieterich RA, 1985, Attempted Reactivation of *Contangious Ecthyma* in Dall Sheep. Am. J. Vet. Res. Vol 46, No 8: 1775-6.

Lampiran 1: Cara Menghitung Konsentrasi Protein *Seed Virus Vaksin Orf*

Absorban Larutan Standar BSA (Bovine Serum Albumin) 5000 ppm

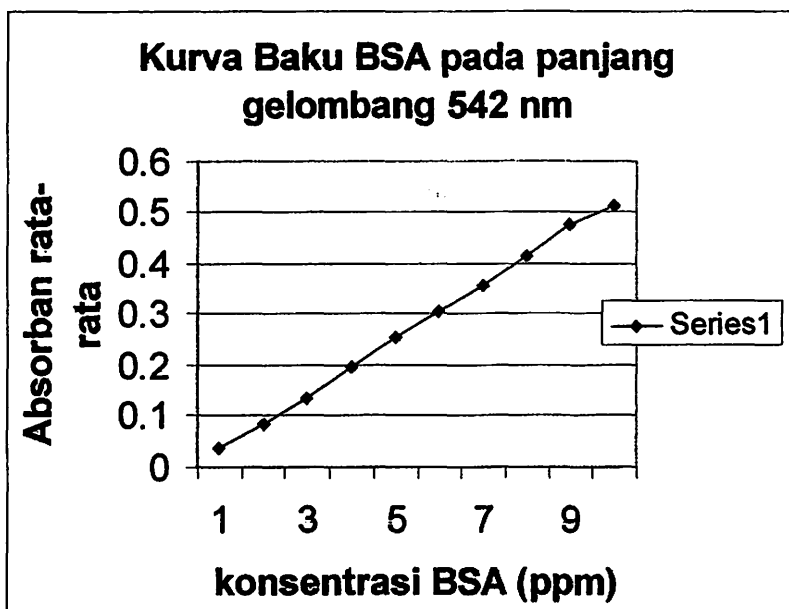
No	Panjang Gelombang (nm)	Nilai Absorban
1	500	0.267
2	506	0.273
3	512	0.277
4	518	0.281
5	524	0.285
6	530	0.297
7	536	0.289
8	542 *	0.291
9	548	0.290
10	554	0.289
11	560	0.287
12	566	0.285
13	572	0.283
14	578	0.280
15	584	0.276
16	590	0.271
17	596	0.267

*) Panjang Gelombang Maksimum



Absorban Larutan BSA berbagai konsentrasi

No	Konsentrasi BSA (ppm)	Absorb1	Absorb2	Absorb3	Absorban rata-rata
1	1000	0.034	0.038	0.036	0.036
2	2000	0.081	0.082	0.083	0.082
3	3000	0.133	0.136	0.136	0.135
4	4000	0.194	0.196	0.195	0.195
5	5000	0.259	0.249	0.254	0.254
6	6000	0.308	0.301	0.305	0.305
7	7000	0.358	0.358	0.358	0.358
8	8000	0.409	0.418	0.415	0.414
9	9000	0.473	0.478	0.477	0.476
10	10000	0.514	0.512	0.513	0.513



Dari grafik ini didapat persamaan $Y = 5 \times 10^{-5} X$. Lalu dari pembacaan hasil resuspensi pellet *seed* virus vaksin *Orf* di spektrofotometer didapatkan hasil absorbansi 0.131. Maka jika hasil itu dimasukkan dalam persamaan akan diperoleh hitungan $Y = 5 \times 10^{-5} X$

$$X = Y / (5 \times 10^{-5}) = 0.131 / (5 \times 10^{-5}) = 262 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran 2: Cara Menghitung BM Fraksi Protein *Seed* Virus Vaksin *Orf* pada *SDS PAGE*

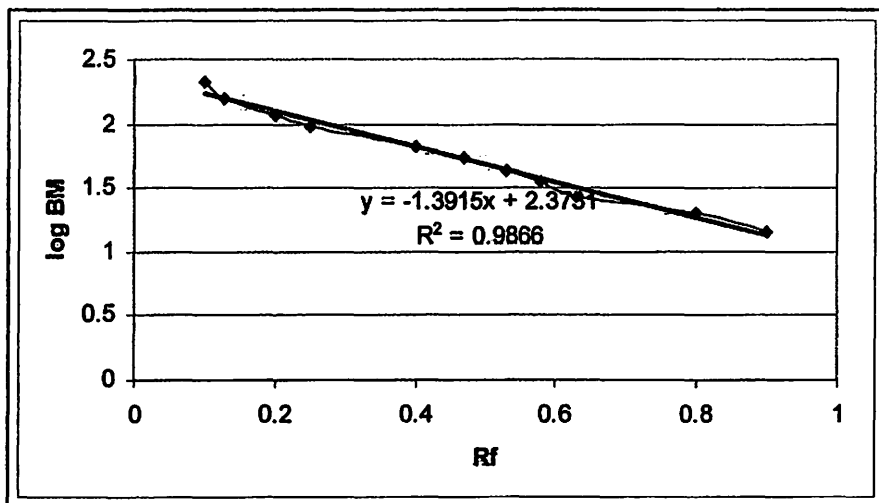
Rf dan BM Marker

a	b	Rf	Log BM	BM
1.0	10	0.100	2.32	212.00
1.3	10	0.130	2.19	158.00
2.0	10	0.200	2.06	116.00
2.5	10	0.250	1.98	97.20
4.0	10	0.400	1.82	66.40
4.7	10	0.470	1.74	55.60
5.3	10	0.530	1.63	42.70
5.8	10	0.580	1.54	34.80
6.3	10	0.630	1.43	27.00
8.0	10	0.800	1.30	20.00
9.0	10	0.900	1.15	14.30

Rf dan BM Fraksi Protein *Seed* Virus Vaksin *Orf*

a	b	Rf	log BM	BM
0.5	10	0.050	2.32	208.93
2.7	10	0.270	2.08	120.22
4.5	10	0.450	1.89	77.62
5.0	10	0.500	1.84	69.18
5.7	10	0.570	1.76	57.54
6.2	10	0.620	1.71	51.28
6.7	10	0.670	1.66	46.70
8.0	10	0.780	1.52	33.11
8.2	10	0.800	1.50	31.62
9.0	10	0.820	1.24	17.37
9.6	10	1.060	1.01	10.23

Kurva Rf dan Log BM Marker



Lampiran 3: Cara Menghitung BM Fraksi Protein *Seed Virus Vaksin Orf* pada *Western Blotting*

Rf dan BM Marker

a	b	Rf	Log BM	BM
1.0	10	0.100	2.32	212.00
1.3	10	0.130	2.19	158.00
2.0	10	0.200	2.06	116.00
2.5	10	0.250	1.98	97.20
4.0	10	0.400	1.82	66.40
4.7	10	0.470	1.74	55.60
5.3	10	0.530	1.63	42.70
5.8	10	0.580	1.54	34.80
6.3	10	0.630	1.43	27.00
8.0	10	0.800	1.30	20.00
9.0	10	0.900	1.15	14.30

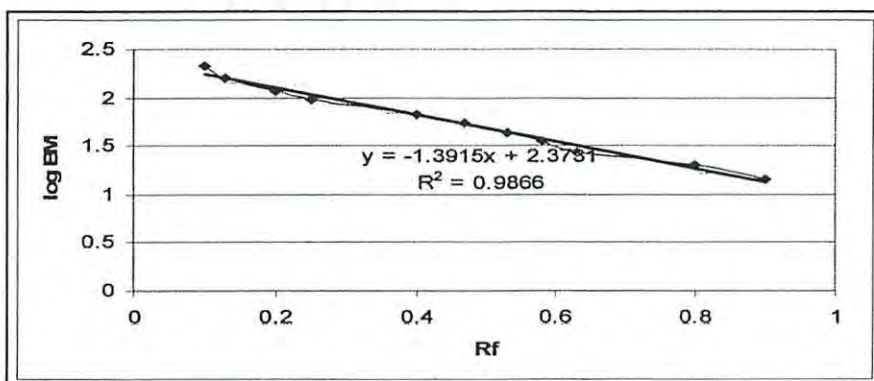
Rf dan BM Fraksi Protein Antigenik *Seed Virus Vaksin Orf* dengan Serum Kambing

a	b	Rf	Log BM	BM
0.5	10	0.050	2.32	208.93
4.5	10	0.450	1.89	77.62
5.7	10	0.570	1.76	57.54
8.0	10	0.780	1.52	33.11
9.4	10	0.94	1.09	11.61
9.6	10	1.060	1.01	10.23

Rf dan BM Fraksi Protein Antigenik *Seed Virus Vaksin Orf* dengan Serum Domba

a	b	Rf	log BM	BM
0.5	10	0.050	2.32	208.93
4.5	10	0.450	1.89	77.62
5.7	10	0.570	1.76	57.54
8.0	10	0.780	1.52	33.11
9.6	10	1.060	1.01	10.23

Kurva Rf dan Log BM Marker



Lampiran 4 : Media dan Bufer-bufer yang Digunakan**4.1. Media Eagle**

	Mg/L
AMINO ACIDS	
L-Arginine HCl	21.1
L-Cystine	12.0
L-Glutamine	292.0
L-Histidine HCl.H ₂ O	10.5
L-Isoleucine	26.2
L-Leucine	26.2
L-Lysine HCl	36.5
L-Methionine	7.5
L-Phenylalanine	16.5
L-Threonine	23.8
L-Tryptophan	4.0
L-Tyrosine	18.1
L-Valine	23.4
VITAMINES	
D-Biotin	1.0
D-Ca-Pantothenate	1.0
Choline Chloride	1.0
Folic Acid	1.0
i-Inositol	1.8
Nicotinamide	1.0
Pyridoxal HCl	1.0
Riboflavin	0.1
Thiamine HCl	1.0

4.2. Komposisi Larutan pada Elektroforesis SDS PAGE

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
Running Buffer pH 8,3	Tris base Glisin SDS Aquabidest	3,03 g 14,4 g 1,0 g sampai 1 L
T-Acryl 30 %	Bisakrilamid (di-vortex hingga larut) Akrilamid Aquabidest	0,08 g 2,92 g 7 ml
LGB pH 8,8	Tris base SDS Aquabidest	1,82 g 0,04 g 10 ml
UGB pH 6,8	Tris base SDS Aquabidest	0,75 g 0,04 g 10 ml
RSB 1 mL	UGB (10%) Gliserol SDS 10 % β merkapto-etanol Bromo-phenol blue Aquabidest	0,125 ml 0,2 ml 0,2 ml 0,05 ml 0,025 ml 0,4 ml
APS 10%	Amonium persulfat Aquabidest	0,1 g sampai 1 ml
Stacking Gel 3 % (1 Plate)	Aquabidest UGB T-Acryl (30%) APS 10% Temed	1475 μ l 625 μ l 400 μ l 15 μ l 10 μ l
Separating Gel 10 % (1 Plate)	LGB T-Acryl (30%) Aquabidest (berurutan, di-degas 10 menit) APS 10% Temed	1500 μ l 1987,5 μ l 2510 μ l 30 μ l 15 μ l

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
Separating Gel 12 % (1 Plate)	LGB	1300 µl
	T-Acryl (30%)	2000 µl
	Aquabidest	1700 µl
	(berurutan, di-degas 10 menit)	70 µl
	APS 10%	7 µl
Staining	Temed	
	Coomasie Brilliant Blue	0,25 g
	Metanol absolut	45,4 ml
	Asam asetat glasial	9,2 ml
Destaining	Aquabidest	hingga 100 ml
	Metanol absolut	
	Asam asetat glasial	70 ml
	Aquabidest	70 ml
		hingga 1 L

No	Stacking Gel 3%	1 Plate	2 Plate	4 Plate
1	UGB	415 µl	830 µl	1660 µl
2	T-Acryl	267 µl	534 µl	1068 µl
3	Aquabidest	975 µl	1950 µl	3400 µl
4	APS	20 µl	40 µl	80 µl
5	Temed	2 µl	4 µl	8 µl

No	Separating Gel 12%	1 Plate	2 Plate	4 Plate
1	LGB	1300 µl	2600 µl	5200 µl
2	T-Acryl	2000 µl	4000 µl	8000 µl
3	Aquabidest	1700 µl	3400 µl	6800 µl
4	APS	70 µl	140 µl	280 µl
5	Temed	7 µl	14 µl	28 µl

4.3 Komposisi Larutan pada *Dot Blotting*

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
PBS 500 ml	KCl	0,1 g
	KH ₂ PO ₄	0,1 g
	NaCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (berurutan sambil distirer)	1,08 g
	Aquabidest	hingga 500 ml
PBS-azida	PBS	10 ml
	Natrium azida 1%	5 µl
PBS skim 5%	PBS	100 ml
	Non fat milk	5 g
PBS-T 0,05 %	PBS	100 ml
	Tween-20	50 µl
TBS	NaCl	8,7 g
	Tris	1,21 g
	Aquabidest	1 L
	HCl pekat	sampai pH 7,4
Antigen (1:4)	Antigen	40 µl
	PBS azida	160 µl
Antibodi Primer (1:100)	Antibodi primer	10 µl
	PBS-T skim	990 µl
Antibodi Sekunder (1:2500)	Antibodi sekunder <i>AP Conjugated</i>	0,4 µl
	TBS	999,6 µl
Substrat Western Blue	Western Blue Substrat Solution	1 ml