

TESIS

REAKTIFITAS PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS A1 SUBTYPE H5N1 TERHADAP BERBAGAI ANTIBODI SUBTYPE H5



G U N A R T I



PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008

**REAKTIFITAS PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS
A1 SUBTYPE H5N1 TERHADAP BERBAGAI
ANTIBODI SUBTYPE H5**

TESIS

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

Oleh :

**G U N A R T I
NIM 090610552 / M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2008

Tanggal 15 AGUSTUS 2008

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL: 15 AGUSTUS 2008

Oleh
Pembimbing Ketua



Dr. Suwarno, drh, M.Si.
NIP. 131836994

Pembimbing



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

Mengetahui
Ketua Program Studi Imunologi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof Dr Sri Hidajati Bayu Santoso, dr, DTM, MS, SpPar.
NIP. 130680855

Tesis ini telah diujikan dan dinilai
oleh panitia penguji pada
Program Pascasarjana Universitas Airlangga
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, M.S, SpMK
 3. Prof Dr dr Sri Hidajati Bayu, DTM, M.S, SpPar
 4. Dr Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan taqwa-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

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

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, M.S, SpMK. pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, saran dan pengetahuan.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan dan Kebudayaan dengan program Beasiswa Unggulan dapat memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof Dr Fasich, Apt atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr Sri Hajati.SH, MS atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Mantan direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr H.Muhammad Amin, dr atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Magister Ketua TKPPS Prof Dr Harjanto, JM, dr, AIF yang telah banyak membantu terselesainya pendidikan saya.

Ketua Program Studi Imunologi Universitas Airlangga Prof Dr dr Sri

Hidajati Bayu, DTM, M.S, SpPar yang telah banyak membantu, memberikan dorongan dan bimbingan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Direktur Politeknik Kesehatan Mataram, ir. Mochtar Mukarim M.Soc, Sc. yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan Program Magister Universitas Airlangga.

Ketua Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Mataram, Yunan Jiwintarum SSi. M.kes yang telah, memberikan kesempatan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan dan teman-teman di tempat kerja yang banyak memberikan dorongan moril dalam proses pendidikan.

Para Dosen Program Studi Imunologi atas Ilmu yang diberikan kepada saya.

Teman-temanku seangkatan, sahabatku Retina Yunani, Wiwin, Erlin, Lina, Hj Sinarni yang telah banyak membantu sampai di Program Studi Imunologi Universitas Airlangga Surabaya atas kerjasamanya selama ini. Terima kasih khusus dan hormat penulis kepada Ibunda dan ayahanda tercinta atas pengorbananya dan doa serta nasehat-nasehat berharga selama ini, penulis haturkan terima kasih atas semua perhatian yang telah beliau berikan dan terima kasih. Kepada Kakak Angkatku tersayang Epti, terima kasih yang tak terhingga atas segala bantuannya, suport dan doanya yang selalu menemaniku disaat-saat masa sulitku sampai selesai pendidikan, saudara-saudaraku tercinta Sisri sekeluarga, seno sekeluarga, woko sekeluarga yang telah mengurus selama pendidikan, yang selalu memberikan dukungan moril dan doanya. . Akhirnya rasa terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada suamiku Harun Nurrasyid, ananda tersayang Arya Maulana Jatmiko yang telah memberikan dorongan moril serta menjadi sumber inspirasi selama penulis mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana serta kepada merekalah tesis ini penulis persembahkan..

Semoga kebaikan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan imbalan dan rahmat dari Allah SWT. Amiiinn.

Surabaya, Agustus 2008

Penulis

RINGKASAN

**REAKTIFITAS PROTEIN NEURAMINIDASE VIRUS AI SUBTYPE
H5N1 TERHADAP BERBAGAI ANTIBODI SUBTYPE H5**

Virus AI subtype H5N1 adalah virus RNA yang termasuk ke dalam family *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus AI subtype H5N1 yang dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia termasuk manusia. Virus AI dibagi kedalam subtype berdasarkan permukaan glikoprotein 16 Haemagglutinin (HA-16), 9 Neuraminidase (NA-9), dan tersusun atas 8 segmen yang menyandi 10 macam protein. Diantara kesepuluh protein tersebut, protein NA yang memiliki beberapa peranan yang sangat penting antara lain dalam penempelan dan pelepasan dalam inang, penentu patogenitas virus, mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor asam sialat dan menentukan respon imun pada inang.

Penelitian ini menggunakan virus AI subtype H5N1 yang diperoleh dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan dan diinokulasi pada telur itik berembrio (TIB) kemudian diidentifikasi terhadap antibodi anti-H5N1 dengan uji HI. Protein NA virus AI subtype H5N1 kemudian dikarakterisasi dengan teknik SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul. Antigenisitas protein NA ditentukan berdasarkan reaktivitas terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 dengan teknik *westren blot* dan *indirect-ELISA*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris yang bertujuan untuk mendeteksi adanya protein neuraminidase (NA) virus AI dari subtype H5N1 terhadap anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 dengan metode ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan, bahwa protein NA virus AI subtype H5N1 memiliki berat molekul 53,5 kDa. Hasil identifikasi protein dengan *westren blot* terlihat, bahwa protein NA virus AI subtype H5N1 hanya dikenali oleh antibodi anti-H5N1 dan tidak dikenali oleh antibodi anti-H5N9 atau anti-H5N2. Reaktivitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9 menunjukkan adanya perbedaan. Protein NA bereaksi secara spesifik dengan antibodi anti-H5N1 dan memberikan nilai OD tertinggi dibanding reaksi terhadap antibodi anti-H5N2 atau anti-H5N9. Antibodi anti-H5N1 memberikan nilai OD 0,417. Sementara itu antibodi anti-H5N2 dan anti-H5N9 memberikan nilai OD yang lebih rendah, yakni berkisar antara 0,206 – 0,225. Hasil pengujian dengan teknik *indirect-ELISA* ini identik dengan hasil pengujian antigenisitas protein NA dengan *westren blot*. Hal ini berbeda dengan reaksi antara *whole molecule* virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi, baik anti-H5N1, anti-H5N2 maupun anti-H5N9, semuanya menunjukkan nilai OD yang tinggi dan tidak dapat dibedakan afinitas antar ketiga jenis antibodi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan Protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 yang berasal dari isolat Blitar memiliki berat molekul 53,5 kDa. Reaktivitas protein NA virus AI subtype H5N1 tertinggi diperoleh terhadap antibodi anti-H5N1, diikuti anti-H5N2 dan anti-H5N9. Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini

adalah : protein NA virus AI subtype H5N1 dapat disarankan untuk digunakan sebagai antigen kit diagnostik berdasarkan reaktivitasnya terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9.

SUMMARY

REACTIVITY NEURAMINIDASE PROTEIN OF AI VIRUS H5N1 SUBTYPE AGAINST TO VARIETY OF H5 SUBTYPE ANTIBODY

The AI virus of H5N1 subtype is an RNA virus that belongs to the family Orthomyxoviridae and a type A influenza virus. This virus is able to infect various poultry and mammalian species, including human beings. AI virus is divided into subtypes according to glycoprotein surface of 16 Hemagglutinin (HA-16), 9 Neuraminidase (NA-9), and composed of eight gene segments that encode 10 types of protein. One these proteins, the NA protein, has several important roles, such as its adherence and release in the host, as the determinant of viral pathogenicity, to prevent the formed virion readherence to sialic acid receptor, and to determine immune response in the host.

This study used AI virus of H5N1 subtype obtained from the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, and inoculated within the embryonated duck eggs (EDE), and identified against anti-H5N1 antibody using HI test. The protein of AI virus H5N1 subtype was subsequently characterized using SDS-PAGE technique to determine molecular weight. The antigenicity of NA protein was determined based on the reactivity against anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibodies using Western blot and indirect ELISA.

This was a laboratory explorative study with an objective to detect the presence of neuraminidase (NA) protein of AI virus of the subtype H5N1 against anti H5N1, anti H5N2 and anti H5N9 by using ELISA method.

Results revealed that NA protein of H5N1 subtype AI virus had molecular weight of 53.5 kDa. Protein identification using Western blot showed that NA protein of H5N1 subtype AI virus was recognized only by anti-H5N1 antibody and not recognized by anti-H5N9 or anti-H5N2 antibodies. The antigenicity of NA protein of H5N1 subtype AI virus against anti-H5N1, anti-H5N2 or anti-H5N9 antibodies showed difference. NA protein reacted specifically with anti-H5N1 antibody and provided the lower OD value as compared to the reaction against anti-H5N2 or anti-H5N9 antibodies. Anti-H5N1 antibody ranged between 0.417, while anti-H5N1 and anti-H5N9 antibodies showed highest OD value, ranging between 0.206 – 0.225. The results of indirect ELISA assay were identical to the results of NA protein antigenicity assay using western blot. This was different from the reaction between H5N1 subtype AI virus whole molecule against antibody, whether it was the anti-H5N1, anti-H5N2 or anti-H5N9. All showed high OD value and the affinity among the three antibodies could not be differentiated.

It can be concluded from the results of this study that: Neuraminidase protein of avian influenza virus of H5N1 subtype obtained from the Islolet Blitar had molecular weight of 53.5 kDa. Reactivity of neuraminidase protein of avian influenza virus of H5N1 subtype result against anti-H5N1 antibody followed by anti- H5N2 and anti- H5N9 antibody. Suggestions that can be provided in this

influenza virus of H5N1 subtype result against anti-H5N1 antibody followed by anti- H5N2 and anti- H5N9 antibody. Suggestions that can be provided in this study are : NA protein A1 virus H5N1 subtype can be used as antigen diagnostic kit based on its reactivity against anti- H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 antibody.

ABSTRACT**REACTIVITY NEURAMINIDASE PROTEIN OF AI VIRUS H5N1 SUBTYPE AGAINST TO VARIETY OF H5 SUBTYPE ANTIBODY**

The examination of NA protein of AI virus of H5N1 subtype was characterized using SDS-PAGE technique to determine the molecular weight. The antigenicity of NA protein was determined according to the reactivity against anti-H5N1, anti-H5N2 and anti-H5N9 using western blot and indirect-ELISA technique.

A laboratory explorative study has been undertaken to detect the presence of neuraminidase (NA) protein of AI virus of the subtype H5N1 against anti H5N1, anti H5N2 and anti H5N9 using ELISA method.

The proportion of NA protein of AI virus of H5N1 subtype in this study had molecular weight of 53.5 kDa. Protein identification using Western blot showed that NA protein of H5N1 subtype AI virus was recognized only by anti-H5N1 antibody and not recognized by anti-H5N9 or anti-H5N2 antibodies. The antigenicity of NA protein of H5N1 subtype AI virus against anti-H5N1, anti-H5N2 or anti-H5N9 antibodies showed difference.

NA protein reacted specifically with anti-H5N1 antibody and provided the highest OD value as compared to the reaction against anti-H5N2 or anti-H5N9 antibodies. Anti-H5N1 antibody ranged between 0.185, while anti-H5N1 and anti-H5N9 antibodies showed highest OD value, ranging between 0.341– 0.432. The results of indirect ELISA assay were identical to the results of NA protein antigenicity assay using western blot. This was different from the reaction between H5N1 subtype AI virus whole molecule against antibody, whether it was the anti-H5N1, anti-H5N2 or anti-H5N9. All showed high OD value and the affinity among the three antibodies could not be differentiated.

In conclusion, neuraminidase protein of avian influenza virus of H5N1 subtype obtained from the isolate Blitar had molecular weight of 53.5 kDa. The AI virus of H5N1 subtype had different antigenicity from that of the subtypes H5N2 and H5N9.

Keywords: Neuraminidase Protein, H5N1 AI Virus, H5 Subtype Antibody



DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM.....	ii
PERSYARATAN GELAR.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY.....	x
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR SKEMA	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat teoritis	4
1.4.2 Manfaat praktis.....	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Epidemiologi Avian Influenza di Indoensia	5
2.2. Virus Avian Influenza (AI).....	6

2.2.1	Etiologi dan morfologi virus AI	6
2.2.2	Sifat virus Avian Influenza	8
2.2.3	Patogenitas virus AI.....	13
2.2.4	Sumber dan cara penularan penyakit AI.....	14
2.2.5	Reseptor Virus	15
2.2.6	Proses Infeksi	16
2.2.7	Gejala klinik dan gambaran patologis AI	17
2.2.8	Diagnosis AI.....	18
2.2.9	Pengendalian dan pencegahan penyakit AI	19
2.3	Pengobatan penyakit AI	20
2.4	ELISA (Enzyme- Linked Immunoabsorbent Assay).....	21
2.5	Teknik <i>Indirect</i> ELISA	23
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konseptual	25
3.2	Alur Kerangka Konseptual	26
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Jenis Penelitian	27
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	27
4.2.1	Unit penelitian	27
4.2.2	Sampel penelitian	27
4.3	Definisi operasional penelitian	28
4.4	Bahan penelitian	28
4.5	Instrumen penelitian	28
4.6	Lokasi dan waktu penelitian	29
4.6.1	Lokasi penelitian	29
4.6.2	Jadwal penelitian	29
4.7	Prosedur Pengambilan Data November	30
4.7.1	Tahapan kegiatan untuk memperoleh data	30
4.7.2	Prosedur penelitian	30
4.7.3	Kerangka operaisonal penelitian	35
4.8	Cara pengolahan dan analisis data	36

BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1	Analisis dan Hasil Penelitian	37
5.1.1	Pembenihan virus	37
5.1.2	Uji Titer virus	38
5.2.2	Uji Titer virus.....	38
5.1.3	Pembuatan antibodi	39
5.1.4	Karakterisasi protein antigenik virus AI subtype H5N1.	39

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1	Reaktivitas Protein Neuraminidase Virus AI Subtype H5N1 Terhadap Berbagai Antibodi subtype H5	45
-----	--	----

BAB 7 PENUTUP

7.1	Kesimpulan	49
7.2	Saran	49

DAFTAR PUSTAKA	50
-----------------------------	----

LAMPIRAN	53
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1	Jadwal Penelitian 29
Tabel 5.1	Hasil Pengamatan Inokulasi virus H5N1 Telur Itik Berembrio (TIB) 38
Tabel 5.2	Hasil Perhitungan Pengenceran Virus 38
Tabel 5.4	Nilai Rata-Rata Optical Density Protein Neuraminidase Virus AI Subtype H5N1 Terhadap Antibodi Anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 43
Tabel 5.6	Hasil uji normalitas Protein Neuraminidase Terhadap Antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dan Tingkat Notasinya..... 50

DAFTAR SKEMA

	Halaman
Skema 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	26
Skema 4.1 Kerangka Operasional Penelitian	35

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Gambar Ilustrasi Virus Avian Influenza	6
Gambar 2.2. Ilustrasi Virus Avian Influenza	10
Gambar 2.3. <i>Antigenic Shift</i> dan <i>Antigenic drift</i> virus AI	12
Gambar 2.4. Penularan Global Virus Avian Influenza	15
Gambar 2.5 Replikasi AI pada sel tropisma	16
Gambar 5.1 Hasil Preparasi Protein Virus AI subtype H5N1 dengan SDS-PAGE	40
Gambar 5.2 Hasil Identifikasi Protein Virus AI subtype H5N1 dengan Metode Western Blotting	41
Gambar 5.3 Alat Elektroforesis	60
Gambar 5.4 Spektrofometer Merk Biorad	61
Gambar 5.5 Hasil Uji Elisa	61

DAFTAR SINGKATAN

BCIB / NBT	: <i>5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxyl-hospatase/Nitroblue Tetrazolium</i>
BM	: Berat Molekul
BSA	: Bovine Serum Albumin
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfhate-Polycrilamide Gel Electrophoresis</i>
NA	: Neuraminidase
HA	: Hemagglutinin
TIB	: Telur Itik Berembrio
TBS Tween	: <i>Tris Buffer Saline Tween</i>
ID	: <i>Immunodifusion</i>
HI	: <i>Hemagglutinesi Inhibition</i>
HA	: <i>Hemagglutination</i>
HPAI	: <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>
LPAI	: <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>
RNA	: Ribo Nucleic Acid
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
AP	: Alkalin Phosphatase
OD	: <i>Optical Density</i>
AEC	: <i>Amino Ethyl carbazole</i>
ITD	: Institute tropical Disease
Rf	: <i>Retandation Factor</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Pembuatan Reagen Penelitian 60
Lampiran 2	Tabel Penghitungan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE .. 61

BAB I

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Di pertengahan tahun 2003 dan awal 2004 flu burung tipe H5N1 telah dilaporkan terjadi pada unggas di delapan negara di Asia Tenggara. Wabah ini telah mengakibatkan kematian lebih dari 100 juta unggas di negara-negara yang terinfeksi, baik karena penyakit tersebut ataupun karena pemusnahan untuk pengendalian. Berdasarkan data di Indonesia per April 2008 menunjukkan bahwa dari 133 kasus Avian Influenza (AI) pada manusia, 108 di antaranya meninggal atau sekitar 81,2 %. Hal ini dapat mengakibatkan kerugian yang sangat besar disektor perunggasan. (WHO,2008).

Penyakit influenza pada unggas Avian Influenza (AI) disebabkan oleh virus influenza A dari famili orthomyxoviridae. Virus avian influenza dibagi ke dalam subtipe berdasarkan permukaan glikoprotein hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sampai saat ini telah dikenal sebanyak 16 jenis HA (HA-16) dan 9 jenis NA (NA-9) yang sudah diidentifikasi. Di antara 16 subtipe HA hanya H5 dan H7 yang bersifat ganas (virulen) pada unggas. Virus AI adalah virus RNA. Virus AI mempunyai 8 segmen genoma yang terdiri dari rangkaian RNA. Virus berukuran 80–120 nm dan mempunyai 500 *spike* (serabut) mempunyai 2 bagian amplop. Segmen ini merupakan genoma yang akan menghasilkan protein untuk menopang hidupnya. Kedelapan segmen ini terdiri dari gen hemaglutinin (HA), neuraminidase (NA), nukleoprotein (NP), matriks

(M), polyacidic (PN), polybasic-1 (PB1), polybasic-2 (PB2) serta non structural (NS). Ke delapan segmen tersebut masing - masing akan menghasilkan 1 macam protein, kecuali gen M dan NS masing - masing menghasilkan dua macam protein. Glikoprotein HA dan NA merupakan protein permukaan yang sangat berperan dalam penempelan dan pelepasan virus dari sel inang. Struktur HA, NA dan M mempunyai peranan yang sangat penting dalam respons imun. Protein HA dan NA menentukan sub tipe dari virus avian influenza, sedangkan protein M merupakan target dari obat antiviral. Protein NP dan M juga dapat digunakan untuk membedakan antara influenza A dengan B atau C (WHO,2004).

Protein neuraminidase merupakan enzim yang akan menghancurkan asam sialat yang terdapat pada dinding sel inang dan berguna di saat virus akan keluar dari sel inang. Protein NA dapat membentuk antibodi yang dapat menghambat aktivitas virus. Imunisasi dengan protein NA terbukti dapat menurunkan replikasi virus. Kekebalan humoral terhadap virus H5N1 manusia dapat memberikan perlindungan parsial pada manusia. Diketahui terjadi reaksi silang antara virus H1N1 manusia dengan virus unggas H5N1. Kedua virus ini diklasifikasikan kedalam serotipe yang sama, tetapi secara filogenik berbeda (Anwar *et al.*, 2006; Sandbbulte *et al.*, 2007).

Virus avian influenza dapat menimbulkan sindrom penyakit pernafasan pada unggas (ayam, itik, enthok) mulai dari tipe ringan (*low pathogenic*) sampai yang bersifat fatal (*highly phatogenic*). Selain menyerang organ pernafasan, virus AI juga dapat menyerang organ pencernaan dan sistem syaraf.

Berdasarkan hasil penelitian Suwarno (2007) isolasi dan analisis protein NA virus AI subtype H5N1 yang mempunyai kemampuan antigenik tinggi, terutama ikatan terhadap antibodi pada unggas yang terinfeksi subtype H5N1 merupakan dasar dari penelitian ini. Mengingat subtype AI, di mana struktur antigenik protein NA pada kesembilan subtype (N1-9) mempunyai tingkat heterologi yang tinggi.

Maka diharapkan dengan isolasi dan karakterisasi protein NA yang berasal dari virus AI subtype H5N1 akan didapatkan perbedaan reaktivitas terhadap berbagai antibodi subtype H5.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang permasalahan tersebut, maka rumuskan masalah yang dikemukakan adalah :

1. Berapakah berat molekul protein NA virus AI subtype H5N1 ?
2. Apakah terdapat perbedaan reaktifitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti – H5N1, anti – H5N2 dan anti – H5N9 ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui dan memperoleh protein neuraminidase (NA) yang berasal dari virus AI subtype H5N1 terhadap H5.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk :

1. Mengetahui berat molekul protein NA virus AI subtype H5N1.
2. Mengetahui reaktifitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, H5N2 dan H5N9 yang terbentuk.
3. Mengetahui titer tertinggi dari nilai OD ELISA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini memberikan manfaat teoritis berupa :

Melengkapi pengetahuan tentang protein NA virus AI subtype H5N1 dan memberikan sumbangan tambahan pengetahuan mengenai pemeriksaan protein NA metode ELISA khususnya dilaboratorium di Institusi kami.

1.4.2 Manfaat Praktis.

Secara praktis hasil dari penelitian ini dapat dipertimbangkan dikemudian hari bagi para peneliti, khususnya terhadap kemungkinan penggunaan protein NA sebagai bahan komponen kit diagnostik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi Avian Influenza di Indonesia

Kasus Avian Influenza pada ayam diyakini muncul pertama kali pada bulan Agustus 2003 di beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Daerah Istimewa Jojkarta (DIY), Lampung, Bali, dan beberapa daerah di Sumatra dan Kalimantan. Pada tahun 2003 yang terjangkit penyakit tersebut mencakup 9 provinsi yang terdiri dari 51 kabupaten / kota dan jumlah ayam atau unggas yang mati mencapai 4,13 juta ekor (Dirjen Peternakan RI, 2005).

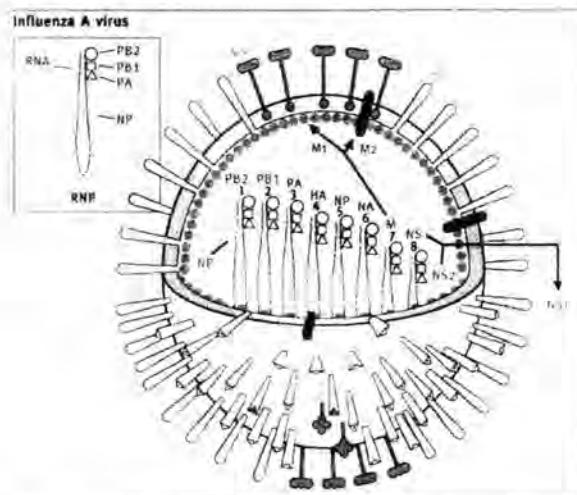
Jenis unggas yang terserang meliputi ayam ras petelur, pedaging, ayam bibit, ayam buras, ayam arab, itik, entok, burung puyuh, burung merpati, perkutut merak. Hasil kajian lapangan, klinik, patologik dan laboratories sesuai dengan uji standar yang telah ditetapkan oleh *Office International Des Epizooties* (OIE) yaitu Organisasi Dunia untuk kesehatan hewan membuktikan bahwa penyebab kematian ayam ras atau unggas peliharaan lain di Indonesia sejak bulan Agustus 2003 tersebut adalah virus influenza tipe A Subtipe H5N1 yang tergolong virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) (VOA news com, 2006).

2.2 Virus Avian Influenza (AI)

2.2.1. Etiologi dan Morfologi Virus AI

Penyakit Avian Influenza (AI) merupakan penyakit viral pada unggas peliharaan, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Masyarakat lebih luas mengenal AI dengan nama flu burung (*bird flu*) yang sebetulnya merupakan penyakit viral (influenza) pada manusia yang ada hubungannya dengan infeksi virus influenza pada unggas yang menyerang unggas di seluruh dunia yang dikenal dengan nama *Fowl Plaque* (Easterday and Berd, 1984).

Penyebab Fowl plaque adalah virus AI. Pada simposium yang dilakukan tahun 1981 diusulkan agar nama Fowl Plaque diganti dengan istilah *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) karena menyebabkan kematian yang sangat tinggi pada unggas (Tabbu, 2000).



Gambar 2.1 Ilustrasi virus Avian Influenza.

Sumber : Heinen, P. *Veterinary (2003) Sciences Tomorrow.*

Avian influenza disebabkan oleh virus influenza adalah virus RNA yang termasuk dalam golongan famili ortomixoviridae, genus virus influenza tipe A, yang mempunyai aktivitas hemagglutinin dan neuraminidase. Virus influenza terdiri dari tiga tipe antigenik yang berbeda yaitu tipe A, B, dan C. Setiap tipe dari virus influenza ditentukan oleh struktur antigenik protein nukleo dan matrik antigen yang saling berhubungan erat di antara virus tertentu. Virus tersebut dapat menginfeksi berbagai jenis unggas, manusia, babi, kuda dan kadang-kadang mamalia lain misalnya, anjing dan ikan paus. Virus influenza tipe A mempunyai 8 RNA segmen, berbentuk helikal dengan diameter 80-120 nm, mempunyai amplop dengan lipid *bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi oleh sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemagglutinin (H) dan neuramidase (N), maka virus influenza A dikelompokkan lagi menjadi banyak sub tipe. Virus influenza tipe A terdiri dari beberapa subtype, yaitu H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2 dll. Adapun sifat virus ini, yaitu dapat bertahan hidup didalam air sampai 4 hari pada suhu 22° C dan lebih dari 30 hari pada 0° C dalam tinja unggas dan di dalam tubuh unggas yang sakit dapat bertahan lebih lama, tetapi mati pada pemanasan 60° C selama 30 menit (Dikenal beberapa tipe influenza, yaitu : tipe A, tipe B dan tipe C (Hoffmann, 2000; Rantam *et al.*, 2004).

2.2.2. Sifat Virus Avian Influenza.

a. Sifat Umum Virus Avian Influenza

Virus avian influenza relatif tidak stabil di lingkungan atau mudah mati di luar tubuh. Virus avian influenza mudah mengaglutinasi sel darah merah ayam. Virus ini dapat inaktif oleh faktor – faktor lingkungan seperti panas, pH, kekeringan dan kondisi yang isotonik. Karena virus ini mempunyai membran lipid di bagian luarnya, maka virus ini peka terhadap pelarut lemak, detergen dan desinfektan seperti ammonium kuartener, aldehida dan iodium (APHIS news, 2004).

Virus avian influenza terlindung oleh bahan organik, yang ada dalam kandang seperti lender, darah dan tinja. Virus ini tetap infeksius dalam faeces selama 30-35 hari pada temperatur 4° C. Virus influenza yang bersifat infeksius dapat diisolasi dari cairan kotoran ayam selama 105 hari setelah depopulasi ayam pada saat terjadi *outbreak* avian influenza. Virus avian influenza dapat bertahan lama dalam kondisi lembab dan dingin, dan dapat diisolasi dari air danau atau kolam yang terletak di daerah yang banyak dihuni oleh unggas air. Sebaliknya virus influenza tidak dapat diisolasi setelah unggas air meninggalkan daerah tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa virus influenza dapat bertahan di lingkungan tetapi tidak dalam waktu yang lama. Virus influenza tumbuh dalam telur ayam bertunas umur 7-10 hari. Virus avian influenza biasanya akan membunuh embrio kurang dari 48–72 jam. Virus yang diisolasi teridentifikasi virus influenza tipe A melalui tes AGP dan ELISA, kemudian dilakukan test dengan menggunakan

antigen spesifik untuk menentukan identitas tipe serologik HA dan NA (Beard 1998).

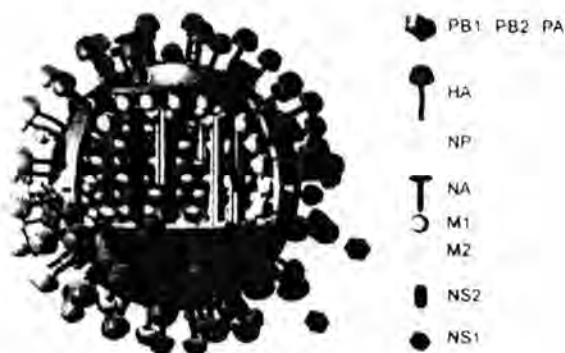
Semua virus influenza tipe A, termasuk yang menyebabkan sakit pada manusia, secara genetik labil dan beradaptasi dengan baik untuk mengalahkan ketahanan tubuh. Virus influenza kurang memiliki mekanisme untuk membaca dan memperbaiki kesalahan yang terjadi selama proses replikasi. Sebagai dampak dari kesalahan yang tidak terkoreksi, komposisi genetik dari virus berubah pada saat virus bereplikasi pada manusia dan hewan dan strain yang sudah ada digantikan oleh patoantigenik yang baru. Komposisi antigenik yang biasa yang mengalami perubahan kecil, konstan dan permanent biasa dikenal dengan "*antigeni drift*" (WHO,2004).

Virus AI dikeluarkan melalui hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka unggas yang terinfeksi, karena virus avian influenza berkembang biak dalam saluran pencernaan, ginjal dan sistem reproduksi. Virus ditularkan melalui kontak langsung dari unggas yang terinfeksi ke unggas peka melalui pernafasan, konjungtiva, dan tinja. Penularan juga dapat secara tidak langsung misalnya melalui debu yang mengandung virus, air minum, kendaraan, kandang ayam, burung, mamalia (WHO, 2006).

b. Sifat Biologis Virus Avian Influenza

Struktur dari virus influenza antara satu dengan virus yang lain sangat mirip. Dengan mikroskop elektron virus berbentuk pleomorfik meliputi virion dengan bentuk bola kasar (dengan diameter kira-kira 120 nm) dan berfilamen.

Dua tipe yang membedakan dari tonjolan seperti paku (panjangnya kira-kira 16 nm) sesuai dengan HA dan NA molekulnya berada di atas permukaan dari virion. Nampak bentuk tangkai paku HA dan NA menonjol keluar dari amplop sebagai pemotong, paku NA berbentuk jamur tetramer. Dua glikoprotein ini digunakan untuk menempel pada amplop lipid yang berasal dari selaput plasma sel inang dengan urutan yang pendek dari hydrophobic amino acid (daerah trans membran). HA adalah suatu tipe glycoprotein I (yang berisi N-Terminal E ctodomain dan sebuah jangkar C-Terminal), sedangkan NA adalah suatu tipe glikoprotein II (yang berisi suatu jangkar N-proksimal dan Terminal E ctodopamin).



Gambar 2.2 : ilustrasi virus avian influenza.

Sumber : Gurter, L,2006. Virology Of Human Influenza (2006).

Keterangan :

- HA : Hemagglutinin.
 NA : Neuraminidase.
 NP : Nukleokapsid protein, virus influenza tipe A, B dan C. Dibedakan berdasarkan nucleoprotein yang dimiliki.

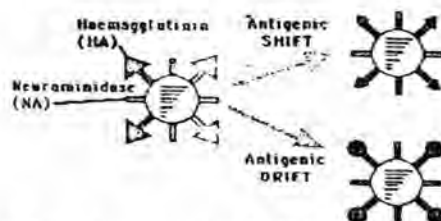
- M1 dan M2 : M1 membentuk protein matrix (hanya pada virus
influenza tipe A). M2 berfungsi untuk
menurunkan endosom.
NS : Protein nonstructural
PA : Protein Polymerase A
PB1 : Protein Polymerase B1
PB2 : Protein polymerase B2

HA memungkinkan virion untuk mengikat diri ke permukaan sel sialilglikosakarida 140 dan bertanggung jawab untuk aktivitas hemagglutinin menimbulkan antibodi netralisasi yang sangat penting dalam perlindungan melawan infeksi. Neuramidase adalah suatu sialidase untuk mencegah agregasi virion dengan memindahkan sel dan permukaan *sialic acid virin* (bagian utama dalam sialilglikosakarida yang dikenali oleh HA). Antibodi terhadap NA juga penting di dalam usaha untuk melindungi diri. Sebagai tambahan untuk HA dan NA suatu protein M2 dengan jumlah terbatas terintegrasi ke dalam virion tersebut, membentuk tetramer, memiliki endosome, mengasamkan dari dalam virion untuk memudahkan pelepasannya. Protein M1 yang berada di dalam amplop adalah berfungsi untuk meneruskan perakitan dan pelepasan. Delapan segmen dari molekul RNA pathogen-stranded (*negative sense*, atau komplementer ke mRNA) terdapat dalam amplop virus bersama-sama NP dan tiga sub unit polymerase virus (PB1, PB2 dan PA). Di mana protein tersebut bersama - sama membentuk suatu Ribonukleo protein (RNP) kompleks yang ikut serta dalam replikasi dan penurunan RNA. Protein NS2, sekarang telah terdapat dalam virion, berperan dalam meneruskan ekspor RNP dari inti melalui interaksi dengan protein M1. Protein NS1 adalah satu-satunya protein non (-) struktural dari virus influenza A, mempunyai berbagai fungsi termasuk pengaturan menyambung dan

ekspor nukleus seluler mRNAs seperti rangsangan penerjemahan. Fungsi utamanya adalah untuk menetralkan aktivitas interferon, sejak NS1 mematikan virus meskipun sedikit kelihatan sehat virus tumbuh secara efisien dibanding virus parent didalam sel interferon-non cacat (Harimoto and Kawaoka, 2001).

c. Variasi Antigenik Virus AI.

Pada virus AI dapat ditemukan dengan frekuensi tinggi dan terjadi melalui 2 cara, yaitu Shift dan Drift . Shift Antigenic dapat timbul akibat meluasnya wabah AI yang bersifat epidemik dan hanya ditemukan pada virus influenza tipe A. *Gene reassortment* yang ditemukan pada virus influenza tipe A yang mengalami “pertukaran atau percampuran gen” sehingga terjadi penyusunan kembali suatu gen baru yang bermanifestasi sebagai sub tipe virus AI baru. Shift Antigenic terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenic yang dominant pada antigen permukaan H dan atau N. Drift Antigenic dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenic yang bersifat minor pada antigen permukaan H dan atau N dan dapat ditemukan pada virus influenza tipe A dan B. Drift antigenic bersifat lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu kawasan. Mutasi yang timbul biasanya menimbulkan perubahan pada materi genetik dan polipeptida virus (Harimoto and Kawaoka , 2001).



Gambar 2.3 Skema *antigenic shift* dan *antigenic drift* virus AI.

2.2.3. Patogenitas Virus AI

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

Berdasarkan *prototype* Virus avian influenza dibedakan dua kelompok yaitu HPAI yang bersifat sangat ganas dan LPAI bersifat kurang ganas (Rahardjo, 2004).

Bentuk LPAI kebanyakan bertanggung jawab dalam banyaknya wabah AI yang terjadi pada unggas. Biasanya wabah tersebut tidak menimbulkan penyakit atau hanya penyakit ringan seperti penurunan produksi telur, tidak bertelur atau penyakit dengan tingkat mortalitas yang rendah (Khayam, 2004).

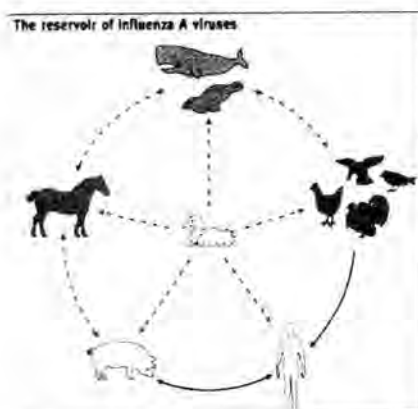
Virus High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) berkembang biak mampu pada saluran pernafasan dan pencernaan juga pada sistem syaraf dan peredaran darah sehingga mampu menyerang dan merusak hampir semua organ tubuh. Kematian akibat HPAI berlangsung cepat dan didahului dengan gejala pernafasan atau kadang-kadang tanpa gejala (APHIS news, 2004). Menurut Raharjo, (2004), salah satu tanda HPAI adalah tingkat kematian yang sangat tinggi mencapai 100%. Selama ini virus Avian Influenza yang bersifat HPAI yaitu H5 dan H7. Sifat mudah mutasi dari virus ini menyebabkan keganasannya ditentukan oleh waktu, tempat dan inang yang terinfeksi. Sedangkan golongan *Low Pathogenic* berkembang biak pada saluran pernafasan (*tracheotropic*). Ayam yang terinfeksi LPAI dapat sembuh dalam waktu seminggu dengan gejala

pernafasan. Ayam yang sembuh dapat menularkan virus melalui tinjanya. Virus LPAI dapat mengalami mutasi menjadi virus HPAI (APHIS news, 2004).

2.2.4. Sumber dan Cara Penularan Penyakit AI

Virus influenza A disekresikan melalui hidung, mulut, konjungtiva dan kloaka unggas yang terinfeksi. Virus influenza bereplikasi pada saluran pencernaan. Selain itu AI juga dapat berkembang biak dengan baik pada saluran pernafasan, ginjal, dan sistem reproduksi bahkan dapat mencapai kesistem syaraf pusat (APHIS news, 2004).

Burung yang terinfeksi mengumpulkan virus di dalam saliva, sekresi nasal dan feces. Burung dapat terinfeksi virus AI akibat kontaminasi, respirasi atau materi fecal dari burung yang telah terinfeksi (Khayam, 2004). AI biasanya bereplikasi pada saluran pencernaan dan unggas mensekresikan virus tersebut dengan titer yang tinggi dalam feces (Harimoto and Kawaoka, 2001). Tranmisi dari virus influenza melalui air merupakan mekanisme mayor penyebaran virus ini diantara burung liar yang bermigrasi (WHO, 2004).



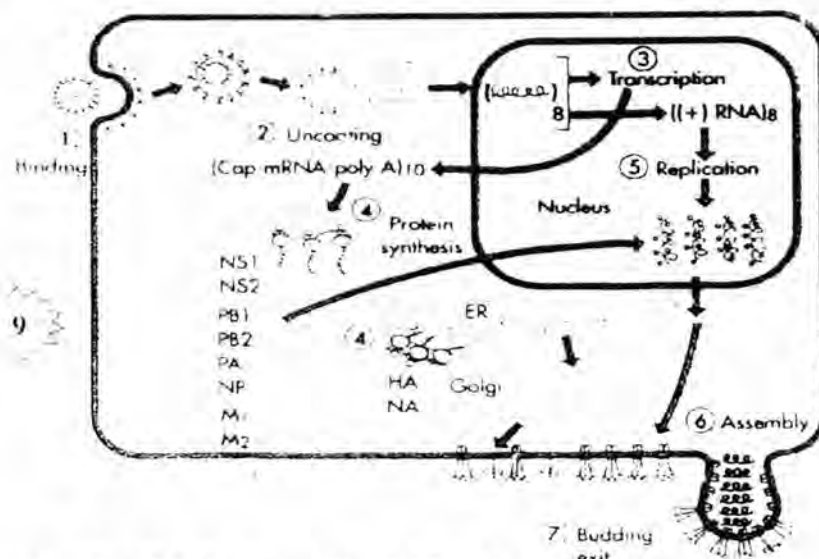
Gambar : 2.4 Penularan global virus Avian Influenza
 Sumber : T. Harimoto & Y. Kawaoka : *Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses*, 2001.

2.2.5. Reseptor Virus

Meskipun telah diketahui virus influenza A dapat terjadi penularan antar spesies termasuk manusia, namun AI tidak efisien dalam replikasi pada sel manusia. Virus human influenza tidak efisien replikasi pada sel unggas. Hal tersebut karena adanya perbedaan reseptor yang dimiliki oleh masing-masing sel tersebut. Reseptor yang dimiliki oleh sel manusia berupa *N-acetylsialic acid* yang mengikat galaktosa dengan ikatan alfa 2,6 atau disingkat NeuAc-alfa 2,6 Gal (asam sialat-alfa 2,6). Sedangkan pada unggas senyawa galaktosa diikat pada alfa 2,3 disingkat NeuAc-alfa 2,3 Gal (asam sialat-alfa 2,3). Perbedaan reseptor ini korelasinya dengan letak asam amino nomer 226 yaitu pada virus Human influenza diisi oleh leusin (leu) sedangkan pada AI dan virus Equine influenza diisi oleh glisin (Gln) (WHO, 2004).

2.2.6. Proses Infeksi

Proses terjadinya infeksi atau patogenesis tahap pertama terjadi secara inhalasi yaitu menghirup, ingesti atau memakan AI. Enzim tripsin dan protease lainnya dalam sel tropisma terutama dalam pada epitel saluran pernafasan, paru-paru dan trachea tersedia untuk pembelahan (cleavage) protein hemagglutinin. Jadi pada saat AI menginfeksi sel, enzim tripsin dan enzim protease dalam sel akan memecah protein hemagglutinin menjadi 2 bagian yaitu HA1 dan HA2. Virion masuk ke sel endositosis.



Gambar 2.5 skema replikasi AI pada sel tropisma (diadaptasi dari Hay M, 2002).

Virion masuk ke dalam sel secara endositosis. Protein HA akan berikatan dengan reseptor yang terdapat di dinding sel inang. Siklus replikasi akan memperbanyak diri terjadi dalam saluran pernafasan dan atau saluran pencernaan dengan mengeluarkan bagian dari virus yang bersifat menimbulkan infeksi. Terlihat pada gambar masuk dan berkembangnya AI ke dalam sel. 1). Mula-mula virion menempel pada reseptor sel tropisma melalui protein hemagglutinin. 2).

Berdasarkan pengamatan di laboratorium diketahui selama 10 menit, proses endositosis dan pelepasan selubung telah mencapai 50 %. proses ini sampai isemua segmen RNA keluar kedalam sitoplasma. 3). Segmen-segmen tersebut masuk kedalam inti sel (nucleus) dan mengalami transkripsi, untuk merubah bentuk (-) RNA menjadi (+) RNA 4). Sebagian segmen keluar kembali ke sitoplasma untuk mempersiapkan protein selubung untuk dipakai oleh virus baru yang akan dihasilkan. Protein yang dimaksud adalah hemagglutinin, Neuramidase, Matriks, dan protein nonstructural. 5). Delapan segmen yang berada di inti sel ditambah dengan segmen RNA yang masih tersisa di sitoplasma melakukan replikasi memperbanyak RNA. 6). Segmen RNA yang sudah mengalami replikasi keluar ke sitoplasma untuk dibungkus dengan protein HA, NA, M, NS menjadi anak AI yang siap dilepas dari sel inang. Proses ini yang mempermudah proses terjadinya antigenic drift dan shift (Raharjo, 2004).

2.2.7. Gejala klinik dan Gambaran patologis AI.

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

Saat ini, penyebab AI adalah *highly pathogenic avian influenza (HPAI)*, subtype H5N1 (H = Hemagutinin; N = Neuramidase). Hal ini menunjukkan bahwa unggas yang sakit mengeluarkan virus influenza A (H5N1) merupakan penyebab wabah AI pada unggas. Secara umum AI tidak menyerang manusia, namun beberapa tipe tertentu dapat mengalami mutasi lebih ganas dan menyerang manusia (Fenner *et al.*, 1995).

Penularan AI (H5N1) pada unggas terjadi secara cepat dengan kematian tinggi. Penyebaran penyakit ini terjadi di antara populasi unggas satu peternak ke peternak daerah lain. Penularan penyakit kepada manusia dapat melalui udara yang tercemar virus tersebut, baik berasal dari tinja atau sekreta unggas yang terserang AI. Adapun orang yang mempunyai resiko besar untuk terserang AI adalah pekerja peternak unggas, penjual dan penjamah unggas. (depkes, 2004).

Tanda-tanda gejala klinis sangat bervariasi tergantung dari virus yang menginfeksi, jenis unggas yang terinfeksi, penyakit-penyakit lain yang berada dilingkungan sekitarnya dengan gejala klinis, pada unggas jengger berwarna biru, borok dikaki, kematian mendadak. Masa inkubasi pada unggas 1 minggu, dan pada manusia berlangsung 1-3 hari. Masa infeksi 1 hari sebelum sampai 3-5 hari sesudah timbul gejala. (Khayam, 2004).

2.2.8. Diagnosis AI.

Penegakan diagnosis AI dilakukan dengan mengamati tanda-tanda klinis seperti gejala penyakit, pemeriksaan pasca kematian, dan dengan pemeriksaan laboratorium. Pengamatan dengan gejala klinis seperti diagnosa saluran

pernafasan atas atau penurunan produksi telur, dan kematian yang tiba-tiba dengan mortalitas yang tinggi tidak dapat menentukan diagnosa yang pasti (Graraibeh, 2002; Raharjo *et al.*, 2004).

Pertumbuhan virus dideteksi dengan uji Hemaglutinasi HA dan untuk identifikasi dilakukan uji HI dengan antibodi spesifik subtype AI dengan menggunakan telur ayam berembrio (TAB) atau telur itik berembrio (TIB). Secara serologik virus AI dapat diidentifikasi dengan enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), hemaglutinasi inhibition (HI), immunodifusion (ID) atau western blot.

Peran protein HA dan NA yang terdapat pada amplop virus menjadi tumpuan dasar pada uji HI. Kedua protein ini menjadi target awal dalam pembentukan antibodi inang. Pada awal infeksi protein ini akan berikatan dengan reseptor dan melepas ribonukleat (RNA). Adanya aktivasi prekursor HA (HAO) oleh protease inang, protein akan terbelah menjadi HA1 dan HA2. Protein HA1 akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respon imun, sedangkan protein HA2 akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membrane endosomal inang (Suzuki, 2002). Protein M2 bersama dengan HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002)

2.2.9. Pengendalian dan Pencegahan Penyakit AI

Pada umumnya kontrol penyakit dilakukan dengan pemisahan burung yang terinfeksi dan pemutusan siklus infeksi. Banyak bukti yang menunjukkan

bahwa sumber terbesar dari infeksi adalah burung yang terinfeksi (Easterday and Beard, 1984).

Usaha pencegahan lain yang dapat dilakukan adalah dengan menghindarkan kontak antara unggas dan burung liar. Khususnya burung air dan burung migrasi liar yang harus dipertimbangkan adanya ancaman karena tingkat infeksi yang tinggi yang diobservasi dari beberapa area, menghindari masuknya burung yang tidak diketahui status imun ke dalam flock, mengontrol lalu lintas manusia, prosedur sanitasi dan desinfeksi yang tepat (Easterday and Beard, 1984).

Hal lain yang juga membantu pencegahan adalah karantina hewan, kontrol dan pengawasan yang efektif, prosedur diagnosa dan program yang tepat serta *biosekuriti* yang tepat. Vaksinasi dapat menjadi alat kontrol karena dapat menekan angka kematian dan sakit, tetapi tidak mencegah infeksi dan penyebaran virus. Vaksin hidup tidak dianjurkan untuk digunakan dalam kegiatan vaksinasi karena potensial menjadi sangat patogen. Eradikasi dengan cara pemusnahan dan pembinasan sebaiknya dilakukan pada saat terjadi *outbreak*. Pengisian kembali paling cepat dilakukan 21 hari kemudian (APHIS news, 2004).

2.3 Pengobatan Penyakit AI

AI tidak dapat diobati. Pemberian antibiotik atau anti bakteri hanya ditujukan untuk mencegah infeksi sekunder dari bakteri atau *mikoplasma*. Di samping itu, perlu juga dilakukan pengobatan suportif dengan pemberian multivitamin untuk membantu proses rehabilitasi jaringan yang rusak (Labbu, 2000).

Amantadin bukan terapi pilihan untuk penyakit AI (H5N1). Pemberian obat ini telah dicoba pada kasus Influenza burung puyuh di Italia serta kalkun, namun kurang efektif dan tidak boleh diberikan pada unggas yang dikonsumsi (Guan *et al.*, 2004; Ratriashrti, 2004).

2.4 ELISA (*Enzyme - Linked Immunoabsorbent Assay*).

Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) merupakan salah satu uji serologis yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Dalam diagnosis penyakit infeksi, ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen (virus, parasit, bakteri, jamur) atau terhadap antibodinya. Pada penyakit non-infeksi, ELISA dapat digunakan untuk evaluasi program vaksinasi, monitor hormon, obat-obatan, antibiotika, toksin, pestisida, komponen serum, protein onkofetal, sitokin, atau penyakit autoimun (Suwarno. dkk, 2007).

Sejak diperkenalkan pada tahun 1971, ELISA telah mengalami perkembangan. Pada dasarnya ELISA dapat dibagi menjadi 3 jenis menurut komponen yang di label enzim, yaitu : pelabelan pada antibodi (Ab), pelabelan pada antigen (Ag), dan pelabelan pada anti immunoglobulin (Suwarno, 2007).

Dua macam antibodi yang digunakan pada ELISA adalah antibodi pertama (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau antibodi anti-globulin mengikat pada antibodi pertama. Anti-globulin ini di label dengan enzim untuk mempermudah memonitor dengan adanya perubahan warna. Adanya reaksi dari enzim secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis. Enzim yang biasa digunakan dalam ELISA adalah

Horseradish Peroxidase (HRP), *Alkalin Phosphatase (AP)*, *urease beta galaktose* dan glukosa oksidase. Pemilihan enzim berdasarkan atas homogen, murah, spesifik dan stabil (Rantam, 2003).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi beberapa persyaratan, di antaranya tidak boleh mengurangi sifat imunologik antigen atau antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk dapat disimpan selama jangka waktu tertentu (Kresno, 2000). ELISA lebih sering digunakan untuk mendeteksi antibodi dari pada tes asai yang lain, karena ELISA lebih ekonomis dan bekerja cepat untuk melakukan tes terhadap sampel. ELISA dapat untuk mendeteksi antibodi dari serotipe 1 dan 2. Peran antibodi dalam ELISA sangat penting untuk mengukur tingkat kekebalan dalam tubuh sampai titernya cukup, yang dapat digunakan untuk membandingkan antibodi netralisasi dan penangkap antigen sehingga virus dapat dideteksi (Suwarno, 2007).

Interpretasi ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) ataupun secara kuantitatif dengan *spektrofotometer*. Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan *spektrofotometer* (*ELISA reader*) yang bekerja berdasarkan pada nilai titer atau absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/OD*) (Suwarno, 2007).

2.5. Teknik *Indirect* ELISA

Teknik *Indirect* ELISA dipakai untuk menentukan antibodi. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan direaksikan dengan antigen yang telah diikat pada fase padat, selanjutnya dilakukan penambahan konjugat (Anti-immunoglobulin yang berlabel) dan diakhiri dengan penambahan substrat. Aktivitas dari enzim yang terikat berbanding terbalik dengan kadar antibodi dalam sampel. Aplikasi dari teknik ini sebagai penentu antibodi dari *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Candida*, *Gumboro*, *Toxoplasma*, dan *Schistosoma*. (Suwarno, 2007).

Pada *Indirect* ELISA untuk deteksi antibodi, permukaan *polistiren* digunakan untuk menyerap antigen protein. Pertama-tama dilapisi dengan antigen yakni dengan pengeraman larutan antigen di dalam tabung semalam. Setelah antigen yang tidak terikat dicuci, serum yang diuji ditambahkan ke dalam tabung sedemikian sehingga setiap antibodi di dalam serum akan terikat dengan antigen pada dinding tabung. Setelah diinkubasi dan pencucian untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat. Adanya antibodi yang tidak terikat diketahui dari penambahan *anti-globulin* terikat enzim. *Anti-globulin* ini mengikat antibodi dan setelah inkubasi dan pencucian, dapat diketahui dan diukur dari penambahan substrat enzim. Enzim dan substrat akan menghasilkan warna dalam tabung. Warna yang dihasilkan dapat diukur secara visual atau lebih baik dibaca dalam *spektrofotometer*. Dalam uji ini intensitas reaksi warna adalah langsung sebanding dengan antigen yang terikat (Tizard, 1988). Menurut Suwarno. (2007), penentuan

antibodi dapat dilakukan dengan pelabelan pada Ig-nya yaitu dengan menggunakan metode *Indirect* ELISA.

ELISA adalah salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antibodi, antigen, hormon maupun materi toksik. Dua macam antibodi yang digunakan dalam ELISA, antibodi pertama (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau anti bodi antiglobulin mengikat pada antibodi pertama. Anti globin ini yang dilabel dengan enzim seperti *horseradish peroxidase*, *alkaline phospatase* yang mempermudah untuk monitor dengan perubahan warna. Adanya reaksi dari enzim ini secara kuantitatif antibodi pertama dapat dianalisis (Rantam, 2003).

Enzim yang dipakai untuk melabel antigen atau antibodi harus memenuhi persyaratan, di antaranya tidak boleh mengurangi sifat imunologi antigen maupun antibodi, harus dapat diperoleh dalam keadaan murni serta stabil untuk disimpan selama jangka waktu tertentu (Kresno, 2000).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

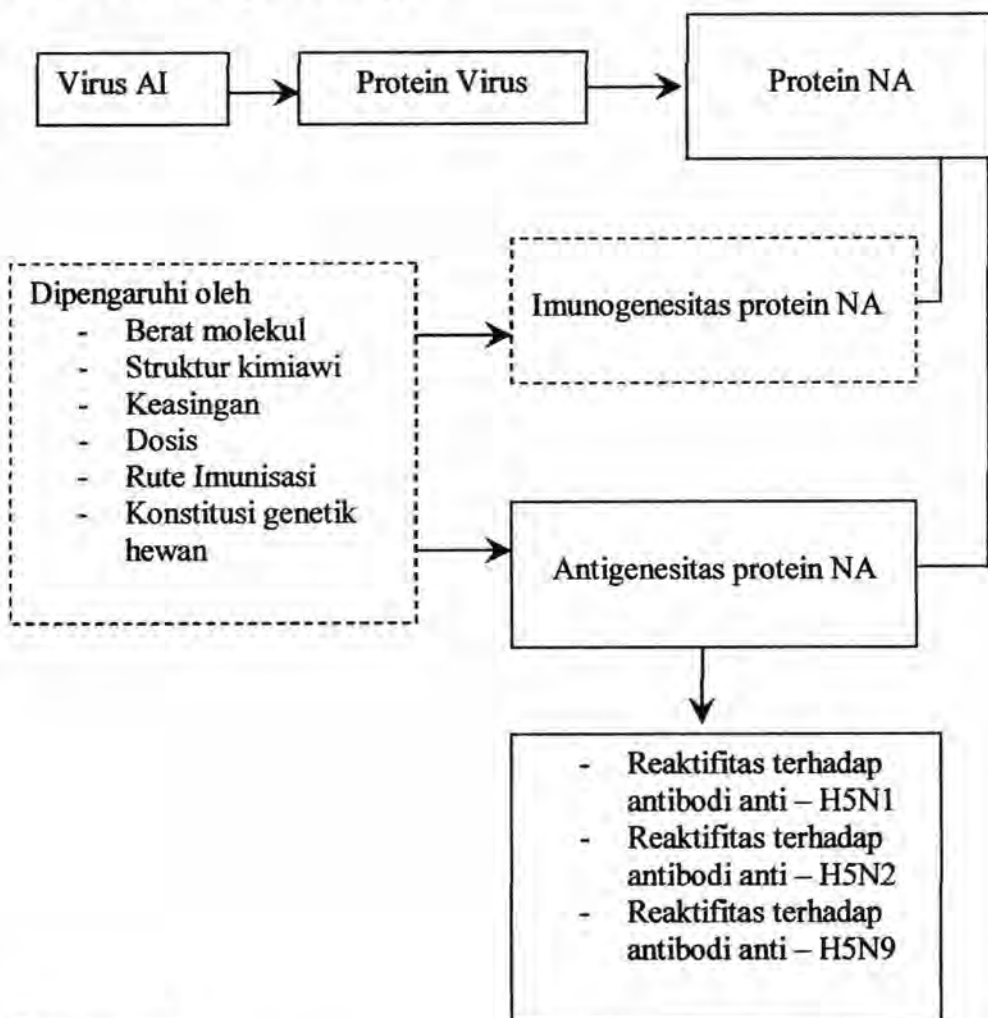
3.1 Kerangka Konseptual

Virus AI subtype H5N1 adalah virus RNA yang termasuk dalam family *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Virus AI subtype H5N1 dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia, termasuk manusia. Virus AI subtype H5N1 tersusun atas 8 segmen gen yang menjadi 10 macam protein. Di antara kesepuluh protein, protein NA memiliki beberapa fungsi yang sangat penting diantaranya sebagai penentu inang, penentu patogenitas virus, melepaskan partikel virus yang sudah dibentuk dari sel, mencegah virion yang sudah terbentuk menempel kembali pada reseptor asam sialat dan menentukan timbulnya respon imun pada inang. Neuraminidase adalah merupakan enzim yang akan menghancurkan asam sialat yang terdapat pada dinding sel inang dan berguna di saat virus akan keluar dari sel inang.

Berat molekul struktur kimiawi, keasingan, dosis, rute imunisasi, konstitusi genetik hewan pada protein NA akan mempengaruhi imunogenesitas protein NA dan antigenesitas protein NA. Antigenesitas Protein NA yang tinggi akan menimbulkan reaktifitas yang berbeda terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9.

Blotting untuk menentukan antigenisitas protein NA, dan tahapan yang terakhir adalah teknik *indirect* ELISA untuk menguji antigenisitas antara protein NA dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dengan melihat reaktifitas masing-masing dari antibodi tersebut.

3.2 Alur Kerangka Konseptual



Keterangan :

———— : dikerjakan

----- : tidak dikerjakan

Skema 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris yaitu mendeteksi adanya protein neuraminidase (NA) virus AI dari subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 dengan metode ELISA.

4.2 Populasi dan sampel penelitian

4.2.1. Unit Penelitian

Unit penelitian adalah Sampel virus AI subtype H5N1 diperoleh dari Departemen Mikrobiologi FKH Unair. Diisolasi pada telur itik berembrio (TIB) dan diamati selama tujuh hari. TIB yang hidup dan yang mati diuji dengan melawan H5N1 dengan uji HI. Hasil dari TIB yang positif diambil cairan alantoisnya dan kemudian dipanen disimpan dalam suhu 4 derajat C sampai digunakan untuk penelitian

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel virus AI subtype H5N1 diperoleh dari Departemen Mikrobiologi FKH Unair.

4.3 Definisi Operasional Penelitian

- a. Protein neuraminidase (NA) adalah Suatu enzim yang akan menghancurkan asam sialat yang terdapat pada dinding sel inang dan berguna di saat virus akan keluar dari sel inang.
- b. Virus Avian Influenza adalah virus AI subtype H5N1 yang akan dipisahkan untuk mendapatkan protein neuraminidase (NA).
- c. Reaktivitas Protein NA adalah nilai OD tertinggi protein NA terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9.

4.4 Bahan Penelitian

Membran nitroselulosa, Marker Rainbow, Kertas Whatman, Bis-acrylamide, Tris, SDS, Temed, Ammonium persulfat, Gliserol, Glycine, Marker protein, Asam sitrat 10 %, TBS Tween 0,05 %, Bovine serum albumin, Konjugate anti-chiken Ig G Alkaline phospatase, Substrat PNPP (Para Nitrofenil fosfat)

4.5 Instrumen Penelitian

Vorteks, Alat-alat gelas, Cetakan dan chaberuntuk SDS, Power suplay, Shaker GFL, Blotter, Cutter, Plastik selopan, Mikroplate 96 sumur, Alat washer, ELISA Reader, lampu peneropong, pensil, bor, spuit, almari es, inkubator, mikroplat bentuk v, yellow tip, spektrofotometer uv - 1601

4.6 Lokasi dan waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Institute tropical disease (ITD) Universitas Airlangga (keduanya berada di kampus C Sukolilo Surabaya).

4.6.2 Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 8 bulan mulai bulan november 2007 sampai dengan Juni 2008, jadwal penelitian seperti terlihat pada Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

Kegiatan \ Bulan ke	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Studi pustaka	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Penyusunan proposal		XX	XX	XX	XX			
Penelitian pendahuluan				XX				
Ujian proposal dan perbaikan						XX		
Pelaksanaan penelitian					XX	XX	XX	
Pengumpulan data						XX	XX	
Analisis data							XX	
Pembuatan laporan							XX	
Ujian tesis							XX	

Keterangan :

I : Januari 2008 II : Pebruari 2008 III : Maret 2008
 IV : April 2008 V : Mei 2008 VI : Juni 2008
 VII : Juli 2008 VIII : Agustus 2008

4.7. prosedur Pengambilan data

4.7.1 Tahapan kegiatan untuk memperoleh data

a. ~~4.7.1~~ Persiapan dan seleksi sample

Persiapan dan seleksi sample dari specimen virus AI subtype H5N1 yang diperoleh dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

b. Perbenihan Virus.

Sebagai pengganti hewan percobaan dan pembenihan disini digunakan Telur Itik Berembrio (TIB) untuk isolasi dan identifikasi dari virus. Dalam TIB virus dapat hidup pada beberapa bagian dari telur, tergantung dari sifat virus. Dan perlu diperhatikan, bahwa TIB berasal dari induk yang sehat, tidak pernah divaksin dan tidak pernah tertular penyakit atau *specific pathogen free (SPF)*. Sebelum TIB di inokulasi harus dilakukan pemeriksaan terlebih dahulu untuk mengetahui apakah embrio dalam TIB masih hidup. Hal ini dilakukan dengan cara meneropong telur dengan di depan 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.

4.7.2 Prosedur Penelitian

a. Uji Hemaglutinasi (HA)

Lubang mikroplate diisi dengan 0,025 ml PZ mulai dari lubang 1 sampai 12 dengan menggunakan pipet droppet dengan volume 0,025 ml. Dengan dropet volume 0,025 ml, diisi lubang mikroplate lubang 1 baris 1 dan 2 dengan antigen 0,025 ml. Campur antigen dan PZ pada lubang 1, kemudian ambil dan pidahkan

ke lubang berikutnya. Demikian seterusnya sampai dengan lubang 11 dan lubang 12 digunakan sebagai control eritrosit (tanpa antigen). Diisi semua lubang dengan 0,05 ml eritrosit ayam 0,5 %, dan diinkubasi dalam suhu kamar selama 30 menit, kemudian dibaca hasilnya.

b. Uji Titer Virus.

Sebelum titrasi virus dilakukan terlebih dahulu dihitung dosis antibiotik yang digunakan. Antibiotik diambil sesuai dengan dosis yang dibutuhkan dan dilarutkan dalam 100 ml PZ. Disediakan 9 buah tabung *venoject* dan masing-masing tabung diisi dengan PZ yang mengandung antibiotik sebanyak 4,5 ml. Vaksin diencerkan dengan cara : mengambil larutan vaksin dan dimasukkan kedalam tabung 1 yang berisi 4,5 ml PZ yang mengandung antibiotik kemudian dihomogenisasikan dengan vortex mixer. Diambil 0,5 ml dari tabung 1 kemudian masukkan ke dalam tabung 2 dan dihomogenisasikan. Dilakukan dengan cara yang sama seperti di atas pada tabung 3 hingga 8.

c. Inokulasi Telur Itik Berembrio (TIB).

Diambil 0,1 ml dari tiap-tiap tabung pada pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-9} dan diinokulasikan pada cairan allantois TIB. Masing-masing pengenceran 5 butir TIB, sehingga untuk 6 pengenceran dibutuhkan 30 butir TIB.

Virus dipanen diakhir pengamatan (hari ke 5) dengan membuka cangkang telur bagian atas untuk mengambil inokulan yang mengandung virus dan kemudian dilakukan uji HA. Pengamatan terhadap TIB dilakukan setiap hari, meliputi pengamatan TIB yang mati ataupun yang hidup. Embrio yang mati dimasukkan kedalam lemari es. Diakhiri pengamatan (hari ke 5) embrio yang

masih hidup dimasukkan ke dalam lemari es untuk mematikan embrio yang masih hidup.

Setelah hari ke lima dilakukan uji serologis dengan menggunakan HA mikroteknik untuk mengetahui apakah embrio terinfeksi virus ND atau tidak, dengan melihat adanya reaksi aglutinasi.

d. Analisis Protein

Hasil biakan virus segar yang berasal dari TIB yang baru dipanen dimurnikan dan berikutnya dilakukan analisis protein dengan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *western blot*.

e. SDS-PAGE

Setelah larutan gel pemisah 12 % dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal, kemudian di atasnya ditambahkan butanol sampai mengeras. Butanol kemudian dibuang, dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas Whatman. Proses selanjutnya adalah penambahan stacking gel dan setelah itu dimasukkan comb dan ditunggu diberi bufer Sampel yang sudah dicampur dengan bufer lisis I/II dipanaskan 42°C, kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke lubang. *Power supply* dinyalakan dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam dan jika gel sudah sampai ke bawah kemudian dimatikan. Plate dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan bufer.

Protein gel kemudian ditransfer ke kertas nitroselulose (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Kertas PVDF diinkubasi pada anode bufer II, kemudian disusun 6 sheet kertas absorben dari bufer I, 3 sheet dari bufer II, PVDF dan polyacrylamid dan 6 sheet pada

katode bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik 0,8 mA/cm² dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquades dan larutan TBS, untuk kemudian, untuk kemudian di-*blotting*. roselulose dan selanjutnya dilakukan western blotting.

f. Western Blotting

Membran PVDF blot diblok dengan 1% BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal dan sebagai kontrol direaksikan dengan serum ayam/kelinci normal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* atau anti-chicken yang dilabel enzim alkalin fosfatase dan diberi substrat 4-NPP, serta diwarnai dengan *western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik dan dihitung berat molekul protein. Potongan gel kemudian dimasukkan ke dalam larutan PBS dan didialisis selama 24 jam, serta setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Arus listrik yang dipakai 100 Volt, 50 mA dan 12 W dan selanjutnya protein ditampung dalam tabung mikrosentrifus.

g. Penghitungan Berat Molekul Antigen Protein

Berat molekul antigen protein dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retandation Factor*) dari *marker* dan masing-masing pita, 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 menkonversikan data nilai Rf dan berat molekul protein standar (Rantam, 2003)

h. 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, sesuai yang dikehendaki untuk selanjutnya dilakukan ELISA

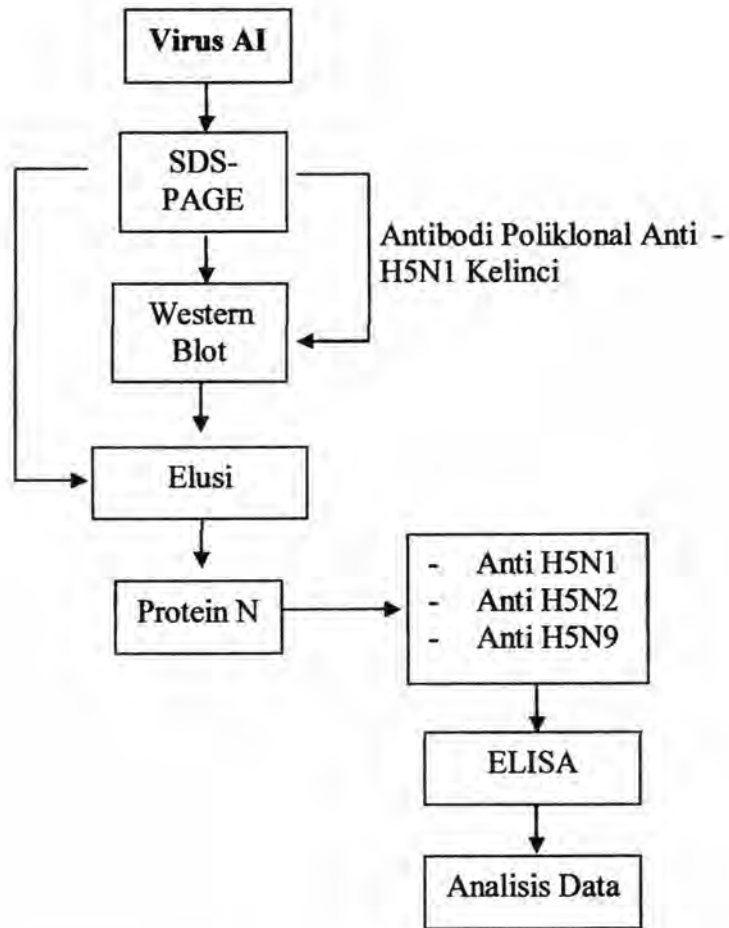
i. Pengujian Reaktivitas Protein Neuraminidase Antibodi Anti NA subtype H5N1

Protein NA subtype H5N1 hasil isolasi dan diuji reaktivitasnya terhadap antibodi anti-H5N1 dengan teknik *western blot* dan *indirect-ELISA*.

j. Uji *Indirect-ELISA*

Uji ini digunakan untuk mengetahui antigenisitas protein NA terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9. Sebanyak 5 ug/ml protein NA subtype H5N1 diikatkan pada mikroplat fase padat dan diinkubasi selama 18 jam suhu 4 C. Mikroplat dicuci sebanyak 6 kali dengan buffer (NaCl-Tween) diblok dengan 200 mikro liter buffer bloking (PBS-Tween) diuji antigenisitasnya terhadap H5N1, H5N2 atau anti-H5N9 yang akan diuji. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 C, dicuci dan ditambahkan konjugat anti-chicken yang berlabel enzim alkalin fosfatase (1 : 4000) dan diinkubasikan kembali pada suhu 37 C selama 1 jam. Setelah itu ditambahkan substrat p-NPP dan resapan dibaca pada panjang gelombang 415 nm.

4.7.3 Kerangka Operasional Penelitian



Skema 4.1 Kerangka Operasional

4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data berupa profil reaktifitas protein NA terhadap antibodi diskriptif (Zainuddin, 2000).

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya protein neuraminidase (NA) virus AI subtipe H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 dan anti-H5N9 dengan metode ELISA.

5.1. Analisis dan Hasil Penelitian

Sesuai dengan penjelasan data penelitian, maka analisis dan hasil penelitian diuraikan sebagai berikut :

5.1.1 Pembenihan virus.

Pembenihan virus dilakukan pada Telur Itik Berembrio (TIB) dengan umur 4 – 8 hari dengan jumlah TIB sebanyak 45 butir, dengan pengenceran dari 10^2 – 10^9 . Masing-masing pengenceran sebanyak 5 butir TIB. Pengamatannya dilakukan setiap hari , apabila embrio mati sebelum 24 jam, telur dibuang. Telur yang embrionya mati lebih dari 24 jam atau yang masih hidup sampai akhir pengamatan, dimasukkan dalam almari es untuk pengamatan dan hasilnya sebagai berikut :

Tabel 5.1. Hasil pengamatan inokulasi Telur Itik Berembrio (TIB) selama 4 hari.

Pengenceran	Positip	Negatip
10^{-2}	5	0
10^{-3}	5	0
10^{-4}	5	0
10^{-5}	4	1
10^{-6}	4	1
10^{-7}	4	1
10^{-8}	0	5
10^{-9}	0	5

5.1.2 Uji Titer Virus

Titer virus pada uji HA diukur berdasarkan pengenceran tertinggi yang masih dapat mengaglutinasi eritrosit. Titer virus pada uji HA selanjutnya dihitung dengan menggunakan rumus Reed and Muench. Dengan hasil sebagai berikut .

Tabel 5.2 Hasil perhitungan pengenceran virus :

Pengenceran	Positip(+)	Negatip(-)	Jml +	Jml -	Rasio	Persen(%)
10^{-2}	5	0	27	0	27/27	100%
10^{-3}	5	0	22	0	22/22	100%
10^{-4}	5	0	17	0	17/17	100%
10^{-5}	4	1	12	1	12/13	92,3%
10^{-6}	4	1	8	2	8/10	80%
10^{-7}	4	1	4	3	4/7	57,1%
10^{-8}	0	5	0	8	0/8	0%
10^{-9}	0	5	0	13	0/13	0%

$$PD = \frac{57,1 - 50}{57,1 - 0} = \frac{7,1}{57,1} = 0,12$$

$$50\% \text{ dep } 10^{-7} - 0,12 = 10^{-7,12}$$

$$\text{EID } 50 = 10^{-7,12} \times 10^{-1} \text{ ml} = 10^{-8,12} \text{ ml}$$

$$\text{Titer} = 10^{8,12} \text{ EID } 50/\text{ml.}$$

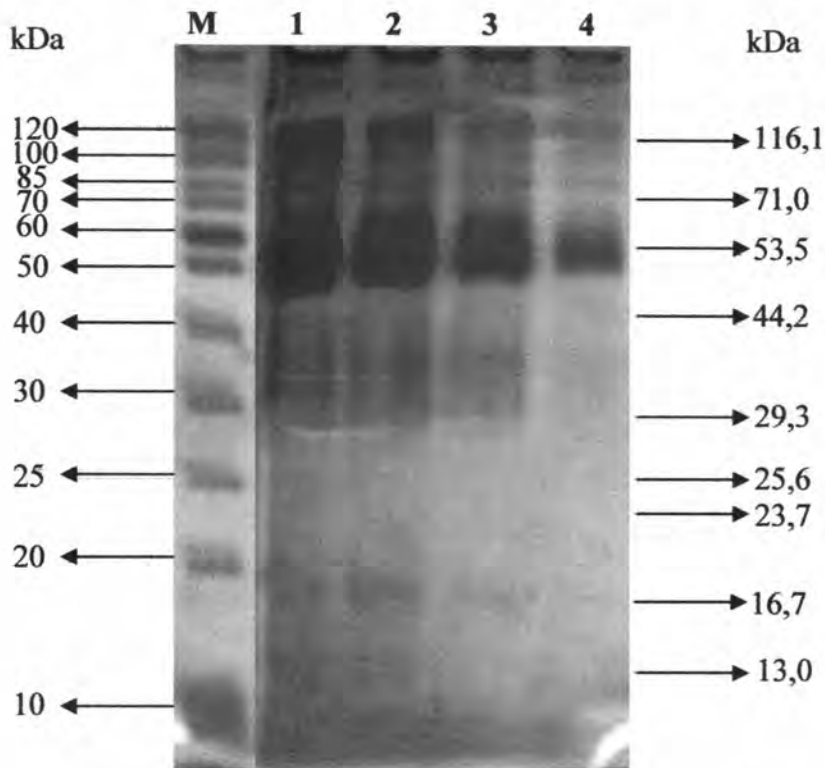
¹³~~5.2.4~~ Pembuatan antibodi

Suspensi virus ditambah formalin 1 % dan freund adjuvan complete kemudian divortex selama 10 menit dan disuntikan ke kelinci sebanyak 1 ml sebanyak tiga kali dengan interval 2 minggu. Pada penyuntikan ke dua menggunakan freund adjuvan incomplete. Setelah selesai penyuntikan diambil darahnya dari daun telinga dan dicentrifuge 1500 rpm selama 10 menit. Kemudian diambil serumnya.

¹⁴~~5.2.5~~ Karakterisasi protein antigenik virus AI subtype H5N1.

a. SDS - PAGE.

Langkah selanjutnya adalah mengkarakterisasi protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil elektroferisis menunjukkan adanya berbagai macam protein dari molekul terendah sampai tertinggi (berat molekul terendah 13 Kd dan berat molekul tertinggi 116 kD) yang disetarakan dengan marker. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil preparasi protein virus AI subtype H5N1 seperti yang ditampilkan pada pemeriksaan metode SDS - PAGE seperti tertera pada Gambar 5.1 tampak protein NA virus AI subtype H5N1 dengan berat molekul 53,5 kDa terletak pada marker protein antara 50 – 60 kDa.

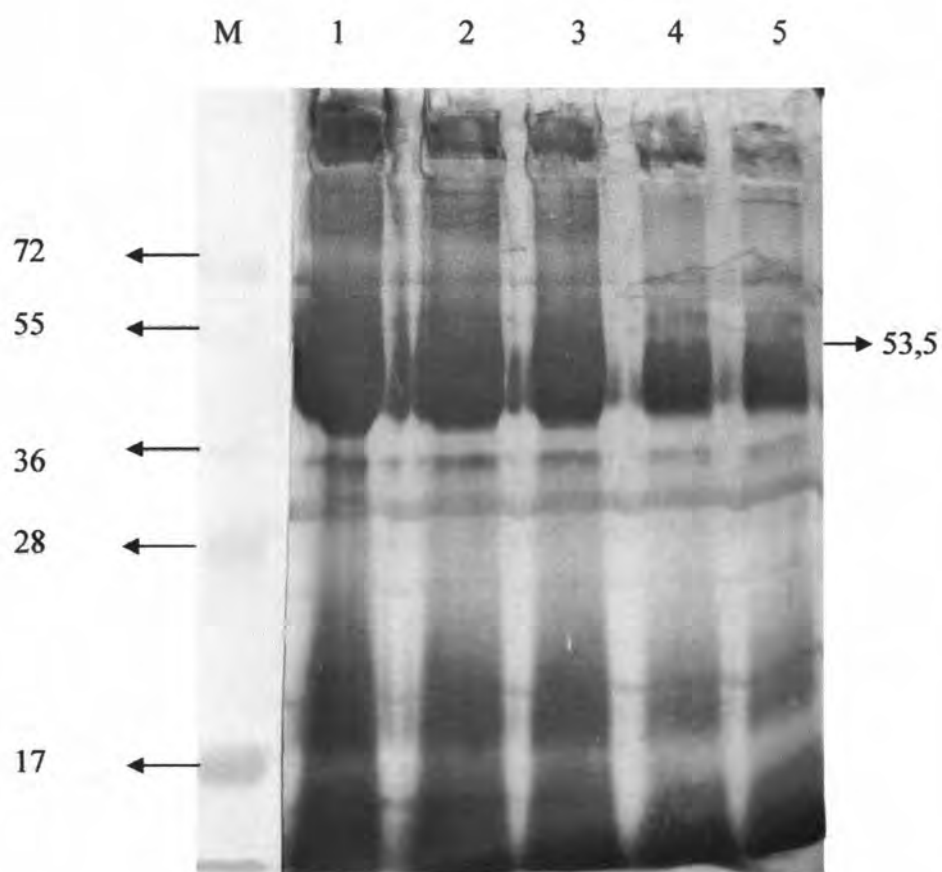


Gambar 5.1 Hasil preparasi protein virus AI subtype H5N1 dengan SDS –PAGE. Kolom 1- 4 virus AI dengan berbagai pengenceran mulai dari pengenceran 1 :10 sampai dengan pengenceran 1 : 80, M marker.

Hasil preparasi protein virus AI subtype H5N1 dengan SDS –PAGE. Terdapat beberapa macam protein dari berat molekul yang terendah sampai tertinggi antara 13,0 sampai 116,1 kDa. Protein NA virus AI subtype H5N1 berada pada marker 53,5 kDa.

b. Western Blotting

Untuk melihat antigenisitas masing – masing band perlu dilakukan blotting dengan metode western blotting menggunakan antibodi poliklonal dengan hasil seperti tertera pada gambar 5.2



Gambar 5.2 : Hasil identifikasi protein virus AI subtype H5N1 dengan metode western blotting dengan berbagai serum anti – rabbit.

Identifikasi protein virus AI subtype H5N1 dengan metode western blotting hanya menghasilkan protein yang spesifik yaitu NA dengan berat molekul 53,5 kDa.

c. Elusi dan pengukuran kadar protein

Setelah diperoleh suspensi protein neuraminidase dari hasil elusi dilakukan pengukuran kadar protein dengan menggunakan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) 1 % setara dengan 3 mg/ ml rekaman standard spektrum 592 nm.

Setelah dielusi diukur kadar proteinnya

Rumus :

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein/ml} &= \frac{\text{Nilai OD sampel}}{\text{Nilai OD standard}} \times \text{konsentrasi standart BSA} \\ &= \frac{0,012}{1,187} \times 6,4 = 0,0647 \text{ gr / dl} \end{aligned}$$

d. Pengujian antigenisitas protein antigenik secara ELISA.

Protein antigenik diuji antigenisitasnya dengan antibodi poliklonal dengan teknik ELISA. ELISA dilakukan terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9. Coating protein antigenik sebanyak 10 ug dan antibodi poliklonal dengan pengenceran 1/100. Hasil dibaca dengan menggunakan ELISA reader dengan filter 415 nm adalah sebagai berikut :

Influenza Subtype H5N1 terhadap Antibodi Anti-H5N1, Anti-H5N2 dan Anti-H5N9.

Antibodi	Neuraminidase (NA)		Hasil
	Rata2	Cut Off	
Anti H5N1	0,417	0.184	+
Anti-H5N2	0,225	0,184	+
Anti-H5N9	0,206	0,184	+
Kontrol Negatif		0.092	

Dari hasil ELISA *Indirect* protein Neuraminidase (NA) dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 menunjukkan hasil positif dengan Cut Off 0,184 dan nilai rata-rata Anti - H5N1 = 0,417, anti - H5N2 = 0,225 dan Anti - H5N9 = 0,206, dengan kontrol negatif 0,092. Perhitungan Cut Off masing-masing reaksi dengan menggunakan rumus : $\text{Cut Off} = 2 \times \text{rata-rata OD serum negatif}$.

Tabel 5.6. hasil Uji Normalitas protein neuraminidase terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dengan Tingkat Notasinya .

Antibodi	Rata - rata
Anti H5N1	0.417 d
Anti H5N2	0,225 c
Anti H5N9	0.206 b
Kontrol	0,092 a

Pada uji normalitas didapatkan hasil Tingkat Notasinya dari urutan yang lemah ke yang kuat yaitu : a-b-c-d . Hasil analisis dengan menggunakan uji anova pada taraf 5 % menunjukkan bahwa perbedaan interaksi antara protein-protein dengan antibodi-antibodi tersebut sangat bermakna (p alfa $< 0,05$).

Dari *post hoc test* HSD diketahui bahwa protein Neuraminidase (NA) virus AI subtype H5N1 dengan berat molekul 53,5 kD bersifat paling antigenik dan berinteraksi paling kuat terhadap antibodi anti-H5N1 dibandingkan dengan anti-H5N2 dan anti- H5N9.

BAB 6**PEMBAHASAN**

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratoris yaitu mendeteksi adanya protein Neuraminidase (NA) virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti H5N1, anti H5N2, anti H5N9 dengan metode ELISA. Sampel dari penelitian ini adalah virus AI subtype H5N1 yang berasal dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

6.1. Reaktifitas Protein Neuraminidase Virus AI Subtype H5N1 Terhadap berbagai Antibodi subtype H5.

Uji Hemaglutinasi (HA) selain digunakan untuk mengetahui titer antigen, juga dapat digunakan retitrasi antigen yaitu untuk mengecek apakah antigen yang dikehendaki memiliki titer 4 HA unit. Pada uji HA menunjukkan titer antigen 4 HA unit dan ini penting digunakan sebagai antigen pada uji hambatan hemaglutinasi. Pada uji titer virus pada uji HA diukur berdasarkan pengenceran tertinggi yang masih dapat mengaglutinasi eritrosit. Titer virus pada uji HA selanjutnya dihitung menggunakan rumus Reed and Muench.

Pada penelitian selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan metode SDS-PAGE yaitu untuk mengetahui karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekulnya. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein merupakan molekul yang amphoteric mengandung dua grup karboksil

negatif dan grup amino positif. Hal tersebut menjadi ukuran dari sejumlah protein grup positif dan negatif, dan merupakan jalan yang tepat sekali untuk membedakan secara relatif jaringan protein yang tidak bermuatan listrik. Dalam PAGE protein dipisahkan seperti migrasi melalui tiga dimensi dengan elektrik. Maka matrik mempunyai dua fungsi yaitu memisahkan protein sesuai dengan ukuran, bentuk dan muatan listrik, dan hal ini memerlukan pH *buffer* yang sesuai. Poliacylamide adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul 500-250.000 Dalton. Dengan pembuatan atau pemilihan total konsentrasi yang tepat akan menentukan pula ukuran yang tepat terhadap ukuran protein yang diinginkan. Jadi semakin tinggi total persentasi akan menghalangi pergerakan protein ke dalam gel, begitu juga juga terlalu rendah total persentasi akan mengakibatkan pergerakan protein menjadi terlalu cepat bergerak melalui gel yang mengakibatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang diinginkan. (Rantam, 2003). Dalam penelitian ini diperoleh gambaran SDS-PAGE berupa beberapa band tebal yang dimiliki oleh protein AI subtype H5N1. Protein Neuraminidase mempunyai berat molekul 53,5 kDa berada dalam marker antara 50-60 kDa. Kondisi acrilamid, persentase acrilamid, pH Tris Hcl (8,8 atau 8,6), kekuatan *power supply* sangat mempengaruhi *running* protein pada proses elektroforesis.

Karakterisasi selanjutnya adalah *western blotting*. Pada umumnya protein yang tidak dimurnikan mengandung banyak protein yang berbeda dan tidak spesifik. Untuk itu dalam mengukur *single protein* diperlukan pengujian secara kimia. Meskipun dengan PAGE protein dapat dideteksi, tetapi bukan protein



yang spesifik, sehingga perlu dilakukan *western blotting* untuk mendapatkan protein dengan berat molekul yang diinginkan. Singkatnya pada *Westrn Blot* tahap pertama dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE dan selanjutnya ditransper ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan commasie blue. Hasil *westrn blotting* pada penelitian ini dengan menggunakan protein yang spesifik dengan antibodi poliklonal menunjukkan reaksi yang jelas. Ini menunjukkan terjadi reaksi antara antigen dan antibodi yang homolog. Reaksi yang demikian menunjukkan adanya respon yang baik reaksi antara antibodi dan antigen yang spesifik. Gambar 5.2 menyajikan identifikasi protein dengan *westren blot*. Pada *westren blot*, protein NA virus AI subtype H5N1 hanya dikenali oleh antibodi anti-H5N1 dan tidak dikenali oleh antibodi anti-H5N9 atau anti-H5N2. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan antigenisitas virus AI antara protein NA subtype H5. Perbedaan antigenisitas, antara lain ditentukan oleh struktur nukleotida suatu molekul protein, jumlah dan jenis epitop, serta afinitas antibodi.. Antibodi anti-N1 hanya mengenali protein N1, tetapi tidak mengenali protein N2 atau N9 (Basler *et al.*, 1999).

Dari hasil ELISA *Indirect* protein Neuraminidase (NA) dengan antibodi anti H5N1, anti H5N2 dan anti H5N9 ketiga-tiganya menunjukkan hasil positif. Pada uji ini sering digunakan untuk mengukur titer antigen dan antibodi dengan cara nilai absorbennya melalui Optical Density (OD). Berdasarkan hasil uji ELISA didapatkan hasil rata-rata anti H5N1 = 0.417, anti-H5N2 = 0.225, anti-H5N9 = 0.206, dan kontrol = 0.0926.

Hasil pengujian antigenisitas protein NA virus AI subtype H5N1 terhadap antibodi anti-H5N1, anti-H5N2 maupun-H5N9 dapat dilihat pada Tabel 5.5. Protein NA bereaksi secara spesifik dengan antibodi anti-H5N1 dan memberikan nilai OD tertinggi dibanding dengan anti-H5N2 dan anti-H5N9. Pada hasil *post hoc test* protein neuraminidase menunjukkan hasil notasinya hasil *post hoc test* protein neuraminidase terhadap antibodi anti H5N1 = 0,417 anti H5N2 = 0.225, anti H5N9 = 0.206.

Dari *post hoc test* HSD diketahui bahwa protein Neuraminidase (NA) virus AI subtype H5N1 dengan berat molekul 53,5 kl bersifat paling antigenik dan berinteraksi paling kuat dengan antibodi anti H5N1. Terdapat pengaruh yang nyata probabilitas antara $0,01 < p < 0,05$ antara N1 dengan N2, N2 dengan N9, N9 dengan K, N2 dengan N1, N2 dengan K. N9 dengan N1, N2 dengan K, K dengan N1 dan terdapat hasil yang tidak signifikan atau tidak pengaruh yang nyata antara perlakuan N1 dengan N9. Dimana hasil probabilitasnya $0.960 > \text{dari } p < 0.05$ N1 dengan N2. Berdasarkan uji statistik Anova pengaruh antara NA dengan H5N1 didapatkan hasil probabilitas $\alpha 0.000$ dimana hasilnya lebih kecil dari $p < 0.05$ artinya terdapat perbedaan atau pengaruh yang nyata antara pengujian NA dengan H5N1.

Hasil analisis dengan menggunakan uji anova pada taraf 5 % menunjukkan bahwa perbedaan interaksi antara protein-protein dengan antibodi-antibodi tersebut sangat bermakna ($p < \alpha$).

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan :

1. Protein neuraminidase virus avian influenza subtype H5N1 yang berasal dari isolat blitar memiliki berat molekul 53,5 kDa.
2. Reaktifitas protein NA virus AI subtype H5N1 tertinggi diperoleh terhadap antibodi anti-H5N1, diikuti anti-H5N2 dan anti-H5N9.

7.2. Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah :

Protein NA virus AI subrype H5N1 dapat disarankan untuk digunakan sebagai antigen kit diagnostik berdasarkan reaktifitas terhadap antibodi anti-H5N1, diikuti anti-H5N2 dan anti-H5N9.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, T., S.K. Lal, and A.V. Khan. 2006. In silico analysis of genes nucleoprotein, neuraminidase and haemagglutinin : A comparative study on different strains of influenza (A) (Bird Flu) virus subtype H5N1. In *Silico Biology* 6 (0015).
- APHIS news, 2004. Highly Patogenic Avian Influenza. [www. Aphis, usda. Gov/avianinfluenza4](http://www.Aphis.usda.Gov/avianinfluenza4) abstract APHIS news. htm.(20 Maret 2006). articles/000041/. [04 November 2005]
- Beard, C.W. 1998. Avian Influenza (Fowl Plague). Influenza. In *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 3d ed. H. G. Purchase et al., eds., Kennett Square, PA : American Association Avian Pathologists, pp. 110-113.
- Beard, C.W. 2003. Avian Influenza (Fowl Plague). Shoutheast Poultry Rescarch Laboratory, Athens, GA.
- Beck J.R., D.E. Swayne S. Davidson, S. Casavant, and C. Gutierrez. 2003. Validation off egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. *Avian Dis* 47 (3 Suppl) : 1196-1999.
- Burgess, Graham. W. 1995. Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. (1-67).
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan. 2005. Perkembangan Penyakit Avian Influenza (AI) dan Upaya Penanggulangannya di Indonesia 29 maret 2005. www.deptan.go.id/.(18 Juli 2005).
- Easterday, B. C. and Beard, 1984. Avian Influenza in : M.S. Hofstad, with H.J. Barner. B.W. Calnex, W.M. Reid H.W. Yoger, Jr. *Diasease of poltry* 8th ed. The Iowa University Press Ames. Iowa. 482-496.
- Ernawati, R., A. P Rahardjo, N. Sianita, F. A. Rantam, W Tjahyaningsih dan Suwarno. 2002. Petunjuk Praktikum Penyakit Viral. Laboratorium Virologi dan Imunologi. FKH Unair. Surabaya.
- FKH Unair, 2005. Surveilans dan epidemiologi virus influenza di Pulau Sulawesi. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- FKH Unair. 2006. Model Vaksinasi Virus Avian Influenza pada Ayam, Unggas Air dan Burung Merpati. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

- Fouchier, R.A., M. Vincent, A. Wllansten, T.M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B.Olsen, and albert D.ME. Osterhuas. 2005. Characterization of Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from black-headed Gulls. *Journal of Virology*. March 2005, Vol. 79, No.5, Pp. 2814-2822.
- Fouchier, R.A.M., V. Munster, A. Wallenstens, T.M. Bestebroer, S. Hersfst, D. Smith, G.F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A.D.M.E Osterhous. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained black-headed gulls, *J Virol* 79 (5) : 2814-2822.
- Gurtler, L. 2006. *Virology of Human Influenza*.
- Harimoto, T, and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev*. 14 : 129-149.
- Harimoto, T. and Kawaoka. 2001. Panedemick Threat Posed by Avian Influenza Viruses. *Clinical Microbiology. Rev*. Vol. 14, No 1, pp.129-149.
- Heinen, P.2003. Swine influenza:a zoonosis.<http://www.vetscite.org/publish/>
- Hoffmann, E., J.Stech, I. Levena, S.Krauss, C. Schotissek, P.S. Chin, M. Peiris, K.F. Shortridge, and R.G. Webster. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Sourthern China : Was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1 ? *J Virol* 74 (14) : 6309-6315. <http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm>. [20 Maret 2006].
- Khayam, O. 2004. H5N1 Avian Flu. Cyber Update <http://www.vadcorner.co./interner64.html>.
- Kobasa, D., K. Well, and Y. Kawaoka. 2001. Amino acid responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase : relationship to growth in the duck intestine. *J. Virol*. 75 : 11773-11780.
- Krafft, A.E., K.L. Russell, A.W. Hawksworth, S. McCall, M. Irvine, L.T. Daum, J.L. Taubenberger. 2005. evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J Clin Microbiol* 43 : 1768-1775.49-4354.
- Kresno, S. B. 2000. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. 3. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rahardjo, A. P. 2004. Avian Influenza : biologi virus, Diagnosa dan Evaluasi Sampel, Disampaikan Dalam Seminar Menyikapi Dampak Avian Influenza, tanggal 14 Pebruari 2004. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

- Raharjo, Y, 2004. Avian Influenza, Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. GITA, Jakarta. 29-84.
- Rantam, F.A. 2004. Kinetika Molekular Virus Avian Influenza dan Pengendalian di Masa Datang, disampaikan dalam seminar Menyikapi Dampak Avian Influenza, tanggal 14 Pebruari 2004. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Ratriastuti. 2004. Mengenal Lebih Dekat Avian Influenza. Poultry Indonesia Januari 2004. 43-45.
- Suwarno, E. Rahaju, A.P. Rahadjo, N. Sianita, J. Rahmahani, F A. Rantam. 2007. Petunjuk Praktikum *ELISA*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Suwarno, 2007. Karakterisasi Protein Neuraminidase Virus Avian Influenza Sebagai Antigen Diagnostik Untuk Penentu Subtipe H5N1. Laporan penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Tabbu, R. C. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangan Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral. Kanisius. Yogyakarta. 238-343.
- World Health Organisation International. 2004. Avian influenza - fact sheet. <http://www.who.int>.
- World Health Organisation International. 2006. Avian influenza. Avian Influenza News <http://www.who.int>.
- Zainuddin M, 2000. Metodologi penelitian. Surabaya, halaman 32-36, 79-81.

Lampiran 1 : Pembuatan reagen penelitian**1.1. Pembuatan separating gel (gel 12 %).**

Bahan :

- Acrylamid bis 30	2,5 ml.
- Tris HCL pH 8,8	1,2 ml
- SDS 0,5 %	1,2 ml
- Aquades	1,1 ml
- APS 10 %	30 ml
- Temed	5 ul

1.2. Pembuatan stacking gel (gel 12%)

Bahan :

- Acrylamid bis 30	0,33 ml.
- Tris HCL pH 8,8	0,4 ml
- SDS 0,5 %	0,4 ml
- Aquades	0,87 ml
- APS 10 %	10 ml
- Temed	4 ul

1.3. Laemmli buffer

Bahan :

- Tris HCL pH 6,8	0,6 ml.
- Gliserol 50 %	5 ml
- SDS 10 %	2 ml
- 2- mercaptoethanol	0,5 ml
- Aquades	10 ml
- Temed	0,9 ml

1.4. E- buffer 10x

Bahan :

- Tris Base	3,29 g
- Glisine	14,4 g.
- SDS	1 g
- Aquades	ad. ltr
- pH	8,3

1.5. E- Coomasie blue

Bahan :

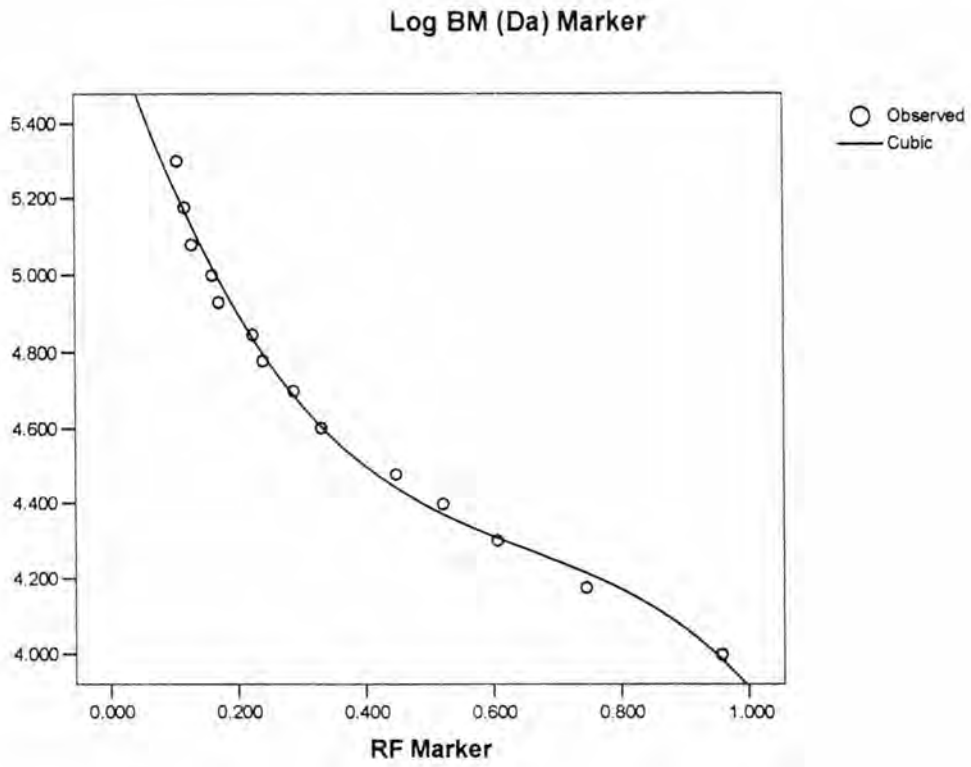
- Coomasie blue	0,25 g
- Metanol	40 ml.
- Asam asetat	10 ml
- Aquades	ad 100 ml

Lampiran 2. Tabel Penghitungan BeratMolekul Protein Hasil SDS-PAGE

A	B	Rf	BM	Log Bm
14	9.4	0.124	116.1	5.065
21	9.4	0.186	71.0	4.851
26	9.4	0.230	53.5	4.728
30	9.4	0.265	44.2	4.465
42	9.4	0.372	29.3	4.467
48	9.4	0.425	25.6	4.409
54	9.4	0.478	23.2	4.366
83	9.4	0.378	16.7	4.222
95	9.4	0.841	13.0	4.114

Rf	Log Bm
0.124	5.065
0.186	4.851
0.230	4.728
0.265	4.465
0.372	4.467
0.425	4.409
0.478	4.366
0.378	4.222
0.841	4.114

Lampiran 3 : Rf Marker Perhitungan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE



Lampiran 4 : Hasil Uji ELISA

Case Summaries^a

			NA OD
Antigen	N1	1	.4810
		2	.4175
		3	.4175
		4	.4175
		5	.3540
	Total	N	5
		Sum	2.0875
		Mean	.417500
		Std. Deviation	.0449013
	N2	1	.2940
		2	.2510
		3	.2570
		4	.1700
		5	.1570
	Total	N	5
		Sum	1.1290
	Mean	.225800	
	Std. Deviation	.0593860	
N9	1	.1025	
	2	.1400	
	3	.1695	
	4	.3025	
	5	.3190	
Total	N	5	
	Sum	1.0335	
	Mean	.206700	
	Std. Deviation	.0980807	
K	1	.0925	
	2	.0945	
	3	.1045	
	4	.0860	
	5	.0855	
Total	N	5	
	Sum	.4630	
	Mean	.092600	
	Std. Deviation	.0077330	
Total	N	20	
	Sum	4.7130	
	Mean	.235650	
	Std. Deviation	.1324325	

a. Limited to first 100 cases.

Lampiran 5 : Hasil Uji Normalitas**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		N1 NA	N2 NA	N9 NA	K NA
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^b	Mean	.41750	.22580	.20670	.09260
	Std. Deviation	.044901	.059386	.098081	.067733
Most Extreme Differences	Absolute	.300	.264	.248	.203
	Positive	.300	.226	.248	.203
	Negative	-.300	-.264	-.236	-.179
Kolmogorov-Smirnov Z		.671	.591	.554	.455
Asymp. Sig. (2-tailed)		.759	.876	.919	.986

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway**Descriptives**

NA OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
N1	5	.417500	.0449013	.0200805	.3540	.4810
N2	5	.225800	.0593860	.0265582	.1570	.2940
N9	5	.206700	.0980807	.0438630	.1025	.3190
K	5	.092600	.0077330	.0034583	.0855	.1045
Total	20	.235650	.1324325	.0296128	.0855	.4810

ANOVA

NA OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.272	3	.091	23.854	.000
Within Groups	.061	16	.004		
Total	.333	19			

Lampiran 6 : Hasil Pembacaan Optical Density terhadap Antibodi anti H5N1, Anti H5N2 dan Anti H5N9 dan Kontrol dengan 5 Kali Perlakuan.

Antigen	Perlakuan	NA OD	Jumlah	Rata-rata
Antigen N1	1	.4810	2.0875	0.4175
	2	.4175		
	3	.4175		
	4	.4175		
	5	.3540		
Antigen N2	1	.2940	1.1290	0.2258
	2	.2510		
	3	.2570		
	4	.1700		
	5	.1570		
Antigen N9	1	.1025	1.0335	0.2067
	2	.1400		
	3	.1695		
	4	.3025		
	5	.3190		
Kontrol	1	.0925	.4630	0.0926
	2	.0945		
	3	.1045		
	4	.0860		
	5	.0855		

Lampiran 7 : Hasil Uji Post Hoc Test**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: NA OD

Tukey HSD

(I) Antigen	(J) Antigen	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N1	N2	.1917000*	.0390160	.001	.080075	.303325
	N9	.2108000*	.0390160	.000	.099175	.322425
	K	.3249000*	.0390160	.000	.213275	.436525
N2	N1	-.1917000*	.0390160	.001	-.303325	-.080075
	N9	.0191000	.0390160	.960	-.092525	.130725
	K	.1332000*	.0390160	.017	.021575	.244825
N9	N1	-.2108000*	.0390160	.000	-.322425	-.099175
	N2	-.0191000	.0390160	.960	-.130725	.092525
	K	.1141000*	.0390160	.044	.002475	.225725
K	N1	-.3249000*	.0390160	.000	-.436525	-.213275
	N2	-.1332000*	.0390160	.017	-.244825	-.021575
	N9	-.1141000*	.0390160	.044	-.225725	-.002475

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

Homogeneous Subsets

NA OD

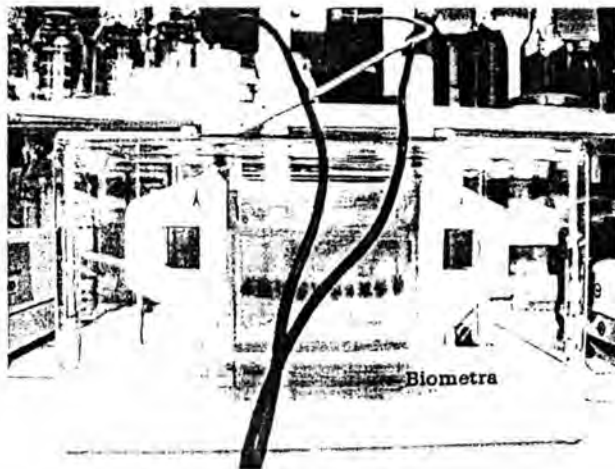
Tukey HSD^a

Antigen	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
K	5	.092600		
N9	5		.206700	
N2	5		.225800	
N1	5			.417500
Sig.		1.000	.960	1.000

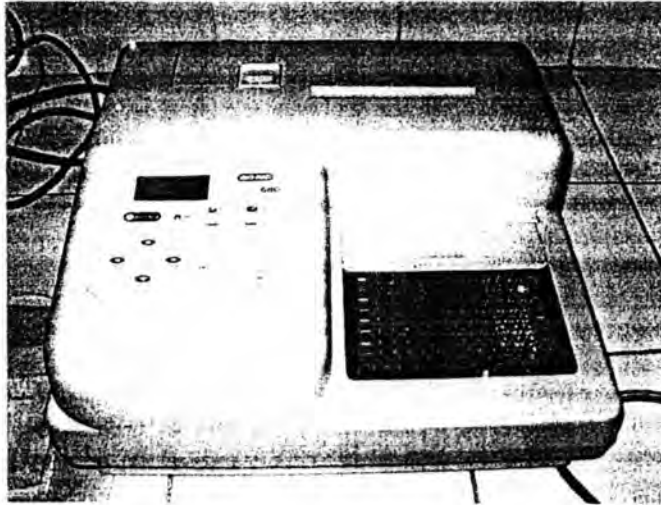
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 8 :Gambar Alat Elektroforesis



Lampiran 9 : Gambar Spektrofotometer Merk Biorad.



Lampiran 10 : Gambar Hasil Uji Elisa.

