

# DISERTASI

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI *PROTEIN IMUNOGENIK Egp 51* VIRUS EBL ISOLAT LOKAL SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUB UNIT

Penelitian Eksperimental Laboratoris



Mr  
Drs NIS 17  
Poi  
1

HASDIANAH HASAN ROHAN

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI *PROTEIN IMUNOGENIK Egp 51*  
VIRUS EBL ISOLAT LOKAL SEBAGAI KANDIDAT  
VAKSIN SUB UNIT**

**Penelitian Eksperimental Laboratoris**

**DISERTASI**

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada Hari : Kamis  
Tanggal : 27 Juli 2006  
Pukul 10.<sup>00</sup> WIB**

Oleh :

**HASDIANAH HASAN ROHAN  
NIM : 090114556 D**

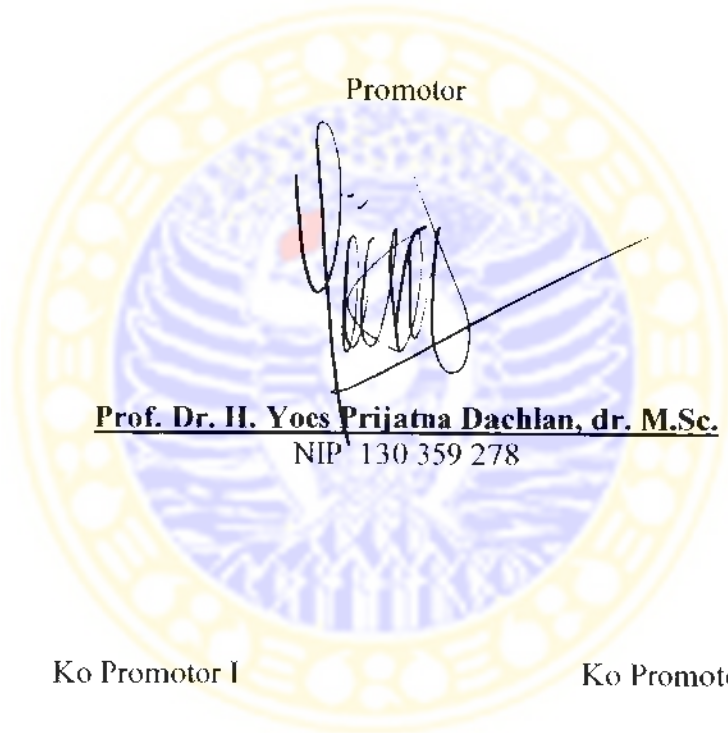
## LEMBARAN PERSETUJUAN

HASIL PENELITIAN DISERTASI YANG TELAH DIUJI

PADA TANGGAL, 6 JULI 2006

Oleh

Promotor



**Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr. M.Sc.**  
NIP. 130 359 278

Ko Promotor I

Ko Promotor II

A large, stylized handwritten signature in black ink.

**Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., MS.**  
NIP. 130 701 125

A large, stylized handwritten signature in black ink.

**Prof. Dr. H. Sumarno, dr. DMM. SpMK.**  
NIP. 130 309 130

**Disertasi ini Telah Diuji dan Dinilai  
Oleh Panitia Penguji Pada  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Pada Tanggal 6 Juli 2006**

**Panitia Penguji :**

- 1. Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc.**
- 2. Prof. Dr. H. Sarmanu, Drh., MS.**
- 3. Prof. Dr. Hj. Sri Subekti B.S., drh., DEA**
- 4. Prof. Dr. Hj. Indri Safitri Mukono, dr., MS.**
- 5. Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh, M.Sc.**
- 6. Prof. Dr. H. Subijanto Marto Sudarno, dr., SpAK. (Ketua)**
- 7. Prof. Dr. H. Sumarno, dr, DMM, SPMK.**
- 8. Dr. Noorhamdani, dr., SPMK.**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomor : 4022/JO3/PP/2006  
Tanggal : 5 Juni 2006**

*Demi masa  
Sesungguhnya manusia itu betul-betul dalam kerugian  
Kecuali orang-orang yang beriman, berbuat baik,  
dan saling menasehati dengan kebenaran  
dan kesabaran*

*(QS. Al-Ashr)*



*Kupersembahkan untuk :*

*Ayahanda dan Ibunda yang selalu berdoa untuk keberhasilanku.  
Suami, anak-anak dan cucuku yang semuanya adalah  
orang-orang yang sangat aku cintai, yang telah  
banyak berkorban selama aku dalam  
pendidikan dan sebagai tempat  
curahan kasihku*

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, inayah, serta anugrah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian disertasi dan seluruh kegiatan akademis. Semoga hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulisan Disertasi dengan judul "ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK Egp 51 VIRUS EBL ISOLAT LOKAL SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN SUB UNIT" telah selesai disusun.

Pada kesempatan yang baik ini saya mengucapkan terima kasih kepada yang terhormat :

Prof. Dr. H Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., selaku Promotor yang telah dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, memotivasi, membantu, memperluas wawasan keilmuan, serta memberikan saran dan memberi dukungan moral secara terus menerus, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof Dr H Sarmanu, MS., selaku Ko Promotor I yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing, memperluas wawasan keilmuan khususnya dalam bidang analisis penelitian (Logika and sains), memotivasi serta menolong saya dalam banyak hal, terutama dalam analisis penelitian, sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan.

Prof. Dr. H. Sumarno, dr., DMM., SPMK., selaku Ko Promotor II dan selaku Kepala Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang yang telah banyak

memberikan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dan memberikan pengarahan, memperluas wawasan keilmuan, memberikan artikel, mengoreksi, memotivasi serta memberikan dukungan moril, yang diberikan selama saya mengikuti Program Doktor ini, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan; dan kepada Wibi Riawan, S.Si yang telah membantu dalam pembuatan preparat imunositokimia penelitian.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr. SpB. TKV, atas kesempatan yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr. Sp.P (K) dan mantan direktur Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono Tirtowidardjo dr. Sp.THT yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Mandojo Rukmo drg. MSc. SpKG dan Prof. Dr. Julianti Hood Alsagaff dr. MS. SpPA. FIAC. Mantan ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas segala perhatian, dukungan dalam membantu memperlancar proses akademik selama mengikuti Pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. H. Poernomo Suryohudoyo, dr., MS., Ph.D., selaku Konsultan yang telah memberikan bimbingan dan saran untuk kelangsungan penyusunan bahan penyusunan Disertasi.

Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D., selaku Konsultan yang telah dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, memotivasi, memberi banyak masukan pemikiran, penyusunan kerangka ilmiah dalam penyusunan disertasi serta memberikan kepustakaan, memperluas wawasan keilmuan.

Dr Fedik A. Rantam, selaku Konsultan yang telah memberikan bimbingan dan saran untuk kelangsungan penyusunan bahan Disertasi;

Kepada Mantan Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Alm) Prof. Dr. Amitaba, Drh. yang telah membimbing dalam pembuatan *cell line OL*. Saya menyampaikan rasa terimakasih yang terhingga pula, semoga arwah beliau mendapatkan tempat yang layak disisi Allah SWT, amin.

Kepada yang terhormat Menteri Pertanian, Dirjen Peternakan, dan Kepala Pusat Veterinaria Farma, serta Kepala Bidang Pengembangan Mutu Peningkatan Produksi Pusat Veterinaria Farma yang telah memberikan izin pada saya untuk menjalani pendidikan Doktorat (S-3) pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga;

Dr. Enoh Rahardjo dari BBPMSOH Gunung Sindur Bogor, saya sampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga pula atas pemberian *seed* virus EBL.

Semua staff sekretariat Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan Semoga amal baik Beliau mendapat balasan yang setimpal dari Allah SWT, Amin.

Terima kasih dan hormat serta cinta yang tak terukur saya sampaikan kepada kedua orang tua saya, ayahanda A. Hasan MHD dan ibunda Ny. Aminah dengan penuh kasih sayang, dan selalu memberikan cinta kasih dan tanggung jawab dalam mendidik saya, serta senantiasa memberi semangat, dorongan dan do'a.



Kepada suami saya tercinta Masruchan (Rohan) yang dengan penuh kecintaan dan kasih sayang selalu menyokong dan memberi dorongan untuk maju, walaupun banyak halangan dan rintangan yang kita terima, tetapi do'a kita yang selalu dan rahmat Allah yang Maha Esa membuat saya bisa menyelesaikan pendidikan ini.

Anak – anak saya tercinta Jannah Shanty Rohana, Irine Rakhmanty Rohana, dan Dian Alief Rachmandani, serta menantu saya Susilo Prabowo, dan cucu tercinta Muhammad Kahfi Jaya Pranata yang selalu dengan cinta kasih dan dorongan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan ini, semoga ini baru langkah awal yang semoga dapat kalian lanjutkan kelak.

Kepada adik – adik saya, Hermalian Hendra, Hernarita, Heva Nurnadia, Herlina Andana Putri, dan Hasiana Carla; yang selalu bergandengan tangan dalam keadaan suka maupun duka, serta memberi dorongan, semangat yang tiada hentinya kepada saya dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada semua pihak, handai taulan dan para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan dorongan selama saya menempuh pendidikan Doktor ini. Untuk itu saya ucapkan terima kasih.

Semoga Allah SWT selalu memberi petunjuk, rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua di dalam menjalani kehidupan ini. Amin Ya Rabbal Alamin.

## RINGKASAN

### Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik *Egp 51* Virus EBL Isolat Lokal Sebagai Kandidat Vaksin Sub Unit

#### Penelitian Eksperimental Laboratoris

Hasdianah Hasan Rohan

Penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) disebut pula *Lymphocytomatosis*, *Lymphosarcoma* atau Leukemia Sapi. Penyakit EBL disebabkan oleh *Retrovirus Exogenoses*. Secara structural dan fungsional menyerupai *Human T-Lymphotropic Virus-1 (HTLV-1)* dan *Human T-Lymphotropic Virus-2 (HTLV-2)*. Virus EBL menyerang sistem *Reticulo Endothelial System (RES)*; sasaran utama virus EBL adalah limfosit B yang menyebabkan adanya proliferasi dan differensiasi abnormal sel-sel limfosit secara cepat yang mengakibatkan timbulnya benjolan-benjolan pada seluruh *limphoglandulae* dan alat-alat *viscera* seperti jantung yang mengakibatkan pembesaran jantung, pembesaran lambung, pada hepar menimbulkan hepatomegali, dan bila bagian tersebut diiris akan mengeluarkan nanah (pus) yang berwarna putih kekuningan, dan mengeras; yang merupakan masa tumor onkogenik dan menyebabkan aroma (bau) yang tidak sedap pada daging sapi. Pada sapi betina yang bunting dapat menyebabkan kematian janin dan pada sapi jantan menyebabkan timbulnya infertilitas (OIE 2003, Nakajima, *et.al*, 2000). Virus EBL bersifat persisten, dimana sekali saja virus EBL menginfeksi hewan ternak sapi, maka seumur hidup virus EBL akan tumbuh dan berkembang di tubuh sapi tersebut, dan akhirnya sapi mati karena penyakit EBL.

Penyakit EBL berjalan sub klinis dan menimbulkan kematian secara mendadak, angka kematian tinggi mencapai 90% - 100% dan menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi pula (Ressang, 1986, Ditkeswan, 1996).

Penyakit EBL adalah termasuk golongan penyakit Daftar A dan bersifat endemik, yaitu penyakit menular yang mempunyai potensi penyebaran yang sangat serius dan cepat, melewati batas negara yang menyebabkan konsekuensi yang serius terhadap sosio ekonomi atau kesehatan masyarakat dan kepentingan umum pada perdagangan hewan secara internasional (Dinas Peternakan Jatim, 2004; OIE, 2003).

Virus EBL merupakan *retro virus* onkogenik eksogenus yang *berenvelop*, dibawah elektron mikroskop berupa partikel tipe-C, mempunyai *buoyant density* 1,18g/ml. Virus EBL terdiri dari *RNA* 60S-70S yang berantai tunggal (*Single stranded*) serta memiliki enzim *reverse transcriptase*

Virus EBL menginfeksi hewan ternak melalui gigitan vektor lalat *Tabanus<sub>sp</sub>* dan *Hippobosca meliensis* masuk ke dalam kulit, sub epidermis dan aliran darah tepi

menuju limfosit B dan akhirnya menuju *limphoglandulae* yang berada di seluruh tubuh.

Penanganan selama ini hanya dengan diagnosis melalui uji *screening* menggunakan antigen KIT *Agar Gel Immunodifusi* produk Canada, Australia dan Perancis, yang harganya cukup mahal. Penelitian pembuatan antigen KIT test penyakit EBL isolat Indonesia telah berhasil dibuat, yang hasilnya sama dengan KIT test produk Canada (Hasdianah, 2000). Selama ini untuk pengujian terhadap penyakit EBL telah dikerjakan oleh BPPH di seluruh wilayah Indonesia, dan cara penanganan yang lain adalah dengan mengadakan karantina ketat. Diagnosis yang sering digunakan sesuai dengan pertemuan ahli EBL di Copenhagen, Denmark 1997, adalah menggunakan *Agar Gel Immunodifusi* melalui uji *Ouchterlony*; dihasilkan garis presipitasi yang berwarna putih sebagai hasil ikatan antigen, antibodi spesifik di dalam agar *ouchterlony*. Hasil positif garis putih diduga adanya infeksi virus EBL (Nossal, 1998; Ishino, *et.al*, 2000 ; Nakajima, *et.al*, 2000; OIE, 2003).

Antigen KIT Produk *import*, disamping harganya cukup mahal juga memerlukan waktu cukup lama untuk sampai di tempat tujuan, apalagi bila tempat tujuan di daerah terpencil, terkadang sapi sudah mati, antigen KIT belum juga tiba.

Kejadian endemik dapat pula terjadi mengingat kurangnya kesadaran dari para peternak untuk melaporkan adanya kematian sapi secara mewabah pada instansi-instansi yang terkait; adanya transmisi dapat terjadi fausta negatif, sangat berbahaya disebabkan tidak diketahui bila sapi tersebut telah positif EBL, akhirnya dapat menyebabkan penularan tinggi dan peletupan wabah serta penyakit ini bersifat endemik disamping itu keterbatasan dana untuk mendeteksi keberadaan penyakit EBL secara menyeluruh di seluruh daerah yang diduga dapat terjangkitnya penyakit EBL. Bertitik tolak dari uraian diatas, maka mendorong peneliti untuk dapat meneliti pembuatan kandidat vaksin sub unit protein imunogenik *Egp 51* virus EBL isolat lokal (lapangan).

Pembuatan protein imunogenik *Egp 51* virus EBL isolat lokal sebagai kandidat vaksin dimulai dengan persiapan media penumbuh virus EBL, yaitu *Cell Line Ovine Lung (OL)* yang dibuat dari paru-paru domba muda berumur 4 minggu yang didapat dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Pada biakan *Cell OL* diinokulasikan virus EBL pasasi lanjut (pasase 16) yang berasal dari virus EBL isolat lapangan dari daerah Lembang, Jawa Barat, yang telah dikembangkan sebelumnya, pada pasase 15 dari BPMSOH Gunung Sindur, Bogor.

Virus EBL diadaptasikan sampai pasase 29, sambil dititrasi untuk mendapatkan virus yang sudah adaptasi dalam biakan *Cell OL* serta mempunyai titer yang tinggi yaitu  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub> sebagai kandidat vaksin sub unit *protein Egp 51*. Uji *Postulat Koch* untuk menentukan apakah virus EBL mempunyai sifat yang berbeda dengan virus alami setelah dilakukan pasase sampai 29 kali pada *Cell OL*. Untuk pembuktian adanya virus EBL dilakukan Uji *Postulat Koch* klasik yang terdiri pembuatan *cell line OL*, Uji Patologi Anatomi, dan identifikasi *cytopathogenic effect* (CPE). Pembuatan antigen KIT diagnosis penyakit EBL telah pula membuktikan keberadaan virus EBL, terbukti dari hasil uji serum lapangan terdapat garis presipitasi pada agar *ouchterlony* pada serum sapi yang diduga positif terinfeksi penyakit EBL yang dibandingkan dengan menggunakan antigen KIT diagnosis penyakit EBL

produksi Kanada sebagai kontrol; hasilnya kurang lebih sama (Thesis, Hasdianah, 2000).

Uji *Postulat Koch* Molekuler yang terdiri dari Uji AGID dan Uji *Western blott*. Hasil pasasi virus EBL dengan titer tinggi  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub> kemudian diadakan sonikasi dengan alat sonikator untuk mendapatkan bagian *envelope (E)* virus EBL yang mengandung protein *Egp 51*. Karakterisasi dengan SDS-PAGE, didapatkan beberapa macam protein EBL yang terdiri dari protein 15 kDa, 24 kDa, 30 kDa dan *envelope glycoprotein gp 51* kDa. Untuk mendapatkan *protein Egp 51*, langkah berikutnya diadakan elektro elusi, kemudian dilanjutkan dengan Uji Hemaglutinasi untuk membuktikan apakah protein E gp 51 mempunyai daya aglutinasi terhadap darah merah sapi yang merupakan protein hemaglutinin; yang dilanjutkan dengan Uji hambatan hemaglutinasi. Untuk membuktikan protein E gp 51 bersifat imunogenik dan protektif dilakukan Uji Respon Imun melalui Uji Serum Netralisasi, Uji *Western blott* dilanjutkan dengan Uji Imunositokimia; dan untuk mengetahui daya protektifitas dari protein *Egp 51* dilakukan Uji *In Vitro* dan Uji *In Vivo* menggunakan hewan coba kelinci dari Batu Malang. Uji *Postulat Koch* molekuler dengan Uji *immunoblotting* melalui *Western blott* dihasilkan satu *band* murni *protein Egp 51*. Pembuatan antibodi poliklonal, dengan menyuntikkan virus EBL pada hewan percobaan kelinci yang ditambah dengan *Freund Adjuvant Incomplete (FAI)* dan *Freund Adjuvant Complete (FAC)*, dihasilkan antibodi poliklonal yang digunakan untuk pengujian *Immunoresponse* secara *invitro* yang terdiri dari uji *Haemaglutinasi*, uji hambatan *hemaglutinasi*, uji *imunositokimia* serta uji *Agar Gel Imunodiffusi*. Langkah berikutnya untuk mengetahui daya imunogenik dan protektif, diadakan uji *in vivo* dengan menggunakan hewan kelinci sebanyak 50 ekor (jenis kelamin jantan) dan berat badan rata – rata 4 kg. Pengujian *invivo* terdiri dari kelompok I sebagai kelompok kontrol, yang tidak diberi *protein Egp 51* tapi *dichallenge* dengan virus ganas titer  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub>, kelompok Iia, Iib adalah kelompok yang diberi kandidat vaksin *protein Egp 51* dan dibooster masing-masing; satu kali, untuk kelompok Iia (P2) dan dibooster 2 kali untuk kelompok Iib (P3), masing-masing pada minggu kedua, sedangkan kelompok Iic adalah kelompok yang *dichallenge* pada minggu ketiga dengan virus ganas titer  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub>. Dari hasil tersebut terlihat bahwa pada kelompok yang tidak diberi kandidat vaksin sub unit *protein Egp 51* hewan coba mati semua, dan setelah diseksi terlihat benjolan-benjolan di seluruh *limphoglandulae*, alat *viscera* yaitu pembesaran lambung, jantung dan terdapat hepatomegali. Bila bagian benjolan tersebut diiris akan keluar nanah (*pus*) yang merupakan massa tumor EBL onkogenik; dan pada kelompok Iia, Iib, dan Iic, hewan coba semuanya hidup.

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa virus EBL isolat lokal mengandung *sub unit protein Egp 51* yang merupakan protein hemaglutinin dan protein hemaglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal bersifat imunogenik dan protektif.

## Summary

### Isolation And Characterization Of Immunogenic Protein *Egp 51* Of Local Isolate EBL Virus As Sub Unit Vaccine Candidate

#### Experimental Laboratories Research

Hasdianah Hasan Rohan

*Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) disease is *Lymphocytomatosis Lymphosarcoma* or Cow Leukemia. EBL disease is because of *Retrovirus Exogenoses*. Structurally and functionally, it looking likes *Human T-Lymphotropic Virus-1 (HTLV-1)* and *Human T-Lymphotropic Virus-2 (HTLV-2)*. EBL virus attacks *Reticulo Endothelial System (RES)*; the main target of EBL virus is lymphocyte B which quickly result in proliferation and abnormal differentiate of lymphocyte cells which result in incidence of bumps on all *limphoglandulae* and viscera tools such as heart which result in heart swelling, stomach swelling, on hepar result in hepatomegall, and if the pieces is sliced will release white, yellowish, and ossifying pus; it constitutes mass of oncogenic tumor and result in indelicate aroma on beef. On female pregnant ox, it can cause the death of foetus and on male ox can cause infertility (OIE 2003, Nakajima, et al, 2000). EBL virus has persistent characteristic, where once EBL virus infect ox, they will grow and develop in body of the ox and finally the ox will death because of EBL disease.

EBL disease is sub clinic disease and can cause death soon. The death rate is high up to 90-100% and cause high economic loss too (Reesang, 1986; Ditkeswan, 1996).

EBL disease can be classified as disease of *List A* and has characteristic of endemic, that is, contagion which has spreading potential serious and fast getting through country boundaries and cause serious consequences to socioeconomic or public health and general importance on international commerce of livestock animal (Dinas Peternakan Jatim, 2004; OIE, 2003).

EBL virus is *enveloped retro virus*, on electronic microscope it is type-C particle and has *buoyant density* 1.18 gr/ml. EBL virus consists of RNA 60S-70S with single stranded and has *reverse transcriptase enzyme*.

EBL virus infects livestock animal through bite of vector fly *Tabanus* and *Hypobosca Milensis* enters into skin, sub epidermis and edge blood stream to lymphocyte B and finally to *limphoglandulae* in all bodies.

During the time, the treatment is only with diagnosis through *screening test* by using antigen KIT *Agar Gel Immunodifusi* product of Canada, Australia, and French with high price. Research to product antigen KIT test of isolate EBL disease in Indonesia has been success with the result of product is same with KIT Test Product of Canada (Thesis, Hasdianah, 2000). During the time, test on EBL disease has been conducted by BPPV in all Indonesian territory and other treatment is by using tight quarantine. The most used diagnosis as according to EBL expert meeting in Copenhage Germany 1997 is by using *Agar Gel Immunodifusi* through *Ouchterlony*

*test*. The test results in white precipitation lines as result of antigen band, specific antibody in *outchertlony agar*. The positive result of white lines prejudices the existence of EBL virus (Nossal, 1998; Ishino, et al, 2000; Nakajima, et al, 2000; OIE, 2003).

Antigen KIT from import product, beside the price is high and needs long time period to arrive in target places, moreover if the place is far from anywhere, sometimes the ox has been death before antigen KIT hasn't been arrived yet.

Endemic event can happens because of low awareness of farmers to report the epidemic of death ox to related institutes; the existence of transmission can cause negative fausta, it is very dangerous because whether the ox has been positive EBL is never known, finally it can cause high infection and epidemic explosion because this disease has characteristic of endemic beside that limited fund to detect the existence of EBL disease thoroughly in all suspected territory. Based on the description above, we have been motivated to research the production of sub unit vaccine candidate of *protein Egp 51* local isolate EBL virus.

The production of *protein Egp 51* local isolate EBL virus as candidate of the vaccine starts from preparation grower medium of EBL virus, that is, *Cell Line Ovine Lung (OL)* obtained from lung of young sheep with the age of 4 weeks which we obtain from RPH Pegirian Surabaya. On the grower medium, *Cell OL* is inoculated with EBL virus from next pasase (pasase 16) which comes from local isolate EBL virus in Lembang, West Java, which previously have been developed on pasase 15 from BPMSOH Gunung Sindur, Bogor.

EBL virus is adapted up to pasase 29 while titrated to get virus which have adapted in grower medium of Cell OL and has high titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> as candidate of *protein Egp 51* sub unit vaccine. Koch postulate test is conducted to determine whether EBL virus has different feature with natural virus after conducting pasase up to 29 times on Cell OL. To prove that EBL virus is exist AGID and invitro tests is conducted on grower medium of Cell OL to result in *cytophatogenic effect (CPE)*.

The other test how to know about the EBL virus, I finished research KIT diagnostic antigen of EBL local isolated similar with KIT diagnostic antigen of EBL a Canada produced.

Result of pasase EBL virus with high titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> sonication is conducted with sonicator to get *envelope (E)* of EBL virus which has *protein Egp 51*. Characterization with *SDS-PAGE*, we get several kind of EBL protein such as P15 kDa, 24 kDa, 30 kDa, and *envelope glycoprotein gp51* kDa. To get *protein Egp 51*, the next step is elution then continued with *immunoblotting* through *Western Blott*. This will result in one *band* pure of *protein Egp 51*. Production of polyclonal antibody by injecting EBL virus to rabbit plus *Freund Adjuvant Incomplete (FAI)* and *Freund Adjuvant Complete (FAC)* result in polyclonal antibody which used to *immunosrespon* invitro test consists of *Haemaglutinasion* test, obstacle test of *haemaglutination*, *immunocytokimia* test, and *Agar Gel Immunodifusi* test. The next step to know immunogenic power and protective, invivo test is conducted by using male rabbit as much as 50 and weight of 4 kg. Invivo test consists of group I as control group which isn't given *protein Egp 51* but is challenged with savage virus with titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>; group IIa, IIb is group which is given vaccine candidate of *protein Egp 51* and is boosted one time for group IIa (P2) and two times for group

IIb (P3), each on second week, while group IIc is group which is challenged on third week with savage virus with titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>. Group II is group which isn't vaccinated and isn't challenged. From the result, we can see that on the group which is not given sub unit vaccine candidate of *protein Egp 51* the rabbits are death and arise bumps in all *lymphoglandulae*, viscera tool, stomach swelling, hearth swelling and *hepatomegali* is exist. If the bumps is sliced then it release pus which constitutes of mass of oncogenic EBL tumor on group IIa, IIb, and IIc, all rabbits are alive. After conducting examination of blood, we can see the increasing of lymphocyte on group which isn't given *protein Egp 51* and *isn't challenged*.

From this research, we can conclude that *protein haemagglutinin Egp 51* is local isolate EBL virus and has characteristic of *immunogenic* and *protective* which can be used as sub unit vaccine candidate.



## ABSTRACT

### Isolation And Characterization Of Immunogenic Protein *Egp 51* Of Local Isolate EBL Virus As Sub Unit Vaccine Candidate

#### Experimental Laboratories Research

Hasdianah Hasan Rohan

It has been found that *protein Egp 51* virus *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) local (field) isolate is suitable for a candidate of protein sub-unit vaccine. *Protein Egp 51* is obtained from several research series, starts from research of making grower medium of virus EBL, made from foetus's lung of sheep with age of 4 week, obtained from Animal Slaughtering House of Pegirian, Surabaya. From this grower medium, we result in *cell line* cell after being grown to pasase 58 in *maintenance cell* medium which contains *fetal calf serum* (FSC) 5%. *Cell line* of foetus's lung of young sheep or *ovine lung* (OL) is cultivated with EBL virus which comes from field (local), obtained from BPM SOH Gunung Sindur Bogor. The EBL virus is developed and adapted until pasase 29 then ditritated and calculated with Karber method, and finally result in titer virus  $10^{7.8}$  TCID on pasase 29. To make sure the existence of EBL virus AGID test is conducted and the existence of *cytopahtogenic effect* on the result of inoculation in OL culture breeder.

Virus with high titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> is purified by *sucrose gradient* with gradual concentration from 20%, 40%, 50%, 60% and 80%. After that virus suspension is poured as much as 4 ml and then centrifuged with velocity 35,000 rpm (Ultra Centrifuge L8-60 M, Beckmann) on the temperature of 4<sup>0</sup> C as long as 2 hours, with opposite light we can see white ring which constitute of EBL virus particle comes from purification as much as 1.22 gr/cm<sup>3</sup>/4 ml.

*Envelope* (E) of EBL virus is obtained from purification of EBL virus, and then sonication is conducted with sonicator. After that characterization is conducted through *SDS-PAGE Electrophoresis*. In this way, several protein such as 15 kDa, 24 kDa, 51 kDa, 75 kDa, 93 kDa, and 102 kDa is found. The next step is to conduct elution, cutting in order to result in *SDS-PAGE* on 51 kDa, then characterized with *immunoblotting* by using *Western Blott*, found one *band protein Egp 51*. It means that *protein Egp 51* has been purified. The next step is to conduct *invitro* test by using poliklonal antibody which resulted from injection of EBL virus plus *Freund Adjuvant Incomplete (FAI)* and *Freund Adjuvant Complete (FAC)* on rabbit. The *Invitro* test we conduct is consist of hemagglutination test, obstacle test of hemagglutination, immuno histochemical test, neutralization serum test. After that, we conduct *invitro* test on rabbit groups which classified into group I or control group: rabbit is challenged with savage virus titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> without giving *protein Egp 51*; group IIa and group IIb is group with *protein Egp 51* then booster one time (P2) for group IIa and booster two times (P3) for group IIb, while group C is given *protein Egp 51* on third week and challenged on savage virus  $10^{7.8}$ .



From the result of research we found that *protein haemagglutinin Egp51* of local isolate EBL virus has characteristic of immunogenic and protective which can be used as candidate of protein sub unit vaccine on EBL disease.

**Keywords:** *Cell Line OL, local isolate EBL virus, characterization of protein Egp 51 kDa, Purification, Sonication, Immunoblotting, Western Blott, Challenge, Immunogenic, Protective.*



## DAFTAR SINGKATAN

ab	Antibodi
ADCC	<i>Antibody Dependent Cell Cytotoxicity</i>
ag	Antigen
AGID	Agar gel Immunodiffusion
BaCl <sub>2</sub>	Barium Chloride
BCDF	B Cell Differentiation Factor
BCGF	B Cell Growth Factor
BBPMSOH	Balai Besar Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan
BPPV	Balai Penyidik Penyakit Veteriner
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Celcius
CPE	Cyto Pathogenic Effect
DAB	Diamino Benzidin
DNA	Deoxy Nucleic Acid
EBL	Enzootic Bovine Leucosis
E	envelope
<i>et. all</i>	Et alili (dan kawan-kawan)
FAC	Freund Adjuvant Complete
FAI	Freund Adjuvant Incomplete
gp	Glycoproteine
HA	Haemaglutination
HI	Haemaglutination Inhibition
HLA	Human Leucocyte Antigen
HTLV	Human -T- Lymphotropic Viruses

<b>IL</b>	<b>Inter Leukine</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilo Dalton</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysa</b>
<b>MHC</b>	<b>Major Histocompatibility Complex</b>
<b>OL</b>	<b>Ovine Lung</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphat Buffer Saline</b>
<b>PEG</b>	<b>Poly Etylen Glicol</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribose Nucleic Acid</b>
<b>SA-HRP</b>	<b>Strep-Avidin horse radis peroxidase</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</b>
<b>SN</b>	<b>Serum Neutralization</b>

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>SAMPUL DALAM</b> .....	i
<b>PERSYARATAN GELAR</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	iii
<b>PENETAPAN PANITIA</b> .....	iv
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xviii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xx
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xxvii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xxviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xxx
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	8
1.3 Tujuan Penelitian .....	9
1.3.1 Tujuan Umum .....	9
1.3.2 Tujuan Khusus .....	9
1.4 Manfaat Penelitian .....	9
1.4.1 Manfaat secara ilmiah .....	9
1.4.2 Manfaat secara praktis .....	10

<b>BAB 2</b>	<b>TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	11
2.1	Sejarah perkembangan imunologi .....	11
2.2	Penyakit EBL .....	12
2.2.1	Sejarah penyakit EBL .....	12
2.2.2	Epidemiologi Penyakit .....	16
2.2.3	Etiologi .....	17
2.2.4	Identifikasi Antigen .....	18
2.2.5	Isolasi Virus .....	19
2.2.6	Patogenesis Virus .....	20
2.2.7	Hewan Coba .....	22
2.2.8	Elektroforesis .....	22
2.2.9	Imunoblotting .....	24
2.2.10	Protein .....	25
2.2.11	Struktur protein .....	26
	2.2.11.1 Karakteristik protein .....	26
	2.2.11.2 Reaksi dan sifat umum protein .....	27
	2.2.11.3 Ikatan kimia yang berperan dalam molekul protein .....	28
	2.2.11.4 Urutan asam amino menentukan konformasi molekul protein .....	29
	2.2.11.5 Transfer protein .....	30
2.3	Penggunaan Virus EBL Isolat Lokal .....	31
2.4	Penggunaan <i>Envelope gp51</i> Virus EBL Sebagai Vaksin .....	31
2.5	Karakter Molekul Adesi .....	33

2.6	Imunogen dan Antigen .....	35
2.7	Epitop, Spesifisitas dan Sensitivitas .....	36
2.8	Respon imun .....	38
2.9	Antibodi .....	39
2.10	Respon imun humoral .....	41
2.11	Dasar-dasar imunokimia .....	44
2.12	Protoonkogen dan Onkogen .....	46
2.13	Darah .....	48
2.14	Pemeriksaan limposit .....	48
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	<b>51</b>
3.1	Kerangka Konseptual .....	51
3.2	Hipotesis Penelitian .....	55
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>56</b>
4.1	Rancangan Penelitian .....	56
4.2	Cara Kerja .....	56
4.2.1	Penelitian Tahap I .....	56
4.2.1.1	Pembuatan <i>Cell Line Ovine Lung</i> (OL) .....	56
4.2.1.2	Inokulasi dan Pengembangan Virus Dalam <i>Cell OL</i> dan Titrasi Virus .....	57
4.2.1.2.1	Inokulasi Virus dan Pengembangan Virus Dalam <i>Cell OL</i> .....	57
4.2.1.2.2	Titrasi Virus .....	58
4.2.1.3	Pembuktian adanya virus EBL .....	58
4.2.1.3.1	Adanya <i>Cytophatogenic effect</i> (CPE) .....	58

4.2.1.3.2 Uji <i>Postulat Koch</i> .....	58
4.2.1.3.3 Uji agar gel imunodifusi .....	59
4.2.1.3.4 Uji <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dengan menggunakan amplifikasi bagian gen <i>Egp 51</i> virus EBL .....	60
4.2.2 Penelitian Tahap II .....	62
4.2.2.1 Pemurnian virus .....	62
4.2.2.2 Pemurnian protein <i>envelope</i> virus EBL .....	62
4.2.2.3 Pengukuran Berat Molekul Protein <i>envelope</i> Virus EBL dengan <i>SDS-PAGE</i> ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate- Polo Acrylamide Gel Electrophoresis</i> ) .....	65
4.2.2.4 Uji hemaglutinasi dari protein virus EBL .....	66
4.2.3 Penelitian Tahap III .....	68
4.2.3.1 Uji <i>In Vitro</i> .....	69
4.2.3.1.1 Pembuatan antibodi poliklonal molekul hemaglutinin .....	69
4.2.3.1.2 Uji hambatan hemaglutinasi ( <i>HI Test</i> ) ....	69
4.2.3.1.3 Uji Imunositokimia .....	71
4.2.3.1.4 Uji <i>Immunoblotting</i> .....	71
4.2.3.1.5 Uji Serum Netralisasi .....	73
4.2.3.2 Uji <i>In Vivo</i> .....	75
4.2.3.2.1 Populasi, sampel dan besar sampel .....	75
4.2.3.2.1.1 Populasi .....	75

4.2.3.2.1.2 Sampel .....	75
4.2.3.2.1.2.1 Unit Sampel .....	75
4.2.3.2.1.2.2 Besar Sampel .....	76
4.2.3.2.1.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel .....	77
4.3 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional .....	77
4.3.1 Identifikasi .....	77
4.3.2 Definisi Operasional .....	77
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	78
4.4.1 Lokasi .....	78
4.4.2 Waktu Penelitian .....	78
4.5 Bahan Penelitian .....	79
4.5.1 Virus .....	79
4.5.2 Sel (Biakan jaringan) .....	79
4.5.3 Media .....	79
4.5.4 Hewan percobaan .....	81
4.5.5 Bahan untuk poliklonal antibodi .....	81
4.5.6 Bahan untuk karakterisasi protein .....	81
4.5.7 Bahan untuk imunositokimia .....	81
4.5.8 Bahan uji imunogenisitas (adjuvant dan lain sebagainya) .....	82
4.6 Alat – alat penelitian .....	82
4.7 Kandang hewan percobaan .....	83
4.8 Prosedur pengumpulan data .....	86



4.9	Analisis data .....	86
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>87</b>
5.1	Data Penelitian .....	87
5.1.1	Hasil Penelitian Tahap I .....	87
5.1.1.1	<i>Cell line</i> .....	87
5.1.1.2	Pembuktian adanya virus EBL .....	89
5.1.1.2.1	<i>Cytophatogenic effect (CPE)</i> .....	89
5.1.1.2.2	Uji <i>Postulat Koch</i> .....	90
5.1.1.2.3	Uji imunodifusi dengan <i>ouchterlony</i> .....	92
5.1.1.2.4	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	94
5.1.2	Penelitian Tahap II .....	95
5.1.2.1	Hasil pemurnian virus EBL .....	95
5.1.2.2	Isolasi protein virus EBL dengan elektro elusi .....	96
5.1.2.3	Hasil uji hemaglutinasi dari protein <i>envelope (E)</i> virus EBL hasil elektro elusi .....	96
5.1.3	Hasil Penelitian Tahap III .....	98
5.1.3.1	Hasil penelitian secara <i>in vitro</i> .....	98
5.1.3.1.1	Hasil pembuatan antibodi poliklonal molekul hemaglutinin <i>Egp 51</i> .....	98
5.1.3.1.1.1	Pengukuran respons imun dengan Uji Hambatan Hemaglutinasi ( <i>HI Test</i> ) .....	98

5.1.3.1.1.2 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA <i>Egp 51</i> dengan pemeriksaan imunositokimia .	101
5.1.3.1.1.3 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA <i>Egp 51</i> dengan pemeriksaan <i>immunoblotting</i> ..	102
5.1.3.1.1.4 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA <i>Egp 51</i> dengan Uji Serum Netralisasi ..	102
5.1.3.2. Hasil Penelitian secara <i>In Vivo</i> ..	103
5.2 Hasil analisis data penelitian ..	104
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> ..	106
6.1 Penelitian Tahap I ..	106
6.1.1 Pembuatan <i>cell OL</i> ..	106
6.1.2 Inokulasi dan titrasi virus EBL pada <i>cell OL</i> ..	107
6.1.3 Uji <i>Postulat Koch</i> pada perubahan patologi anatomis ..	108
6.1.4 Uji agar gel imunodifusi ..	112
6.2 Penelitian Tahap II ..	113
6.2.1 Elusi protein spesifik imunogenik ..	114
6.3 Penelitian Tahap III ..	116

6.3.1 Uji <i>In Vitro</i> .....	116
6.3.2 Uji <i>In Vivo</i> .....	118
6.4 Temuan Baru .....	125
<b>BAB 7 KESIMPULAN</b> .....	127
7.1 Kesimpulan .....	127
7.2 Saran .....	127
Daftar Pustaka .....	128



## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Hasil Uji <i>Ouchterlony</i> Serum Sapi dari BPPH Yogyakarta 12 Juni 1998 Dengan Antigen Tes KJT Produk Pusvetma (Isolat Lokal) dan Produk Canada (Import) .....	14
Tabel 4.1.	Media RPMI untuk pengembangan virus .....	80
Tabel 5.1	Uji <i>HA</i> dari protein E virus EBL hasil elektro elusi 101 .....	97
Tabel 5.2	Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA <i>Egp 51</i> dengan pemeriksaan <i>HI</i> pada konsentrasi serum 1/2 sampai dengan 1/256 .....	100
Tabel 5.3	Hasil penghitungan jumlah limfosit setelah <i>dichallenge</i> dengan virus EBL pada titer $10^{7,8}$ TCID <sub>50</sub> .....	104

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perkembangan <i>RNA</i> virus .....	20
Gambar 2.2	Sapi dengan tumor pada seluruh bagian tubuh yang terinfeksi EBL .....	22
Gambar 2.3	Skema Dasar dari Adaptasi Sistem Imun .....	44
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian .....	54
Gambar 4.1	Kerangka operasional penelitian Tahap I .....	61
Gambar 4.2	Skema isolasi protein <i>envelope gp 51</i> virus EBL menurut Matsujama. Modifikasi .....	64
Gambar 4.3	Kerangka operasional penelitian Tahap II .....	68
Gambar 4.4	Kerangka operasional penelitian Tahap III secara <i>In Vitro</i> .....	79
Gambar 4.5	Kerangka operasional penelitian Tahap III secara <i>In Vivo</i> .....	85
Gambar 5.1	Janin domba untuk persiapan pembuatan <i>Cell Line OL</i> .....	87
Gambar 5.2	<i>Cell OL</i> dalam beberapa tingkat pertumbuhan .....	88
Gambar 5.3	Kerusakan <i>cell OL</i> akibat pemaparan Virus EBL .....	90
Gambar 5.4	Hasil Uji <i>Postulat Koch</i> Klasik .....	91
Gambar 5.5	Kontrol negatif Hasil Uji Agar gel presipitasi .....	92
Gambar 5.6	Hasil Uji Agar gel presipitasi .....	93
Gambar 5.7	Hasil <i>PCR</i> dengan primer yang spesifik gen penyandi protein <i>Egp 51</i> dari virus EBL .....	94
Gambar 5.8	Hasil berat molekul protein virus EBL dengan <i>SDS-PAGE</i> .....	95
Gambar 5.9.	Hasil uji hemaglutinasi dari protein Envelope (E) virus EBL hasil elektro elusi .....	96
Gambar 5.10.	Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA <i>Egp 51</i> dengan <i>HI</i> .....	99

- Gambar 5.11. Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan imunositokimia ..... 101
- Gambar 5.12. Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan *immunoblotting* ..... 102
- Gambar 5.13. Hasil uji protektifitas pada hewan kelinci dengan pemberian protein *Egp 51* dan *dichallenge* dengan virus ganas titer  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub> ..... 103



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Cara Pembuatan <i>cell line OL</i> .....	138
Lampiran 2 : Cara menghitung titer virus (CPE) .....	140
Lampiran 3 : Hasil Pengembangan <i>Cell-Line OL</i> .....	141
Lampiran 4 : Hasil Pasase dan Hasil Titiasi Virus EBL .....	145
Lampiran 5 : Gambar Ultracentrifus yang digunakan untuk pemurnian virus ...	146
Lampiran 6 : Gambar alat sonikator yang digunakan untuk memecah protein E virus EBL .....	147
Lampiran 7A : Hasil Uji Serum Netralisasi .....	148
Lampiran 7 B : Grafik Hasil Serum Netralisasi .....	152
Lampiran 8 : Hasil Uji <i>Ouchterlony</i> Serum Kelinci Sebelum Vaksinasi dengan menggunakan antigen tes kit produk Pusvetma dan produk Kanada ( <i>import</i> ) .....	153
Lampiran 9 : Hasil pemeriksaan limfosit .....	154
Lampiran 10 : Gambar limfositosis pada hewan coba .....	157
Lampiran 11 : Perkembangan vaksin sub-unit <i>hemagglutinin</i> .....	158
Lampiran 12 : Tabel Populasi sapi Potong Menurut Propinsi, 2001 – 2005 .....	159
Lampiran 13 : Tabel Populasi Sapi Perah Menurut Propinsi, 2001 – 2005 .....	160
Lampiran 14 A : Prosedur Karantina Pemasukan dan Pengeluaran Hewan di Indonesia .....	161
Lampiran 14 B : Prosedur Karantina Pemasukan dan Pengeluaran Hewan di Indonesia .....	162
Lampiran 15 : Laporan Penyakit EBL di Pulau Jawa dan Madura Tahun 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, dan 1999 .....	163
Lampiran 16 : Penyakit pada Sapi Potong .....	164

Lampiran 17 : Elusi .....	155
Lampiran 18 : Daftar Penyakit Hewan OIE (Office International des Epizooties) .....	166
Lampiran 19 : Hasil Pengujian Mutu Produksi pada Antigen KIT Diagnosis Penyakit EBL produksi PUSVETMA .....	168
Lampiran 20 : Cara Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Pertanda .....	169





## BAB 1

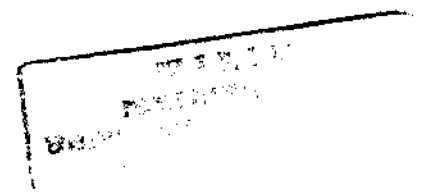
### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) tersebar di mana – mana; seperti yang dilaporkan pertama kali oleh Leiserin pada tahun 1771, kemudian tahun 1885 oleh Siedamstratsky di Jerman Utara; bahkan penyakit EBL juga tersebar di Swedia Selatan, Denmark, sampai ke Rusia, USA, serta ke negara Eropa Timur sebagaimana yang dilaporkan Miller *et al.*, (1976) dan Trainin *et al.*, (1990). Tahun 1976 penyakit EBL telah dinyatakan sebagai penyakit *cosmopolitan* (Johnson *et al.*, 1987; OIE, 2000).

Penyakit EBL menyerang sapi, disebut pula *Cattle Leucemia*, *Bovine Lymphosarcoma*, *Bovine Lymphocytomatosis* atau Leukemia sapi (Emanuelson *et al.*, 1992; Yoko 1998).

Ishino *et al.*(2000) dan OIE (2000) menyatakan bahwa penyakit EBL dapat menular secara horizontal yaitu dari sapi ke sapi lainnya atau dari sapi ke hewan kambing, kerbau, domba, kuda, rusa, dan babi, melalui urine yang mengalir di dalam kandang, transportasi, alat medis yang digunakan pekerja di peternakan, dan melalui hisapan lalat *Tabanus**sp* dan *Hippobosca meliensis*. Penularan dapat pula secara vertikal artinya penularan dari induk bunting ke janin yang menyebabkan kematian janin (Spitter and Arlik, 1996; Nakajima *et al.*, 2000).



Di Indonesia penyakit EBL pertama kali masuk bersama sapi yang datang dari Australia, seperti yang dilaporkan pertama kali oleh Ressang pada tahun (1957) EBL menyerang kerbau di Bogor. Pada tahun (1983) Dharma melaporkan adanya penyakit EBL yang menyerang sapi peranakan ongole (PO) di Banyuwangi. Prabowo tahun (1985) melaporkan pula adanya penyakit EBL yang menyerang sapi di Bengkulu Utara. Pada tahun (1988) Enoh Raharjo dari Balai Besar Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) menemukan kasus EBL pada sapi di Lembang, Bandung, Jawa Barat. Virus EBL yang ditemukan Enoh Raharjo yang berasal dari lapangan di Lembang merupakan virus alam (isolat lokal). Virus EBL isolat lokal tersebut dikembangbiakkan pada biakan jaringan OL sampai pasase 15. Berturut – turut distribusi geografis penyakit EBL di Indonesia, yaitu pada tahun 1988 di Bandung 6 kasus, Cilacap 33 kasus, dan di Surabaya 60 kasus. Pada tahun 1989 di Cilacap 33 kasus dan Surabaya meningkat menjadi 62 kasus, pada tahun 1990 di Jakarta 15 kasus dan pada tahun 1991 di Malang 9 kasus. Pada tahun 1998 ditemukan pula 12 kasus positif EBL pada pemeriksaan sampel serum sapi dari lapangan (Balai Penyidik Penyakit Veteriner/BPPV Yogyakarta) yang diuji dengan antigen KIT EBL produk Pusvetma Indonesia dan antigen KIT EBL produk Kanada sebagai kontrol (BPPV Wilayah IV, 2000; Hasdianah, 2000).

Penyakit EBL disebabkan oleh virus EBL yang termasuk golongan *retrovirus*, menyerang *Reticulo Endothelial System* dapat menimbulkan Lekosis

(*Leukomogenic*). Virus penyebab EBL adalah virus *exogenous*. Secara struktural dan fungsional menyerupai *HTLV-1* dan *HTLV-2*, target utama adalah Limfosit B (Altaner *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1987; Goldsby, 2000).

Penyakit EBL menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar sampai miliaran rupiah karena penyakit EBL termasuk penyakit daftar A. Penyakit daftar A adalah penyakit yang bersifat endemik, yaitu penyakit menular yang mempunyai potensi penyebaran yang sangat serius dan cepat, melewati batas negara, yang menyebabkan konsekuensi yang serius terhadap sosial ekonomi atau kesehatan masyarakat dan kepentingan umum pada perdagangan hewan secara Internasional (Dis Nak Jatim, 2004; OIE, 2003). Penyakit EBL bersifat ganas, menyebabkan *limfositosis persisten*, kematian janin di dalam kandungan, dan menyebabkan infertilitas pada sapi jantan. Angka morbiditas dan mortalitas tinggi mendekati 100% (Dirkeswan, 1996; Dis Nak Jatim, 2004).

Diagnosis pada penyakit EBL yang dilakukan sampai saat sekarang adalah deteksi dini penyakit dengan melakukan uji serologis menggunakan agar *Ouchterlony* (Agar Gel Imunodifusi). Antigen KIT yang digunakan adalah Antigen KIT EBL produksi Kanada, Perancis, dan Australia. Diagnosis penyakit EBL telah dikerjakan oleh BPPV di seluruh Indonesia; yang terdiri dari BPPV Wilayah I Medan, Wilayah II Bukittinggi, Wilayah III Lampung, Wilayah IV Yogyakarta, Wilayah V Banjar Baru, Wilayah VI Denpasar, dan Wilayah VII Maros Makassar (Direktorat Kesehatan Hewan, 1996). Penggunaan uji serologis

dengan menggunakan agar *Ouchterlony* (AGID) adalah merupakan kesepakatan bersama dari pertemuan ahli – ahli EBL di *Conpenhagen* Denmark tahun 1989 yang memutuskan untuk uji diagnosis penyakit EBL menggunakan agar gel imunodifusi (Miller *et al.*, 1999; OIE, 2000).

Pengobatan yang tepat ataupun pencegahan penyakit EBL melalui vaksinasi sampai saat ini belum ditemukan. Beberapa penelitian di berbagai negara untuk mengatasi kasus EBL telah dilakukan, di antaranya penelitian yang dilakukan Kabeya *et al.*, (2001), yang mengadakan penelitian tentang daya protektif dari peptida *envelope* virus EBL, yang digunakan sebagai bahan vaksin dan disuntikkan pada delapan ekor domba. Hasil yang didapat dari penelitian tersebut memperlihatkan adanya respons proliferasi *T cell* dan resistensi terhadap tantangan virus EBL. Penelitian yang dilakukan oleh Kabeya *et al.*, (2001) hasilnya belum memuaskan, karena daya protektif yang dihasilkan belum secara menyeluruh, tetapi daya protektif terhadap infeksi virus EBL, hanya terdapat pada lima ekor domba. Penelitian lain yang sedang dilakukan oleh Konnai *et al.*, (2006) menganalisa tingkat ekspresi *m-RNA* untuk *TNF- $\alpha$*  di mana tingkat ekspresi *m-RNA* untuk *TNF- $\alpha$* , adalah lebih tinggi pada sapi yang diinfeksi dengan EBL.

Masalah pengobatan belum ditemukan obat yang efektif terhadap penyakit EBL, kendala pembuatan vaksin antara lain belum terungkapnya mekanisme dari *limfositosis persisten*. Seperti yang dikatakan Johnson 1987 adanya variasi dari

durasi prevalensi dan konsentrasi antibodi karena adanya perbedaan geografis dari beberapa negara. Penggunaan isolat lokal sangatlah penting dalam penelitian ini.

Virus EBL adalah onkogenus dan eksogenus *retrovirus*, yang struktur dan fungsinya sama dengan *Human T-lymphotropic viruses 1 dan 2 (HTLV-1 dan HTLV-2)* pada manusia. Virus EBL masuk melalui LPS dan perantara TLR-4, NF- $\kappa$ B akan mengaktifkan transkripsi untuk sintesis protein yang akan meningkatkan IL-8 yang mengaktifkan proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B (Hino *et al.*, 1995; Grossman *et al.*, 2001). Partikel virus EBL terutama terdiri dari *nucleoprotein p12, capsid (core) protein p24, transmembrane glycoprotein gp30, envelope glycoprotein gp 51*, dan beberapa enzim, termasuk *reverse transcriptase* (Trudel *et al.*, 1999; Weitter *et al.*, 1999; OIE, 2000). Adanya proliferasi dan diferensiasi dari sel limfosit akan menyebabkan *limfositosis persisten*. Ekspresi LPS maka akan terjadi pula peningkatan ekspresi protein hemagglutinin *Egp 51*. Proses terjadinya ekspresi LPS sampai dengan peningkatan protein hemagglutinin *Egp 51* terdiri dari dua macam proses yaitu dimulai dengan *Innate Immunity* dan diikuti oleh *Adaptive Immunity*. Peningkatan jumlah protein hemagglutinin *Egp 51* karena adanya peningkatan IL-8 dan bantuan *NF- $\kappa$ B* akan menyebabkan pula peningkatan jumlah antibodi dalam jumlah yang tinggi (Pelzer, 1997). Peningkatan ekspresi protein hemagglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal yang dapat menyebabkan peningkatan jumlah antibodi yang tinggi. Protein hemagglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal ini akan diteliti apakah benar bersifat

antigenik, imunogenik, dan protektif dan dapat menimbulkan peningkatan jumlah antibodi yang tinggi.

Protein *Egp 51* berfungsi menetralisasi virus EBL, mempunyai efek T sitotoksik terhadap sel target (sel terinfeksi) dan epitop *Egp 51* mempunyai posisi konformasional dan diharapkan bersifat imunogenik dan protektif (Johnson *et al.*, 1987; Ott *et al.*, 2003).

Pada beberapa bakteri telah ditemukan protein hemagglutinin yang bertindak sebagai molekul adhesin seperti halnya pada bakteri *Vibrio Cholera* 38 kDa (Sumarno, 2000). Sri Winarsih dkk (1998) menemukan protein hemagglutinin 32 kDa dan 20 kDa pada *Helicobacter pylori* yang bersifat imunogenik. Protein hemagglutinin selain pada mikroba dapat pula ditemukan pada virus dan pada parasit. Pada virus seperti pada penyakit *HIV* telah ditemukan protein hemagglutinin yang berasal dari *envelope glycoproteine* dengan berat molekul 140 kDa yang berperan pada perlekatan virus *HIV* pada *cell CD<sup>8+</sup>* (Weiner *et al.*, 1999; Karzenstein DA *et al.*, 1999). Selain itu protein hemagglutinin dapat pula ditemukan pada penyakit flu burung disebabkan oleh virus tipe A. Virus influenza tipe A terdiri dari Hemagglutinin (H) dan Neuramidase (N) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2005). Pada parasit protein hemagglutinin dapat ditemukan pada penyakit Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* mengandung protein hemagglutinin yang merupakan molekul adhesin dengan berat molekul 270 kDa (Fitri, 2005).

Vaksin adalah antigen non toksik yang apabila diberikan secara suntikan, melalui oral, maupun melalui inhalasi dapat menginduksi respons pertahanan spesifik tanpa harus melalui proses sakit (Grossman *et al.*, 2001).

Antigen yang digunakan sebagai vaksin adalah antigen atau imunogen yang poten yaitu protein, terutama protein yang mempunyai berat molekul antara 20.000-100.000 dalton (Harlow and Lane, 1988), sedangkan apabila berat molekulnya kurang dari 10.000 dalton biasanya tidak bersifat imunogenik (Tizzard, 1988).

Sampel virus EBL pasase 15 yang diperoleh dari BPM SOH Gunung Sindur Bogor adalah virus EBL yang berasal dari lapangan (isolat lokal), kemudian dikembangkan pada biakan jaringan OL di Pusat Veterinaria Farma sudah sampai dengan pasase 29. Bagian protein *Egp 51* dari virus EBL isolat lokal pasase 29 yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein *Egp 51*, karena protein *Egp 51* mempunyai berat molekul yang tinggi yaitu 51.000 dalton, merupakan makro molekul, protein *surface*, dan biasanya *envelope glycoprotein* suatu virus adalah merupakan protein hemaglutinin. Protein hemaglutinin pada umumnya protein adhesin yaitu protein yang berperan dalam perlekatan suatu mikroba baik virus maupun bakteri pada sel *hospes* (Jawetz et al, 1982: Sumarno, 2000).

Penelitian tentang protein hemagglutinin *Egp 51* isolat lokal yang dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit memang belum pernah diteliti. Protein hemagglutinin *Egp 51* isolat lokal ini murni, maka diharapkan pula dalam penggunaannya tidak menimbulkan reaksi *post vaccinal*. Pada penelitian epidemiologis yang telah dikerjakan oleh Johnson pada tahun 1987 yang meneliti mengenai antibodi maternal dalam kolostrum sapi yang spesifik terhadap *glikoprotein envelope (gp 51)* virus EBL, pada empat perusahaan susu di negara Amerika Serikat (Michigan dan Florida), Jerman, dan Jepang menunjukkan adanya durasi, prevalensi, dan konsentrasi antibodi kolostrum yang bervariasi. Variasi geografis baik dari sisi epitop dan sifat fisiologis respons imun hospes virus EBL *gp 51* yang mempengaruhi keanekaragaman diversitas genetik virus EBL. Ternyata keanekaragaman diversitas genetik virus EBL merupakan faktor utama dalam mempengaruhi keanekaragaman durasi, prevalensi, dan konsentrasi antibodi kolostrum (Johnson, 1988; Altaner, 1991; OIE, 2000).

Bertitik tolak dari permasalahan di atas, maka akan diteliti isolasi dan karakterisasi protein hemagglutinin imunogenik *Egp 51* virus EBL isolat lokal sebagai kandidat vaksin sub unit, untuk mencegah adanya pengaruh keanekaragaman durasi, prevalensi, dan konsentrasi antibodi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut :



1. Apakah sub unit *protein envelope gp 51* virus EBL isolat lokal merupakan protein hemaglutinin ?
2. Apakah sub unit *protein hemaglutinin envelope Egp 51* virus EBL isolat lokal bersifat imunogenik dan protektif ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan sub unit protein *Egp 51* virus EBL isolat lokal merupakan protein hemaglutinin yang menginduksi terbentuknya antibodi yang bersifat imunogenik dan protektif

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian adalah :

1. Membuktikan sub unit *protein envelope Egp 51* virus EBL isolat lokal merupakan protein hemaglutinin.
2. Membuktikan sub unit *protein hemaglutinin envelope Egp 51* virus EBL dapat bersifat imunogenik dan dapat menginduksi terbentuknya antibodi yang protektif.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat secara ilmiah**

1. Memperjelas pengetahuan mengenai patogenesis virus EBL dan mendapatkan pembuktian sub unit protein hemaglutinin *envelope gp51* virus EBL isolat lokal sebagai kandidat vaksin

2. Menambah khasanah ilmu pengetahuan tentang pentingnya *Uji Postulat Koch* secara klasik dan *Uji Postulat Koch* secara molekuler, sebagai pembuktian keberadaan suatu virus EBL.

#### 1.4.2 Manfaat secara praktis

1. Dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin sub unit, khususnya protein *envelope virus* EBL.
2. Membantu program pemerintah dalam pemberantasan penyakit hewan menular virus EBL pada sapi.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sejarah perkembangan imunologi

Pada saat ini imunologi mengalami perkembangan yang sangat pesat, terutama dalam penyempurnaan pencegahan, diagnostik dan pengobatan dari suatu penyakit. Perkembangan variolasi dimulai sejak abad ke-18. Teknik tersebut merupakan usaha pencegahan terhadap penyakit cacar, teknik ini dilakukan dengan cara menggores kulit orang yang sehat, kemudian dibubuhi bubuk yang berasal dari penderita cacar yang tidak parah. Kemudian cara ini dilarang karena membahayakan, dan kadang-kadang menimbulkan kematian (Abba *et al.*, 1991; Goldsby *et al.*, 2002).

Edward Jenner pada tahun 1749-1823, mencoba menggunakan bibit cacar dari sapi (*vacca*), yang ditularkan kepada manusia, ternyata cara ini dapat memberikan hasil yang lebih aman dan efektif dalam penanggulangan penyakit cacar. Karena itu maka istilah variolasi diganti dengan vaksinasi (Kuby, 1992; Stites *et al.*, 1997). Di bidang kedokteran, perkembangan imunologi, telah melahirkan berbagai cabang ilmu seperti imunopatologi, imunogenetik, imunologi tumor, imunologi transplantasi, dan imunokimia. Sedangkan cabang imunologi yang relatif baru adalah psikoneuroimunologi, yang dipelopori oleh Robert Ader pada tahun 1980.

Pengembangan diagnostik mengalami kemajuan yang sama, di mana ditemukannya suatu teknik pembuatan antibodi monoklonal oleh Georges Kohler

dan Cesar Milstein pada tahun 1975. Ditemukannya uji serum netralisasi, RIA, ELISA, agar difusi serta uji – uji diagnostik lainnya, mengimbangi perkembangan teknologi yang ada (Miller *et al.*, 1976; Castel *et al.*, 1993).

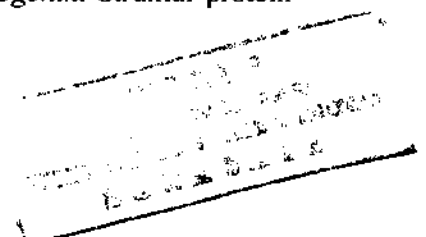
## 2.2 Penyakit EBL

### 2.2.1 Sejarah Penyakit EBL

EBL pertama kali ditemukan oleh Leiserin tahun 1771 pada sapi potong di Jerman Utara (Miller *et al.*, 1976). Pada tahun 1885 Siedamstratsky menemukan banyak sapi yang mati secara tiba-tiba, tanpa gejala klinis di daerah Timur Laut Jerman, dan mengadakan penelitian terhadap sapi-sapi yang mati tersebut, setelah diseksi ditemukan adanya perubahan patologis-anatomis. Perubahan patologis-anatomis yang terlihat yaitu adanya pembengkakan mencolok pada semua kelenjar getah bening, pembesaran hati, ginjal, limpa, jantung, dan uterus, penebalan tidak merata di sub mucosa lambung, terutama bagian pilorus, ke usus disertai ulcerasi. Pada bagian yang bengkak tersebut setelah diiris ditemukan adanya pus (nanah) kental, padat berwarna putih kekuningan, yang merupakan masa tumor karena *Lymphocytosis persistant* (Ressang dkk., 1996; Robert, 1996; Spitter *et al.*, 1996).

Pada tahun 1976 penyakit EBL dinyatakan dapat menular cepat dan ganas, dan termasuk penyakit *cosmopolitan* (Johnson *et al.*, 1987; OIE, 2000).

Penyebab penyakit ini adalah virus EBL *berenvelope* yang merupakan *retro-virus* yang dapat menimbulkan *lekosis* atau *leukemogenik*. Struktur protein



yang terpenting adalah *glikoprotein* yang mempunyai berat molekul 51.000 dalton (gp 51 kDa). Di bawah elektron mikroskop berupa partikel tipe-C dan mempunyai epitop yang sama di *regio* manapun juga, serta tidak menular pada manusia (Trainin *et al.*, 1990; Trudel *et al.*, 1990; Meïrom *et al.*, 1997)

Sampai sekarang penyakit EBL masih banyak ditemukan di negara – negara Belgia, Canada, USA, Rusia, Negara – negara Eropa Timur, Asia dan Australia (OIE, 2000; Dinas Peternakan, 2002).

Di Indonesia penyakit EBL pertama kali masuk bersama sapi yang datang dari Australia, seperti yang dilaporkan pertama kali oleh Ressay pada tahun (1957), EBL menyerang kerbau di Bogor, kemudian Dharma tahun (1983) melaporkan EBL menyerang sapi peranakan ongole (PO) di Banyuwangi. Prabowo tahun (1985) melaporkan pula adanya penyakit EBL yang menyerang sapi di Bengkulu Utara. Pada tahun (1988) Enoh Raharjo dari BPMSOH menemukan kasus EBL pada sapi di Lembang, Bandung, Jawa Barat; yang kemudian oleh Enoh virus EBL isolat lokal dari lapangan tersebut dikembangbiakkan pada biakan jaringan OL sampai pasase 15. Sampel virus EBL pasase 15 tersebut kemudian dikembangbiakkan pada biakan jaringan OL di Pusat Veterinaria Farma sudah sampai dengan pasase 29, dan virus EBL pasase 29 tersebut yang akan digunakan dalam penelitian ini. Berturut – turut distribusi geografis penyakit EBL di Indonesia, yaitu pada tahun 1988 di Bandung 6 kasus, Cilacap 33 kasus, dan di Surabaya 60 kasus, pada tahun 1989 di Cilacap 33 kasus dan Surabaya meningkat menjadi 62 kasus, pada tahun 1990 di Jakarta 15 kasus

dan pada tahun 1991 di Malang 9 kasus. Pada tahun 1998 dilaporkan kembali dari BPPV Yogyakarta ditemukan sapi yang positif EBL sebanyak 12 ekor dari 20 serum lapangan yang diperiksa. Pemeriksaan menggunakan antigen *test KIT* EBL produksi Pusvetma yang dibandingkan dengan *antigen test KIT* EBL produksi Canada sebagai kontrol; didapat hasil kurang lebih sama; yang berarti *antigen test KIT* EBL produk Pusvetma adalah *antigen test KIT* yang sudah layak digunakan sesuai dengan Sertifikat lulus uji dari Kepala laboratorium pengujian mutu produksi Pusat Veterinaria Farma seperti pada lampiran 15 (Dirkeswan, 1996, Hasdianah, 2000). Nilai dari hasil uji *ouchterlony* disajikan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1 : Hasil Uji *Ouchterlony* Serum Sapi Dari BPPV Yogyakarta 21 Juni 1998 Dengan Antigen Tes Kit Produk Pusvetma (Isolat Lokal) dan Produk Canada (Import)**

No.	Kode Serum Sapi	Antigen KIT EBL Produksi	
		Isolat Lokal	Import
1	1800	-	-
2	1328	+	+
3	2981	-	-
4	2082	+	+
5	0261	+	+
6	6873	+	+
7	6103	-	+
8	48 SES	+	+
9	6825	-	-
10	6865	+	+
11	5376	+	+
12	0240	+	+
13	S 136	-	-
14	S 176	+	+
15	S 154	-	-
16	S 160	+	+
17	S 192	-	-
18	S 141	+	+
19	S 114	-	-
20	S 66	+	+

Sumber : Hasdianah, 2000.

Keterangan :

- + : Diduga terinfeksi EBL
- : Tidak terinfeksi EBL

Penyakit EBL adalah penyakit yang fatal dan ganas, menyerang *Reticulo-Endothelial System (RES)*. Pada sapi yang terinfeksi berat tampak jumlah limfosit yang meningkat secara sedang atau menyolok. Di mana pada sapi yang normal umur lebih dari 4 tahun, terlihat jumlah limfosit berkisar 4-6 ribu sel per  $\text{mm}^3$  (Trinin *et al.*, 1990; Spitter *et al.*, 1996). Infeksi biasanya berlangsung secara sub-klinis, dan pada stadium preklinis keadaannya umum tidak terganggu, setelah masa inkubasi diperkirakan 80-95% dari sapi tertular EBL akhirnya mati (Burney *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1999; Ishino *et al.*, 2000).

Diagnosis penyakit EBL dapat dilakukan melalui uji komplemen fiksasi (*CFT*), dan uji serologi menggunakan agar *ouchterlony* (Boisseou *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1999). Diagnosis yang umum dan lebih sering digunakan baik oleh peneliti yang terdahulu maupun pada saat sekarang adalah dengan uji serologi menggunakan agar *ouchterlony* (agar difusi); dengan menggunakan perangkat antigen EBL. Penggunaan uji serologi agar *ouchterlony* ini, sesuai dengan perjanjian para ahli EBL yang disepakati pada seminar EBL di Copenhagen Jerman tahun 1985 (Miller *et al.*, 1999; OIE, 2000). Perangkat (KIT) antigen EBL yang digunakan untuk pengujian penyakit EBL pada umumnya berisi antigen EBL murni, serum referen untuk pengujian, serum kontrol positif, serum kontrol positif lemah, serum kontrol negatif, pengencer *buffer* dan ada pula yang dilengkapi dengan agar difusi. Tergantung dari kebutuhan masing – masing produsen (Pelzer *et al.*, 1997; Ott *et al.*, 2003).

Bila uji serologi untuk mendeteksi antibodi dengan agar difusi ini membentuk garis presipitasi yang jelas, berarti sapi tersebut diduga positif EBL karena adanya keseimbangan antara antigen dan antibodi yang saling berikatan, maka akan terbentuklah garis presipitasi di dalam agar difusi, yang berarti sebagian besar virus antigen EBL berada di dalam limfosit dan infeksi baru saja terjadi (Roitt *et al.*, 1993; Spitter *et al.*, 1996; Sugimoto, 1999).

Dewasa ini penyakit EBL cukup meresahkan petani peternak maupun pengusaha peternakan sapi ataupun Instansi yang terkait, karena termasuk penyakit Daftar A menular cepat, ganas, dan menimbulkan kematian sapi secara mendadak tanpa menunjukkan gejala – gejala klinis yang jelas, menyebabkan reproduksi menurun, dan dapat menyebabkan infertilitas pada sapi jantan serta bersifat persisten, di mana sekali saja sapi terkena infeksi EBL, maka infeksi akan berlangsung seumur hidup sampai menimbulkan kematian pada sapi tersebut (Dirjen Nak, 1977; Resang, 1986; Teifke *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Epidemiologi penyakit

Epidemiologi penyakit (distribusi geografis) EBL pertama kali ditemukan di Jerman lebih dari 100 tahun yang lalu, dan selama abad 18, penyakit ini telah meluas di benua Eropa, menyebar ke Benua Amerika kembali menyerang Benua Eropa pada pertengahan abad 20 melalui sapi impor dari Amerika Utara, serta negara lain termasuk India dan Indonesia yang tertular melalui sapi yang masuk dari negara Australia. Menurut FAO (1976) EBL Kosmopolitan, merupakan



penyakit Hewan Karantina, menyerang ternak sapi, dapat menular pada domba, rusa, kuda, kerbau dan babi (Ressang, 1989; Ishino *et al.*, 2000). Sapi tidak menularkan penyakit ini ke manusia, penyakit ini bukan merupakan penyakit Zoonosis (Subronto, P. 1989; Dis Nak. 2000).

Apabila induk sapi tertular virus EBL dengan virulensi rendah maka infeksi tidak terlihat, tetapi janin dapat tertular melalui induk yang terinfeksi EBL dan dapat menyebabkan kematian janin. Infeksi EBL yang persisten merupakan masalah dan berperan dalam epidemiologi EBL. Vektor mekanis yang dapat membantu penularan virus EBL antar kandang yaitu peternak, petugas kandang, dokter hewan, para pembeli sapi dan peralatan seperti peralatan makan dan sebagainya. Pada daerah enzootik penularan penyakit pada peternakan dapat terjadi secara tidak langsung oleh lalat *Tabanus* sp dan *Hippobosca meliensis* (Johnson *et al.*, 1987; Kucerova *et al.*, 1999).

Penyakit ini dinyatakan endemik, apabila frekuensi penyakit mencapai 30-100 kasus per 100.000 ekor sapi, dan bila ada sapi yang terserang penyakit EBL khronis dalam sebuah peternakan, maka diperkirakan 1-5% dari jumlah sapi yang ada akan tertular (Trudel *et al.*, 1990).

### 2.2.3 Etiologi

Virus EBL termasuk dalam golongan *retro* virus yang menimbulkan leukosis (*leukomogenic*). Di bawah mikroskop *elektron* berupa partikel-partikel tipe C mempunyai *buoyant density* 1,18 gram/ml. Antigen penyebab EBL

adalah virus *exogenous* secara struktural dan fungsional menyerupai *HTLV-1* dan *HTLV-2*, target utama adalah limfosit B (Hino *et al.*, 1995; Grossman *et al.*, 2001).

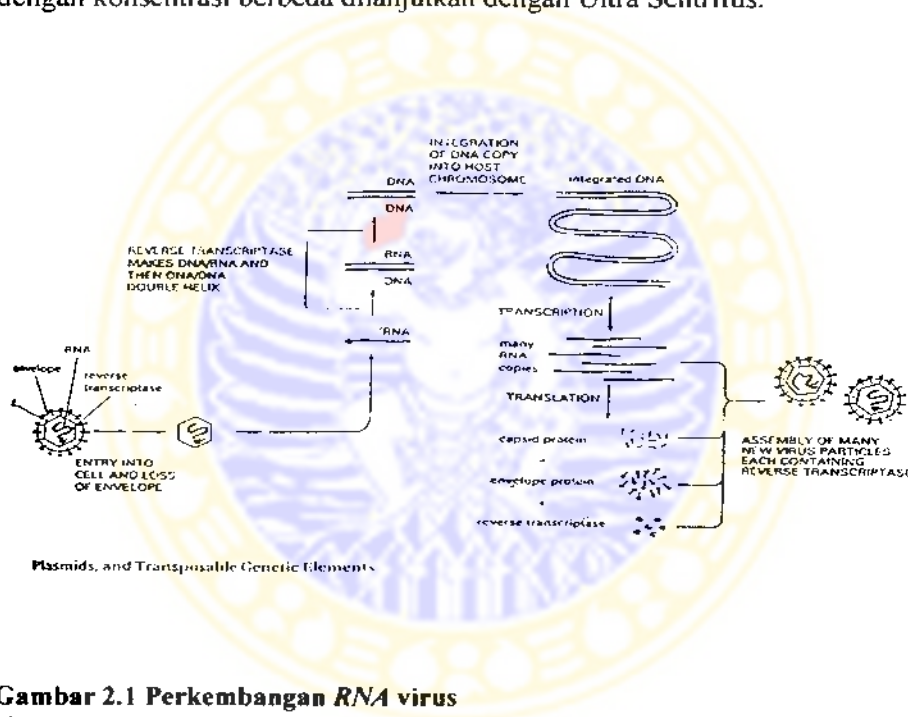
#### 2.2.4 Identifikasi Antigen

Virus EBL dapat diidentifikasi melalui inokulasi virus pada *cell OL* terlihat adanya *CPE*, kemudian melalui uji agar gel imunodifusi terlihat adanya garis presipitasi yang merupakan ikatan antigen antibodi spesifik. Identifikasi virus EBL dapat pula dilakukan melalui uji *Postulat Koch* akan terlihat adanya perubahan patologi anatomis, yaitu berupa pembesaran hepar, lambung, serta *limphoglandulae* yang terdapat pada seluruh bagian tubuh yang berisi nanah berwarna putih kekuningan, kental, padat, dan mengeras (Ressang, 1989; Ishino *et al.*, 2000; OIE, 2000).

Partikel virus terutama terdiri *RNA* beruntai-tunggal, *nucleoprotein p12*, *capsid (core) protein p24*, *transmembrane glycoprotein gp 30*, *envelope glycoprotein gp 51*, dan beberapa enzim, termasuk *reverse transcriptase*. *DNA* provirus, yang dihasilkan oleh transkripsi terbalik (*reverse transcription*) sebagian besar genom virus, menyatu secara random ke dalam *DNA* inti sel host tempat ia menetap (Trudel *et al.*, 1999; Weitter *et al.*, 1999; OIE, 2000).

Inaktivasi virus dilakukan dengan jalan menambahkan *aminomethylated compounds of E-Leucine* ( $6,6 \times 10^2$  E-Leucine  $6,6 \times 10^3$  Formaldehyde), dieramkan pada suhu  $37^\circ \text{C}$  selama 18 jam (Parfonich *et al.*, 1983).

Protein EBL terdiri dari glikoprotein yang mempunyai berat molekul 51.000 dalton atau *gp 51*. Metode yang digunakan untuk pemurnian antigen adalah modifikasi dari metode Trudel *et al.*, 1990 dan Artama (1996), yaitu antigen murni dibuat dengan jalan menginokulasikan virus antigen EBL isolat lokal ke dalam biakan jaringan OL. kemudian hasil inokulasi dikonsentrasikan dengan menambahkan ammonium sulfat jenuh  $\pm 30\%$ , *dicentrifuge* yang diambil endapan virusnya. dilanjutkan pemurnian virus melalui *sukrose gradient* dengan konsentrasi berbeda dilanjutkan dengan Ultra Sentrifus.



**Gambar 2.1 Perkembangan RNA virus**  
(Sumber : Abbas et al., 2000)

### 2.2.5 Isolasi Virus

- Sel-sel satu inti dari 1.5 ml darah dalam *ethylene diamine tetra-acetic acid* (EDTA) dipisahkan pada gradien densitas *ficoll/sodium metrizoate*, kemudian

dibiakkan dengan  $2 \times 10^6$  *cell fetal bovine lung* (FBL) atau *ovine lung* (OL), dan ditumbuhkan selama 3-4 hari dalam 40 ml *minimal essential medium* (MEM) yang mengandung 20% *fetal calf serum*. Virus yang dibiakkan di dalam *cell OL* akan berkembang membentuk *syncytia* atau *cytopathogenic effect*. Antigen virus EBL dapat dideteksi dalam supernatan biakan *cell OL* melalui *radio immuno assay* (RIA), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *immunobloting* atau *agar gel immunodiffusion* (AGID), dan keberadaan partikel-partikel EBL dapat ditunjukkan dengan mikroskop elektron (Parslow, 1990; OIE, 2000).

- b. Virus EBL dapat pula tumbuh di dalam *cell* kekelawar (*Batch Cell*), FKDL *cell*, dan *Ovine Lung Cell* yang bersifat *cell line*, diinkubasikan selama 5-7 hari; akan tumbuh *Cytopathogenic Effect* (CPE) yang merupakan hasil pemaparan virus di dalam *cell* (Ressang, 1986; Subronto P, 1989; OIE, 2003).

### 2.2.6 Patogenesis Virus

Virus EBL sangat ganas dan virulen. Sapi dapat terinfeksi dari segala umur, termasuk dari masa embrio, umumnya subklinis, lebih dari 30% menyerang sapi diatas umur 2 tahun. Penyakit berkembang menjadi *persistant lymphocytosis* sebagian berkembang menjadi *lymphosarcoma* di berbagai organ internal (Kucerova, 1999; Theilen,1987).

Timbulnya benjolan-benjolan hampir pada seluruh bagian tubuh, benjolan-benjolan tersebut yang berisi masa tumor EBL dapat ditemukan pada limfoglandula, jantung, hati, ginjal, uterus dan *subcutan*. Bila bagian tersebut

diiris akan keluar nanah (pus) berbentuk padat, keras dan berwarna putih kekuningan diikuti dengan pembesaran lambung, hati dan uterus serta adanya perdarahan pada bagian tersebut (Putra, 1993; Nossal *et al.*, 1998; Ishino *et al.*, 2000).

Jumlah limfosit normal sapi berumur di atas 4 tahun adalah 2500-7500/mm<sup>3</sup> (rata-rata 4000/ml), dan jumlah limfosit normal pada kelinci adalah 200-500/mm<sup>3</sup>. Dengan adanya infeksi EBL jumlah limfosit meningkat dengan cepat dan persisten jauh di atas angka normal yang menyebabkan limfositosis persisten; adanya limfositosis persisten menyebabkan pembengkakan dan benjolan – benjolan pada hampir seluruh bagian tubuh hewan ternak sapi yang terinfeksi EBL; akhirnya menimbulkan kematian pada sapi tersebut (Trainin, *et al.*, 1990, Tizzard, 1995; Splitter, 1996; OIE, 2000). Sebagaimana Gambar 2.2



**Gambar 2.2 Sapi dengan tumor pada seluruh bagian tubuh yang terinfeksi EBL (Sumber : *Department of Primary Industries, Victoria, Australia, 2006*)**

### 2.2.7 Hewan coba

Hewan coba untuk penelitian EBL dapat digunakan kelinci dan domba. Inokulasi virus ke hewan domba dapat dipakai untuk pendeteksian virus sebagai alternatif pada biakan sel. Dalam hal ini, infeksi dapat dipertegas dengan pendeteksian respon antibodi spesifik setelah 6 minggu penyuntikan virus EBL. menggunakan hasil serum sapi yang terpapar virus EBL melalui uji serologi agar *ouchterlony* (AGID), dan uji serologi serum netralisasi (Harlow *et al.*, 1986, Ressay, 1987; Pastoret *et al.*, 1999).

### 2.2.8 Elektroforesis

Metode ini sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul, selain itu juga untuk mengetahui titik isoelektrik dengan *IEF (Iso Electric Focusing)*. Ada beberapa metode elektroforesis yaitu satu dimensi elektroforesis umumnya adalah *SDS-PAGE*, dan dua dimensi elektroforesis (*IEF-SDS-PAGE*).

*Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)* adalah merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang *amphoteric* mengandung kedua grup karboksil negatif dan grup amino positif. *Isoelectric point (pI)* adalah pH pada protein yang tidak mempunyai jaringan elektrik. Hal itulah 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.

Poliakrilamid adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul antara 500-250.000 Dalton. Pori-pori pada matrik dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrylamid* dengan *bis acrylamide*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total persentasi *acrylamid* atau peningkatan derajat persentasi konsentrasi campuran dengan *bisacrylamid*. 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 terlalu rendah total persentasi akan mengakibatkan pergerakan protein menjadi terlalu cepat bergerak melalui gel yang mengakibatkan didapatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang diinginkan.

Selama elektroforesis, voltase, arus dan power harus tetap. Jika selama elektroforesis R meningkat, maka efek E, I atau P stabil sesuai dengan macam daftar persamaan. Jika E tetap, maka kecepatan berkurang dan panas yang timbul tetap. Jika I tetap, maka kecepatan tetap tetapi panas timbul. Jika P tetap, maka kecepatan berkurang tetapi panas tetap. Harapan dari parameter yang penting ini dapat digunakan sebagai kontrol pada saat pemanasan. Jika pemanasan yang berlebihan mengakibatkan terjadinya peningkatan difusi *band* dari protein, juga akan terjadi migrasi protein yang tidak konsisten dari tengah ke tepi dari gel (*smiling of the protein bands*). *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*). Pada *SDS-PAGE*, protein dielektroforesis dalam detergen ionic, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)*. Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam

amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein *SDS*-komplek migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya. Ada dua sistem pada *SDS* yaitu kontinyu (Weber and Osbon) dan diskontinyu (*Laemmli*). Pada system kontinyu campuran protein dilapiskan pada bagian atas (*bands* pada bagian atas dari *separating gel*). Sehingga kelemahan pada system ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Sedang pada system diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis yang tipis berupa pita atau *band* yang tipis (Baktir A. 2000; Rantam, 2003).

### 2.2.9 Immunoblotting

Untuk mengembangkan deteksi protein dalam gel diawali dengan penelitian antibodi sebagai sampel dalam gel. Teknik dikuasai dengan cara inkubasi yang intensif dan pencucian sebanyak tiga kali. Langkah selanjutnya adalah transfer protein dari gel ke membran awalnya agak kesulitan. Akhirnya diikuti oleh Southern (1975) dengan sukses memindahkan *DNA* dari agarose ke membran *nitrocelulose*. Selanjutnya diketahui pula bahwa *Western blot* digunakan untuk mendeteksi berat molekul protein dari campuran antigen dan digunakan untuk membedakan reaksi silang di antara protein dan digunakan studi untuk modifikasi protein selama protein disintesis di dalam sel. Keuntungan metode ini adalah membran *nitrocelulose* setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan.



Selain itu juga dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein. *autoradiography, calorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay*.

Singkatnya pada *Western blott* tahap pertama dilakukan pemisahan protein dengan *SDS-PAGE* dan selanjutnya ditransfer ke membran *nitrocelulose* yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *Fast-Red* atau *commasie blue* (Towbin *et al.*, 1979; Roitt *et al.*, 1998; Baktir A. 2000).

### 2.2.10 Protein

Protein yang merupakan suatu bentuk polimer dari asam amino, sangat penting dalam kehidupan suatu organisme karena memegang peranan penting dalam semua proses biologis dalam suatu sel. Hampir semua katalis dalam sistim biologis adalah enzim yang juga merupakan protein. Protein juga berperan dalam transportasi dan penyimpanan suatu senyawa, pengaturan dan koordinasi gerak, sistim imunologi tubuh, mengontrol pertumbuhan maupun diferensiasi sel dan lain sebagainya.

Asam amino pembentuk protein saling terikat satu sama lain dengan ikatan peptida membentuk struktur primer, sekunder, tersier dan kuarterner. Ada 20 macam asam amino pembentuk protein. Urutan asam amino dalam suatu protein merupakan hal yang sangat penting karena menentukan struktur tiga dimensi protein yang erat hubungannya dengan fungsi protein. Perubahan susunan asam amino dapat mengakibatkan gangguan fungsi protein sehingga dapat menimbulkan penyakit. Urutan asam amino pembentuk protein ditentukan oleh

gen. Walaupun gen menentukan macam protein yang akan dibentuk oleh sel, gen (DNA) bukanlah cetakan langsung bagi sintesis protein. Cetakan untuk sintesis protein adalah mRNA yang disintesis berdasarkan urutan nukleotida pada DNA (Safitri, 1993; Doran et al., 1996).

## **2.2.11 Struktur Protein**

### **2.2.11.1 Karakteristik Protein**

Protein merupakan kelompok senyawa yang terbesar terdapat dalam sel sebagai biomolekul, yaitu sebanyak 50% berat kering senyawa organik total terdapat dalam sel. Ditinjau dari fungsi biologiknya dikenal ada beberapa macam kelompok protein, misalnya sebagai enzim, hormon, protein pengangkut, protein pembangun dan masih banyak lagi fungsi yang lain. Dengan cara pengelompokan yang lain dapat ditemukan : (1) kelompok protein sederhana, yaitu yang hanya tersusun atas unit-unit polipeptida saja dan (2) protein majemuk yang tersusun atas senyawa protein dengan karbohidrat atau lipida (glikoprotein dan lipoprotein). Berdasar atas bentuk dikenal protein globular yang bentuknya bulat atau lonjong dan protein fibrous, berbentuk serabut. Struktur protein berasal dari penggabungan beratus-ratus asam amino, padahal jumlah asam amino yang umum terdapat dalam alam hanya 20, maka kebanyakan asam amino frekuensinya lebih dari satu. Dalam jasad hidup yang sangat kompleks susunan selnya, terdapat beribu-ribu jenis protein. Secara kimiawi perbedaan itu terletak pada frekuensi jenis asam amino yang menyusun protein dan urutan asam aminonya. Perbedaan itu akan menyebabkan terjadinya perbedaan struktur primer, sekunder, tersier dan

selanjutnya menyebabkan perbedaan fungsi biologik protein (Sofro, 1990; Murray *et al.*, 2000)

#### 2.2.11.2 Reaksi dan Sifat Umum Protein

Faktor-faktor luar seperti asam. basa, garam, dan suhu dapat menyebabkan perubahan baik kimiawi maupun fisik. Perubahan yang terjadi di atas dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis protein atau asam amino tertentu yang terdapat dalam bahan yang diteliti. Adanya gugus terminal NH<sub>2</sub> dan COOH (karboksil) serta gugus rantai cabang R dapat bermuatan positif ataupun negatif menyebabkan protein tadi bersifat basa dan asam. Sifat demikian merupakan sifat kembar yang dinamakan elektrolit amfoterik atau lazim disingkat dengan amfolit.

Konformasi molekul protein didukung oleh 4 macam struktur yaitu primer, sekunder, tertier dan kuartener. Struktur primer suatu protein dapat ditentukan secara umum oleh komposisi asam aminonya dan secara khusus oleh urutan aminonya. Komposisi asam amino suatu protein memberikan informasi dasar tentang jenis dan tipe asam amino yang terkandung dalam molekul protein tersebut, sedangkan urutan asam amino suatu protein seperti suatu sidik jari, yang menjelaskan identitas suatu molekul protein dengan mudah dapat ditentukan dari urutan aminonya. Contoh : dua molekul protein yang berbeda urutan asam aminonya mungkin mempunyai kesamaan komposisi asam aminonya. Struktur primer ini ditentukan oleh adanya ikatan kovalen antara sisa asam amino yang berurutan yang membentuk ikatan polipeptida (John, 1996; Murray, *et al.*, 2000)

### 2.2.11.3 Ikatan Kimia yang Berperan dalam Molekul Protein

Protein sebagai rantai makro molekul saling terikat oleh ikatan kovalen yang cukup kuat untuk menjaga dan memelihara urutan asam amino sebagai sub unit makro molekul ini. Tetapi informasi yang diemban oleh urutan asam amino dikuatkan melalui ikatan non kovalen yang kekuatannya jauh lebih lemah. Ikatan non kovalen yang dikenal antara lain adalah ikatan hidrogen, interaksi Van der Waals, ikatan ionik dan ikatan hidrofobik. Ada ikatan lemah lain yang dihasilkan akibat struktur tiga dimensi molekul-molekul air yang cenderung untuk memaksa menyatukan gugus yang bersifat hidrofobik. Dengan cara ini gangguan gugus hidrofobik terhadap jaringan ikatan hydrogen terbentuk antara molekul air akan sekecil mungkin. Ikatan yang terbentuk antara gugus hidrofobik ini sebagai ikatan hidrofobik.

Ikatan non kovalen tidak tahan terhadap gerakan termal yang cenderung menyebabkan molekul-molekul saling terpisah. Jadi mempertahankan dua permukaan molekul yang saling terkait diperlukan ikatan non kovalen dalam jumlah besar. Sejumlah besar ikatan semacam ini dapat terbentuk bila kedua permukaan molekul tersebut saling cocok, hal itu dikenal sebagai kekhususan pengenalan biologis yang terjadi misalnya antar enzim dengan substratnya. Ikatan non kovalen juga menentukan bagaimana bagian-bagian yang berbeda pada suatu molekul saling cocok. Sesungguhnya suatu protein yang terbangun atas rantai panjang yang fleksibel dapat tergulung dengan banyak cara. Tetapi dalam prakteknya, hampir semua protein dalam sel mempunyai hanya satu bentuk tergulung yang stabil (Murray *et al.*, 2000, Kolozik, 2000).

#### 2.2.11.4 Urutan Asam Amino Menentukan Konformasi Molekul Protein

Suatu protein sesungguhnya mempunyai konformasi yang sangat banyak. Tetapi dalam kondisi biologis, rantai polipeptida umumnya akan tergulung dalam salah satu konformasi saja. Hal ini terjadi karena rantai samping asam amino akan saling berasosiasi, juga rantai samping ini berasosiasi dengan air membentuk ikatan non kovalen, tergantung pada macam rantai dan posisi dalam polipeptida, maka suatu kekuatan besar akan terbentuk dan memberikan konformasi tertentu dengan kestabilan yang tinggi.

Protein umumnya tergulung secara spontan menjadi bentuk yang benar. Misalnya protein dapat mengalami denaturasi, suatu keadaan di mana rantai polipeptida yang fleksibel kehilangan konformasi semula. Salah satu faktor penting yang mengatur tergulungnya suatu polipeptida adalah distribusi samping polar maupun non polar. Selama sintesis protein, banyak rantai samping hidrofobik cenderung didorong ke dalam molekul yang memungkinkan mereka terhindar dari kontak dengan lingkungan berair. Sementara itu, rantai samping polar cenderung mengatur dengan sendirinya di luar molekul, di dalam mereka dapat berinteraksi dengan air maupun gugus lainnya.

Ikatan peptida, karena mereka sendiri bersifat polar, akan cenderung untuk berinteraksi antara mereka sendiri atau dengan rantai samping polar, dengan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen berperan penting dalam penyatuan berbagai bagian rantai polipeptida membentuk molekul protein yang tergulung dan ikatan ini sangat penting dalam banyak interaksi pada permukaan protein (Murray *et al.*, 2000, Kolozik *et al.*, 2000).

Setelah keluar dari sitoplasma, protein yang disekresikan atau yang terletak pada permukaan kerap kali memperoleh ikatan rantai-rantai kovalen. Misalnya ikatan disulfida antara gugus SH sisteina yang berdekatan pada rantai polipeptida yang tergulung dapat berperan untuk menstabilkan struktur tiga dimensi suatu protein ekstraseluler, meskipun sesungguhnya mereka tidak dibutuhkan untuk penggulangan molekul tersebut. Ikatan S-S ini jarang terbentuk pada protein yang masih di sitosol.

Sebagai hasil akhir interaksi semua sisa asam amino pada umumnya molekul protein akan tergulung secara spontan membentuk suatu formasi yang unik, biasanya kompak dan globuler atau panjang menyerupai serat. Inti bagian dalam terbangun oleh rantai samping hidrofobik yang menyatu dan terpadu dalam susunan yang ketat, sedangkan bagian luar yang sangat kompleks dan tidak teratur umumnya terbentuk dari rantai samping polar. Penempatan dan kimiawi berbagai atom yang berbeda pada permukaan menyebabkan tiap protein mempunyai ikatan yang spesifik terhadap permukaan makromolekul lain maupun molekul yang lebih kecil.

#### **2.2.11.5 Transfer protein**

Pada proses ini protein dapat secara langsung ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan alat model Bio-Rad yang konvensional yang memakan waktu 24 jam dan ada yang baru dengan menggunakan *semidry blotting* (Biometra) dengan memakan waktu 1 jam 30 menit. Tetapi kebanyakan transfer protein dari gel ke membran nitroselulose dilakukan dengan teknik elektroforesis.

Transfer *buffer* harus mengandung *ionic* yang rendah tanpa menggunakan elektroforesis yang tinggi arusnya. Methanol pada proses ini sering ditambahkan ke *buffer* untuk meningkatkan ikatan protein ke nitroselulose dan mengurangi pembengkakan gel selama transfer, sehingga mengurangi elusi. Pada protein yang mempunyai berat molekul tinggi biasanya efektif jika dilakukan dengan waktu yang cukup lama sekitar 12 jam (Towbin *et al.*, 1979; Rantam, 2003).

### 2.3 Penggunaan Virus EBL Isolat Lokal

Penelitian epidemiologis oleh Johnson pada tahun 1987 mengenai antibodi maternal dalam kolostrum sapi yang spesifik terhadap *glikoprotein envelope Egp 51* virus EBL, pada 4 perusahaan susu di negara-negara Amerika Serikat (Michigan dan Florida), Jerman dan Jepang menunjukkan durasi, prevalensi dan konsentrasi antibodi kolostrum yang bervariasi. Variasi geografis, baik dari sisi epitop virus EBL *gp 51* dengan diversitas genetik yang diekspresikannya karena sifat fisiologis respons imun hospes, ternyata merupakan faktor utama dalam mempengaruhi keanekaragaman durasi, prevalensi, dan konsentrasi antibodi kolostrum (Johnson, 1998; Altaner, 1991; OIE, 2000). Fenomena di atas yang melatarbelakangi peneliti untuk menggunakan virus EBL isolat lokal sebagai kandidat vaksin.

### 2.4 Penggunaan *Egp 51* Virus EBL Sebagai Kandidat Vaksin

*Envelope* virus EBL memperantarai peletakan virus dengan permukaan sel hospes (sel B), antibodi spesifik terhadap glikoprotein virus EBL *gp 51* berfungsi

menetralisasi virus EBL. Antibodi spesifik terhadap glikoprotein virus EBL *gp 51* mempunyai efek sitotoksik terhadap sel target (sel terinfeksi). Epitop *gp 51* tersebut mempunyai posisi konformasional dengan demikian substansi tersebut mempunyai imunogenisitas yang tinggi. Virus EBL berintegrasi ke dalam biakan sel (Spitter *et al.*, 1996).

Ciri pokok antigenisitas agar dapat bersifat antigenik adalah molekul harus besar, kaku dan kimiawi kompleks. Walaupun molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen, tetapi molekul besar jauh lebih baik karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Persyaratan lainnya bagi antigenisitas adalah keasingan dan sel peka antigen tidak akan bereaksi dengan bahan yang tidak begitu dikenalnya (Abbas *et al.*, 1991; Goldsby, 2001).

Protein *Egp 51* mempunyai berat molekul 51 kDa atau 51.000 dalton, yang merupakan makromolekul, *proteine surface* dan biasanya *envelope glycoproteine* suatu virus adalah merupakan protein hemaglutinin. Protein hemaglutinin pada umumnya merupakan protein adhesin yaitu protein yang berperan dalam perlekatan suatu mikroba baik virus maupun bakteri pada sel hospes (Jawetz *et al.*, 1982; Sumarno, 2000). Protein *Egp 51* berfungsi menetralisasi virus EBL, mempunyai efek sitotoksik terhadap sel target (sel terinfeksi) dan epitop *Egp 51* mempunyai posisi konformasional dan diharapkan bersifat imunogenik dan protektif (Miller *et al.*, 1999; Sugimoto *et al.*, 1999).

Pada beberapa bakteri telah ditemukan protein hemaglutinin yang bertindak sebagai molekul adhesin seperti halnya pada bakteri *Vibrio Cholera* 38



kDa; pada *Salmonella thypi* 36 kDa (Sumarno, 2000). Sri Winarsih dkk (1998) menemukan protein hemaglutinin 32 kDa dan 20 kDa pada *Helicobacter pylori* yang bersifat imunogenik. Protein hemaglutinin selain pada mikroba dapat pula ditemukan pada virus dan pada parasit. Pada virus seperti pada penyakit *HIV* telah ditemukan protein hemaglutinin yang berasal dari *envelope glycoproteine* dengan berat molekul 140 kDa yang berperan pada perlekatan virus *HIV* pada *cell CD<sup>8+</sup>* (Weiner *et al.*, 1999; Karzenstein DA *et al.*, 1999). Selain itu protein hemaglutinin dapat pula ditemukan pada penyakit flu burung disebabkan oleh virus tipe A. Virus influenza tipe A terdiri dari Hemaglutinin (H) dan Neuramidase (N) (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2005). Pada parasit protein hemaglutinin dapat ditemukan pada penyakit Malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* mengandung protein hemaglutinin yang merupakan molekul adhesin dengan berat molekul 270 kDa (Fitri, 2005).

## 2.5 Karakter Molekul Adesi

Untuk mengetahui karakter molekul adesi dapat diketahui dengan menggunakan petunjuk yaitu adanya kemampuan untuk menggumpalkan sel darah merah mamalia yang dimiliki oleh molekul adesi tersebut. Kejelasan adanya fenomena ini belum ada, namun kemungkinannya adalah disebabkan oleh adanya kemiripan struktur biologi antara permukaan sel darah merah dan reseptor pada permukaan sel epitel. Protein hemaglutinin yaitu yang merupakan protein yang

mempunyai kemampuan menggumpalkan darah merah yang terletak pada bagian pili bakteri digolongkan menjadi 2 yaitu : *mannose sensitive haemagglutini* (MSHA) dan *mannose resisten haemagglutinin* (MRHA). MRHA akan berubah menjadi MSHA apabila sel darah merah diaktifkan dengan asam tannat 0,01% (Sumarno, 2000).

Penelitian yang pertama kali dilakukan mengenai adesi bakteri adalah menggunakan bakteri *E. coli* yang menyebabkan diare. Model penelitian tersebut dikerjakan dengan menggunakan reseptor kultur jaringan *HEp-2*. Pada penelitian selanjutnya ternyata diketahui bahwa adesi *E. coli* pada kultur jaringan tersebut ternyata ada tiga macam model adesi. Model yang pertama adalah *localize adherant* (adesi lokal), *diffuse adherant* (adesi difus) dan *aggregate adherant* (adesi agregasi). Tanda-tanda yang menunjukkan dari ketiga model tersebut adalah : adesi lokal menunjukkan gambaran koloni bakteri dalam formasi bergerombol yang terletak pada permukaan sel reseptor, pada model adesi agregasi dapat ditemukan kumpulan gambaran sel bakteri yang membentuk seperti *stacked-brick* (susunan tumpukan batu bata) yang terdapat pada reseptor sel maupun pada gerombolan bakteri yang ditemukan diluar sel reseptor. Sedangkan pada pengamatan model adesi difus terlihat dalam formasi paparan yang merata dan hanya terletak pada permukaan sel reseptor.

Beberapa peneliti berusaha mencari hubungan antara model adesi bakteri tersebut di atas dengan proses kejadian penderita diare. Hasil penelitian tersebut ternyata menemukan bahwa model adesi jenis agregasi sering dihubungkan

dengan terjadinya kasus-kasus diare, sedangkan untuk model adesi yang lain masih menjadi perdebatan.

Bobot molekul yang merupakan protein adesi ternyata terdapat variasi antara bakteri yang satu dengan yang lain. Contoh variasi ini misalnya dapat dijumpai pada *E. coli* yang memiliki tiga macam protein adesi yang berbobot : 15 kDa, 16 kDa dan 16,8 kDa. Sedangkan pada bakteri *E. coli* yang lain yang merupakan galur liar ditemukan protein yang berbobot 31 kDa. Di mana protein ini terdiri dari 2 sub unit protein CS31A-H dan CS31A-L. Penelitian selanjutnya bobot molekul antara CS31A-L ternyata sama dengan bobot molekul CF29K yang merupakan protein adesi pada *K. pneumoniae* (OIE, 2003).

Penelitian model adesi *K. pneumoniae* yang menggunakan kultur jaringan embrio usus manusia *Int-407* ditemukan 2 profil adesi protein CF29K. Protein yang pertama mempunyai bobot molekul 29 kDa. Di mana pelekatannya yang menyebar dan protein ini disandi oleh gen yang terletak pada plasmid. Protein adesi lain yang kedua ditemukan pada *K. pneumoniae* yang berbobot 29,5 kDa. Protein yang berbobot 29,5 kDa ini pada umumnya sering dijumpai pada galur liar dan disandi oleh gen yang terletak pada kromosom, model adesinya adalah agregasi (Sri Wienarsih dkk., 1998; Sumarno, 2000).

## 2.6 Imunogen dan Antigen

Imunogen merupakan suatu bahan, bila dimasukkan ke dalam tubuh dapat membangkitkan respons imun, sedangkan antigen merupakan suatu bahan yang dapat berkaitan dengan antibodi spesifik, namun tidak membangkitkan respons

imun. Oleh karena itu maka semua imunogen merupakan antigen, tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen (Altamer, 1991; Abbas *et al.*, 2000; Bratawidjaja, 2001). Bila ada suatu imunogen yang masuk ke dalam tubuh, maka respon imun yang terjadi dapat diamati baik secara seluler maupun humoral (Artama, 1996; Yoko *et al.*, 1998; Goldsby *et al.*, 2000).

Telah dijelaskan bahwa faktor yang dapat mempengaruhi imunogenesitas dari suatu bahan antara lain, keasingannya, ukuran molekul, kerumitan struktur kimiawi, konstitusi genetik, metode memasukkannya dan dosis yang diberikan (Susilohadi, 2003).

Walaupun diketahui bahwa molekul besar dapat suatu imunogen, tetapi hanya bagian atau daerah tertentu dari bagian molekulnya yang terlibat dalam ikatan dengan antibodi yang ditimbulkan. Daerah tersebut selain menentukan spesifisitas reaksi dengan antibodi, juga sebagian penentu timbulnya respon imun. Daerah ini disebut sebagian *determinant antigenic* atau epitop (Abbas *et al.*, 2000; Ishino *et al.*, 2000).

## 2.7 Epitop, Spesifisitas dan Sensitivitas

Istilah epitop adalah bagian dari antigen yang bereaksi dengan antibodi atau reseptor spesifik pada limfosit T. Epitop dahulu disebut antigenic determinant (Hedde *et al.*, 1979)

Pada individu yang normal, imunogen dalam tubuh akan menimbulkan respons imun baik humoral (*humoral immune response*) maupun seluler (*cell*

*mediated immune response*). Respons imun ini diatur oleh *immune response gene (irgenes)* yang berada dalam *Major histo compatibility complex (MHC)*.

Gen ini akan mengatur respons seluler, yang kemudian melalui subset limfosit T. (*T Helper* dan *T Suppressor*) akan mengatur respons humoral. Gen di MHC yang mengkode antigen dan terlibat pada penampilan imunogen asing adalah Gen kelas II (Nisnoff, 1985; Abbas *et al.*, 1991; Putra, 1993). Limfosit merupakan derivat dari stem sel yang telah mengalami proses diferensiasi dan maturasi. Proliferasi dan maturasi sel-sel darah yang normal akan dimulai dari sel-sel bakal (*precursor*) darah adalah suatu sel induk (*stem cell*) yang bersifat *pluri-potent* (PSC); PSC kemudian berdiferensiasi menjadi tiga macam sel induk, yaitu *megakaryocytic Stem Cell* (MeSc), *Erythropoetic Stem Cell* (ErSc) dan *Granulocytic-Macrophage Stem Cell* (G & MSc). Sedangkan LSC akan berdiferensiasi menjadi *B-Lymphocyte Stem Cell*, melalui suatu rangsangan menjadi sel plasma, dan *T-Lymphocyte Stem Cell* akan menjadi *T-Helper* (T-penolong), *T-Suppressor* (T-penghambat) serta *T-Killer* (T-pembunuh). Akibat gangguan gen dari salah satu kromosom, yang disebabkan oleh pengaruh virus, maka akan terjadilah gangguan dari proses diferensiasi dan proliferasi sel-sel darah. Karena diferensiasi terganggu maka terjadilah penghentian maturasi (*maturation-arrest*) pada suatu stadium tertentu dari proses maturasi sel-sel darah. Bila proses proliferasi berjalan terus, baik secara biasa maupun dipercepat, maka akan terjadilah penumpukan (*accumulation*) dari sel-sel yang terhenti maturasinya, disebut dengan leukemia. Leukemia Akut (LA), adalah proliferasi

abnormal dari sel-sel muda darah jenis blast dengan segala akibatnya (Roitt, 1986; Gosselin *et al.*, 1988).

## 2.8 Respon Imun

Respons imun adalah suatu tahapan proses kejadian yang teregulasi dengan sangat kompleks yang melibatkan beberapa tipe sel, sel yang menampilkan antigen APC (*antigen presenting cells*), sel T (*thymus derived lymphocytes*), sel B (*bone marrow derived lymphocytes*) sel-sel tersebut mengadakan interaksi satu sama lain baik langsung atau melalui mediator interleukin. Sistem imun dapat berhubungan dengan sistem komplemen, sistem pembekuan dan sistem fibrinolitik (Goldsby *et al.*, 2000).

Untuk membangkitkan respon imun yang efektif diperlukan adanya antigen (Ag) yang bersifat asing dan ditampilkan sedemikian rupa oleh *antigen presenting cells (APC)* yang sebelumnya telah mengalami proses yang cukup kompleks sehingga mudah dikenali oleh sistem imun sebagai ancaman, antigen ditampilkan secara efisien oleh *antigen presenting cells (APC)* akan dikenali oleh sel T *helper*. Sel T *helper* tersebut menjadi aktif yang selanjutnya akan memicu aktivasi sel limfosit yang lain, yaitu sel B dan sel T sitotoksik. Limfosit yang telah aktif akan mengadakan proliferasi dan menjalankan fungsi efekturnya yang spesifik dengan tujuan akhir untuk melenyapkan antigen baik yang bebas maupun yang terkait dengan sel. Setiap step ini diregulasi oleh sistem signal yang terdapat dalam sel sistem imun yang dibangkitkan dari lingkungannya. Signal ditangkap oleh sel melalui reseptor untuk antigen, reseptor untuk sitokin, reseptor untuk

protein matriks ekstraseluler, dan reseptor untuk molekul permukaan sel (*cells surface molecules*) yang diekspresikan oleh limfosit, APC, dan sel endotel atau sel epitel (Stites, 1997). Sel yang menerima signal akan memberikan respons bermacam-macam dalam bentuk aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi sel efektor dan relokasi dari sel atau produknya ke tempat di mana harus menjalankan fungsinya. Signal tersebut harus ditransduksikan melalui membran plasma dan sitoplasma untuk mencapai nukleus, dengan tujuan akhir untuk aktivasi transkripsi, translasi, dan produksi akhir spesifik protein biologis (Goldsby *et al.*, 2000).

## 2.9 Antibodi

Antibodi merupakan suatu imunoglobulin yang dihasilkan oleh sel plasma. Menurut letaknya, imunoglobulin pada dasarnya terbagi menjadi dua yaitu : 1) merupakan reseptor antigen permukaan (imunoglobulin ini termasuk protein integral pada membran). 2) merupakan imunoglobulin yang dilepaskan oleh sel, yaitu imunoglobulin sekresi (Hudson *et al.*, 2001)

Pada molekul antibodi dikenal 3 kategori epitop yaitu idiotipe, isotipe dan alotipe. Idiotipe merupakan epitop yang terdapat pada daerah variabel yang memberikan ciri khas dari antibodi, sedangkan isotipe terletak pada rantai konstan (C). Bila isotipe terletak pada rantai CH akan menentukan kelas dan sub kelas dari antibodi, dan bila isotipe terletak pada rantai CL, akan menentukan tipe dan subtipe dari antibodi. Sebagai contoh pada rantai MU ( $\mu$ ), mempunyai epitop yang

khas, sehingga akan menentukan anti IgM. (Grossman *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2001).

Setelah sampai pada membran sel, yaitu persis bersinggung dengan permukaan sebelah dalam dari membran sel, kemudian gelembung tersebut akan mendesak membran sel, kemudian gelembung tersebut akan mendesak keluar, kemudian membuka, dan muncullah suatu imunoglobulin.

Imunoglobulin dari hasil sintesis tersebut dapat bertindak sebagai imunoglobulin permukaan yaitu suatu imunoglobulin yang tertancap pada permukaan membran sebelah luar, dan juga dapat bertindak sebagai imunoglobulin sekretori, yaitu suatu imunoglobulin yang dilepas oleh sel ke dalam cairan tubuh (Goldsby *et al.*, 2000; Hudson *et al.*, 2001).

Ada beberapa faktor pengendali pertumbuhan yang terjadi pada siklus pembelahan sel, di antaranya adalah protein-Rb (pRb = protein retinblastoma) yang disandi oleh gen RBb dan protein-53 (p53) yang disandi oleh gen P53, kedua jenis protein ini termasuk suppressor protein yang bekerja pada inti sel.

Penyuntikan imunogen ke dalam tubuh hewan imunokompeten, akan mengakibatkan limfosit B mengalami proliferasi dan differensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi. Periode terjadinya pembentukan antibodi dapat dibedakan menjadi tiga fase (Robert, F, 1996, Splitter, 1996) yaitu :

1. Fase logaritmis : pada fase ini terjadi kenaikan kadar antibodi secara logaritmis dalam waktu 4-10 hari.



2. Fase datar : pada fase ini, kadar antibodi yang diukur adalah antibodi yang diproduksi oleh sel plasma, setelah dikurangi dengan antibodi yang telah berikatan dengan antigen.
3. Fase penurunan : pada fase ini, antibodi yang mengalami katabolisme yang berkaitan dengan antigen, lebih banyak daripada yang diproduksi (Harlow *et al.*, 1988; Goodman, 1994).

Siklus pembelahan sel (khususnya limfosit B), pada dasarnya sama dengan pembelahan sel pada umumnya yaitu dibagi dalam dua kelompok : mitosis (M) dan interval antara akhir mitosis dan awal dari mitosis berikutnya, yang disebut interfase.

Setelah terjadi penggandaan DNA, barulah sel tersebut dapat melakukan pembelahan diri. Dengan demikian, maka penggandaan DNA terjadi sebelum fase mitosis yaitu pada interfase. Periode sintesa DNA pada interfase, disebut sebagai fase sintesis (S), fase ini terletak di antara gap 1 (G1) pada akhir mitosis dan gap 2 (G2) pada awal mitosis (Jack *et al.*, 1994; Safitri, 1993).

Dilaporkan pula bahwa pemberian imunogen secara berulang akan menimbulkan peningkatan jumlah sel memori (Goodman *et al.*, 1994; Goldsby *et al.*, 2000). Adanya sejumlah sel memori tersebut, bila diberi suatu rangsang imunogen yang sama, akan terjadi proses proliferasi dan diferensiasi yang sangat cepat. Seperti halnya limfosit B dan KGB bila disensitisasi dengan suatu imunogen secara berulang, maka limfosit tersebut dalam satu siklusnya memerlukan waktu kurang dari 6 jam (Abbas *et al.*, 2000; Bratawidjaja, KG, 2001).

## 2.10 Respon Imun Humoral

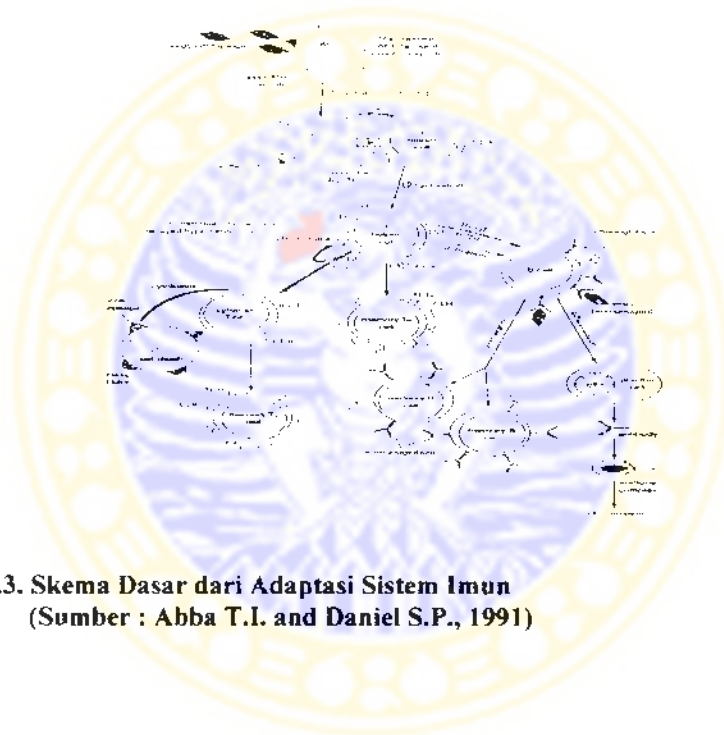
Bersama dengan masuknya antigen ke dalam tubuh maka perangkat imun akan memberikan respons berupa suatu kaskade reaksi yang terkenal dengan dogma sentral imunologi. Sesuai dengan banyaknya antigen determinan (epitop), maka suatu antigen akan menstimulasi sejumlah sel limfosit B yang mana hanya sel yang mempunyai reseptor sesuai dengan masing-masing epitop yang selanjutnya berproliferasi. Hal ini sesuai dengan hipotesis dari Clonal selection Theory dari Burnet yang mengatakan bahwa : Klon limfosit imunokompeten mempunyai reseptor pada permukaan sel yang sangat spesifik dan identik dengan imunoglobulin yang disintesis oleh sel progeninya. Reseptor ini adalah imunoglobulin akan tetapi masih terikat membran sel melalui suatu tanker yang terdiri dari kira-kira 30 asam-asam amino hidrofobik (Roitt *et al.*, 1998). Setiap limfosit-B yang imunokompeten mempunyai reseptor antibodi yang unik dan spesifik. Masing-masing limfosit B akan mensintesis antibodi dengan kespesifikan yang telah ditentukan sebelum kontak dengan antigen. Antigen yang sesuai akan menstimulasi klon-klon limfosit spesifik untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori berkaitan dengan reseptornya sendiri-sendiri. Oleh karena itu maka dalam tubuh mamalia terdapat berbagai macam klon sel limfosit-B yang telah ditentukan (*predetermine*) untuk suatu antigen determinan tertentu sehingga masing-masing populasi sel B mempunyai potensi untuk mensintesis antibodi spesifik. Bila antigen berhasil melewati berbagai barrier dan masuk dalam tubuh mamalia maka terjadilah rangkaian reaksi

imun baik seluler maupun humoral akibatnya adanya interaksi yang spesifik antara masing-masing klon sel limfosit-B dengan antigen. Hal ini berarti respons imun itu beraneka ragam dan demikian pula sejumlah klon dapat sekaligus terstimulasi tergantung dari potensi dan jumlah epitop suatu antigen, dengan kata lain imun respons adalah heterogen. Ini berarti pula bahwa antibodi yang dibebaskan sel pun mempunyai kespesifikan yang heterogen dan berbeda-beda. Dengan demikian antiserum konvensional adalah amat heterogen, berbeda sifat, kelas dan subkelas, afinitas dan spesifisitas. Antibodi dari serum mamalia seperti tersebut di atas disebut dengan antibodi poliklonal. Sebaliknya antibodi yang diproduksi dari satu klon sel menghasilkan hanya satu macam imunoglobulin yang disebut dengan antibodi monoklonal. Anti serum yang heterogen itu sampai pertengahan 1980 an masih digunakan untuk diagnosis, terapi, profilaksis dari beberapa penyakit tertentu dan juga dari antibodi campuran seperti itu adalah mempunyai keanekaragaman susunan, sulit standarisasi dan umumnya karena adanya keanekaragaman antibodi maka kurang dari 1% yang diharapkan spesifik terhadap epitop yang dikehendaki. Sebaliknya monoklonal memiliki sifat yang berlawanan yaitu spesifisitas yang sudah tertentu dengan afinitas yang tetap, serta memiliki subkelas atau kelas imunoglobulin tertentu dan dapat pula mempunyai fungsi biologis tertentu yang meniadakan semua kelemahan-kelemahan dari antibodi poliklonal (Burgess, 1998).

Imunitas humoral diperantarai oleh antibodi produksi dari sel B. Fungsi fisiologis dari antibodi adalah untuk menetralisasi dan eliminasi antigen yang menginduksinya. Eliminasi antigen atau mikroba membutuhkan beberapa

mekanisme efektor yang tergantung dari kelas atau isotipe antibodi. Sistem imun humoral memiliki kapasitas untuk memberikan respon terhadap berbagai antigen dengan membentuk kelas antibodi yang berbeda. Respons antibodi bervariasi

tergantung dari tipe antigen, keterlibatan sel T, riwayat paparan antigen dan tempat masuk anatomis dari antigen (Roitt, 1998; Abbas *et al.*, 2000).



**Gambar 2.3. Skema Dasar dari Adaptasi Sistem Imun**  
(Sumber : Abba T.I. and Daniel S.P., 1991)

## 2.11 Dasar-dasar imunokimia

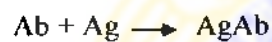
### Interaksi antigen-antibodi *in vitro*

Interaksi antigen-antibodi *in vitro* yang merupakan dasar imunokimia dapat dibagi dalam dua kategori yaitu kategori primer dan kategori sekunder.

- a. Interaksi antigen-antibodi primer adalah permulaan reaksi dan merupakan pengikatan antigen-antibodi tingkat molekular. Biasanya reaksi ini tidak terlihat dengan mata biasa tetapi memerlukan suatu indikator, misalnya dengan melabel antigen atau antibodi dengan berbagai zat seperti radioisotop, enzim atau zat warna fluoresein dan lain-lain. Sesuai dengan label yang dipakai, maka teknik penetapan interaksi antigen-antibodi dengan label radioisotop disebut teknik RIA, dan teknik yang menggunakan label enzim disebut ELISA, sedangkan teknik yang menggunakan indikator fluoresein disebut imunofluoresensi. Teknik-teknik itu bermanfaat untuk penetapan antigen atau antibodi yang kadarnya rendah.
- b. Interaksi antigen-antibodi sekunder dapat mengakibatkan presipitasi atau aglutinasi. Reaksi antigen-antibodi dapat terjadi langsung, tetapi kadangkala reaksi baru terjadi apabila ada komplemen. Apabila antigen yang ada dalam larutan direaksikan dengan antibodi spesifik, akan terbentuk kompleks antigen-antibodi yang besar sehingga kompleks mengendap dan terjadi presipitasi. Bila antigen itu terikat pada suatu partikel, misalnya partikel lateks, kuman, eritrosit maupun partikel lain, maka interaksi antigen-antibodi tersebut menyebabkan terjadinya gumpalan atau aglutinasi. Interaksi antigen-antibodi sekunder merupakan dasar berbagai jenis teknik uji *in vitro*, misalnya teknik imunodifusi, aglutinasi lateks, hemaglutinasi, uji fiksasi komplemen, turbidimetri, nefelometri, dan lain-lain (Porter, 1979; Kresno, 1996).

Ada dua jenis kekuatan yang mengikat antigen pada antibodi. Pertama – tama daya *coulombic*, yaitu daya tarik menarik antar gugusan molekul antigen dan antibodi yang mempunyai muatan listrik yang berlawanan. Makin dekat jarak antigen dan antibodi, makin cepat keduanya berikatan. Daya lain yang mengikat antigen pada antibodi adalah kekuatan van der waals. Dasar daya ikat ini adalah kesesuaian antara antigen dengan antibodi.

Ikatan antibodi dengan antigen merupakan ikatan yang reversibel dan mudah terlepas (disosiasi). Disosiasi bergantung pada kekuatan ikatan itu yang dinyatakan dengan suatu Konstante K, yang diperoleh dengan rumus :



$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

[Ag] = Banyaknya antigen *combining site* pada antibodi

[Ab] = Konsentrasi antigen

Makin sesuai antibodi dengan antigen, reaksi makin bergeser ke kanan dan kompleks antigen-antibodi makin sulit berdisosiasi. Ini berarti bahwa antibodi mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen bersangkutan (Roitt, 1985; Charles *et al.*, 1993).

## 2.12 Protoonkogen dan Onkogen

Timbulnya sifat keganasan dari suatu sel, tidak cukup hanya ada satu gen yang mengalami mutasi melainkan terjadinya keganasan karena adanya akumulasi dari berbagai mutasi (Putra, 1993; Suryohudoyo, 2000).

Banyak teori yang menjelaskan bahwa mutasi gen merupakan sumber dari munculnya suatu keganasan. Seperti halnya sumber dari munculnya suatu keganasan. Seperti halnya onkogen (*mutated protooegen*), gen ini dapat menyandi suatu protein yang bersifat overaktif. Misalnya gen erb-B atau gen erb-B2. Gen erb-B atau erb-B2 mengkode suatu protein yang mempunyai peranan spesifik, dalam menstimulasi faktor pertumbuhan atau reseptor dari faktor pertumbuhan pada sel (Abbas *et al.*, 2000).

Pada onkogen akan menyandi protein yang bersifat *overaktif*, sedangkan mutasi yang terjadi pada gen tumor supresor akan menyandi protein yang bersifat inaktif (Nossal, 1998; Suryohudoyo. 2000; Dachlan P, 2001).

*Lymphocytosis* dapat terjadi karena infeksi virus EBL, kenaikan jumlah *limphocyte* secara persisten, menyebabkan terjadinya *lymphocytosis persistent* (Norimine *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2001). Benjolan-benjolan di seluruh *lymphoglandulae*, pembesaran hati yang menyebabkan hepatomegali, pembesaran lambung, adanya benjolan pada ginjal, limpa dan jantung ; sebagai akibat adanya proliferasi dan differensiasi abnormal dari sel-sel *lymphocyte*; pada sapi normal umur 0 –1 tahun jumlah *lymphocyte* < 10.000 ; dikatatakan *suspect* terineksi EBL bila jumlah *lymphocyte* 10.000-12.000; dan positif terinfeksi EBL bila jumlah *lymphocyte* > 12.000. Pada sapi umur 1-2 tahun, jumlah *lymphocyte* normal < 9.000; *suspect* 9.000 – 11.000; positif > 11.000. Pada sapi umur 2-3 tahun, normal < 7.500; *suspect* 7.500 – 9.500; dan positif > 9.500. Pada sapi umur 3-4 tahun, normal < 6.500; *suspect* 6.500 – 8.500; dan positif > 8.500. Pada sapi umur

lebih dari 4 tahun, normal *lymphocyte* < 5.000; *suspect* 5.000 – 7.000; dan positif > 7.000 (Theilen *et al.*, 1987; Trainin, *et al.*, 1990).

Molekul-molekul antibodi yang ada secara alami dalam membran luar sel-sel kanker seperti *lymphoma* yang berkembang dari sel B dan menghasilkan molekul-molekul antibodi. Antibodi ini menghasilkan molekul yang dapat membedakan sel-sel kanker dari sel-sel serupa (sel-sel penghasil antibodi non kanker). Beberapa mutasi mengaktifkan gen-gen yang dinamakan onkogen yang mendorong pertumbuhan sel secara tak terkendali. Pada mutasi dalam gen supresor tumor dapat menyebabkan hilangnya rem normal untuk mengendalikan pertumbuhan sel yang tidak terkendali (Blease, 1997; Splitter *et al.*, 1996).

### 2.13 Darah

Darah adalah cairan yang kompleks, di mana terkandung di dalamnya bahan-bahan seperti *erythrocyte*, *leucocyte* (limposit, monosit, eosinopil dan netropil), *thrombocyte*, protein-protein, vitamin-vitamin dan hormon-hormon. Plasma darah didapat dengan menambahkan antikoagulan kedalam darah, dan di dalamnya masih terdapat fibrinogen. *Anticoagulensia* yang digunakan adalah EDTA (*Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid*), pada pemeriksaan gangguan pembekuan darah, *anticogulensia* yang digunakan adalah *citras natricus* 3.8 %. Serum darah didapat dari hasil darah yang dibekukan pada suhu kamar, kemudian *dicentrifuge* 1500 rpm selama 10 menit ; di dalam serum darah tidak didapatkan fibrinogen; tapi didapatkan elektroit seperti K, Na, Cl, Creatinine dan Ureum.



## 2.14 Pemeriksaan Limposit

Untuk pemeriksaan limposit (*leucocyte cell*) digunakan minyak imersi. Perhitungan limposit menggunakan alat *haemocytomezer superiod* yang terdiri dari selang khusus untuk menghitung sel leukosit (limposit) dan alat *haemocytomezer* berupa bentukan dek gelas yang bergaris ini membentuk kolom-kolom, *neubauer improved, double*, ruting. Prinsip pada perhitungan *defferential* adalah bila jumlah limposit dalam batas normal 2500-7500 (rata-rata 4000) per  $\text{mm}^3$  untuk hewan sapi, dan 200-500  $\text{mm}^3$  untuk hewan coba kelinci. Perhitungan jumlah limposit normal 10.000-20.000, maka yang dihitung 200 sel / mm (OIE, 2003). *HI test* negatif tidak terjadi pengendapan *erythrocyte*, karena tidak terjadi ikatan antigen dan antibodi spesifik maka akan terlihat aglutinasi berarti negatif antibodi. Perhitungan *differensial* dilakukan dengan mengadakan identifikasi dan perhitungan paling sedikit 100 leukosit; perhitungan dilakukan pada daerah *counting area*. *Counting area* dimulai dari satu sisi dan bergerak menuju sisi yang lain, kemudian pindah sejauh 2-3 lapangan pandang ke kiri atau ke kanan. Untuk memudahkan penghitungan dapat dipergunakan cara dengan membuat kolom-kolom, dan masing-masing di bagi menjadi 10. Limposit dicatat dari kolom nomer 1, bila jumlahnya sudah 10 kita pindah mengisi kolom kedua dan seterusnya. Sehingga setiap kolom mengandung 10 limposit, bila kesepuluh kolom sudah terisi, berarti kita sudah mendapatkan 100 sel. Agar darah yang akan diperiksa tidak membeku, dapat dipakai bermacam-macam antikoagulan, antara

lain, EDTA (*Ethylene diamine Tetra Acetate*), pemakaian 1,5 mg EDTA dalam 1 ml darah sebagai garam natrium atau kaliumnya dibuat dalam bentuk larutan 10% EDTA tidak berpengaruh terhadap besar dan bentuk lekosit maupun eritrosit.

Cara membuat darah EDTA adalah dengan menyediakan wadah kemudian ditetaskan 2-3 tetes larutan EDTA 10% dengan pipet Pasteur ke dalamnya. biarkan mengering. Kemudian dialirkan 2 ml darah melalui dinding wadah. setelah itu wadah ditutup dan segera dicampurkan dengan gerakan melingkar searah jarum di atas meja perlahan-lahan selama 60 detik.

Darah EDTA dapat disimpan dalam suhu 4<sup>o</sup> C, paling lama 24 jam untuk pemeriksaan hemoglobin, hematokrit hitung lekosit, hitung eritrosit dan laju endap darah. Bila akan diperiksa biarkan sampai mencapai suhu kamar; dan untuk membuat sediaan apus dapat dipakai darah EDTA yang disimpan paling lama 2 jam. Antikoagulan yang lain adalah Larutan Oksalat dan Larutan Trisodium sitrat (Djalil S, 1994; OIE, 2000).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual

Penyakit infeksius EBL sampai dengan saat ini masih merupakan masalah pada peternakan sapi baik di Indonesia maupun di negara-negara lain. Berdasarkan fakta di lapangan, sampai saat ini belum ada pengobatan yang tepat, dan belum ditemukannya vaksin untuk mengatasi penyakit EBL. Selama ini di Indonesia untuk mencegah kasus penyakit EBL hanya dengan melakukan diagnosis dini dengan uji serologis melalui uji imunodifusi dengan *Agar Ouchterlony* dan melakukan karantina ketat. Kerangka konsep yang mendasari penelitian ini adalah informasi ilmiah bahwa partikel virus EBL masing – masing terdiri dari *nucleo capsid* pada protein p 15 kDa, *transmembrane* pada protein p 24 kDa dan gp 51 kDa pada bagian *envelope* virus EBL. Virus EBL biasanya adalah protein hemaglutinin, dan protein hemaglutinin bersifat sebagai molekul adhesin. Virus EBL mempunyai epitop yang sama di daerah regio manapun juga, berperan dalam menginduksi pembentukan antibodi (OIE. 2000; Bonzio, 2006).

Dari tinjauan Kepustakaan telah diuraikan tentang partikel virus EBL, peran molekul adhesin, protein hemaglutinin *Egp 51*, serta perkembangan vaksin sub unit hemaglutinin, berdasarkan dari urutan tersebut disusunlah kerangka konseptual seperti tertera pada gambar 3.1.

Penyakit EBL mempunyai komponen antigen yang menetap pada darah tepi limfosit-B. Untuk membangkitkan respon imun yang efektif diperlukan adanya antigen (Ag) yang bersifat asing dan ditempelkan sedemikian rupa oleh *antigen presenting cells* (APC). Kandidat vaksin yang akan dibuat adalah hasil isolasi dan karakterisasi protein hemagglutinin imunogenik *envelope* virus EBL isolat lokal sebagai pembangkit anti EBL (Kenneth *et al.*, 1996).

Mekanisme limfositosis persisten belum terungkap yang merupakan salah satu kendala mengapa belum ditemukannya vaksin yang tepat untuk penyakit EBL (Xu *et al.*, 1993).

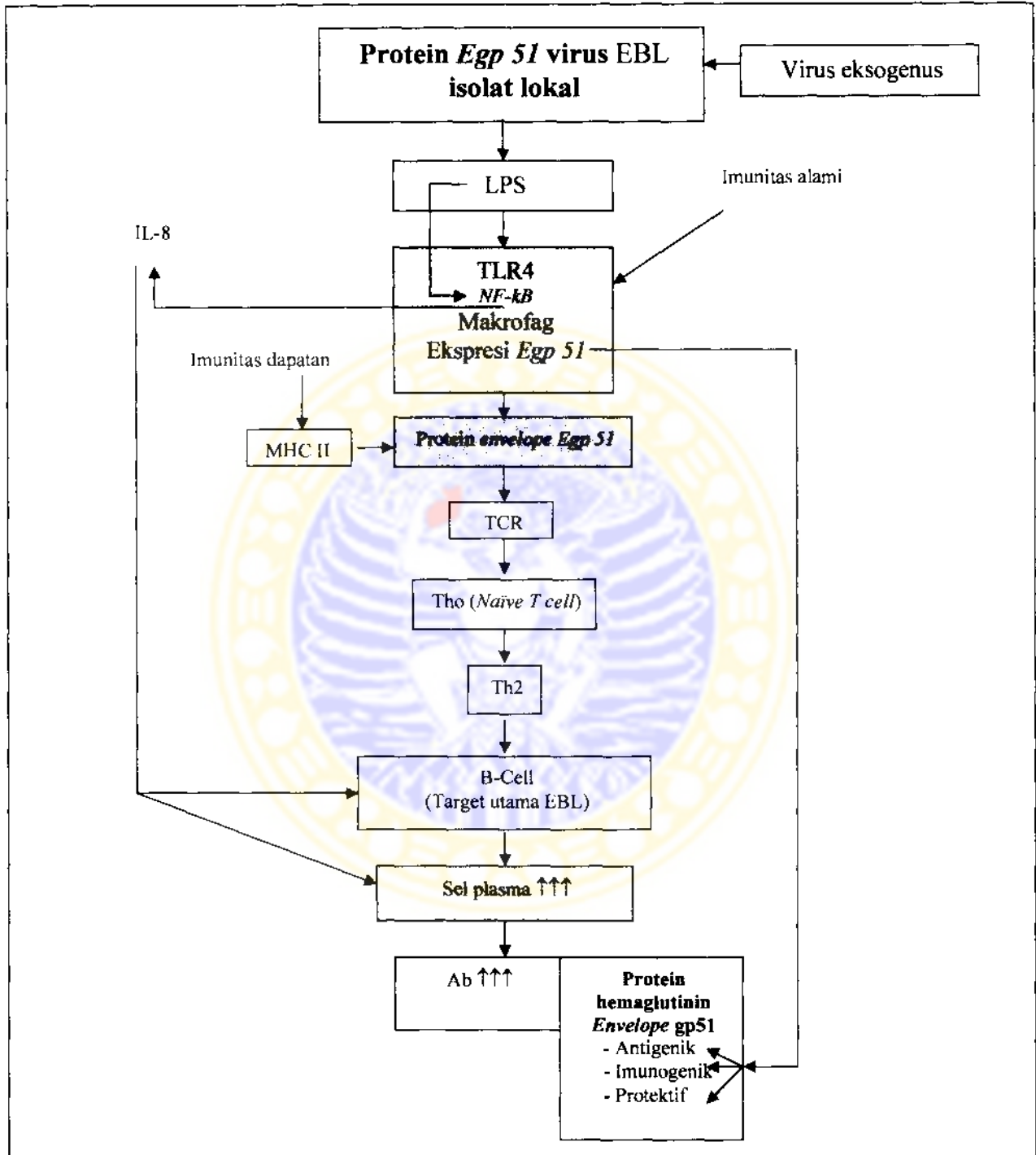
Kemudian berdasarkan pernyataan Tizzard (1988) bahwa protein yang baik dan bersifat imunogenik dapat menimbulkan antibodi harus memiliki berat molekul di atas 10.000 Dalton, sedangkan berat molekul virus EBL yang digunakan sebagai sampel penelitian ini memiliki berat molekul lebih besar yaitu 51.000 Dalton (kDa). Oleh karena itu diharapkan protein yang diisolasi dan dikarakterisasi dapat bersifat antigenik maupun imunogenik.

Dalam skema kerangka konseptual, digambarkan bagaimana protein hemagglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal membangkitkan timbulnya respon imun yang terdiri dari *Innate Immunity*, kemudian diikuti oleh *Adaptive Immunity*.

EBL adalah *retro virus* onkogenik, eksogenus dan sebagai antigen penyebab terjadinya *Enzootic Bovine Leukosis*. Akibat infeksi EBL dapat menyebabkan terjadinya limfositosis persisten. Dengan limfosit B sebagai sasaran utama untuk virus EBL, maka virus ini pada fase imunitas alami (*Innate*

*immunity*), membutuhkan LPS (Lipopolisakarida), yang merupakan konstituen virus EBL, sebagai *ligand* (*PAMP = Pathogen Associated Molecular Pattern*) yang berguna bagi virus EBL untuk memasuki makrofag melalui *TLR 4 (Toll Like Receptor 4; Pattern Recognition Receptor)*. LPS mengaktifkan *NF- $\kappa$ B* dalam makrofag dan meningkatkan sintesis IL-8 (Kabeya *et al.*, 1998; Gabriella *et al.*, 2003). Ekspresi gp 51 dalam makrofag meningkat oleh LPS (Gabriella *et al.*, 2003; Bondzio, 2006). Peningkatan IL-8 berfungsi mengaktifkan proliferasi dan diferensiasi sel B. Kompleks MHC kelas II dan *Egp 51* berinteraksi dengan *Th0 (Naive T Cell)* yang memacu aktifitas profil Th2. Meningkatnya ekspresi *Egp 51* dan meningkatnya IL-8 akan memacu aktifitas sel B untuk memproduksi antibodi (Meirom *et al.*, 1997; Pelzer *et al.*, 1997; Teifke *et al.*, 2005). Akhir dari kerangka konseptual ini melahirkan suatu hipotesis apakah sub unit protein hemaglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal bersifat antigenik, imunogenik dan protektif.

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan atas rumusan masalah dan tujuan serta kerangka konseptualnya, maka dapat ditarik hipotesis sebagai berikut :

- Sub unit protein hemaglutinin *E gp51* virus EBL bersifat imunogenik dan protektif.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang tiga tahap terdiri dari Tahap satu untuk mendapatkan *cell line* yang baik sebagai media penumbuh virus EBL, dan sekaligus membuktikan bahwa virus yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar virus EBL. Tahap dua merupakan penelitian kualitatif untuk mendapatkan protein hemaglutinin *Egp 51* kDa yang bersifat imunogenik. Tahap tiga merupakan penelitian kuantitatif untuk membuktikan protein hemaglutinin *Egp 51* kDa bersifat protektif.

#### 4.2 Cara Kerja

##### 4.2.1 Penelitian Tahap I

##### 4.2.1.1 Pembuatan *Cell Line Ovine Lung (OL)* (Johan, 1975)

Pembuatan *Cell OL (Ovine Lung)* sebagai media penumbuh virus EBL. *Cell OL* dibuat dengan jalan mengambil janin domba muda umur 4 minggu dari Rumah Potong Hewan (RPH) Surabaya (gambar 5.1.1). Janin domba yang diperoleh dari RPH dimasukkan kedalam tempat yang steril yaitu beker gelas yang telah diisi dengan cairan media *eagle over lay* yang mengandung antibiotika kanamycin dengan dosis tinggi 0,01 mg/1000ml dalam suhu dingin 4<sup>0</sup>C. Janin dipotong kecil – kecil di dalam *erlen meyer*, kemudian ditripsinasi sambil diputar di atas *stirer*

*Stored cell OL* yang *confluent* (penuh) dibagi dua, digunakan sebagai *working seed* dan *master seed cell* ditripsinasi, kemudian ditambahkan *media stored (Eagle*



*overlay*) 40%, (*Foetal Calf Serum*) 40%, TPB 10%, DMSO 10%, hasil tripsinasi dicampurkan dengan *media stored*, dimasukkan botol *Wheton* (15-20 ml), disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  sampai  $-196^{\circ}\text{C}$  (*Liquid Nitrogen*).

#### 4.2.1.2 Inokulasi dan Pengembangan Virus dalam *Cell OL* dan Titrasi Virus

##### 4.2.1.2.1 Inokulasi dan Pengembangan Virus dalam *Cell OL*

Virus EBL didapat dari lapangan, diambil dari sapi di Lembang, Jawa Barat, dan dipasasekan sampai pasase 15 oleh BPMSOH Bogor, kemudian dipasase lanjut di Pusat Veterinaria Farma sampai adaptasi pada pasase 29. Suspensi virus EBL, sebanyak 5-10 ml diinokulasikan pada *cell OL*, di dalam *roux* botol yang berkapasitas 100 ml, diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam, kemudian ditambahkan media penumbuh virus yang terdiri dari media RPMI ditambah serum sapi steril inaktif (dipanaskan pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit) sebanyak  $\pm 3\%$ . Diobservasi terhadap pertumbuhan *Chytopathogenic Effect (CPE)*, virus dipasase sampai pasase 29. Virus EBL dapat dikembangkan dalam kultur jaringan *cell* (biakan jaringan), *ovine lung (OL)* yaitu biakan sel paru janin domba, dan menimbulkan *cyathogenic effect* atau *CPE*. *CPE* adalah hasil infeksi virus EBL pada *monolayer cell* yang semula *smooth* kemudian 5-7 hari setelah inokulasi akan timbul kerusakan *cell* yang membentuk bulatan-bulatan yang merupakan bentukan *CPE* (Bird, *et.al*, 1981; Johnson *et.al*, 1987, OIE 2000). Pada penelitian ini menggunakan *cell OL*, karena pada penelitian sebelumnya virus EBL tumbuh paling baik pada *cell OL* (Hasdianah, 2000).

#### 4.2.1.2.2 Titrasi Virus

Harga sensitivitas dihitung dengan rumus Karber, yang dihitung harga negatif *CPE*. Negatif *CPE* berarti positif antibodi. Dilakukan pada *Cell OL* dalam *mikroplate* datar yang mempunyai 96 sumuran Dibaca hasil titer dibawah mikroskop (*inverted microscope*) dengan melihat adanya kerusakan *cell*, positif *CPE* dihitung dengan metode Karber (Johan, 1975 ; OIE, 2000).

#### 4.2.1.3 Pembuktian adanya virus EBL

##### 4.2.1.3.1 Adanya *cytophathogenic effect (CPE)*

Keberadaan virus EBL telah diterangkan di atas dapat dilihat melalui inokulasi virus EBL di dalam *cell line OL*. Setelah melalui masa inkubasi kurang lebih 7 hari maka akan ditemukan adanya *cytophathogenic effect* yang menunjukkan adanya paparan virus di dalam *cell line OL*, dan membuktikan adanya virus EBL yang telah menginfeksi *cell line OL*.

##### 4.2.1.3.2 Uji *Postulat Koch*

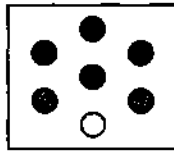
Virus dapat dideteksi melalui uji *Postulat Koch*, dengan menyuntikkan virus pada hewan coba domba, akan terlihat benjolan-benjolan pada *limfoglandulae*, di bawah kulit, *lambung*, *hepar* pada hampir seluruh bagian tubuh, bila bagian tersebut diiris akan terlihat nanah berwarna putih kekuningan yang merupakan masa tumor EBL (Harlow, *et.al*, 1986; Ressang, 1987).

Pada uji *Postulat Koch* digunakan untuk menentukan apakah virus EBL mempunyai sifat yang berbeda dengan virus alam setelah dilakukan pasase sampai 29 kali pada *cell OL*. Pada uji ini dilakukan dengan cara menyuntikkan virus EBL sebanyak 4 ml (2 ml suspensi virus EBL ditambah 2 ml *freund adjuvant complete*) pada hewan domba, dieramkan selama 49 hari terdiri dari penyuntikan pertama, inkubasi satu minggu, kemudian penyuntikan kedua (*Booster I*); setelah dua minggu dilanjutkan dengan penyuntikan ketiga (*Booster II*); dieramkan selama 28 hari dipanen darahnya untuk diambil serumnya, kemudian dilakukan uji AGID. Hewan coba yang telah disuntik viru EBL setelah masa inkubasi selain diambil serumnya, juga diseksio untuk melihat perubahan patologi anatomisnya yang akan menunjukkan adanya gejala EBL, antara lain terlihat tumor di bagian luar dan bagian dalam tubuh. Bagian tumor tersebut bila dipotong akan keluar nanah yang putih kekuningan, kental dan keras yang merupakan massa tumor dari leukemia. Setelah 46 hari domba diinjeksi dengan virus EBL timbul gejala spesifik *natural EBL infection*, dimana terlihat adanya tumor di bagian luar dan bagian dalam tubuh. (Ressang, 1986; Ishino, 2000).

#### 4.2.1.3.3 Uji agar gel imunodifusi

Virus dapat dideteksi melalui uji *ouchterlony* agar gel imunodifusi, dimana terbentuknya garis presipitasi dari ikatan antigen-antibodi spesifik menggunakan antigen tes kit produk Pusvetma dan tes kit Kanada yang direaksikan dengan serum sapi sebagai antibodi, maka hasil positif bila terlihat garis putih di dalam imunodifusi tersebut (Roitt, *et.al*, 1999; Nakajima, *et.al*, 2000; Hasdianah, 2000; Hudson, *et.al*,

2001). Agar imunodifusi dimasukkan ke dalam plate ukuran 15 ml kemudian dilubangi menjadi 7 lubang dengan jarak 3 mm.



Bagian tengah ditetesi antigen virus EBL 0,05  $\mu$  dan bagian luar ditetesi 0,05  $\mu$  serum (antibodi) diinkubasikan dalam temperatur 37° C, suasana lembab, dengan memberi alas kertas saring yang dibasahi untuk mencegah kekeringan pada agar. Diinkubasikan selama 3 kali 24 jam → di sebelah dilihat timbulnya garis berwarna putih yang merupakan hasil ikatan antigen-antibodi spesifik.

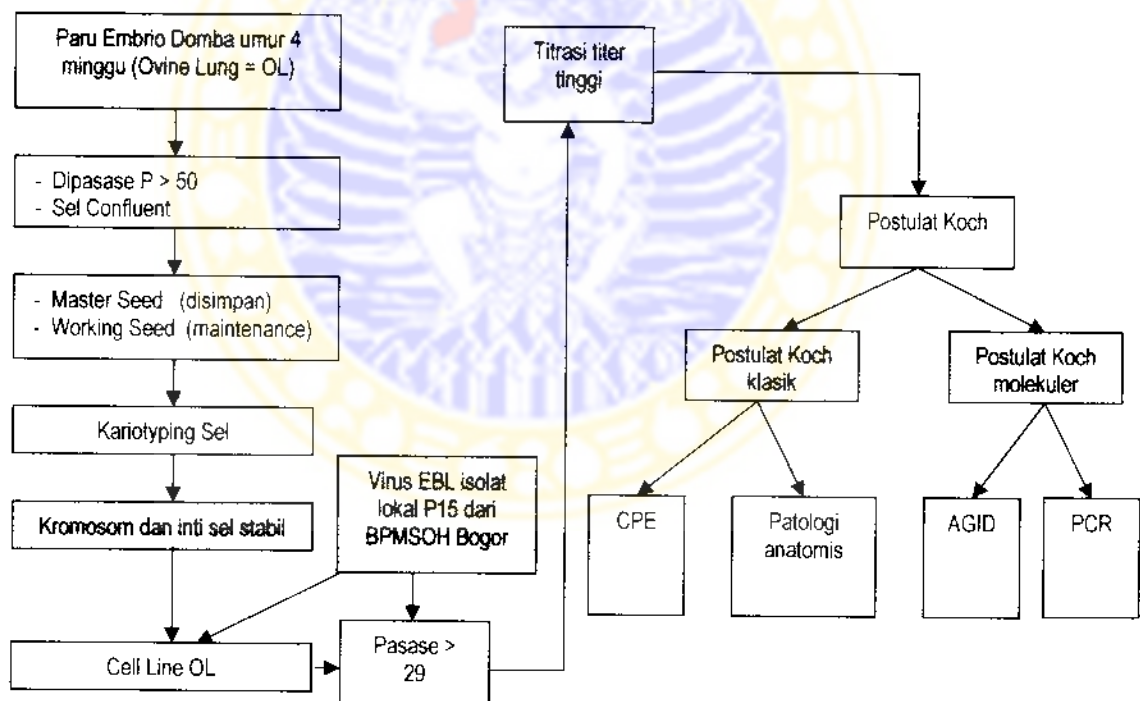
#### 4.2.1.3.4 Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan amplifikasi bagian gen *Egp 51* virus EBL

Adanya virus EBL dapat pula dideteksi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dengan mengamplifikasikan bagian gen *envelope gp 51* virus EBL pada posisi 603 bp. Virus EBL adalah virus *single stranded RNA*, oleh karena itu uji PCR yang dilakukan adalah *Reverse Transcriptase* (RT) PCR. Ekstraksi RNA dari isolat virus menggunakan Qiagen RNA easy TM RNA Isolasi Kit (cat#74104), metode menurut OIE, 2003, dengan susunan Primer (3' dan 5' primer) gp 51 adalah

3' GGG-CCG-CGA-GAG-CTC-AAC-GTC 5'

Splitter *et al.*, (1996) ; OIE (2000).

Kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan Template RNA, didenaturasi dengan pemanasan  $92^{\circ}\text{C}$ . Larutan reaksi kemudian didinginkan suhunya sampai  $42^{\circ}\text{C}$ , sehingga primer memperkuat rangkaian target RNA. Primer kemudian memanjang dengan RT untuk mensintesa cDNA. Setelah cDNA terbentuk dapat dilanjutkan dengan reaksi PCR. PCR terdiri dari 25-30 putaran, dan setiap putaran terdiri dari 3 langkah, yaitu : *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Visualisasi dilakukan dengan gel elektroforesis, menggunakan kadar gel 2% dengan *ethium bromide* 9%, kemudian dilakukan pemotretan.



**Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian Tahap I**

## 4.2.2 Penelitian Tahap II

Penelitian Tahap dua merupakan penelitian kualitatif, yang terdiri dari serangkaian penelitian sebagai berikut :

### 4.2.2.1 Pemurnian virus

Pemurnian virus dilakukan untuk mendapatkan partikel virus EBL yang murni untuk analisis dan karakterisasi protein antigenik dan imunogenik. Pemurnian virus ini dilakukan sepanjang diperlukan untuk mengkarakterisasi protein virus EBL. Supernatan dari biakan sel yang telah diinokulasi dengan virus EBL kemudian dikoleksi dengan menggunakan tabung 50 ml. Hasil koleksi supernatan biakan virus pada kultur sel kemudian dituangkan pada tabung *ultra centrifuge* yang berisikan 5 ml sucrose dengan konsentrasi yang bertingkat mulai dari 20%, 40%, 50%, 60% dan 80% kemudian dituangkan suspensi virus sebanyak 4 ml dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 35.000 rpm (*Ultra Centrifuge* L8-60M, Beckmann) dengan temperatur 4°C. Hasil disentrifugasi ditunggu sampai 2 jam dengan menggunakan sinar yang berlawanan arah dan sampai terlihat cincin putih. Hasil pertanda cincin putih menunjukkan partikel virus EBL sebanyak 1,22 g/cm<sup>3</sup> / 4 ml suspensi virus pasase 29 dengan titer 10<sup>7,8</sup> TCID<sub>50</sub> (Trudei *et al.*, 1990, Artama, 1996).

### 4.2.2.2 Pemurnian protein *envelope* virus EBL

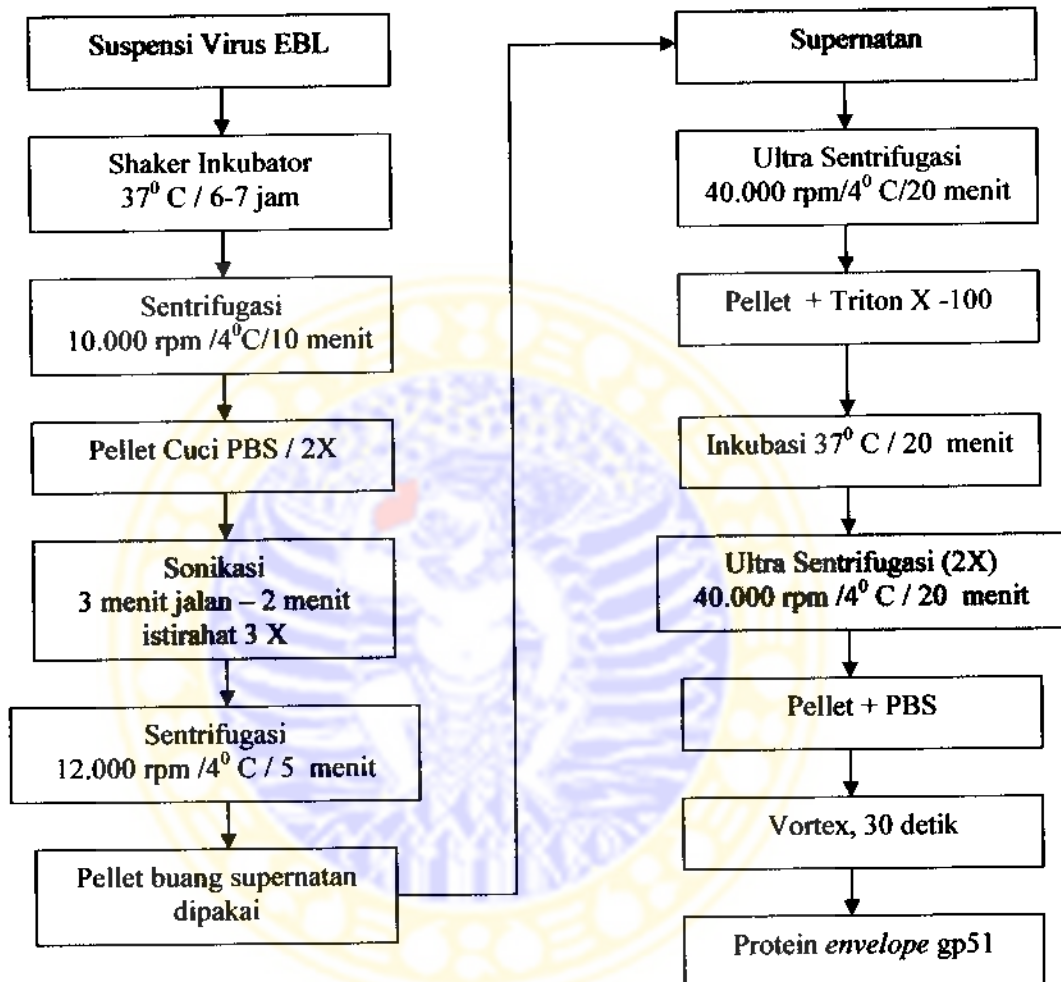
Untuk isolasi protein *envelope* gp 51 virus EBL ini digunakan metode Matsujama (1984) yang dimodifikasi dengan cara virus EBL dari *Master Seed*

dicairkan dibuat suspensi dengan penambahan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan kemudian suspensi virus EBL dimasukkan inkubator (*shaker incubator*) suhu 37<sup>o</sup> C selama 6-7 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi memakai *Refrigerated Centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10menit pada suhu 4<sup>o</sup> C, sehingga didapatkan supernatan dan endapan (*pellet*). Supernatan dibuang dan pellet dicuci dengan PBS, pencucian dilakukan 2 kali sehingga didapatkan *supernatan* dan *pellet* yang mengandung protein terlarut. Supernatan dibuang dan *pellet* dilarutkan dalam 20 ml PBS untuk kemudian dilakukan sonikasi.

Sonikator yang dipakai adalah *Ultrasonic homogenizer* tipe 4710 – series, metode yang digunakan merupakan modifikasi metode Matsujana (1984) kekuatan 20 KHz dan pemakaian 3 menit diikuti dengan istirahat 2 menit dan perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi lagi.

Sentrifugasi dengan memakai *Refrigerated Centrifuge* kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit akan diperoleh pellet (dibuang) dan *supernatan* kemudian dilakukan lagi Ultrasentrifugasi kecepatan 40.000 rpm selama 20 menit sehingga diperoleh *pellet* dan selanjutnya dilarutkan kedalam 20 ml 2 % Triton X – 100 ditambah PBS sama banyak dan diinkubasi pada 37<sup>o</sup> C selama 20 menit. Kemudian dilakukan Ultrasentrifugasi ulang (40.000 rpm / 4<sup>o</sup> C selama 20 menit), *supernatan* dibuang dan *pellet* dilarutkan dengan PBS untuk dilakukan Ultrasentrifugasi lagi. Hasilnya *supernatan* (dibuang) sehingga diperoleh *pellet* yang kemudian dilarutkan dengan PBS pada tabung *microtube* dan dilakukan *vortex* selama 30 menit, larutan ini merupakan *protein soluble* yang perlu diukur berat molekulnya. Penentuan kadar protein juga diperlukan untuk mendapatkan kadar protein spesifik dalam rangka

pembuatan vaksin protein sub unit, secara skematis isolasi protein *envelope gp51* sebagaimana Gambar 4.2. di bawah ini.



**Gambar 4.2. Skema isolasi protein *envelope gp 51* virus EBL menurut Matsujama. Modifikasi.**



#### 4.2.2.3 Pengukuran berat molekul protein *envelope* virus EBL dengan *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Protein yang diperoleh dilakukan pengukuran berat molekul dengan menggunakan metode *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polo Acrylamide Gel Electrophoresis*) dengan kadar gel 12 %.

Pelaksanaan *SDS-PAGE* meliputi antara lain pembuatan *Stacking gel*, *Separating gel*, *Running gel*, *Electrophoresis*, dan *Staining*. Pada running dengan elektroforesis digunakan arus listrik 125 V kekuatan 25 mA.

Larutan protein sebelum diukur berat molekulnya ditetapkan lebih dulu kadarnya per mililiter dengan memakai alat UV – *Visible Spectrophotometer* tipe UV- 1601 dan protein standar memakai 1 % *Bovine Serum Albumine (BSA)*. Dengan alat ini dapat diketahui kadar kandungan proteinnya yang kemudian dapat dipakai sebagai ukuran pemakaian protein tersebut baik untuk *SDS-PAGE*.

Dari elektroforesis (dalam rangkaian proses *SDS-PAGE*) akan diperoleh hasil gambaran protein berupa pita (*band*) yang mempunyai berat molekul tertentu. Pita (*band*) yang ditentukan berat molekulnya dan setara dengan *marker*, dipotong kemudian dilakukan elektro elusi.

Protein di daerah *envelope* hasil dari *SDS-PAGE* Elektroforesis; dilakukan elektro elusi, akan dihasilkan pita (*band*) dari protein *envelope* virus EBL; selanjutnya diadakan uji hemaglutinin untuk mengetahui adanya reaksi aglutinasi dari protein *Egp 51* yang akan digunakan untuk penelitian berikutnya.

#### 4.2.2.4 Uji hemaglutinasi dari protein virus EBL

Protein yang diperoleh dari hasil elektro elusi terdiri dari protein dengan berat molekul 15 kDa; 24 kDa dan protein *Egp 51* kDa. Pada ketiga protein tersebut diadakan uji hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi digunakan untuk mengetahui keberadaan protein *envelope* virus EBL, dengan menggunakan antigen virus EBL yang direaksikan dengan darah merah sapi. Hasil dikatakan positif bila terjadi aglutinasi; dan dapat diketahui titer dari pada aglutinasi tersebut. Uji hemaglutinasi menurut petunjuk dari OIE 2003 dan Wringati, 2005. Pengenceran *sample* dibuat pada konsentrasi  $\frac{1}{2}$  pada *mikroplate V* dimana setiap sumur volumenya adalah 50  $\mu$ . Kemudian digoyang dengan menggunakan *rotator plate* selama 1 menit. Selanjutnya diletakkan pada suhu kamar selama 30 menit. Besarnya titer ditentukan dengan melakukan pengamatan adanya aglutinasi darah merah pada pengenceran terendah.

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk mencari titer antigen 4 unit HA sebagai persyaratan untuk pengujian Hambatan Hemaglutinasi (*HI Test*). Bahan yang digunakan pada uji hemaglutinasi (*HA Test*) adalah *Phosphate Buffer Saline free Ca<sup>++</sup>* dan *Mg<sup>++</sup>* (PBS), antigen yang dilarutkan dalam PBS dengan perbandingan 1 : 10, dan darah merah 0,5% (RBC). Pengenceran sampel dibuat di dalam mikroplate V, dimana setiap sumur berisi 0,05 ml PBS, 0,05 ml antigen dan 0,05 ml darah merah, semua lubang 1 diencerkan sampai lubang 10, lubang 11 dan 12 kontrol. Hasil dihitung dengan titer HA Unit pada 4 HA Unit.

**Skema kerja HA test :**

Lubang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
PBS (1 = 0,05 ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Antigen (1:10) (1 = 0,05 ml)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	buang 0,05 ml
Eritrosit 0,5% (1 = 0,05 ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

Biarkan pada suhu kamar (25° C), sampai kontrol eritrosit dapat dibaca (sekitar 30 menit)

Pengenceran	20	40	80	160	320	640	dst.
-------------	----	----	----	-----	-----	-----	------

**Kontrol**

Lubang	1	2	3	4	5	6	
PBS (1 = 0,05 ml)	1	1	1	1	1	1	
Antigen 8 HA Unit (1 = 0,05 ml)	)	)	)	)	)	)	buang 0,05 ml
Eritrosit 0,5% (1 = 0,05 ml)	1	1	1	1	1	1	

Biarkan pada suhu kamar (25° C), selama 30 menit

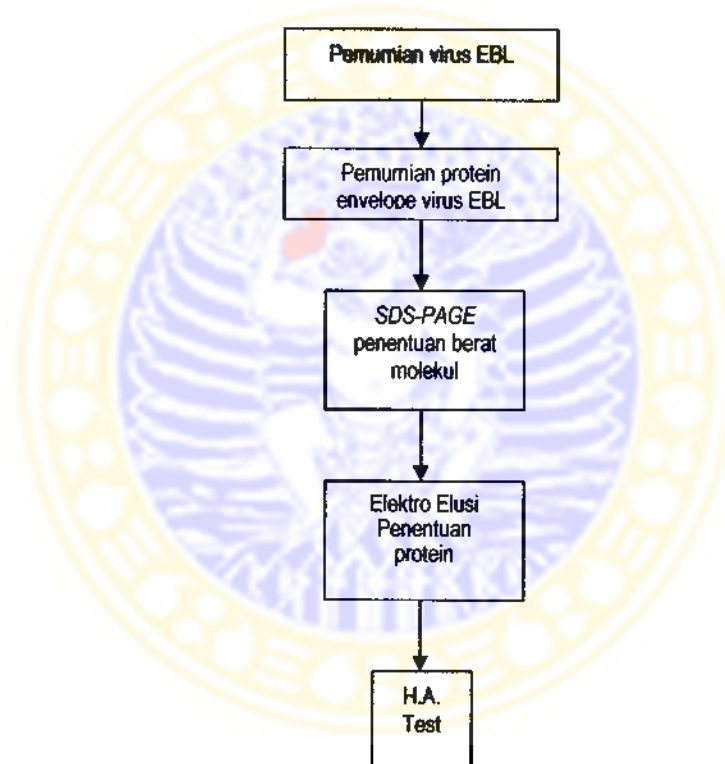
HA Unit	4	2	1	½	dst.	
Catatan HA	+	+	+	-	-	-

Pembacaan hasil, HA sempurna (100%) adalah aglutinasi terlihat jelas berupa gumpalan darah merah secara merata (difusi) pada dasar lubang dan penjernihan cairan bagian atas tanpa terjadinya pengendapan darah merah berbentuk titik di tengah lubang.

Uji HA untuk hasil elektro elusi protein envelope virus EBL dilakukan dengan metode seperti di atas dengan menggunakan ketiga macam protein 15 kDa, 24 kDa, dan protein *Egp 51* kDa.

Akan dihasilkan protein hemaglutinin yang mengaglutinasi darah merah sapi (mamalia).

Skema operasional penelitian Tahap II seperti gambar 4.3.



**Gambar 4.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II**

#### **4.2.3 Penelitian Tahap III**

Penelitian Tahap tiga yang merupakan penelitian kuantitatif, melalui uji *In Vitro* dan uji *In Vivo*.

#### 4.2.3.1 Uji *In Vitro*

Uji *In Vitro* terdiri dari

##### 4.2.3.1.1 Pembuatan antibodi poliklonal molekul hemaglutinin

Pembuatan antibodi poliklonal untuk mendapatkan antibodi dilakukan imunisasi pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) dengan berat badan 4 kg, jenis kelamin jantan sebanyak 3 ekor yang diperoleh dari peternak di Kodya Batu. Imunisasi antigen (molekul hemaglutini) protein *E gp51* diberikan pada dosis 0,4 mg/ekor di booster 2 minggu menggunakan *Freund's Complete Adjuvant (FCA)* dan *Freund's Incomplete Adjuvant (FIA)*. Perbandingan jumlah antara molekul hemaglutinin protein *E gp51* virus EBL dan *FIA/FCA* adalah sama banyak (masing-masing 2 ml). Protein *E gp51* dan adjuvant disuntikkan pada bagian punggung setiap kelinci disuntik secara *sub cutaneus*, diulangi setiap 2 minggu sekali sampai 4 kali (8 minggu). Pengambilan darah untuk mengukur titer antibodi dilakukan dengan Uji Agar Gel Imunodifusi, pada minggu ke 1 dan ke 2 setelah penyuntikan terakhir. Pada minggu ke 3 pengambilan darah untuk mengukur titer antibodi yang diuji dengan *SN Test*, *HI Test*, Uji *Immunoblotting* dan Uji Imunositokimia.

##### 4.2.3.1.2 Uji Hambatan Hemaglutinasi (*HI Test*)

Uji hambatan aglutinasi dikerjakan dan disesuaikan dengan petunjuk dari OIE 2003 dan Wringati, 2005. Uji HI untuk mengukur derajat kekebalan terhadap penyakit EBL. Bahan yang digunakan untuk *HI Test* adalah PBS<sup>-</sup>, serum, antigen 4 HA Unit dari hasil *HA Test (antibodi poliklonal EBL)*. Darah merah yang digunakan

adalah 0,5%. Pengenceran dikerjakan dalam mikropate V, pada setiap sumur berisi 0,025 ml PBS  $\bar{}$ , 0,025 ml serum di lubang 1, kemudian diencerkan sampai lubang 10, kemudian pada semua lubang ditambahkan antigen 4 HA Unit, dibiarkan pada suhu kamar 25° C selama 15 menit. Selanjutnya pada tiap sumur tersebut di atas ditambahkan protein hemaglutinin (*protein Egp 51 kDa* virus EBL), sebanyak 25  $\mu$ . Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37° C selama setengah jam. Setelah waktu inkubasi selesai pada tiap sumur ditambahkan 50 ml sel darah sapi konsentrasi 0,5 %. Hasil reaksi hambatan aglutinasi dibaca setelah inkubasi pada suhu kamar (25° C) selama 30 menit.

**Skema cara kerja HI Test :**

Lubang	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS (1 = 0,025 ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sera (1 = 0,025 ml)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)	)
Antigen 4 HA Unit (1 = 0,025 ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Biarkan pada suhu kamar (25° C), selama 15 menit												
Eritrosit 0,5% (1 = 0,05 ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biarkan pada suhu kamar (25° C), sampai kontrol eritrosit dapat dibaca (sekitar 30 menit)												
Pengenceran	2	4	8	16	32	64	dst.	Kon Erit	Kont Sera			

Dibaca HI sempurna (100%) adalah terjadinya pengendapan darah merah pada dasar lubang, terjadi ikatan antigen antibodi spesifik.

#### 4.2.3.1.3 Uji Imunositokimia

Biakan sel dicuci dengan HEPES *buffer* selama 30 menit dan difiksasi dengan metanol selama 5 menit. Kering anginkan dan cuci dengan PBS pH 7,4. Aplikasikan 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 10 menit dan cuci dengan PBS pH 7,4. Bloking menggunakan serum 5 % FBS (*Foetal Bovine Serum*) yang mengandung 0,25 % Triton X-100 dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan tetesi dengan antibodi primer, kemudian inkubasi semalam. Cuci dengan PBS pH 7,4 tetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan inkubasi selama 1 jam. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan *SA-HRP* (*Strep-Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit, kemudian cuci dengan PBS pH 7,4 dan *DAB* (*Diamino Benzidin*) pada slide kultur dan *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH<sub>2</sub>O, keringkan dan tutup *coverglass*, kemudian dibaca hasilnya.

#### 4.2.3.1.4 Uji Immunoblotting

Uji *Immunoblotting* yang digunakan adalah *Westernblot*, Metode pemeriksaan *Western Blot* menggunakan metode dari Towbin (1979). Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas *nitrocellulose* menggunakan alat *semi dry bloter* buatan *Biorad*. Cara memindahkan pita protein kepada kertas *nitrocellulose* adalah dengan menggunakan aliran listrik sebesar 300 mA selama kurun waktu 30 menit. Untuk mengetahui apakah protein sample telah pindah pada kertas *nitrocellulose* maka dilakukan pengecatan dengan menggunakan pewarna *ponco* 2% yang mengandung TCA sampai konsentrasi mencapai 3%.

Sebagai pertanda untuk menentukan bobot molekul protein hasil pemeriksaan *western blotting* maka menggunakan lajur yang berisi protein petanda. Pada setiap pita protein petanda tersebut ditusuk dengan jarum supaya tidak kehilangan jejak oleh karena pada waktu dibilas dengan air pewarna *ponco* tersebut tidak nampak. Untuk menghilangkan warna *ponco* dibilas dengan H<sub>2</sub>O. Selanjutnya pada kertas *nitrosellulose* diratakan dengan cairan TBE yang mengandung albumin dengan konsentrasi 3 % didalam larutan yang mengandung TBE pH 7,4 dan Tween 20 pada konsentrasi 0,05%, selanjutnya dilakukan inkubasi semalam. Setelah waktu inkubasi cukup maka dilakukan pencucian dengan menggunakan cairan TBE pH 7,4 yang ditambah tween 20 konsentrasi 0,05 % sampai 2 kali, dimana tiap kali pencucian memerlukan waktu 5 menit. Apabila waktu pencucian selesai maka ditambahkan antibodi primer Ig G dengan konsentrasi 1/1000 dalam TBE pH 7,4 yang mengandung larutan BSA konsentrasi 1%, kemudian digoyang selama 2 jam. Dilakukan pencucian lagi sebanyak 2 kali, dimana setiap pencucian memerlukan waktu 5 menit, sebagai larutan pencuci adalah cairan TBE pH 7,4 yang mengandung *Tween* 20 konsentrasi 0,05 %. Selanjutnya ditambah antibodi sekunder yaitu anti rabbit IgG konsentrasi 1/1000 pH 7,4 dan BSA konsentrasi 1 %. Digoyang selama 2 jam dan dilindungi terhadap pengaruh sinar. Kemudian dilakukan pencucian 2 kali selama 5 menit dengan menggunakan TBE pH 7,4, *Tween* 20 dengan konsentrasi 0,05 %. Sebagai bahan warna digunakan tablet *β Cip* yang dilarutkan pada H<sub>2</sub>O 10 ml. Larutan ini dituangkan pada kertas *nitrosellulose* dan dilakukan pengamatan terjadinya reaksi warna merah. Jika reaksi cukup kemudian dibilas dengan H<sub>2</sub>O dan



selanjutnya dikeringkan dengan meletakkan di atas kertas saring. Pada hasil akan terlihat adanya 1 band yang merupakan protein *Egp 51 kDa*.

#### 4.2.3.1.5 Uji Serum Netralisasi

Metode *Serum Netralisasi Test* (SN Test) sebagai berikut :

Bahan protein spesifik yang telah diperoleh diukur daya antigeniknya dengan teknik *SN Test*. Sifat antigenesitas protein spesifik ini terlihat dari titer antibodinya. Antibodi yang digunakan berasal dari kelinci yang telah dikebalkan terhadap EBL. Titer antibodi yang tinggi ini merupakan hasil tanggap kebal (respon imun) akibat pemberian sub unit protein spesifik yang digunakan untuk pengujian imunogenisitas pada hewan coba (kelinci).

Uji Serum Netralisasi untuk mengetahui kenaikan titer antibodi yang ditimbulkan oleh sub unit *protein Egp 51* isolat lapangan pada waktu tertentu setelah hewan percobaan diberi sub unit *protein E gp51* tersebut. Cara yang digunakan, dengan menggunakan monolayer *Cell OL* di dalam mikrolit dasar yang ditantang dengan virus ganas (Titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>) sebanyak 200 / ml. *cell OL* yang telah ditripsinasi dengan trypsin 0.25 % disuspensikan dalam RPMI media yang mengandung *Poly Ethylen Glikol* (PEG – 6000) dan serum sapi 10%, sebanyak ± 150 ml/Roux, besar jumlah sel adalah 150.000 ml yang telah dihitung lebih dulu dalam kamar hitung cell (*Haemocytometer*) kemudian serum yang didapat dari hewan percobaan kelinci diinaktivisasikan melalui pemanasan selama 30 menit pada suhu 56<sup>0</sup>C. serum difiltrasi dengan milex diencerkan 1/10. Masukkan ke lubang sumuran masing-masing 0.05 ml *Eagle media* dengan menggunakan *titer tex*, lubang deret

kesatu diisi dengan masing-masing serum 0,05 ml. Dimulai dengan pengenceran terendah (1 : 2) serum diencerkan *two fold dilution* 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256, diencerkan dengan *multiple chanel pipet*, dan yang terakhir dibuang 0,05 ml (100-300 TCID<sub>50</sub>) diberikan pada tiap-tiap sumuran, kemudian tutup *mikroplate* dengan penutup *mikroplate (seal)* lalu dikocok. setelah itu diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C. Pada setiap sumuran ditambahkan *Cell* sebanyak 0,10 ml, deret sumuran terakhir diberi kontrol *Cell* sebanyak 0,10 ml, dan deret sumuran awal diberi 0,05 ml virus tanpa pengenceran sebagai kontrol virus. *Mikroplate* ditutup dengan *seal* plastik, diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24, 48 sampai 72 jam, sambil diobservasi melihat pertumbuhan CPE, bila positif CPE berarti negatif antibodi, dan bila negatif CPE, berarti positif antibodi. Sumuran 1 dan 2 berisi kontrol virus; sedangkan sumuran 11 dan 12 berisi kontrol *cell*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

#### Keterangan Sumuran :

Sumuran 11 dan 12 : Kontrol Sel

0,1 ml media

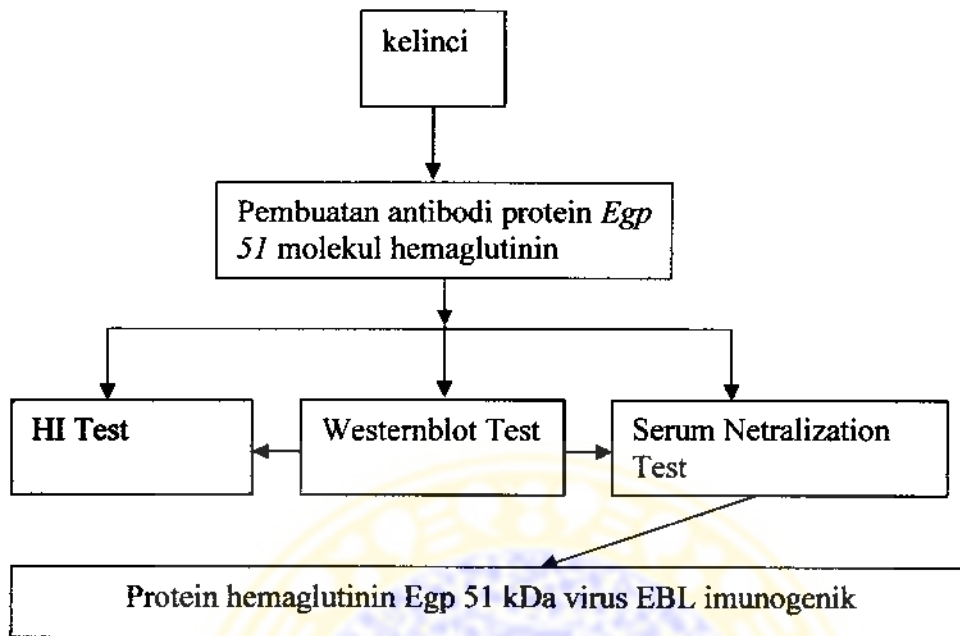
0,1 ml sel

Sumuran 1 dan 2 : Kontrol Virus

0,05 ml media

0,05 ml virus

0,10 ml sel



**Gambar 4.4 Kerangka Operasional Penelitian Tahap III secara *In Vitro***

#### 4.2.3.2 Uji *In Vivo*

##### 4.2.3.2.1 Populasi, sampel dan besar sampel

###### 4.2.3.2.1.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sekelompok kelinci jantan, berat badan  $\pm$  4 kilogram dan umur 4 – 6 bulan.

###### 4.2.3.2.1.2 Sampel

###### 4.2.3.2.1.2.1 Unit Sampel

Unit sampel adalah kelinci umur 4 – 6 bulan belum pernah divaksinasi EBL, bebas terhadap antibodi EBL didapat dari kelompok peternakan kelinci di daerah

Batu, Malang. Pengambilan sampel dengan cara mengambil darah dari jantung sebanyak 5 ml per ekor kemudian diadakan uji AGID terhadap serumnya.

#### 4.2.3.2.1.2.2 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini diperoleh dengan menggunakan rumus dari Steel dan Torrie (1980) sebagai berikut :

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 D}{\delta^2}$$

Keterangan :

$n$  = besar sampel tiap ulangan

$\sigma$  = simpangan baku

$D$  = beda antara perlakuan dengan kontrol (untuk menentukan beda sampel tersebut)

$\delta$  = galat

$Z_{\alpha}$  = harga standar normal untuk 0,05 = 1,96

$Z_{\beta}$  = harga standar normal untuk 0,10 = 1,28

$$n = \frac{(1,96 + 1,28)^2}{1}$$

$$n = 10$$

#### 4.2.3.2.1.2.3 Prosedur Pengambilan Sampel

Sebagai sampel dalam penelitian ini adalah serum kelinci dari daerah Batu, Malang yang diberi perlakuan, dan sebagai kelompok kontrol adalah serum kelinci yang tidak diberi *Egp 51* tapi *dichallenge*.

### 4.3 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

#### 4.3.1 Identifikasi

Dalam penelitian ini digunakan variabel sebagai berikut :

- **Variabel bebas (*Independent variable*)** adalah dosis kandidat vaksin *protein Egp 51* EBL isolat lapangan yang diberikan secara *intra cutan*.
- **Variabel tidak bebas (*Dependent variable*)** titer antibodi pada masing-masing pengambilan darah, jumlah kenaikan limfosit, dan titer antigen dari virus EBL isolat lokal hasil inokulasi dalam biakan jaringan OL dengan menggunakan *mikroplate datar*.

#### 4.3.2 Definisi Operasional

Virus EBL dapat menyebabkan penyakit leukemia pada sapi potong dan sapi perah. Penyakit ini bersifat fatal, ganas, dan menyebabkan angka kematian tinggi mencapai 90-100% serta bersifat persisten. Sebagian besar virus berada dalam sel limfosit. Reaksi antigen antibodi spesifik yang berikatan, membuat suatu garis yang lurus, jelas, dan terang di dalam agar *ouchterlony*. Untuk diagnosis penyakit EBL sesuai dengan kesepakatan bersama ahli EBL di seluruh dunia, pada pertemuan

seminar EBL di Copenhagen pada bulan Oktober 1979, yang resmi digunakan sebagai uji penyakit EBL (Miller, 1999).

#### **Definisi Operasional Variabel :**

Tantang	: Inokulasi virus EBL virulen dengan titer $10^{7.8}$ TCID <sub>50</sub>
Satu dosis vaksin	: $10^5$ TCID <sub>50</sub> (Miller, 1999)
Perhitungan limfosit	: Menggunakan <i>haemocytometer</i>
Limfosit persisten	: Jumlah limfosit 200-500 cell/mm <sup>3</sup> (kelinci = normal) Jumlah limfosit 5000-7500 cell/mm <sup>3</sup> (sapi = normal)
Titer antibodi	: Diukur dengan menggunakan <i>SN Test</i>

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

##### **4.4.1 Lokasi**

Lokasi penelitian : Pusat Veterinaria Farma, Universitas Brawijaya Malang; dan *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya

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

Waktu penelitian : Dalam penelitian ini waktu yang dibutuhkan adalah 9 (sembilan) bulan.

- Tahap persiapan (pengadaan alat, bahan dan hewan percobaan)
- Pembuatan *cell line*, identifikasi virus, titrasi virus dan pemurnian virus

- Karakterisasi sub unit *protein E gp51* virus EBL isolat lokal
- Uji antigenitas dan imunogenisitas

Sehingga seluruh pelaksanaan pemeriksaan dan pengujian memerlukan waktu 9 (sembilan) bulan. Untuk analisis data, penyusunan akhir dan lainnya, dibutuhkan waktu sekitar 3 (tiga) bulan.

## 4.5 Bahan Penelitian

### 4.5.1 Virus

Pada penelitian ini digunakan virus EBL *isolat lokal* berasal dari lapangan Lembang, Jawa Barat, yang diperoleh dari BPM SOH Gunung Sindur Bogor pada tahun 1995. Virus mempunyai *buoyant density* 1,18 gram/ml. Virus yang diterima pada pasase 15 dan dikembangkan sampai dengan pasase 29; disimpan di dalam Revco (-80°C)

### 4.5.2 Sel (Biakan jaringan)

Biakan jaringan yang digunakan adalah OL yang bersifat *cell line*.

### 4.5.3 Media

1. Media eagle 90% ditambah serum sapi 10%, digunakan untuk pengembangan biakan jaringan.
2. Media RPMI 98% ditambah FCS 3% inaktif (dipanaskan pada suhu 56°C selama 30 menit), digunakan untuk pengembangan virus EBL *isolat lokal* (Tabel 4.1)

**Tabel 4.1. Media RPMI untuk pengembangan virus**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Gram / Liter</b>
Calcium Nitrat 4 H <sub>2</sub> O	0,1
Magnesium Sulfate (Anhydrous)	0,04884
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	5,9
Sodium Phosphate dibasic (Anhydrous)	0,8
L-Arginine	0,2
L-Asparagine (Anhydrous)	0,05
L-Aspartic Acid	0,02
L-Cystine 2 HCl	0,0652
L-Glutamine Acid	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine	0,015
L-Hydroxy proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lycine HCl	0,04
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serin	0,03
L-Threonine	0,02
L-Tryptophan	0,005
L-Tyrosine 2 Na 2H <sub>2</sub> O	0,02883
L-Valine	0,02
D-Biotine	0,0002
Choline Chloride	0,003
Folic Acid	0,001
Myo Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
P-Amino Benzoic Acid	0,001
D-Pantothenic Acid (Hemicalcium)	0,00025
Pyridoxine HCl	0,001
Riboflavine	0,0002
Thiamine HCl	0,001
Vit B <sub>12</sub>	0,000005
D-Glucose	4,5
Glutathione (reduced)	0,001
HEPES	3,5745
Phenol Red	0,0053

Sumber : Bogel *et al.*, 1989



#### 4.5.4 Hewan percobaan

Domba muda umur 4 minggu yang diperoleh dari RPH Pegirian Surabaya, kelinci jantan dengan berat badan 4 kilogram yang diperoleh dari peternakan kelinci Batu, Malang (sesuai dengan Harlow, 1988).

#### 4.5.5 Bahan Untuk Poliklonal Antibodi

- Kelinci lokal dengan berat badan 4 kilogram (sesuai dengan Harlow, 1988)
- *Freund Adjuvant Complete dan Incomplete*
- Virus EBL (*protein E gp51*)

#### 4.5.6 Bahan Untuk Karakterisasi Protein

- Virus EBL isolat lokal
- Protein *E gp51* virus EBL isolat lokal
- Bahan-bahan untuk pemeriksaan *SDS-PAGE* dan Elusi
- Seperangkat bahan untuk pemeriksaan *WESTERN BLOTT*

#### 4.5.7 Bahan Untuk Imunositokimia.

- HEPES buffer
- PBS
- SA-HRP
- DAB

#### 4.5.8 Bahan uji imunogenisitas (*adjuvant* dan lain sebagainya)

- *Nitroselulose*
- Cairan TBE yang mengandung *Tween 20*
- Anti rabbit IgG

#### 4.6 Alat – alat Penelitian

Dalam penelitian ini alat yang dipakai sebagai berikut :

1. *Laminar flow* : adalah tempat untuk mengerjakan pengembangan sel (biakan jaringan) dan pengembangan virus.
2. Identifikasi dan pemurnian virus EBL isolat lokal, Alat-alat untuk pengembangan sel, pengembangan virus terdiri dari *laminar flow*, *inverted microscope*, alat penghitung sel, inkubator dan ultrasentrifus.
3. Pembuatan antibodi poliklonal penerapannya dilakukan di laboratorium dan kandang hewan coba. Pencampuran antara suspensi virus dengan *adjuvant freund komplit* dengan menggunakan alat *Ultra Dispenser Model LK 22* merek Yamato Jepang.
4. Isolasi sub unit protein dengan alat sonikator (*Ultrasonic homogenizer*) tipe 4710 series, buatan *Cole-Parmer Instrument Co. Chicago-Illionis (60648)* dan sentrifugasi dengan alat *Referigerated centrifuge* merek Hitachi tipe himac SCR 20 B, serta *Shaker* dengan *speed regulator* model VRN-2000.
5. Identifikasi sub unit protein yang memiliki berat molekul besar dengan menggunakan metoda *SDS-PAGE* memakai gel elektroforesis yang dimodifikasi dengan pemakaian 120 V 40 mA.

6. Karakterisasi protein setelah diambil dari membran *nitrocelulose* dan *immunoblotting* dengan antibodi poliklonal metode *Western blotting* akan diperoleh protein sub unit murni. Alat yang dipakai antara lain *microplate*, *microtitre* dan alat *elektroforesis*.

#### 4.7 Kandang Hewan Percobaan

Tiga puluh ekor kelinci dipelihara pada sepuluh kurungan kandang besi. masing – masing berukuran 70x120 cm; masing – masing kurungan diisi dengan tiga ekor kelinci. Dari tiga puluh ekor kelinci dibagi menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Satu kelompok perlakuan adalah kelompok I yang *dichallenge* tanpa perlakuan, dan tiga kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok IIa, IIb, dan kelompok IIc.

Pengujian *In Vivo* adalah untuk mengetahui protein spesifik. Uji *In Vivo* yang dilakukan adalah sebagai berikut :

Pengujian imunogenik secara *in vivo* menggunakan hewan coba kelinci jantan yang sehat (bebas penyakit) umur 4-6 bulan sebanyak 30 ekor dengan berat badan masing – masing  $\pm 4$  kg yang didapat dari peternak kelinci di daerah Batu Malang Jawa Timur.

Langkah awal adalah pembuatan vaksin protein sub unit adalah dengan cara suspensi *protein E gp51* spesifik ditambah dengan *adjuvant Freund complit* (perbandingan 3:7) lalu dicampur hingga homogen dengan memakai alat Ultra Dispenser model LK-22 merk Yamato, suhu dingin pada 20.000 rpm selama 10 menit. Hasilnya berupa larutan vaksin berwarna putih dan dipakai sebagai vaksin

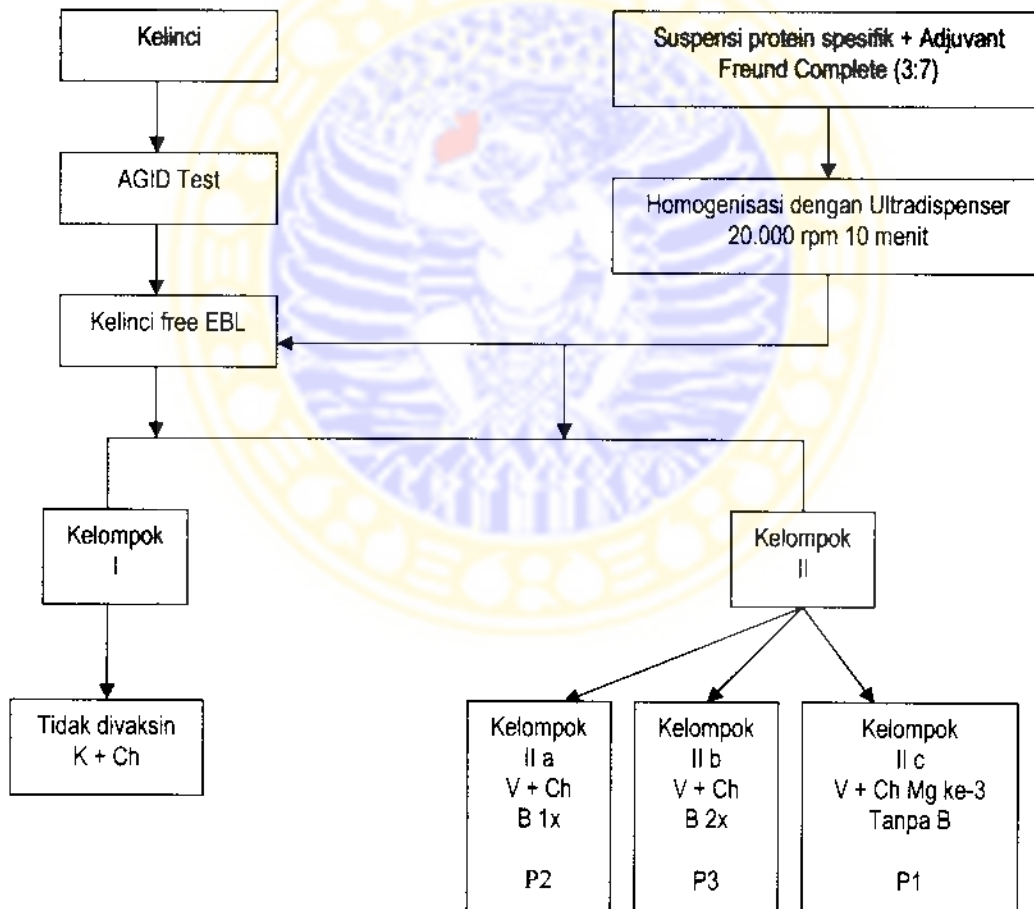
protein sub unit pada hewan coba, selanjutnya hewan coba kelinci yang sehat, sebelum perlakuan dilakukan pengambilan darah yang dilanjutkan dengan pemeriksaan pre perlakuan, menggunakan AGID Tes Kit EBL Produk Canada, untuk mendapatkan *sample* yang semuanya negatif terhadap EBL, kemudian dari semua *sample* negatif dibagi atas kelompok I tidak diberi suntikan *protein E gp51* (sebagai kelompok kontrol = K) hanya disuntik PBS<sup>-</sup> dan di-*challenge* virus EBL dengan titer  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub>, kelompok IIa divaksin protein sub unit dan *booster* sebanyak satu kali (P2), kelompok IIb diberi vaksin dan dilakukan *booster* sebanyak dua kali (P3), sedangkan kelompok IIc diberi vaksin *protein E gp51* satu kali tanpa *booster* dan pada minggu ketiga dilakukan uji tantang (Ch) dengan memberikan suspensi virus EBL isolat lokal yang ganas. Uji tantang (*challenge test* = Ch) dilakukan pada semua kelompok.

Adapun cara pemakaian *protein E gp51* spesifik tersebut (sudah ditambah dengan *ajuvan Freund complit*) disuntikkan pada kelinci percobaan secara intra kutan pada daerah punggung di beberapa tempat dengan dosis 4 ml setiap ekor. Kemudian dilakukan pengukuran titer antibodi pada hari ke 7 dan 21.

Kelompok IIc kelompok yang divaksin tanpa *booster* untuk uji tantang (*challenge test*) diberikan pada minggu ke 3. Pengukuran titer antibodi juga dilakukan pasca penyuntikan pada kelompok IIa, IIb, dan IIc, yang diambil serum dari darah kelinci pada hari ke 7 dan 21 setelah penyuntikan. Serum yang didapat digunakan untuk uji SN, dan diamati perubahan patologi anatomi yang terjadi, serta dilihat terhadap kenaikan limfosit secara *persistent*.

Pada kelompok *booster* baik *booster* satu kali (P2) maupun *booster* dua kali (P3) pengambilan darah juga dilakukan sampai dengan dua minggu saja pasca pemberian suntikan vaksin terakhir (pengukuran titer antibodi cukup dua kali saja).

Demikian isolasi dan karakterisasi sub unit protein gp 51 virus EBL isolat lokal sebagai protein spesifik dan dipakai sebagai kandidat vaksin sub unit dalam penelitian ini. Untuk jelasnya penelitian dapat diikuti pada skema Kerangka Operasional Penelitian (Gambar 4.5)



**Gambar 4.5 Kerangka Operasional Penelitian Tahap III secara *In Vivo***

Keterangan : AGID : Agar gel imunodifusi

K : kontrol

Ch : Challenge

P2 : kelompok yang divaksin booster 1 kali ..... Kelompok IIa

P3 : kelompok yang divaksin booster 2 kali ..... Kelompok IIb

P1 : kelompok yang divaksin tanpa booster dich. Mg ke-3 ..... Kelompok IIc

#### 4.8 Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan dan pencatatan data dilakukan pada saat sebelum dan sesudah perlakuan. Pengembangan sel, titrasi antigen, titrasi antibodi, kenaikan sel limfosit serta pembuatan antibodi poliklonal dan pengujiannya hasilnya dicatat. Pemeriksaan isolasi sampai dengan karakterisasi protein sub unit juga dilakukan pencatatan hasilnya. Pada penelitian laboratoris ini merupakan penelitian yang bersifat kualitatif, sedangkan pada uji imunogenisitas (pemberian vaksin sub unit protein), dari masing-masing kelompok diperoleh data pengumpulan titer antibodi dan dicatat mulai hari pertama (titer awal) kemudian dicatat titer antibodi pada hari ke 7, 21, dan setelah penyuntikan. Penelitian ini bersifat kuantitatif yang hasil pengukuran titer antibodi dilakukan analisis statistik (Zainuddin, 1988; Sarmanu, 2003).

#### 4.9 Analisis Data

Data hasil pemeriksaan titer antibodi dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA), pada Tahap III Uji *in vivo* dengan rancangan acak lengkap dan apabila terdapat perbedaan nyata dilakukan LSD  $p \leq 0,05$  (Steel and Torrie, 1980).

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

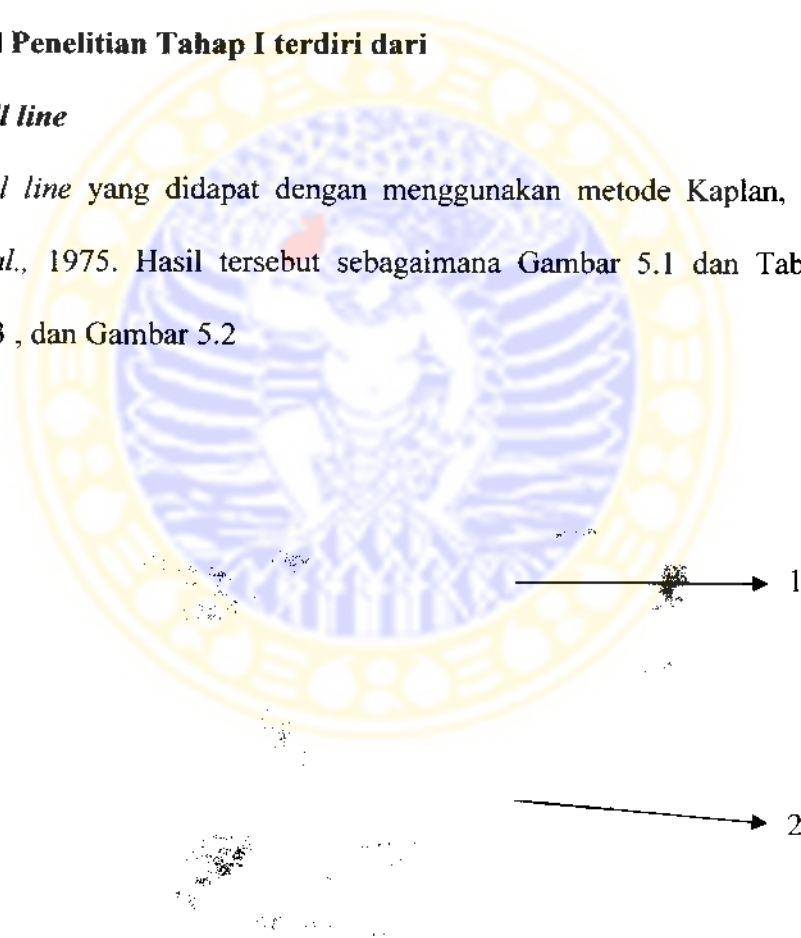
#### 5.1 Data Penelitian

Pencatatan data hasil dalam penelitian ini disusun sebagai berikut :

##### 5.1.1 Hasil Penelitian Tahap I terdiri dari

###### 5.1.1.1 *Cell line*

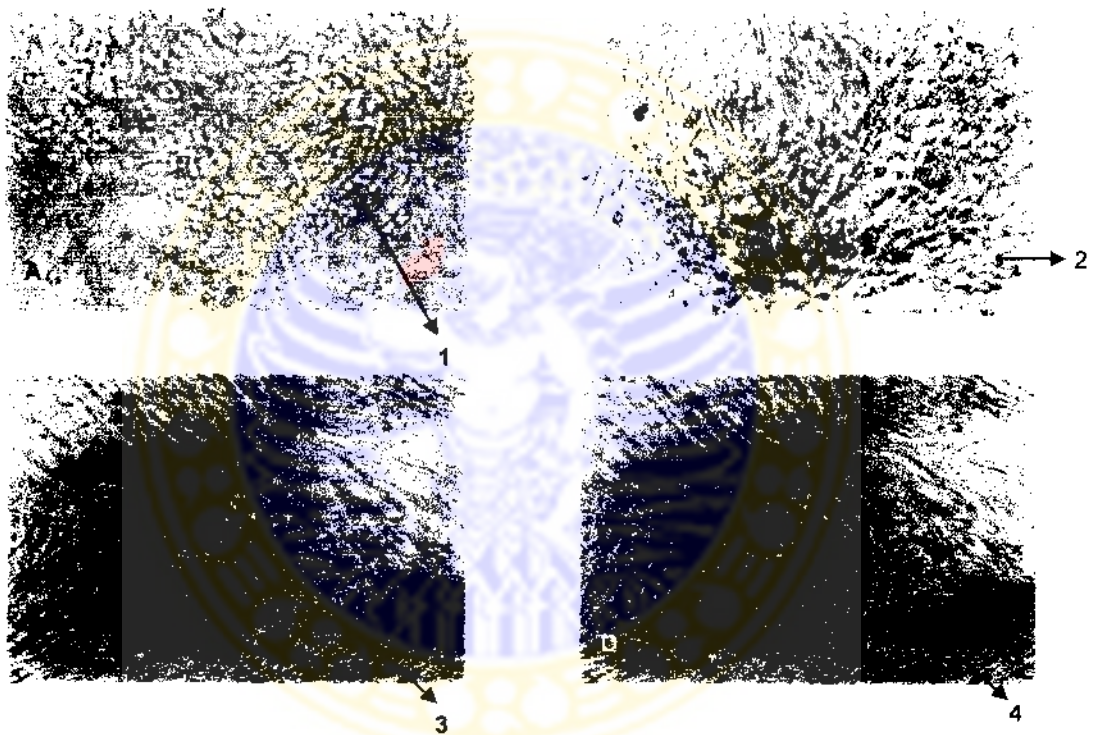
*Cell line* yang didapat dengan menggunakan metode Kaplan, *et.al.*, 1973, Johan, *et.al.*, 1975. Hasil tersebut sebagaimana Gambar 5.1 dan Tabel 5.1 pada Lampiran 3 , dan Gambar 5.2



**Gambar 5.1. Janin Domba untuk Persiapan Pembuatan *Cell Line OL*.**

Keterangan : 5.1.1. Media *eagle* dan antibiotik Kanamycin 0,4%  
5.1.2. Janin domba umur 4-6 minggu

Sifat dari *cell line* mempunyai inti sel dan kromosom yang bersifat stabil, sehingga dapat dipasase berkali-kali dan tidak bersifat toksik; sehingga sel tetap tumbuh dengan baik dan *confluent* sebagaimana Gambar 5.2.



**Gambar 5.2. Cell OL dalam beberapa tingkat pertumbuhan**

Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope*

- Keterangan :
- 5.2.A . Gambar sel OL dalam pertumbuhan tahap awal pasase tiga,
  - 5.2.B. Gambar sel OL mulai mengalami perkembangan
  - 5.2.C. Gambar sel OL pada pasase 50
  - 5.2.D. Gambar sel OL pada pasase 58
1. Sel tampak hidup pada tahap awal tampak being bulat
  2. Sel mengalami perkembangan tampak memanjang
  3. Sel *confluent* (memanjang yang memenuhi seluruh permukaan) pada pasase 50
  4. Sel tampak sama dengan 3, pada pasase 58



Pada awal pertumbuhan sel OL masih terlihat berupa bundaran bening sebagai pertanda sel yang hidup (Gambar A). Pada perkembangan berikutnya sel mulai memanjang ke atas ke bawah, ke kiri dan ke kanan mengisi bagian kosong (Gambar B). Perkembangan mulai *confluent* pada hari ke 5 pada pasase awal sebagaimana Gambar (C) tetapi setelah pasase ke ke 9 (perkembangan sudah tampak *confluent* pada hari ke 3, hal ini berlangsung sampai pasase 50 sebagai pertanda sel sudah mengalihkan sifat *cell line* (Kaplan *et.al.*, 1973 dan Johan P., 1975).

Selanjutnya *cell line OL* diinokulasi dengan virus EBL, secara berkali-kali untuk mengetahui keberadaan virus EBL; karena *cell line OL* merupakan media penumbuh dari virus EBL (Kaplan, *et.al.*, 1973 dan Ishino, *et.al.*, 2000; Hasdianah, 1998). Keberhasilan pembuatan *cell line* seperti yang ditampilkan Gambar 5.2 A sampai Gambar 5.2 D, maka penelitian selanjutnya dapat dikerjakan yaitu pembuktian mengenai adanya virus EBL.

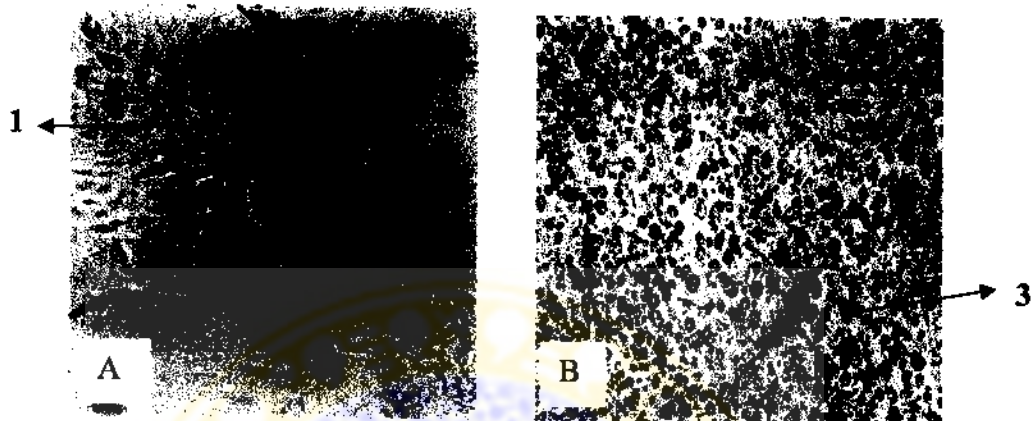
#### **5.1.1.2 Pembuktian adanya virus EBL**

Keberadaan virus EBL dapat dibuktikan dengan beberapa cara yaitu dengan *CPE*, uji *Postulat Koch* dan uji imunodifusi dengan *ouchterlony*.

##### **5.1.1.2.1 *Cytopathogenic effect (CPE)***

Untuk mendeteksi keberadaan virus EBL dilakukan uji *CPE* dengan melakukan pemaparan virus pada *cell OL* dimana hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.3.

*Cyto Pathogenic Effect* sebagai akibat kerusakan *cell line OL* yang terpapar oleh virus EBL.



**Gambar 5.3. Kerusakan *cell OL* akibat paparan Virus EBL**

Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope*

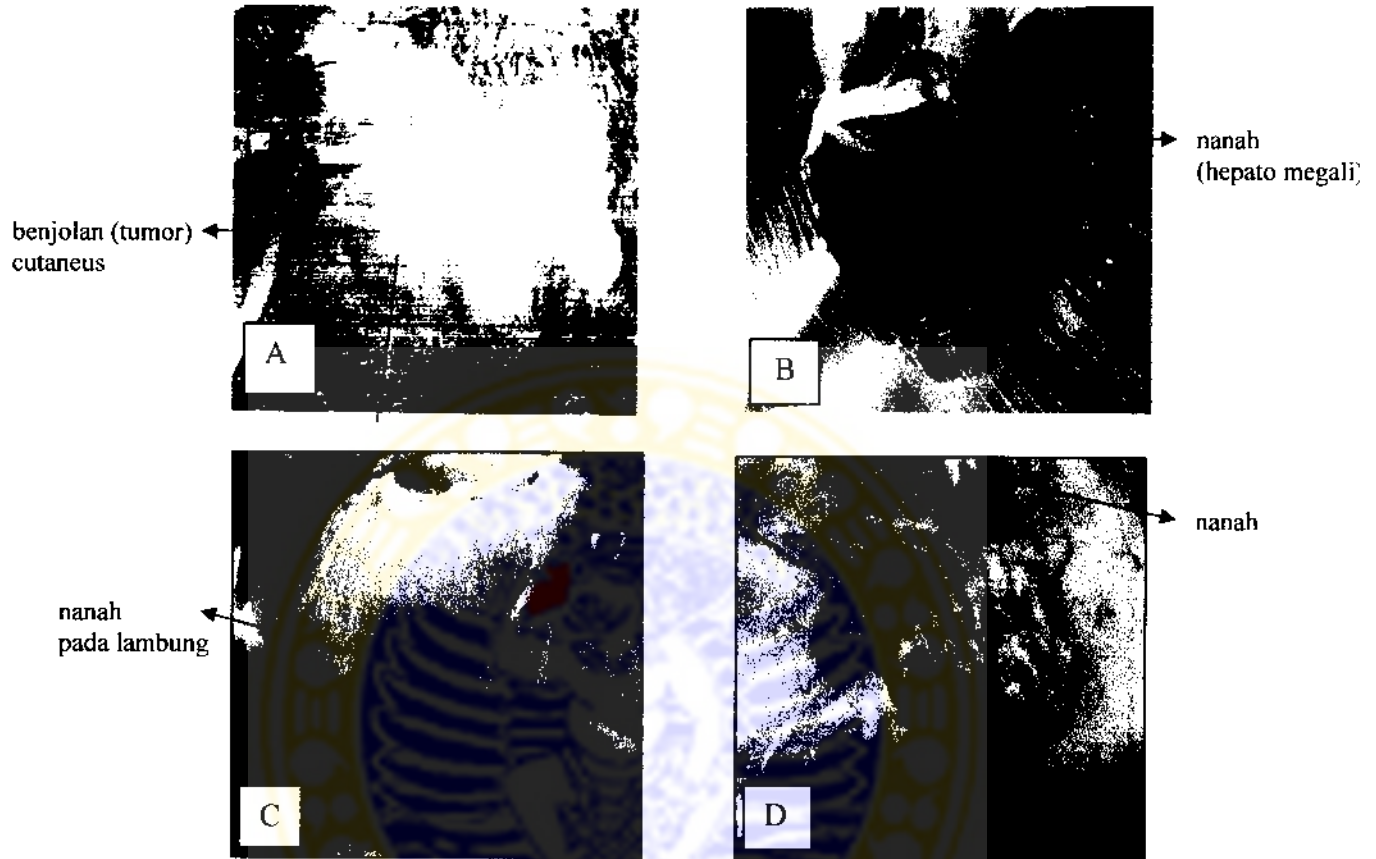
Keterangan : A. Gambar *cell OL* yang terpapar virus pada hari ke-5  
 1. *Cell OL* yang mengalami kerusakan yang menunjukkan sifat CPE  
 2. *Cell OL* yang belum mengalami kerusakan  
 B Gambar *cell OL* (3) yang mengalami kerusakan yang menunjukkan sifat total (100%) pada hari ke 7.

Pada hari ke 5 *cell OL* yang terpapar virus EBL mulai tampak adanya CPE yang menunjukkan kerusakan *cell* yang ditandai adanya bagian *cell toxic* yang tampak menyeluruh setelah hari ke 7.

#### 5.1.1.2.2 Uji *Postulat Koch*

*Postulat Koch* digunakan untuk menentukan apakah suatu mikroba (virus EBL) dapat menimbulkan penyakit.

Hasil uji *Postulat Koch* dapat dilihat pada Gambar 5.4.



**Gambar 5.4. Hasil Uji *Postulat Koch* Klasik**

**Keterangan :** A. Benjolan (peradangan) pada kulit domba.

B. Nanah (pus) pada hepar yang mengalami pembesaran.

C. Nanah (pus) pada lambung.

D. Nanah (pus) dari bagian tumor kelenjar limpha.

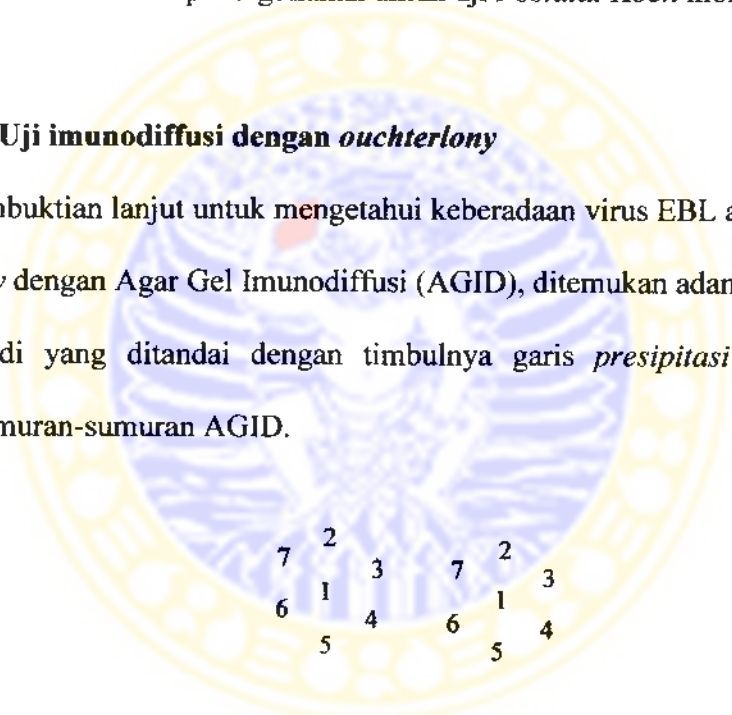
Ditemukan reaksi peradangan akibat pemaparan virus EBL sehingga timbul benjolan pada bagian kulit Gambar 5.4.A, pada bagian hepar terjadi hepatomegali Gambar 5.4.B, pembesaran lambung Gambar 5.4.C dan Gambar 5.4.D terlihat adanya nanah yang berwarna putih kekuningan, mengeras, yang merupakan massa

dari EBL dan mengeluarkan bau yang tidak sedap. Hasil ini merupakan uji *Postulat Koch* klasik.

Berbasis dari uji *Postulat Koch* klasik yang digunakan pada bidang virologi yang sukar dan lama untuk dikultur maka pengujian dapat dilakukan dengan uji *Postulat Koch* molekular. Reaksi serologi untuk menentukan adanya antigen atau antibodi dengan metode imunodifusi dengan *ouchterlony* dan keberadaan materi genetik dari virus EBL dapat digunakan untuk uji *Postulat Koch* molekular.

#### 5.1.1.2.3 Uji imunodifusi dengan *ouchterlony*

Pembuktian lanjut untuk mengetahui keberadaan virus EBL adalah melalui uji *ouchterlony* dengan Agar Gel Imunodifusi (AGID), ditemukan adanya ikatan antigen dan antibodi yang ditandai dengan timbulnya garis *presipitasi* berwarna putih diantara sumuran-sumuran AGID.



7 2 3 7 2 3  
6 1 4 6 1 4  
5 5

#### Gambar 5.5 Kontrol negatif Hasil Uji Agar gel presipitasi

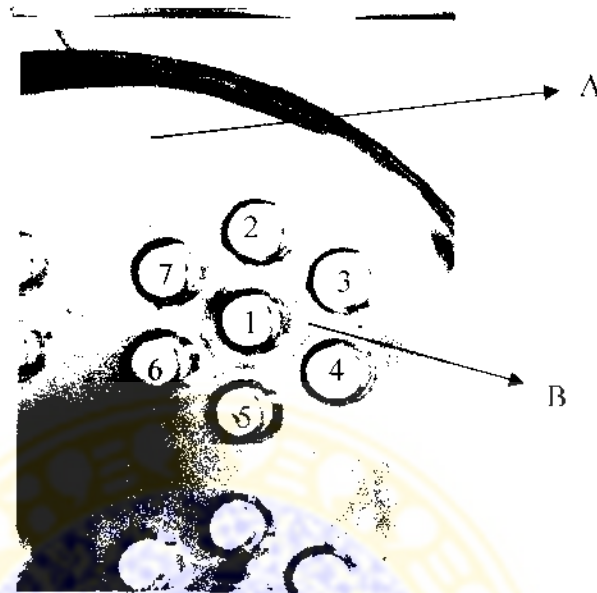
Keterangan :

Sumuran 1 : antigen *EBL* isolat lokal

Sumuran 2,3,4,5,6,7 : serum antibodi kelinci

tanpa perlakuan (kontrol negatif)

Data presipitasi sebagaimana Gambar 5.6.



**Gambar 5.6. Hasil Uji Agar gel presipitasi**  
**Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope***

**Keterangan :**

Sumuran 1 : antigen *EBL* isolat lokal  
 Sumuran 2,3,4,5,6,7 : serum antibodi protein *Egp 51*

Gambar A : adalah agar *ouchterlony*  
 Gambar B : adalah garis presipitasi, sebagai reaksi antigen antibodi spesifik

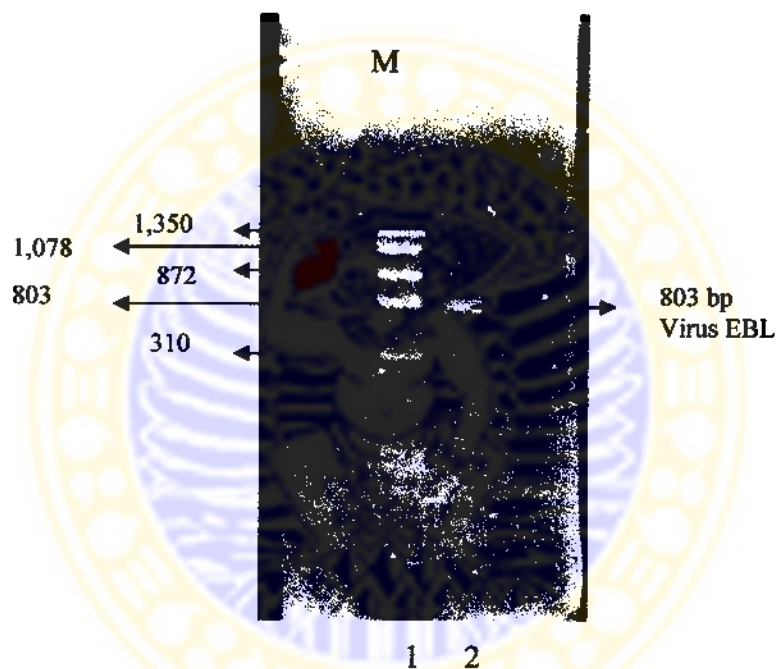
Garis presipitasi yang terlihat pada Gambar 5.6 menunjukkan adanya ikatan antigen dan antibodi spesifik EBL pada agar *plate* yang berdiameter 15 cm. Garis presipitasi pada agar *plate* jarak antara sumuran satu dengan yang lain adalah 3 mm. Gambar 5.6 A adalah merupakan bagian agar *ouchterlony*. Sedangkan Gambar 5.6 B adalah garis presipitasi yang disebabkan oleh adanya reaksi antigen antibodi spesifik EBL isolat lokal.

#### 5.1.1.2.4 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Untuk lebih lengkap pembuktian keberadaan virus EBL dilakukan pula uji *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan susunan primer (3' dan 5' primer) gp51 adalah :

3'GGG-CCG-CGA-GAG-CTC-AAC-GTC 5'

Hasil sebagaimana Gambar 5.7.



**Gambar 5.7. : Hasil *PCR* dengan primer yang spesifik gen penyandi protein Egp 51 dari virus EBL**

**Keterangan :** 1. Marker QX – 174 RF DNA/Hae III  
2. Hasil *PCR* dari virus EBL

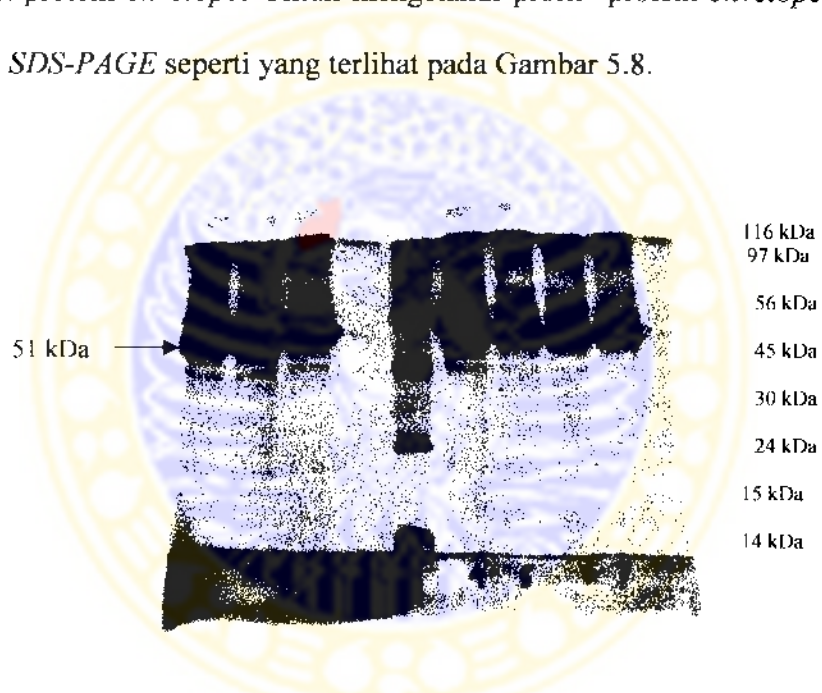
Pada lajur 2 ditemukan pita (band) dengan ukuran 803 bp yang merupakan bagian dari gen yang menyandi protein *envelope* dari virus EBL . Primer tersebut

adalah spesifik yang mengakit gen sebesar 803 bp dan ini merupakan penyandi protein *Egp 51* virus EBL.

## 5.1.2 Penelitian Tahap II

### 5.1.2.1 Hasil pemurnian virus EBL

Pemurnian virus EBL dilakukan dengan *sucrose gradient*, dilanjutkan pemurnian protein *envelope*. Untuk mengetahui profil protein *envelope* EBL maka dilakukan *SDS-PAGE* seperti yang terlihat pada Gambar 5.8.



**Gambar 5.8** Hasil berat molekul protein virus EBL dengan *SDS-PAGE*

**Keterangan :** Analisis protein dengan *SDS-PAGE* kadar gel 12%.

Lajur 1-7 berisi protein virus EBL; yang terdiri dari protein 15 kDa, 24 kDa, dan protein *envelope* 51 kDa; M adalah Marker.

Hasil *SDS-PAGE* pada Gambar 5.8 menunjukkan protein virus EBL menunjukkan berat molekul yang terlihat antara 14 kDa – 116 kDa. Protein dengan berat molekul 51 kDa merupakan protein virus EBL yang paling menonjol. Selanjutnya untuk mengetahui protein mana yang merupakan *protein hemagglutinin*,

maka diperlukan pemurnian dengan elektro elusi. Tujuan dari elektro elusi untuk menghasilkan protein yang murni.

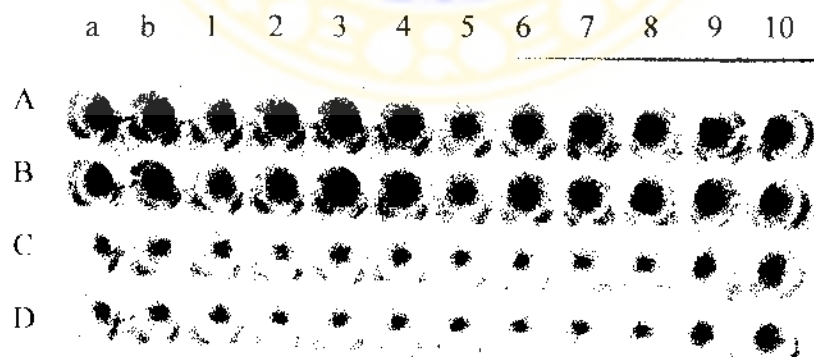
### 5.1.2.2 Isolasi protein virus EBL dengan elektro elusi

Elektro elusi dilakukan pada protein dengan berat molekul 51 kDa, 24 kDa, dan 15 kDa, yang diambil dari hasil *SDS-PAGE*, oleh karena pada Gambar 5.8 tersebut kelihatan jelas.

Hasil elektro elusi dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi, untuk mengetahui protein mana yang mempunyai sifat *hemaglutinin*.

### 5.1.2.3 Hasil uji hemaglutinasi dari protein *Envelope (E)* virus EBL hasil elektro elusi

Hasil uji HA dari protein *E virus EBL* ternyata ditemukan protein dengan berat molekul 51 kDa adalah protein *hemaglutinin*. Hasil pemeriksaan sebagaimana Gambar 5.9



**Gambar 5.9. Hasil uji hemaglutinasi dari protein *Envelope (E)* virus EBL hasil elektro elusi**

**Keterangan :** Lajur A dan B = kontrol positif pada sumuran Aa, Ab, Ba, Bb  
 Lajur C dan D = kontrol negatif pada sumuran Ca, Cb, Da, Db  
 Lajur A dan B, sumuran 1 – 10, berisi protein E gp51 kDa dengan pengenceran sampel secara duplo.  
 Lajur C, sumuran 1 – 10, berisi protein dengan BM 15 kDa  
 Lajur D, sumuran 1 – 10, berisi protein dengan BM 24 kDa



Hasil uji hemaglutinasi protein dengan berat molekul 15 kDa, 24 kDa adalah negatif. Sedangkan uji aglutinasi protein dengan berat molekul 51 kDa positif. Hasil titer aglutinasi pada protein dengan berat molekul 51 kDa adalah sebesar 4 *HIA* unit seperti Gambar 5.9.

Hasil aglutinasi dapat ditabulasi seperti pada tabel 5.1

**Tabel 5.1. Uji HA dari protein E virus EBL hasil elektro elusi**

L	Protein dengan berat molekul	Pengenceran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol negatif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	15 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	15 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	24 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	24 kDa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	51 kDa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	51 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	Kontrol positif aglutinasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Keterangan :**

Lajur A kontrol tidak terjadinya aglutinasi (kontrol negatif yang berisi PBS dan RBC)  
 Lajur B dan C adalah protein 15 kDa  
 Lajur D dan E adalah protein 24 kDa  
 Lajur F sampai sumuran 4 adalah aglutinasi dari protein E gp 51 kDa pada pengenceran 1/128 dan 1/256  
 Lajur G sumuran 1 sampai sumuran 12 adalah protein E gp 51 kDa pada pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 masing – masing pengenceran dimasukkan pada 2 sumuran  
 Lajur H berisi kontrol aglutinasi (kontrol positif yang berisi protein E gp 51 dan RBC tanpa pengenceran)

Hasil uji aglutinasi menunjukkan protein *Egp51* merupakan protein HA. Tujuan penelitian Tahap II dimana untuk membuktikan protein *Egp51* sebagai protein HA telah terbukti, hasil penelitian ini digunakan untuk penelitian Tahap berikutnya.

### **5.1.3 Hasil penelitian Tahap III**

Hasil penelitian Tahap III untuk membuktikan protein HA *Egp51* merupakan protein yang bersifat imunogenik yang dibuktikan secara *in vitro*. Untuk membuktikan protein HA *Egp51* bersifat protektif dibuktikan dengan uji secara *in vivo*. Untuk pembuktian tersebut telah dilakukan serangkaian penelitian sebagai berikut.

#### **5.1.3.1 Hasil Penelitian secara *In Vitro***

##### **5.1.3.1.1 Hasil pembuatan antibodi poliklonal molekul hemaglutinin *Egp 51***

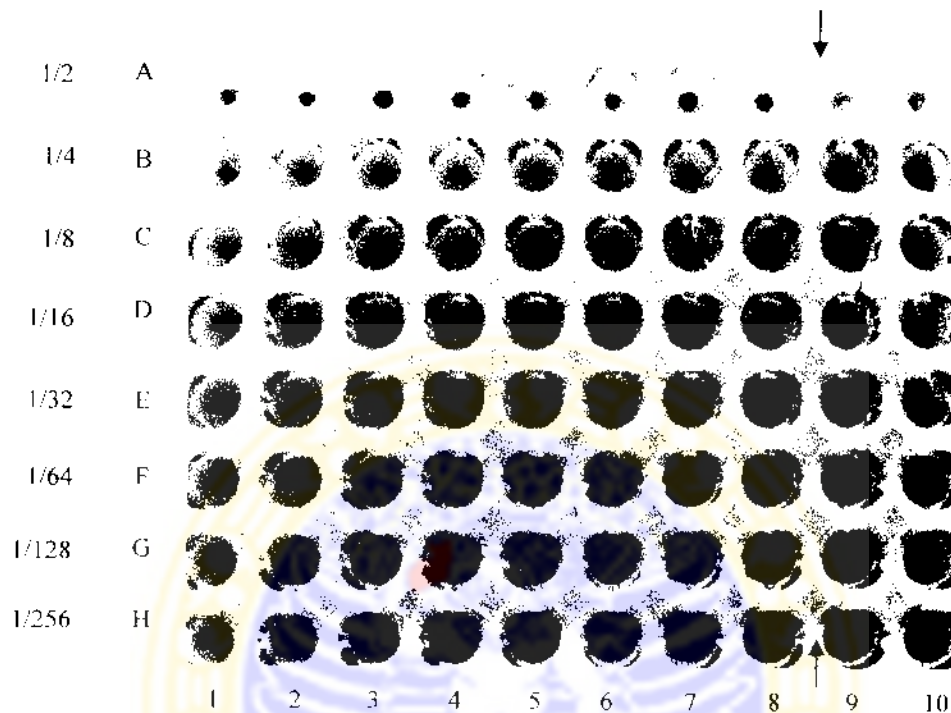
Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* pada kelinci dilakukan pengukuran dengan *HI Test*, Uji Imunositokimia, Uji *Immunoblotting*, dan Uji Serum Netralisasi.

##### **5.1.3.1.1.1 Pengukuran respons imun dengan Uji Hambatan Hemaglutinasi**

###### ***(HI Test)***

Uji hambatan hemaglutinasi untuk mengukur respons imun serum kelinci akibat suntikan protein HA *Egp 51* virus EBL menggunakan virus EBL sebagai antigen dengan kekuatan 4 HA Unit.

Uji HI digunakan dapat dilihat pada Gambar 5.10 dan Tabel 5.2.



**Gambar 5.10.** Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan HI

**Keterangan :**

Lajur A sampai dengan H kolom 1 sampai dengan kolom 8 adalah kontrol positif terlihat endapan sel darah merah yang tidak terikat oleh antigen yang menandakan adanya antibodi

Lajur A sampai dengan H kolom 9 dan 10 adalah kontrol negatif, terjadi aglutinasi berarti terjadi pengikatan antigen terhadap sel darah merah.

Kolom 1 sampai dengan kolom 8 adalah lajur pengenceran yang terdiri dari 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

Hasil tes HI pada Gambar 5.11, ternyata masih positif pada pengenceran paling tinggi yaitu 1/256).

Hasil tabulasi Uji HI sebagaimana Tabel 5.2.

**Tabel 5.2. Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA Egp 51 dengan pemeriksaan HI pada konsentrasi serum 1/2 sampai dengan 1/256**

L	HA 4 Unit	Pengenceran								K negatif	
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	9	10
		1	2	3	4	5	6	7	8		
A	Protein 51 kDa	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-
B	Protein 51 kDa	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-
C	Protein 51 kDa	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-
D	Protein 51 kDa	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-

**Keterangan :**

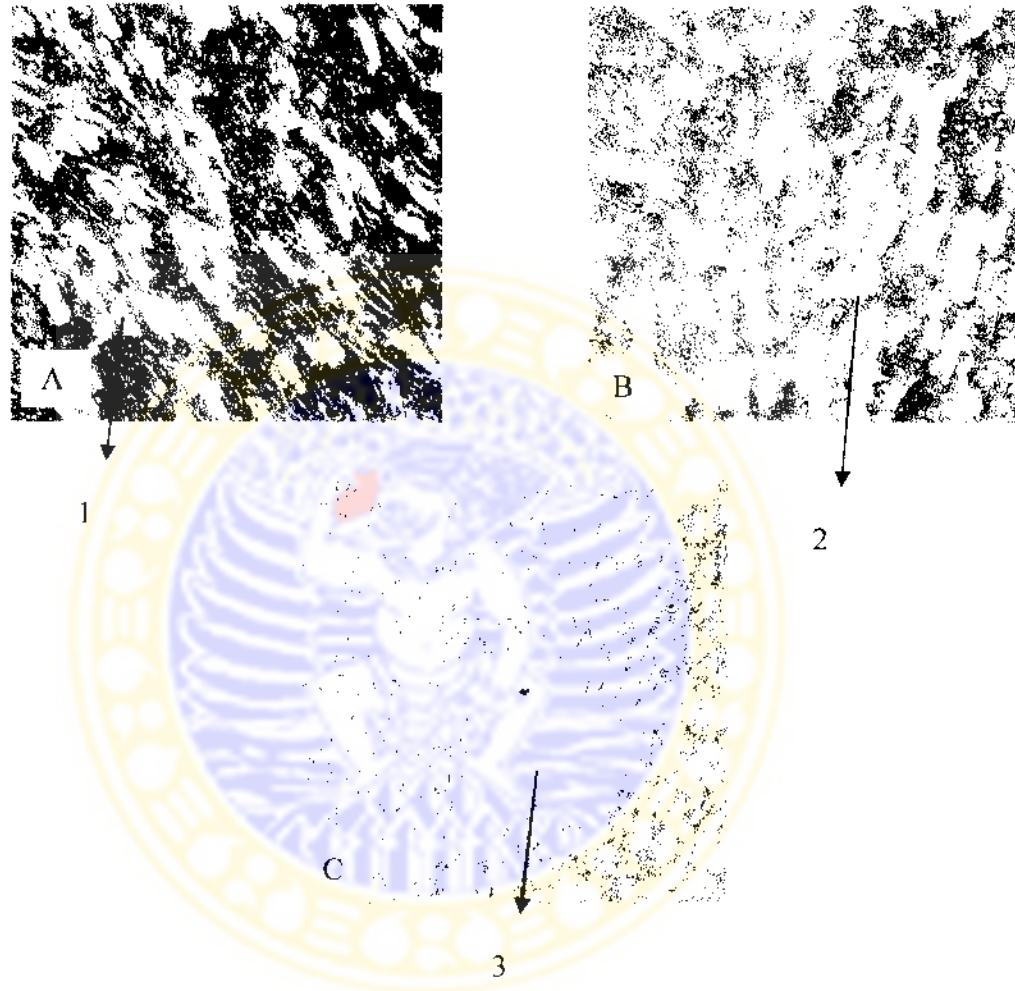
**Lajur A sampai dengan D** kolom 1 sampai dengan kolom 8 adalah kontrol positif terlihat endapan sel darah merah yang tidak terikat oleh antigen yang menandakan adanya antibodi

**Lajur A sampai dengan D** kolom 9 dan 10 adalah kontrol negatif terjadi aglutinasi berarti terjadi pengikatan antigen terhadap sel darah merah.

**Kolom 1 sampai dengan kolom 8** adalah lajur pengenceran yang terdiri dari 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

### 5.1.3.1.1.2 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan Imunositokimia

Hasil pemeriksaan imunositokimia sebagaimana Gambar 5.11.



**Gambar 5.11. Hasil Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan imunositokimia**

**Keterangan :**

**Gambar A:** kontrol sel yang tidak dipapar virus EBL dan tidak diberi protein *Egp 51* terlihat sel masih utuh (*intack*) (1)

**Gambar B:** sel yang dipapar virus EBL, kemudian diberi protein *Egp 51* terlihat bagian yang berwarna coklat merupakan bagian yang mengenali antibodi; terjadi ikatan antigen antibodi

**Gambar C:** sel yang dipapar virus EBL tanpa pemberian protein *Egp 51* terlihat bagian yang berwarna hijau yang menandakan tidak terjadi ikatan antigen antibodi. Sel mengalami kerusakan (3)

### 5.1.3.1.1.3 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan *immunoblotting*

Hasil Uji *Immunoblotting* dapat dilihat pada Gambar 5.12.



**Gambar 5.12.** Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan pemeriksaan *immunoblotting*

**Keterangan :** Pada lajur 2 dan 3 berisi protein 15 kDa dan 24 kDa tidak terlihat *band* (pita protein) yang berarti tidak terjadi respon imun  
 Pada lajur 4, 5, dan 6 berisi protein *Egp 51* kDa terjadi respon imun ditandai dengan terlihatnya *band* (pita protein).  
 Pada lajur 8 berisi marker protein

Lajur 1,2 dan 3 tidak tampak gambar pita protein, sedangkan pada lajur 4,5 dan 6 ditemukan pita protein dengan berat molekul 51 kDa

### 5.1.3.1.1.4 Hasil Uji Respons imun yang diakibatkan oleh suntikan molekul HA *Egp 51* dengan Uji Serum Netralisasi

Hasil Uji Serum Netralisasi untuk mengetahui daya protektif imunogenik dari protein *Egp 51* kDa.

Pada Uji protektifitas yang dilakukan pada hewan coba kelinci dengan pemberian protein *Egp 51 kDa* dan di-*challenge* dengan virus ganas titer  $10^{7.8}$  *TCID<sub>50</sub>*. Hasilnya ternyata organ hati dan lambung tidak menunjukkan adanya pus (nanah). Hal ini menunjukkan bahwa protein *Egp 51 kDa* bersifat protektif seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.13. A dan B.

## 5.2 Hasil analisis data penelitian

Tabel 5.3. merupakan tabulasi dari hasil penelitian isolasi dan karakterisasi sub unit protein HA *Egp 51* virus EBL isolat lokal sebagai protein kandidat vaksin sub unit.

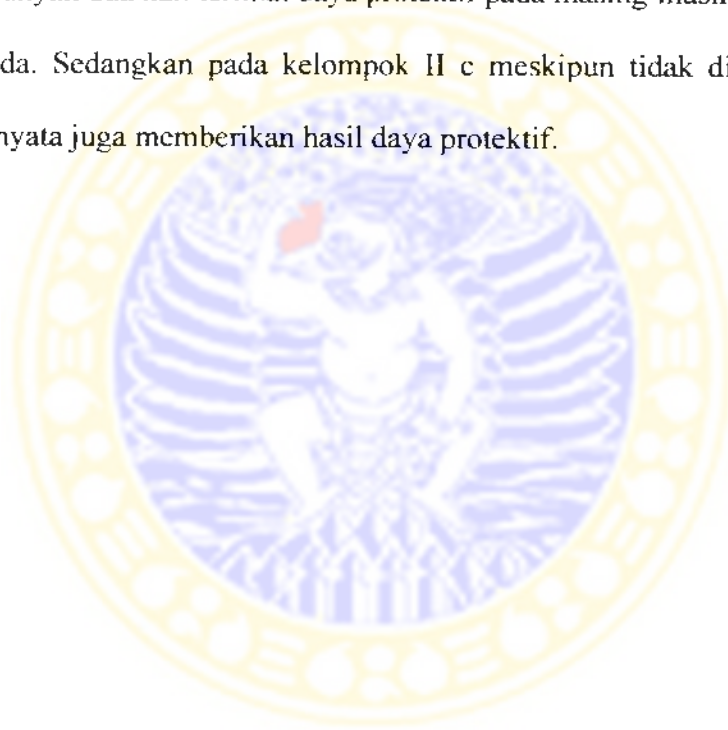
Salah satu pertanda adanya penyakit EBL, ditunjukkan dengan adanya kenaikan jumlah limfosit secara abnormal.

**Tabel 5.3. Hasil penghitungan jumlah limfosit setelah di-*challenge* dengan virus EBL pada titer  $10^{7.8}$  *TCID<sub>50</sub>***

Pemeriksaan Hari Ke	Perlakuan			
	Virus	Virus + Protein <i>Egp 51</i>		
		Boster 1 Kali	Boster 2 Kali	Tanpa Boster
5	18843,40 ± 375,21 <sup>a*</sup>	405,80 ± 5,31 <sup>b</sup>	395 ± 5,45 <sup>b</sup>	400,60 ± 4,51 <sup>b</sup>
10	18751,00 ± 512,96 <sup>a</sup>	413,40 ± 5,58 <sup>b</sup>	400,00 ± 1,00 <sup>b</sup>	403,00 ± 4,12 <sup>b</sup>
15	18878,40 ± 515,54 <sup>a</sup>	411,60 ± 3,58 <sup>b</sup>	400,60 ± 0,89 <sup>b</sup>	401,80 ± 2,39 <sup>b</sup>
20	19018,00 ± 475,03 <sup>a</sup>	412,00 ± 3,08 <sup>b</sup>	399,60 ± 0,55 <sup>b</sup>	406,20 ± 5,26 <sup>b</sup>
25	19149,20 ± 472,40 <sup>a</sup>	411,60 ± 4,39 <sup>b</sup>	397,80 ± 2,86 <sup>b</sup>	402,80 ± 4,86 <sup>b</sup>
30	19269,80 ± 496,60 <sup>a</sup>	411,60 ± 4,39 <sup>b</sup>	397,80 ± 2,86 <sup>b</sup>	402,80 ± 4,82 <sup>b</sup>
35	19388,20 ± 475,25 <sup>a</sup>	393,80 ± 41,96 <sup>b</sup>	399,80 ± 0,84 <sup>b</sup>	401,80 ± 5,75 <sup>b</sup>
40	19690,90 ± 430,48 <sup>a</sup>	408,00 ± 4,53 <sup>b</sup>	400,00 ± 0,71 <sup>b</sup>	397,40 ± 8,79 <sup>b</sup>
45	20564,00 ± 871,19 <sup>a</sup>	412,00 ± 3,78 <sup>b</sup>	389,40 ± 22,60 <sup>b</sup>	404,20 ± 8,84 <sup>b</sup>

- Superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda sangat nyata ( $p < 0,05$ )

Pada Tabel 5.3 terlihat adanya perbedaan yang signifikan dari hewan coba yang disuntik dengan protein *Egp 51 kDa* dengan yang tidak disuntik protein *Egp 51 kDa* (kelompok kontrol); tetapi di-*challenge* dengan virus EBL titer tinggi  $10^{7.8}$   $TCID_{50}$ . Pada kelompok kontrol semua hewan coba akhirnya mati setelah hari ke 45. ini merupakan pertanda bahwa dosis yang dipakai adalah merupakan *lethal dose*. Pada kelompok II a suntikan ulangan satu kali dan kelompok II b diberi suntikan ulangan sebanyak dua kali terlihat daya protektif pada masing-masing kelompok yang tidak berbeda. Sedangkan pada kelompok II c meskipun tidak dilakukan suntikan ulangan ternyata juga memberikan hasil daya protektif.





## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Penelitian Tahap I

EBL adalah penyakit ganas yang menyebabkan angka kematian 90 – 100 % dan menimbulkan kerugian ekonomi cukup tinggi, sampai saat ini pengobatan maupun vaksinnnya belum ditemukan (Resang *et al.*, 1996; OIE, 2000).

Untuk mengetahui apakah virus EBL ini memenuhi *Postulat Koch* maka dilakukan penelitian pendahuluan yang terdiri dari serangkaian penelitian yaitu: pembuatan *cell OL*, inokulasi dan titrasi virus EBL pada *cell* uji OL, patologi anatomis, uji agar gel imunodifusi dan deteksi materi genetik

##### 6.1.1 Pembuatan *cell OL*

Metoda isolasi dan identifikasi *cell* dilakukan dengan mengambil fetus domba muda umur 4 minggu dari RPH Pegirian Surabaya, kemudian dicuci dengan PBS, direndam dengan media RPMI ditambah dengan antibiotika. Kemudian diambil paru-paru, dipotong kecil – kecil, ditripsinasi, sentrifus, diambil endapannya diberi media *maintenance cell* ditambah dengan *foetal calf* serum 5-10% dalam 100 ml media; diinkubasikan selama 5-7 hari pada suhu 37° C, diobservasi sampai dengan *cell confluent* kemudian dipasase berulang-ulang sampai pasase 50 yang merupakan sifat *cell line*. Pada perkembangan pertama terlihat *cell* masih mengalami adaptasi, sehingga perlu diadakan penggantian *media maintenance* untuk mendapatkan *cell* yang *confluent*. Masa inkubasi yang dibutuhkan pada pengembangan *cell* awalnya

masih memerlukan waktu berkisar 5-7 hari, dengan perkembangan *cell* yang masih belum maksimal; ini terjadi pada pasase satu sampai pasasi dua belas. Pasase selanjutnya sudah terlihat perkembangan *cell line* yang mulai mengalami adaptasi dan berkembang cepat, dimana inti *cell* dan kromosom bersifat stabil, yang dapat dipasasi secara terus menerus dengan masa inkubasi yang semakin pendek. Sifat *cell line* adalah dapat berkembang dan dipasasi secara terus menerus sampai pasase 50, sebagaimana Lampiran 3 dan Gambar 5.2 (A, B, C).

Menurut Johan, 1975 dan Kaplan *et al.*, 1973, bahwa *cell* dikatakan dapat bersifat *cell line*, bila dapat dipasase sampai pasase 50. Pada penelitian ini ternyata *cell OL* bersifat *cell line* dan dapat dipasase melebihi pasase 50 yaitu sampai pasase 58, sebagaimana pada Lampiran 3 dan Gambar 5.2 (D) Menurut Johan, 1975 dan Kaplan *et al.*, 1973, media *maintenance cell* yang digunakan adalah terdiri dari *media eagle overlay* sembilan puluh lima persen ditambah dengan *foetal calf serum* lima persen; tetapi pada penelitian ini media *maintenance cell* yang digunakan sama seperti peneliti terdahulu kemudian ditambahkan pula TPB sebanyak sepuluh persen karena menurut Burke *et al.*, 1973 TPB dapat merangsang peningkatan pertumbuhan dan perkembangan *cell*, ternyata dengan menggunakan TPB sepuluh persen memang dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan *cell* (Hasdianah, 1998).

### **6.1.2 Inokulasi dan titrasi virus EBL pada *cell OL***

Virus EBL diisolasi dari sapi di Lembang oleh BPMSOH tahun 1998 diinokulasikan menggunakan *cell OL* sampai dengan pasasi 15; kemudian dalam penelitian ini diadaptasikan pada *cell OL* sampai dengan pasasi 29.

Virus EBL adalah virus RNA yang mempunyai sifat stabil. Oleh karena itu virus ini dalam memproduksi antigen untuk karakterisasi proteinnya telah dipasasekan sampai 29 kali, sehingga didapatkan virus yang mempunyai titer cukup tinggi (sesuai dengan OIE, 2000). Sifat pertumbuhan virus EBL pada *Cell OL* pasase 15 membentuk *CPE* 50% memerlukan waktu 7 hari dengan  $TCID_{50} 10^{4.4}$ . Selanjutnya semakin meningkat jumlah pasasenyanya semakin cepat daya multiplikasinya hingga pada pasase 25 daya multiplikasinya sangat meningkat tajam, *CPE* terbentuk 90% memerlukan waktu hanya 3 hari dengan nilai  $TCID_{50} 10^{7.4}$ . Walaupun demikian untuk mencari sifat yang stabil, maka diperlukan pasase ulang sampai pada pasase 27 virus mampu membentuk *CPE* 90% dalam waktu 2 hari dengan  $TCID_{50} 10^{7.8}$  sebagaimana Gambar 5.4 (A, B). Hal ini menunjukkan bahwa virus EBL sifat pertumbuhannya stabil dengan harapan tidak mengalami mutasi. Hasil titrasi virus selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4 (Kaplan, 1973; Sarjono, 1993; Ishino, *et.al*, 2000).

### 6.1.3 Uji *Postulat Koch* pada perubahan patologi anatomis

Adanya kenyataan bahwa yeast mempunyai peranan yang nyata terhadap terjadinya fermentasi maka para ilmuwan sekitar tahun 1860-an yang salah satu diantaranya adalah Louis Pasteur mempunyai ide kesamaan ide mengenai *germ theory of disease* (teori penyakit yang dihubungkan dengan mikroorganisme). Pada kurun waktu tersebut belum dikenal istilah bakteri, virus, jamur maupun protozoa. Teori ini berdasar atas adanya peristiwa yang terjadi pada fermentasi tersebut yaitu adanya perubahan materi organik oleh pengaruh mikroorganisme secara fisik maupun kimiawi.

yaitu *Treponema pallidum* dan Morbus Hansen yaitu *Mycobacterium leprae* tidak dapat ditumbuhkan pada media perbenihan. Apalagi penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus sukar untuk ditumbuhkan pada media perbenihan misalnya virus penyebab AIDS dan SARS.

Atas dasar kenyataan tersebut diatas maka mulai akhir 1960-an ditemukannya plasmid bakteri dan sekitar 1970-an adanya revolusi dalam bidang biomolekuler dengan ditemukannya DNA rekombin maka *Postulat Koch* (Robert Koch) direvisi menjadi *Postulat Koch* versi molekuler. Postulat tersebut juga terdapat empat syarat yaitu, syarat pertama : Gen atau produknya harus ditemukan pada strain bakteri yang virulent, yang menimbulkan penyakit dan tidak ditemukan pada bakteri yang tidak menimbulkan penyakit (*avirulent*). Syarat ke dua : Kerusakan atau kehilangan gen virulensi tersebut akan menyebabkan penurunan atau kehilangan sifat virulensinya. Syarat ke tiga : *Gene* virulensi tersebut dapat ditemukan pada penderita yang sakit akibat infeksi bakteri yang virulent tersebut. Syarat yang ke empat : Antibodi yang dihasilkan oleh produksi gen yang virulent tersebut bersifat protektif (Salyers and Whitt, 1994)

Untuk mengetahui apakah virus EBL ini memenuhi *Postulat Koch* maka dilakukan serangkaian penelitian yaitu : pembuatan *cell OL*, inokulasi dan titrasi virus EBL pada *cell OL*, patologi anatomis, agar gel imunodiffusi dan deteksi materi genetik

Kelainan patologi anatomis terlihat jelas bahwa adanya virus EBL ditunjukkan dengan pembesaran hati yang menyebabkan hepatomegali, pembesaran lambung yang berisi nanah serta adanya benjolan – benjolan pada hampir seluruh permukaan tubuh ternak sapi yang terserang virus EBL, yang mana bila bagian

tersebut diiris maka akan mengeluarkan nanah yang berwarna putih kekuning – kuning, padat, dan mengeras, juga menimbulkan bau yang sangat tidak sedap. Benjolan – benjolan yang terbentuk adalah merupakan hasil dari proliferasi dan differensiasi abnormal dari *cell* limfosit yang menyebabkan limfositosis persisten (Lanier, 1991; Kenneth *et al.*, 1996). Kenaikan jumlah limfosit secara abnormal dan sangat menyolok sebagai akibat dari infeksi virus EBL; sebagaimana Lampiran 7 menunjukkan bahwa infeksi virus EBL sangat ganas seperti yang dikatakan oleh Spitter *et al.*, 1996 dan Norimine *et al.*, 2000. Dengan adanya kenaikan jumlah limfosit yang menyebabkan limfositosis persisten karena bantuan IL-8 dan NF-kB sehingga akan menyebabkan sel plasma mengekspresikan antibodi dalam jumlah yang tinggi. Antibodi dalam jumlah yang tinggi hasil ekspresi IL-8 dan NF-kB yang menghasilkan pula protein hemaglutinin *Egp 51* dalam jumlah yang tinggi yang bersifat antigenik, imunogenik, dan protektif menurut Bonzio *et al.*, 2003. Selama ini perlekatan virus EBL melalui LPS seperti yang dikatakan Bonzio *et al.*, 2003, ternyata virus EBL dapat dilekatkan dan diekspresikan melalui protein hemaglutinin *Egp 51* yang merupakan molekul adhesin dengan bantuan IL-8 dan NF-kB untuk menghasilkan antibodi hasil ekspresi protein hemaglutinin *Egp 51* yang bersifat antigenik, imunogenik, dan protektif sebagai temuan baru dalam penelitian ini.

Dengan pemberian antibodi terhadap protein *Egp 51* yang bersifat imunogenik dan protektif, mekanisme terjadinya kenaikan limfosit secara persisten ini dapat dihambat dan dicegah sebagaimana gambar pada Lampiran 8. Dari hasil seperti pada Gambar 5.5 terlihat adanya perbedaan yang nyata pada hewan coba yang diberi protein *Egp 51* di mana terlihat tidak terbentuknya nanah pada bagian hepar hewan

percobaan, yang menunjukkan mekanisme limfositosis persisten dapat dicegah. Hal ini seperti yang dinyatakan oleh *Robert Koch* tahun 1876 untuk mengetahui keberadaan suatu virus maka diadakan Uji *Postulat Koch* klasik. Hasil tersebut sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 5.5. (OIE, 2000)

#### 6.1.4 Uji agar gel imunodiffusi

Dihasilkan adanya garis presipitasi dari serum yang didapat dari hewan coba yang diberi protein *Egp 51* dengan antigen virus EBL seperti pada Gambar 5.7

Hasil penelitian mengenai reaksi antigen antibodi yang dikerjakan menggunakan agar gel imunodiffusi metode Nakajima, *et.al.*, 2000 dapat dilihat adanya garis presipitasi yang merupakan hasil ikatan antigen dan antibodi di antara sumuran – sumuran agar gel imunodiffusi yang membuktikan bahwa virus EBL dapat berikatan dengan antibodi spesifik sebagaimana pada Gambar 5.7. Seperti pada penelitian terdahulu bahwa untuk mendeteksi keberadaan virus EBL digunakan uji serologi yaitu uji agar gel imunodiffusi; hal ini sesuai dengan kesepakatan ahli EBL berdasarkan hasil pertemuan di Copenhagen tahun 1989 (Djaffar, 1985; Miller *et al.*, 1999). Keberhasilan pembuatan antigen *test KIT* penyakit EBL yang berisi antigen *test*, serum *refferen*, serum negatip, serum kontrol positip, serum kontrol positip lemah (*weak positive*); yang telah digunakan untuk pengujian serum lapangan penyakit EBL, dan sebagai kontrol digunakan antigen *test KIT* penyakit EBL produksi Kanada, di mana hasilnya adalah kurang lebih sama; yang membuktikan pula bahwa virus EBL isolat lokal yang digunakan dalam penelitian ini benar adalah virus EBL isolat lokal; sebagaimana Tabel 2.1.

Garis presipitasi di antara sumuran antigen dan antibodi menunjukkan bahwa adanya ikatan antigen antibodi spesifik, berarti yang digunakan adalah benar virus EBL (Miller, 1995; OIE, 2000; Hasdianah, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian Tahap I ini ternyata dapat menyimpulkan beberapa poin di atas dari uji *Postulat Koch* dapat terpenuhi dan virus yang akan digunakan untuk penelitian tahap berikutnya adalah benar virus EBL. Penelitian selanjutnya meliputi penelitian Tahap II yaitu eksploratif dan Tahap III yang terdiri dari penelitian *in vitro* dan *in vivo*.

## 6.2 Penelitian Tahap II

Penelitian Tahap II bertujuan untuk menentukan protein *Egp 51* adalah protein hemaglutinin. Penelitian ini meliputi : pemurnian virus EBL, pemurnian protein *envelope* virus EBL, pengukuran berat molekul protein *Egp 51* virus EBL dengan *SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polo Acrylamide Gel Electrophoresis)* sebagaimana Gambar 5.7, terlihat ada beberapa jenis protein virus EBL yang terdiri dari protein struktural yang mempunyai berat molekul yang berbeda, yaitu 15 kDa, 24 kDa, serta protein *envelope* yang merupakan glikoprotein dengan berat molekul 51 kDa. Dari ketiga macam protein tersebut sangat memungkinkan dapat digunakan sebagai vaksin. Dari hasil *SDS-PAGE* dalam penelitian ini terlihat pita band tebal dengan berat molekul 51 kDa sangat mencolok dibanding pita yang lain di bawahnya. Hal ini menunjukkan bahwa protein dengan berat 51 kDa merupakan protein yang bersifat makromolekul dan diharapkan dapat bersifat imunogenik sesuai dengan yang dikatakan oleh Abbas *et al.*, 1991 dan

Goldsby, 2001 yang mengatakan protein molekul yang besar mempunyai daya imunogenitas yang tinggi. Ciri pokok antigenesitas agar dapat bersifat antigenik haruslah merupakan molekul yang besar, kaku, dan kimiawi kompleks. Dan molekul yang besar jauh lebih baik karena ukuran dan kerumitan strukturnya. Ternyata bagian protein yang bersifat hemagglutinin dan bersifat imunogenik adalah protein yang mempunyai berat 51 kDa, yang merupakan protein hemagglutinin. Protein hemagglutinin *Egp 51* kDa adalah bersifat molekul adhesin. Molekul adhesin sangatlah penting dalam perlekatan virus, di mana protein hemagglutinin *Egp 51* kDa merupakan protein yang akan digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit karena protein hemagglutinin *Egp 51* kDa sangatlah memenuhi persyaratan sebagai kandidat vaksin sub unit sebagaimana hasil yang telah ditemukan dalam penelitian ini.

### 6.2.1 Elusi Protein Spesifik Imunogenik

Pita protein tebal yang terbentuk pada berat molekul 38,1 kDa dipotong dilakukan elusi, kemudian diukur kembali berat molekulnya. Pengukuran berulang ini dimaksudkan untuk mengecek kembali kebenaran dan ketepatan sebagaimana seperti berat molekul semula. Pengujian ini penting karena ketepatan berat molekul yang sesuai dan tepat menunjukkan kemurnian protein spesifik dengan berat molekul sama seperti semula.

Karakterisasi selanjutnya adalah melakukan *Immunoblotting (Western blott)*. Hasil *blotting* dalam penelitian ini menggunakan bahan protein spesifik dan antibodi poliklonal menunjukkan reaksi spesifik yang jelas. Ini berarti terjadi reaksi pengikatan antara antigen dengan antibodi yang homolog. Reaksi demikian menunjukkan bahwa



respon imun yang ditimbulkan oleh tubuh kelinci dalam rangka membentuk antibodi adalah akibat reaksi dari antigen sebagai benda asing yang spesifik dan mampu menggerakkan tubuh untuk membentuk antibodi. Hal ini sesuai dengan pendapat Tizzard (1988) dan Samik (1993) yang menyatakan bahwa terjadinya respon imun adalah karena reseptor pada permukaan molekul antibodi mampu mengikat molekul antigen karena homolog, sehingga terjadi ikatan antara antigen-antibodi.

Dari seluruh hasil pengujian yang telah dilakukan ternyata hanya protein *Egp 51* yang bersifat protein hemagglutinin. Protein hemagglutinin merupakan protein adhesin, yaitu protein yang berperan dalam perekatan suatu mikroba baik virus maupun bakteri pada sel hospes (Karzenstein *et al.*, 1999; Sumarno, 2000; Fitri L.E., 2005). Pada beberapa bakteri telah ditemukan protein hemagglutinin yang bertindak sebagai molekul adhesin seperti halnya pada bakteri *Vibrio Cholera* 38 kDa; dan pada *Salmonella thypi* 36 kDa (Sumarno, 2000; Sunarto S., 2002). Pada virus telah ditemukan pula protein hemagglutinin seperti pada virus *HIV* yang berasal dari *envelope glycoprotein* dengan berat molekul 140 kDa yang berperan pada pelekatan virus *HIV* pada cell  $CD^{8+}$  (Weiner *et al.*, 1999; Karzenstein *et al.*, 1999). Pada parasit telah ditemukan protein hemagglutinin pada penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* yang mempunyai berat molekul 270 kDa, protein hemagglutinin ini berfungsi sebagai protein adhesin (Fitri L.E., 2005). Protein *Egp 51* adalah protein hemagglutinin serta merupakan molekul adhesin yang bersifat protektif dan imunogenik yang terdapat pada bagian *envelope* virus EBL; hal ini menunjukkan protein *Egp 51* dapat digunakan sebagai kandidat vaksin, hal ini dapat ditunjukkan sebagaimana Gambar 5.10 dan Tabel 5.3 (Sumarno, 2000; Abigail, 2002). Beberapa

penelitian mengenai hemagglutinin dapat digunakan sebagai bahan dasar vaksin, sebagai contoh dalam menanggulangi penyakit pertusis yang disebabkan oleh *Bordella pertusis*, dan vaksin lain yang berbasis protein hemagglutinin yang berisi molekul adhesin yaitu vaksin pertactin. Bakteri lain yang akan digunakan sebagai bahan vaksin yang mengandung protein hemagglutinin dan masih dalam penelitian adalah pada bakteri yang menyebabkan infeksi saluran kencing, yaitu bakteri yang mengandung protein hemagglutinin strain UPEC (*Uro Pathogenic Eicesheria coli*) (Sumarno, 2000). Dari hasil pembahasan yang didukung dengan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin yang berada di daerah *envelope* virus EBL, adalah protein *Egp 51* yang bersifat imunogenik.

### 6.3 Penelitian Tahap III

#### 6.3.1 Uji *In Vitro*

Penelitian tahap III terdiri dari penelitian *in vitro* yang tujuannya untuk membuktikan respon imun dari protein hemagglutinin berat molekul 51 kDa bersifat imunogenik dan protektif. Penelitian *in vitro* yang dilakukan di dalam *mikroplate* dihasilkan bahwa protein *Egp 51* kDa mempunyai sifat imunogenik di mana di dalam *mikroplate* protein *Egp 51* dapat menghasilkan aglutinasi, menunjukkan adanya virus EBL.

Sifat imunogenitas dari protein hemagglutinin 51 kDa virus EBL dapat dilihat dari hasil penelitian yang ditampilkan pada Gambar 5.13, dan Tabel 5.1. Hasil *HA* menunjukkan pada protein *Egp 51* dapat menghasilkan titer 4 *HIA* unit, berarti pada titer 4 *HIA* unit ini dapat dilanjutkan dengan uji respon imun, yang menunjukkan

bahwa virus EBL bersifat imunogenik seperti laporan Wringati, 2005 dari *training "Surveillance and Diagnose of Avian Influenza"* di Hongkong dan Sri Wienarsih dkk., 1998, yang mengatakan bahwa protein hemagglutinin adalah molekul adhesi yang sangat penting dalam perlekatan virus pada tubuh inang.

Uji *Postulat Koch* Molekuler melalui Uji *Western Blott*, terjadi ikatan kuat antara protein dan antibodi poliklonal EBL. Hal ini tidak akan terjadi bila mereaksikan protein dengan serum normal, karena serum normal tidak dapat mengenal epitop yang terdapat pada protein. Oleh karena itu selanjutnya hasil purifikasi virus EBL dari supernatan biakan kultur *cell* dapat digunakan untuk karakterisasi protein antigenik dan imunogenik (Doran, *et.al*, 1996; Parslow, 1990; Grossman, *et.al*, 2001; Abigael, *et.al.*, 2002).

Eksperimen reaksi hambatan hemagglutinasinya dapat dilihat pada baris yang berisi *protein Egp 51* menunjukkan *protein sub unit Egp 51* virus EBL tersebut menghambat aglutinasi virus EBL, terlihat adanya endapan dari sel darah merah sapi yang menandakan *protein Egp 51* berikatan dengan antigen virus EBL sebagai petunjuk bahwa *protein Egp 51* tersebut bersifat imunogenik (OIE, 2003; Sumarno, 2000). Pada Uji Imunohistokimia terlihat sebagaimana Gambar 5.15, bagian *cell* yang terlihat masih *intact* walaupun telah diberi virus ganas titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> menunjukkan bahwa *protein E gp51* yang diberikan bersifat imunogenik protektif. adanya warna coklat menunjukkan adanya bagian virus dan warna hijau menunjukkan bagian yang terproteksi (Tortora *et al.*, 2001).

Sedangkan untuk membuktikan bahwa anti bodi protein hemagglutinin 51 kDa adalah bersifat protektif dapat dilihat dari hasil penelitian Uji *HI* seperti pada

Gambar 5.14. dan Tabel 5.2. Pada Uji *HI* ditemukan sifat protektif dari protein *Egp 51* hemagglutinin, dengan titer 64 *HI* unit yang menandakan virus EBL bersifat protektif. Pada uji serum netralisasi test terlihat bahwa antibodi *gp 51* mempunyai daya protektifitas lebih tinggi dibandingkan dengan protein lainnya. Hal ini berarti *protein gp 51* mempunyai sifat imunogenik. Sedang jenis protein yang mempunyai berat molekul 24 kDa dan protein 15 kDa lebih cocok untuk digunakan sebagai bahan diagnostik, karena kemungkinan protein ini diekspresi pada awal infeksi dan yang menginduksi respon imun pertama kali di dalam induk semang. Hasil sebagaimana Lampiran 5, terlihat pada Kelompok I titer rendah tidak ada daya imunogenisitas dan protektifitas karena pada kelompok ini tidak diberi *protein Egp 51* tetapi *dichallenge* dengan Virus EBL Titer  $10^{7.8}$  *TCID<sub>50</sub>*. Pada kelompok II sudah mulai terlihat adanya daya imunogenisitas dan protektifitas yang positif; karena pada kelompok II (IIa, IIb, IIc) merupakan kelompok yang diberi protein hemagglutinin *Egp 51*, dari hasil kelompok II dapat ditarik kesimpulan bahwa melalui uji serum netralisasi terdapat titer antibodi yang tinggi dengan pemberian protein hemagglutinin *Egp 51* pada yang diboster 1 kali maupun yang diboster 2 kali. Dari hasil tersebut di atas membuktikan bahwa protein hemagglutinin *Egp 51* bersifat imunogenik dan protektif.

### 6.3.2 Uji *In Vivo*

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* yang kemudian *dichallenge* virus EBL ganas dengan titer  $10^{7.8}$  *TCID<sub>50</sub>* pada hari ke lima menunjukkan jumlah lebih banyak secara sangat signifikan daripada jumlah limfosit yang *dichallenge* virus yang sama tetapi sebelumnya mendapat

perlakuan pemberian protei *Egp 51*, baik yang mengalami pembosteran satu kali, dua kali bahkan yang tidak *dibooster* tapi *dichallenge* ( $p < 0,01$ ). Di antara subyek yang diberi perlakuan pemberian protei *Egp 51*, menunjukkan bahwa pembosteran tidak menunjukkan pengaruh terhadap jumlah limfosit yang signifikan. Hal itu dapat dilihat dari antara subyek yang *dibooster* satu kali terhadap subyek yang *dibooster* dua kali atau terhadap subyek yang tanpa *dibooster* dan subyek yang *dibooster* dua kali terhadap subyek yang tidak mengalami pembosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang *dichallenge* virus EBL tetapi mendapat perlakuan pemberian protei *Egp 51* baik yang mengalami *booster* ulang satu kali, dua kali dan tahap *booster* ulang berturut – turut adalah  $18843,40 \pm 375,21$ ;  $405,80 \pm 5,31$ ;  $395 \pm 5,45$ ;  $400,60 \pm 4,51$ .

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protei *Egp 51* yang kemudian *dichallenge* virus EBL ganas dengan titier  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> pada hari kesepuluh menunjukkan jumlah lebih banyak secara sangat signifikan daripada jumlah limfosit yang *dichallenge* virus yang sama tetapi sebelumnya mendapat perlakuan pemberian protei *Egp 51*, baik yang mengalami *booster* ulang satu kali, dua kali bahkan yang tidak *dibooster* ( $p < 0,01$ ). Seperti pada hari ke lima pemeriksaan jumlah limfosit di antara subyek yang diberi perlakuan pemberian protei *Egp 51*, menunjukkan bahwa pembosteran tidak menunjukkan pengaruh terhadap jumlah limfosit yang signifikan. Hal itu dapat dilihat dari antara subyek yang *dibooster* satu kali terhadap subyek yang *dibooster* dua kali atau terhadap subyek yang tanpa *diboster* dan subyek yang *diboster* dua kali terhadap subyek yang tidak mengalami pembosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang

signifikan ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang *dichallenge* virus EBL. Jumlah limfosit subyek yang *dichallenge* virus EBL tetapi mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* baik yang mengalami *pemboosteran* satu kali, dua kali dan tanpa *pemboosteran* berturut turut adalah  $18751,00 \pm 512,96$ ;  $413,40 \pm 5,58$ ;  $400,00 \pm 1,00$ ;  $403,00 \pm 4,12$ .

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* yang kemudian *dichallenge* virus EBL ganas dengan titier  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub> pada hari ke lma belas sebesar  $18878,40 \pm 515,54$ . Jumlah ini lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan dengan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama dan diperiksa pada hari yang sama tetapi ditambahkan protein *Egp 51*. baik terhadap subyek yang mengalami *pemboosteran* satu kali yaitu sebesar  $411,60 \pm 3,58$ . subyek yang mengalami *pemboosteran* dua kali, sebesar  $400,60 \pm 0,89$  atau tanpa *pemboosteran*  $401,80 \pm 2,39$  ( $p > 0,05$ ).

Hasil pemeriksian yang dilakukan pada hari kedua puluh menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* adalah  $19018,00 \pm 475,03$  sedangkan tiga perlakuan lainnya, terdiri atas pemberian protein *Egp 51* dan *dibooster* satu kali, pemberian protein *Egp 51* dan *dibooster* dua kali dan pemberian protein *Egp 51* tanpa *pemboosteran* berturut turut adalah  $412,00 \pm 3,08$ ;  $399,60 \pm 0,55$  dan  $406,20 \pm 5,26$ . Hasil analisis data menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* lebih banyak secara sangat signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* baik yang *dibooster* maupun tanpa *pemboosteran* ( $p < 0,01$ ). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* dan mengalami

pemboosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami pemboosteran dua kali ( $p > 0,05$ ). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* dan mengalami pemboosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa pemboosteran ( $p > 0,05$ ). Antara subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* dan mengalami pemboosteran dua kali terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* tetapi tanpa mengalami pemboosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

Pada hari ke 25 hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* sebesar  $19149,20 \pm 472,40$ . jumlah limfosit pada subyek ini lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp 51* ( $p < 0,01$ ). Di antara subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* diperoleh hasil jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali tidak berbeda nyata dengan jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang tidak diboster tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap subyek yang mengalami pemboosteran satu kali atau dua kali ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* baik yang mengalami pemboosteran satu kali, dua kali atau tanpa pemboosteran masing – masing sebesar  $411,60 \pm 4,39$ ;  $397,80 \pm 2,86$  dan  $402,80 \pm 4,86$ .

Hasil pemeriksaan jumlah limfosit pada keempat perlakuan yang dilakukan pada hari ke tiga puluh masing sebesar  $19269,80 \pm 496,60$  untuk subyek yang

*dichallenge* virus EBL ganas,  $411,60 \pm 4,39$  untuk subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dan diberi perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali,  $397,80 \pm 2,86$  subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dengan *pemboosteran* dua kali dan  $402,80 \pm 4,82$  untuk subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dan diberi perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan tanpa *pemboosteran*. Dari hasil analisis data yang diperoleh pada pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke tiga puluh memperlihatkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp 51* ( $p < 0,01$ ). Di antara perlakuan yang menerima perlakuan protein *Egp 51* memperlihatkan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan dan mengalami *pemboosteran* satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami *pemboosteran* dua kali atau tidak mengalami *pemboosteran* ( $p > 0,05$ ). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp 51* dan mengalami *pemboosteran* dua kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa *pemboosteran* ( $p > 0,05$ ).

Dan melalui uji *in vivo* terlihat adanya daya protektifitas dengan pemberian protein hemaglutinin *Egp 51*, baik yang *dibooster* 1 kali maupun yang *dibooster* 2 kali menunjukkan hasil yang sama.

Analisis data jumlah limfosit yang diperoleh dari pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke 35 menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak diberi perlakuan pemberian protein *Egp 51* lebih banyak secara sangat signifikan disbanding jumlah



limfosit subyek yang diberi perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan mengalami *pemboosteran* satu kali, dua kali atau tanpa *pemboosteran* ( $p < 0,01$ ). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami *pemboosteran* dua kali ( $p > 0,05$ ). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama dan tidak mengalami *pemboosteran* ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* dua kali terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa mengalami *pemboosteran* tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit yang diperoleh pada pemeriksaan hari ke 35 dari subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51*, jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali, jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* dua kali dan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan tanpa *pemboosteran* berturut – turut adalah  $19388,20 \pm 475,25$ ;  $393,80 \pm 41,96$ ;  $399,80 \pm 0,84$  dan  $401,80 \pm 5,75$ .

Jumlah limfosit yang diperoleh dari hasil pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke empat puluh pada subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51*, pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali, pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* dua kali dan pemberian protein *Egp 51* tanpa

*pemboosteran* berturut – turut adalah  $19690,90 \pm 430,48$ ;  $408,00 \pm 4,53$ ;  $400,00 \pm 0,71$  dan  $397,40 \pm 8,79$ . Hasil selengkapnya pemeriksaan jumlah limfosit pada hari keempat puluh lebih jelas disajikan dalam Lampiran 7.

Seperti yang terlihat dalam Lampiran 7, jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp 51* ( $p < 0,01$ ). Di antara subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* diperoleh hasil jumlah limfosit subyek yang *dibooster* dua kali tidak berbeda nyata dengan jumlah limfosit subyek yang *dibooster* dua kali ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek yang tidak *dibooster* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap subyek yang mengalami *pemboosteran* satu kali atau dua kali ( $p > 0,05$ ).

Seperti hasil pemeriksaan yang diperoleh pada hari sebelumnya, analisis data jumlah limfosit pada hari ke 45 menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat ini lebih banyak secara signifikan bila dibandingkan subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* baik yang mengalami *pemboosteran* satu kali, dua kali atau tanpa *pemboosteran* ( $p < 0,01$ ). Subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* satu kali tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan baik terhadap subyek yang subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* dua kali atau mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan tanpa ( $p > 0,05$ ). Jumlah limfosit subyek mendapat perlakuan pemberian protein *Egp 51* dengan *pemboosteran* dua kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap subyek yang mengalami *pemboosteran* satu kali atau dua kali ( $p > 0,05$ ). Data hasil

pemeriksaan jumlah limfosit pada empat perlakuan yang dilakukan pada hari ke 45 selengkapnya disajikan dalam Lampiran 7.

Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa protein *Egp 51* bersifat protektif. Hasil lain terlihat pada Gambar 5.17. menunjukkan protein *Egp 51* bersifat protektif, sebagaimana pada Gambar 5.17 tersebut bagian hati dan lambung tidak menunjukkan benjolan – benjolan tumor yang berisi pus (nanah) masa tumor EBL, dengan pemberian protein *Egp 51* dan *dichallenge* dengan virus EBL yang ganas mempunyai titer  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>. Dari hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan pernyataan ilmiah sebagai berikut bahwa :

**Protein hemagglutinin *Egp 51* kDa virus EBL merupakan protein yang bersifat imunogenik dan protektif**

#### 6.4 Temuan Baru

Berdasarkan atas hasil penelitian yang telah dilakukan ini, penemuan baru telah terjadi dalam bidang penyakit viral, khususnya mengenai virus EBL; yaitu tentang patogenesis penyakit EBL yang selama ini belum terungkap. Temuan baru tentang patogenesis penyakit EBL ternyata protein hemagglutinin *Egp 51* yang bersifat imunogenik dan protektif yang merupakan molekul adhesin yang berfungsi dalam perlekatan virus pada tubuh inang; di mana selama ini perlekatan virus tersebut melalui LPS seperti yang telah ditemukan oleh Bonzio *et al.*, 2003. Ekspresi LPS akan menyebabkan peningkatan ekspresi protein hemagglutinin *Egp 51*. Peningkatan ekspresi protein hemagglutinin *Egp 51* melalui dua macam proses yang dimulai

dengan *Innate Immunity* dan diikuti oleh *Adaptive Immunity*. Terjadinya peningkatan eksresi protein hemaglutinin *Egp 51* karena adanya peningkatan IL-8 dan *NF- $\kappa$ B* yang akan memacu sel B (sel target utama EBL) dan memacu sel plasma untuk menghasilkan antibodi dalam jumlah yang tinggi. Peningkatan jumlah antibodi yang tinggi akibat peningkatan ekspresi protein hemaglutinin *Egp 51* yang menghasilkan antibodi bersifat antigenik, imunogenik, dan protektif. Penemuan protein hemaglutinin *Egp 51* sebagai molekul adhesin yang dapat dianalogkan fungsinya seperti LPS, penemuan yang baru ini merupakan penemuan yang dapat menambah khasanah dan informasi ilmiah dalam bidang penyakit viral. Penemuan baru ini merupakan informasi ilmiah mengenai sifat viral yang dapat ditinjau dari segi uji *Postulat Koch* yang bersifat klasik dan uji *Postulat Koch* yang bersifat molekuler.

Penemuan baru dalam penelitian ini protein hemaglutinin *Egp 51* sebagai kandidat vaksin sub unit untuk penyakit EBL, diharapkan dapat dibuat dengan harga yang lebih murah dan lebih mudah diproduksi dengan hasil imunitas pada peternakan sapi, khususnya di Indonesia dapat ditingkatkan. Di samping itu juga penemuan baru ini merupakan sumbangan ilmiah terhadap ilmu di bidang molekuler, khususnya virus EBL yang telah ada di Indonesia.

## BAB 7

### KESIMPULAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan atas hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Virus EBL isolat lokal mengandung *sub unit protein envelope gp 51* yang merupakan protein hemaglutinin.
2. Protein hemaglutinin *envelope gp 51* virus EBL isolat lokal bersifat imunogenik dan protektif.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengembangan penelitian lanjutan dan uji lapangan untuk menentukan apakah *sub unit protein E gp 51* isolat lokal ini dapat digunakan sebagai vaksin.
2. Perlu dilakukan pengembangan penelitian lanjutan untuk menentukan apakah *sub unit protein E gp 51* isolat lokal dapat dipakai sebagai alat diagnosis cepat EBL (*rapid diagnostic*).
3. Untuk mengevaluasi struktur virus yang telah ditemukan perlu pemeriksaan lanjut dengan menggunakan elektron mikroskop

## DAFTAR PUSTAKA

- Abba Terr I., Daniel Stites P., 1991. **Basic Human Immunology in a Lange Medical Book**, Prentice Hall International Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp 80-105.
- Abbas Ak, Litcman AH, Pober J.S., 2000. **Celluler and Molecular Immunology**. USA WB Sounder's Company. Sounders. pp 13-33, 125-151.
- Abigail A, Salyers and Dixied Whist, 2002. **A Molecular Approach in bacterial Pathogenesis 2th ed Department of microbiology**, University of Illinois, Urbana, Illinois ASM Press Washington DC. pp 36-52.
- Altaner, C, ban J. Altanerocva. V, and Janik. V., 1991. **Protective Vaccination Againts Bovine Leukaemia Virus Infection by Means of cell Drived Vaccine Ver.Sci. Vol (9)**. pp 889-894.
- Artama W.A., 1996. **Metode pembuatan Ekstrak Antigen membran Sel**. PAU. Biokimia UGM Yogyakarta.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI, 2005. **Abstrak Laporan Flu Burung di Indonesia, Januari, 2004**
- Baktir A., 2000. **Elektroforesis Gel untuk Protein Teori danPraktikum**. Fakultas Pescasarjana Universitas Airlangga Surabaya, hal. 8-42.
- Blease, M.R., 1997. Gene Therapy for Cancer. **Journal Science and medicine**, June, pp 91-95.
- Bonzio A., Gabler, C., Beier, D., Risse, S., Einspanier, R., 2003. **Bacterial Lipopolysaccharide (LPS) Activates Bovine Leukemia Virus (BLV) Expression through Toll-like Receptor 4**, Effects of Hydrogen peroxide on Bovine Leukemia Virus Expression, *Biol. Chem.* 384 (7) : pp 1063-1072
- Bratawidjaja, K.G., 2001. **Imunologi Dasar Edisi 4.**, Fakultas Kedokteran universitas Indonesia. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta. hlm 226-258.
- Brostof J., Scading G.K., 1998. **Oral Immunology Disorders**. In (Roitt I., Brostof J., Male D.) : *Clinical Immunology*, forth edition, Gower Medical Publishing. pp.83-115
- Burke. C.N. and Rovozzo, 1973. **A Manual of Basic Virological Techniques**. Prentice-Hall, Inc., Engliwood Cliffs Nj.. pp 39-48, 64-87

- Burney, A., Mamerickx, M., 1987. **Enzootic Bovine Leucosis and Bovine Leucosis Virus**, Martinus Nij hooft Publishing, Boston/Dordrenht/Lancafer, pp 3-44, 97-103
- BPM SOH, 1990. **Pengujian Mutu Produk Biologik Virus**, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur, Bogor, hlm 20-23
- BPPH, 1998. **Laporan Uji EBL di Yogyakarta dan sekitarnya** ed. Juni 1998
- Dachlan P., 2001. **Immune Respons Towards Infection. Seminar Anti Microbial Resistance Study-Indonesian The Netherlands** Surabaya. hlm 15-35
- Daniel P, Tristram G. and Parslow., 1997. **Medical Immunology**. 9<sup>th</sup> ed., Epleton & large. A.Simon & Schuster Company. Printed in The United State of America.
- Dinas Peternakan, 2002. **Laporan Penyakit Hewan di Kotamadya Surabaya**. Dinas Peternakan Kotamadya Surabaya.
- Dinas Peternakan, 2004. **Laporan Penyakit Hewan Menular List A**. Dinas Peternakan Kotamadya Surabaya.
- Direktorat Jenderal Peternakan, 1977. **Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular**. Jilid IV. Direktur Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta. hlm 1-4
- Direktorat Kesehatan Hewan, 1996. **Peta penyakit Hewan di Indonesia**. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Peternakan. Direktur Kesehatan Hewan. Jakarta.
- Djafar, M., 1985. **Pemeriksaan Enzootic Bovine Leucosis dengan Metode Agar Gel Diffusions Test**. Informasi Penyakit Hewan dari BPPH Wilayah VII Maros (1). hlm 3-9.
- Djalil, S., 1994. **Petunjuk Pemeriksaan Hematologi**. Department Kesehatan RI Pusat Laboratorium Kesehatan. Katalog Depkes RI. 61615 Ind. hlm 8-13.
- Doran J.L. Callinson S.K and Cloutheir S.C., 1996. **Diagnostic Potential of Self A DNA probes to Salmonella Enteritidis and Certain Other O Serogroup D1 Salmonella Serovars**. Journal molecullar Cell. Probes. Aug; 10 (4) : 233-246.
- Emanuelson, U., Scherling, K. and Petterson, H., 1992. **Relationship between Herd Bovine Leukemia Virus Infection Status and Reproduction**,

**Disease Incidence, and Productivity in Swedish Dairy Herds.** *Prev. Vet. Med.* 12:121-131

Fitri, L. E., 2005. **Analisis Patogenesis Malaria dengan Komplikasi : Tinjauan Molekuler terhadap Peran Molekul Adhesin Terinfeksi *Plasmodium Falciparum* Isolat Malang dan Keterlibatan Senyawa Reaktif Oksigen,** Disertasi Pasca Sarjana Program Biomedik UNIBRAW

Gabriella, S.M., Rossi, A. and Amici, C., 2003. **New Embo Member's Review. NF-kB and Virus Infection : Who Controls Whom,** Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica and IneMM. CNR, 00133 Rome, Italy

Goldsby. R.A. Kindit Tj, Osboerne. B.A., 2000. **Kuby Immunology,** forth edition, WH Freeman and Company New York. pp : 1-514.

Goldsby. R.A. Kindit Tj, Osboerne. B.A., 2002. **Active and passive immunization Designing vaccine for Active immunization, Whole organism vaccine, Recombinant Vector Vaccine, DNA vaccine,** WH Freeman and Company New York. pp : 72-76. 449-465.

Goodman J, in Stites DP, Ter Al., 1994. **The immune Respons.** Prentice international Inc, pp 34-60.

Grossman M, Ter Al., 2001. **Immunology Therapy Immunization,** Medical immunology 10<sup>th</sup> ed. Ed by Parslow T.G, Stites DP, Ter Al, imboden JB. Large Medical Books/Mc Graw-Hill Medical publishing Division. pp 699-713.

Harlow E, D. and D. Lane, 1988. **Antibodies a Laboratory Manual Cold Spring** harbourgh Laboratory, pp 55-138.

Hasdianah, R. H., 1998. **Studi Perbandingan Pembuatan *Primary Cell Chicken Embrio Kidney* dengan *Cell Line Foetal Kidney Lamb.*** pada Kongres PDHI di Yogyakarta

Hasdianah, R.H., 2000. **Studi Perbandingan Antigen KIT *Enzootic Bovine Leucosis (EBL)* isolat Lokal dengan Antigen KIT *EBL* produk Canada.** Tesis. Perpustakaan universitas Airlangga Program Pasca Sarjana, Surabaya 2000, hlm 3-40.

Hino, S., Katamine, S., Miyamoto, T., Doi, H., Tsuji, Y., Yamaba, T., Kaplan, J.E., Rudolph, D.L. and Lai, R.B., 1995. **Association between Maternal Antibodies to The External Envelope Glycoprotein and Vertical Transmission of Human T-lymphocytic Virus Type-1.** *J. Clin. Invest.* 95:2920-2925



- Hudson, L ; hay, F.C., 2001. **Practical Immunology** 3<sup>rd</sup> ed., Oxford Blackwell Scientific Publications London Edinburgh Boston Melbourne paris-Berlin Vienna, pp 251-254.
- Ishino, S. Nhara, S. Konoy, Sentsui H., 2000. Experiment infection of bovine Leukosit Virus in Small laboratory Animal, National Institute on Animal health 1-3 Kannodai Tsukuba, Ibaraki 305 Japan. **J. Versci** 50(6), pp 124-1251.
- Jack, S : Cohen : Hogan M.E., 1994. **Synthetic Strads of DNA are being developed as drugs, Called antisense and triplex agents, they can potentially attack viruses and cancer's without harming healthy tissue.** The new genetic medicines. pp.79-136
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D., 1999. **Immunobiology, The Immune System in Health and Disease**, forth edition, Elseiver Science Ltd/Garland Publishing, pp.314-316
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., 1982. **Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (dr. Gerard Bonang, alih bahasa) Review of Medical Microbiology, E.G.C., Penerbit Buku Kedokteran, ATMAJAYA, Jakarta, hlm 463-490, 537-540**
- Johan, P., 1975. **Cell and tissue Culture** (Ed 5) Churchill Livingstone Ediburg london and New York, pp 261-290.
- John, W.M., 1996. **The Protein Protocols Hand Book**, Humana Press, Totowa New Jersey
- Johnson, R. Kanee JB, Anderson, M., 1987. **Bovine leukemia Virus : Duration of BLV Colostral Antibodies in Calves from Commercial Dairy Herds** *Prev. Vet,med*, 4 : pp 371-376.
- Kabeya H., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M., 1999. Characterization of Immune Responses Caused by Bovine Leukemia Virus Envelope Peptides in Sheep, Hokaido University, Sapporo 060-0818, **Japan, J. Vet. Med. Sci.** 61(5) : 475-480
- Kabeya H., Ohashi K., Onuma M., 2001. Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection, Laboratory of Veterinary Public Health, Hokaido University, Sapporo 060-0818, **Japan, J. Vet. Med. Sci.** 63(7) : 703-708

- Kabeya H., Fukuda A., Ohashi K., Sugimoto C., Onuma M., 2001. **Up-regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA is Associated with Bovine-Leukemia Virus (BLV) Elimination in the Early Phase of Infection**, *Vet Immunol Immunopathol*, Aug 30, 81(1-2), pp 129-39
- Kaplan, MM, Koprowski, H, 1973. **Laboratory techniques In rabies (3th ed)**. World Health Organization, Geneva, pp 312-330.
- Karzenstein DA, Kundu S, Spritzeirj, Smooler BR, haszlett P, Valentine F, Merigan, TC., 1999. **Delayed - Type Hypersensitivity to Recombinant HIV Envelope Glycoprotein (rgp 160) after Immunization with Homologous antigen**. *J. Acquir Immune-Defic-Syndrome* 1999 Dec 1: 22 (4). pp 314-347.
- Kenneth, L.R. and Clark. K., 1996. **Analysis of The Role of MHC Class II Presentation in The Stimulation of Cytotoxic L. Lymphocyte by Antigens Targeted into The Exogenous Antigens MHC Class I, Presentation Pathway** *The Journal of Immunology*, 156 : pp 3721-3726
- Kolozik A.E., Hantze M.W., Hagemeterc, Batram C.R., 2000. **Molekulare Medizin Grundlaen-Pathomechanism-klinik**. Copyright by Walterde Gruytes Gmbh & Co., pp 30-32
- Kresno, S.B., 1996. **Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium**. Edisi ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. hlm 228-241; 268-280
- Kuby, J., 1992. **Immunology, N.H.**, Freeman and Company, New York, pp 63-65, 142-178
- Kucerova, 1999. **Bovine Leukemia Virus Structural Genevector Are Immunogenic and lackpathogenecity in rabbit Model**, *J. Virol*, 1999, October, 73 (110) : 81606.
- Laemli U.K., 1970. **Cleavage of Stuctural Protein During The Assmebly of Thead Bacteriophage T4**. *Nature*, 227 : 680-684.
- Lanier, L., 1991. **Cell of The Immune Respons : Lymphocyty and Mononuclear Phogocyty, In : Basic and Clinical Immunology**. 7<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall International Inc. USA
- Male D., 1998. **Cell Migration and Inflammation**. In Roitt I., Brostoff J., Male D., eds). *Immunology*. forth edition, London, Gower Medical Publishing, pp 14.2-14.7

- Matsujama, S.I., Inokuchi, K. and Matshushita, S., 1984. Promotor Exchange Between OMP F and OMP C for Osmoregulated Major Membrane Proteins of E.Coli K-12, *J. Bacteriol* 156:1041-1047
- Meirom, R., Moss, S. and Brenner, J., 1997. **Bovine Leukemia Virus gp 51 Antigen Expression** is Associated with CD5 and Ig markers on The Infected Lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59:113-119
- Miller, J.M and Van der Maaten MJ, 1999. Use of Glycoprotein Antigen in the Immunodiffusion Test for Bovine Leukemia Virus Antibodies. *Eur J. Cancer*, 13, 1369-1375.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., 2000. **Harper's Biochemistry**, 25<sup>th</sup> edition, New York, Mc Graw-Hill, Health professions Divisions.
- Norimine, J., Amills, M., Ramiya V., Olmstead, C.A., Lewin, H.A., 2000. **Immunogenetic Mechanisms of Resistance to Persistent Lymphocytosis in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle**, Department of Animal Sciences 206 Edward R. Madigan Laboratory 1201 W. Gregory Drive Urbana, IL 61801
- Nossal GJW, 1998. In : **Fundamental Immunology 14<sup>th</sup> ed.** By Paul WE Lippincott-Raven Publishers Phil. NY. pp 1387-1426.
- Office International des Epizooties (OIE), 2000. **World organization for Animal Health's manual of Standards for Diagnostic test, and Vaccines, list A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees.**
- Office International des Epizooties (OIE) Journal Oktober Copy right @ 2000. **Epizootic Bovine Leucosis manual of Standart for Doiagnostic Test and Vaccine. American Type Culture Collection, 10801. university Bourklevard, Manassas-Virginia. 20110-2209, United States of America, pp 328-345.**
- Office International des Epizooties (OIE) Journal Oktober Copy right @ 2003. **New Castle Dosease manual of Standart for Diagnostic Test and Vaccine.** American type Culture Collection, 10801. University Boulevard, Manassas-Virginia. 20110-2209. United States of America, pp 221-237.
- Ott, S.L., Johnson, R. and Wells, S.L., 2003. **Association between Bovine-Leukosis Virus Seroprevalence and Herd-Level Productivity on US Dairy Farms.** *Prev. Vet.* 61:249-262. Med.
- Parslow. TG. Stites DPTerr. al: Imboden, JB, 1990. **Medical Immunology 10<sup>th</sup> ed,** pp 40-72. 215-254.

- Parvanovic, V, zh don ov, A. a, larazenko, E. M, nommiyu, A., 1983. The Possibility of Spesific Protection Against Bovine leukimia virus infection bovine Leukimia with Inactivated BLV. *J br – vet* (39), pp 137-146.
- Pastoret. P.P, balncou J, Vannier P. and Verschueren. C., 1999. **Veterinary vaccinology.2<sup>nd</sup>**. ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherland.
- Pelzer, K.D., 1997. **Economics of Bovine Leukemia Virus Infection**. *Vet Clin. North Am. Food Anim. Proct.* 13:129-141
- Putra ST., 1993. **Patofisiologi Kanker dan Perkembangannya**, naskah Lengkap Simposium Onkologi Dasar, Kongres nasional II, 23 Mei – 1 Juni, Surabaya, Indonesia, hlm ; 3-36.
- Raharjo, E., 1988. **Laporan Pengujian Penyakit EBL pada Sapi di Balai Inseminasi Buatan Lembang dan Sekitarnya**
- Rantam, F.A., 1997. **Bornavirus and Cells culture. isolations bornavirus from Human and Animal and Their Characterization**. *Diss. ved. med. FV-Berlin*.
- Rantam, F.A., 2003. **Metode Imunologi**. Airlangga University Press. PNB. 042/05.03/AUP-B5E, Kampus C Unair Jalan Mulyorejo 60115 Surabaya, hlm. 145-155.
- Reinacher M, thurmond M.C, Onuma M, Portetellede D, Picanso J. and Theilen G.H., 1998. **Immunohistological Demonstration of Virus and Tumow Associated Antigens in Tissues in experimental and Spontaneous bovine Leukemia Virus (BLV) Infection**. *vet Immunol Immunopathol*, 22 : 223-231.
- Ressang, AA, 1989. **Penyakit Viral pada Hewan Mamalia yang Penting di Indonesia**. Penerbit Universitas Indonesia-UI Press, Jakarta. hlm 110-119
- Ressang, AA, 1996. **An Immune Boost to The War on Cancer**, *Journal, Research News, Science* Vol. 272, pp 28-30.
- Robert, F., 1996. **Penyakit Viral pada Hewan-Mamalia yang penting di Indonesia**, 14 – 1. Press, hlm 110 – 119.
- Roitt I., Brostoff J., Male D., 1993. **Immunology**. 3<sup>rd</sup> edition Mosby, Year Book. Europe Limited

- Roitt I., Brostoff J., Male D., 1998. **Cell Involved in Immune Responses**. Dalam Roitt I., Brostoff J., Male D. *Immunology*, forth edition Mosby, pp 7.25-2.12
- Safitri, I.M, 1993. **DNA (Deoxribo Nucleat Acid)**. Seminar pada Kelompok Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, mendalian System, hlm 1-10.
- Samik. W.A **Imunologi III**. Cetakan Pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sarjono, 2003. **Virus Patogen Hewan. Kursus Singkat Virologi**, 4 Januari – 3 Februari 1993, PAU, Bioteknologi Universitas Gajahmada, Yogyakarta.
- Sarmanu, 2003. **Validitas dan Reabilitas Instrumen Penelitian, Materi Pelatihan Structural Equation Modelling**. Lembaga penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, 2003.
- Sofro, A.S.M., 1990. **Imunokimia**. Edisi pertama. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gajah Mada Yogyakarta
- Spitter, G.A, Orlik, O., 1996. **Progression to Persistent Lymphocytosis and Tumor Development in Bovine leukemia Virus (BLV) Infected Cattle Correlates with Impaired Proliferaion of CD<sup>4+</sup> + Cell in Response to gag and env-Encoded BLV Proteins**. *Journals of Virology*, NDV, 1996, pp 7584-7593.
- Sri Wienarsih, Sumarmo dan Roekistiningsih, 1998. **Fungsi dan Sifat Immunogentitas Protein Haemaglutinin 32 kDa dan 20 Kda pada helicobacterpyory**, *Majalah Kedokteran universitas Brawijaya Malang*.
- Steel, G.D. Robert and Torrie, H. James, 1980. **Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik**, P.T. Gramedia Pustaka Utama, hlm 71-82
- Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., 1997. **Medical Immunology**. 9<sup>th</sup> edition, San Francisco, University of California, pp 63-138
- Subroto Prodjohardjono, 1989. **Penyakit Enzootic Bovine Leukosis di Indonesia**, *Bulletin RKH UGM Vol. IX/No. 2*, hlm 32-35.
- Subronto Prodjohardjo, 1989. **Penyakit Enzootic Bovine lekosis di Indonesia**, *Bulletin RKH UGM Vol. IX/No. 2*, hlm 32-35.
- Sugimoto, C., Omema, M., Ohashi, K., Kabeya, H., 1999. **Characterization of Immune Responses Caused by Bovine Leukemia Virus Envelope Peptides in Sheep**. *J. Vet. Med. Sci* (5) pp 475-480

- Sumarno, 2000. **Disertasi Karakteristik Molekuler Protein Adesi vibrio Cholerae 01.MO94 V dan Protein Reseptornya pada Sel Epitel usus halus Tikus Putih (Wistar)**. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, hlm 37-46.
- Suryohudoyo, P., 2000. **Kapita Selekta Ilmu Kedokteran – Molekuler Perpustakaan Nasionalis**, Jakarta, hlm 126-128.
- Susilohadi Widjajanto, 2003. **Disertasi Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik Salmonella Pullorum sebagai Bahan Vaksin Sub Unit**. Penelitian Eksperimental Laboratorik, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 43-49
- Teifke, J.P., Gene, L. And Beier, D., 2005. **Studies on The Regulation of BLV Expression. Reported of Bovine Leukosis Virus Partially M Co-operation with Bondzio, A., Gabler, C., Freil Universitat**. Berlin
- Theilen, GH, made Well BR., 1987. **Veterinary Cancer Medicine 2<sup>th</sup> ed** Lea & Febriger Philadelphia, pp 408-423.
- Tizzard, 1998. **Pengantar Immunologi Veteriner**. Edisi ke-2. Airlangga University Press. Surabaya.
- Tizzard, I., 1995. **Pengantar Immunologi Veteriner** WB Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Mexico City. pp 281-302.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Cose, C.L., 2001. **Microbiology An Introduction**. 8<sup>th</sup> ed., Addison Wesley Longman Inc., New York, USA.
- Trainin, Z, Berstein, S, Rosental and Berner J., 1990. **The Fat of Milk From Dairy Cattle Infected with bovine leucosis Virus**, *J. Vet. Research Communications* (14) ; pp 436-448.
- Trudel, M. and Payment. P., 1990. **Concertation and Purification of Viruses by Molecular Filtration and Ultracentrifigation Methods**, center de recherche and Virologic Instute Armand Frappier C.P. 100. Loyal Quebec, Canada, *J. Vet. Sci* (34) pp 436-448.
- Towbin. H., Slaterin T. and Gordon. Y., 1979. **Electrophoresis Transfer of Protein From Polacrylamide gels to Nitrocellulose Sheets. Procedure and Some Applications**. *Procedure natural Academic Science*. USA. 76 : 4350-4354.

- Weiner, B., Kennedy, R.C., 1999. **Vacines Crafted From genetic material Might One Day Prevent AIDS, Malaria and Other Devastating Infections That defy Current Immunization technologies. They May Even help Treat cancer.** Genetic Vaccines in Scientific American pp 34-41.
- Widjajanto, S., Sodik, A., Fedik, A.R., 2000. **Studi Awal Laboratoris Vaksin In Aktif S. Pullorum dengan Pengukuran Titer Antibodi Post Vaksinasi.** Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya
- Wringati, 2005. **Laporan Dari training "Surveillance and Diagnose of Avian Influenza"**, Hongkong tanggal 31 Okt – 31 Nop. 2004, Pusat Veterinaria Farma Surabaya.
- Xu, A., Van, Eijk, M.J.T. Park, C. and Lewin, H.A., 1993. Polymorphism in BoLa-DRB3 Exon-2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus. **J. Immunol.** 151:6977-6985
- Yoko, A ; Ikawa, Y., Tajima, S., 1998. **Complete Bovine Leukemia Virus (BLV) Provirus is Conserved in BLV-Infected Cattle through out the Course of B-Cell Lymphosarcoma Development.**
- Zainudin, M., 1988. **Metodologi Penelitian.** Fakultas Farmasi – Universitas Airlangga.

## Lampiran 1 Cara Pembuatan *cell line OL*

Janin dicuci dengan larutan buffer (*posphat buffer saline free Ca<sup>++</sup> dan Mg<sup>++</sup>*), fetus dibuka secara steril, diambil paru-parunya dipotong kecil-kecil, ditripsinasi dengan versen trypsin 0,25%, dihomogenosasikan, di sentrifus, diambil endapannya diberi media *maintnance cell (Eagle Overlay media ditambah foetal calf serum 5-10 % dalam 100 ml media)*, diinkubasikan selama 5-7 hari pada suhu 37 derajat celcius, diobservasi terhadap pertumbuhan *cell*, sampai dengan *cell* terlihat *confluent* (penuh). *Cell yang confluent* kemudian displiting dan dipasase berulang sampai dipasase melebihi pasase 50 yang merupakan sifat dari *cell line*. *Cell* dibagi dua bagian sebagai *working seed* dan sebagai *master seed*. Diadakan uji sterilitas, bila hasilnya baik maka biakan sel dapat sebagian disimpan sebagai *master seed* dan sebagian lagi dikembangkan ulang sebagai *working seed*. Untuk mengetahui sifat dari sel diadakan uji *kariotyping* di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Unair, pada sel paru domba muda ini ditemukan inti sel dan kromosom bersifat stabil yang merupakan sifat dari *cell line*. *Kariotyping* sel yang dilakukan dengan cara mengambil hasil tripsinasi sel diinkubasikan dalam CO<sub>2</sub> inkubator temperatur 37<sup>0</sup>C, tekanan CO<sub>2</sub> : 0,5 selama 72 jam tambahkan 0,1 ml MTX lalu diinkubasi lagi selama 7 jam dalam temperatur dan tekanan CO<sub>2</sub>. Pindahkan dalam tabung *centrifuse* dan disentrifuse selama 15 menit. Aspirasi supernatan, sisanya pindahkan dalam botol kultur yang berisi MM (*Maintenance Medium*) baru dan tambah 0.1 ml sol Thymidin, inkubasi lagi selama 5 jam. 10 menit sebelumnya tambahkan 0.15 ml larutan *colcemid*. Setelah itu *centrifuse* 15 menit dan aspirasi supernatannya. kemudian ditambahkan 8 ml larutan KCL 0.075 N dan inkubasi lagi selama 15 menit.



Centrifuse 15 menit dan aspirasi supernatan dan ditambahkan fixative (Metanol asetik acid 3:1) simpan dalam lemari pendingin/*refrigerator* 1 hari. Ulangi sentrifuse dan aspirasi, kemudian diganti fixative 5 kali hingga supernatan jernih. Baru dilakukan pembuatan preparat. Teknik pembuatan preparat : gelas obyek dicuci dulu dengan alkohol lalu dikeringkan, saat akan digunakan dihembusi nafas supaya lembab. Lalu teteskan sediaan pada gelas obyek dengan jarak 30 cm. Setelah itu keringkan dan dilihat pada mikroskop fase kontras untuk melihat timbulnya kromosom. *Cell OL* adalah *cell line* dengan ciri-ciri inti sel dan kromosom bersifat stabil walaupun telah displiting melebihi pasase 50 (Tabel 5.2.1). disimpan dengan *media stored* (media penyimpanan) yang terdiri dari serum Bovine/fetal serum 60%, *TPB* 10%, *DMSO* 10%, suspensi sel 20% dicampur secara homogen kemudian dituang kedalam botol *wheton* (15-20 ml) ditutup secara steril. *Cell* di simpan di *refrigerator* secara berurutan pada suhu  $-20^{\circ}$ ,  $-40^{\circ}$ ,  $-80^{\circ}$  Celcius, dan dalam *liquid nitrogen* ( $-196^{\circ}$  C). bila diperlukan *cell line OL* dapat dihidupkan kembali (*thawing*)

## Lampiran 2 Cara menghitung titer virus (CPE)

Kriteria perhitungan *CPE* sebagai berikut :

$$\log_{10} \text{ dilusi titik akhir} = - \left( x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_1}{n_1} \right)$$

Diketahui :

$x_0$  :  $\log_{10}$  resiprok (kebalikan) dilusi terendah di mana semua binatang dinyatakan positif

$d$  :  $\log_{10}$  faktor dilusi

$n_1$  : jumlah binatang yang dipakai di tiap dilusi individu (setelah mendiskonto/memotong kematian kebetulan)

$r_1$  : jumlah binatang positif  $x_0$

Pengenceran yang digunakan adalah : *two fold dilution* yaitu kelipatan 10,  $10^0$ ,  $10^{-1}$  dan seterusnya. Media *RPMI* 4,5 ml, Virus EBL : 0,5 ml. Membuat suspensi *cell* (100), *cell* monolayer *OL* ditripsinasi dihitung  $\pm 1,2 - 1,5 \times 10^5$  ml (Burke *et al.*, 1973; Johan, 1975). Kemudian masukkan *cell* terlebih dahulu pada setiap sumuran 0,15 ml. Untuk kontrol diberi *cell* 0,20 ml tiap sumuran masing-masing 0,15 ml sel dan 0,05 ml virus. Setelah itu ditutup dengan *seal* yang steril. Inkubasikan 5-7 x 24 jam pada suhu  $37^0$  C sambil di-observe terlihat adanya *CPE*.

**Lampiran 3 : Hasil Pengembangan *Cell-Line OL*****Tabel 5.1.**

No.	Pasasi Sel/p	$\Sigma$ Botol	$\Sigma$ sel x $10^6/ml$	Waktu (hari)	Hasil %	Perlakuan splitting/ W / M / Seed	Kromosom Stabil	Inti sel Stabil
1	P1	2 R	5	5-7	100 (c)	P2 / 1 M P2 / 2 W	+	+
2	P2 / 1 P2 / 2	2 R	9 8	5	90 90 (c)	P3 / 1 M P3 / 2 W	+	+
3	P3 / 1 P3 / 2	2 R	12 10	5	90 90 (c)	P4 / 1 M P4 / 2 W	+	+
4	P4 / 1 P4 / 2	2 R	10 8	4	90 90 (c)	P5 / 1 M P5 / 2 W	+	+
5	P5 / 1 P5 / 2	2 R	9 10	5	90 90 (c)	P6 / 1 M P6 / 2 W	+	+
6	P6 / 1 P6 / 2	2 R	10 10	4	90 90 (c)	P7 / 1 M P7 / 2 W	+	+
7	P7 / 1 P7 / 2	2 R	12 8	4	90 90 (c)	P8 / 1 M P8 / 2 W	+	+
8	P8 / 1 P8 / 2	2 R	12 12	4	90 90 (c)	P9 / 1 M P9 / 2 W	+	+
9	P9 / 1 P9 / 2	2 R	10 11	3	90 90 (c)	P10 / 1 M P10 / 2 W	+	+
10	P10 / 1 P10 / 2	2 R	9 10	3	90 90 (c)	P11 / 1 M P11 / 2 W	+	+
11	P11 / 1 P11 / 2	2 R	12 12	3	90 90 (c)	P12 / 1 M P12 / 2 W	+	+
12	P12 / 1 P12 / 2	2 R	13 10	3	90 90 (c)	P13 / 1 M P13 / 2 W	+	+
13	P13 / 1 P13 / 2	2 R	11 13	3	90 90 (c)	P14 / 1 M P14 / 2 W	+	+

Dilanjutkan pada halaman 142

**Lampiran 3 : Hasil Pengembangan *Cell-Line OL***

No.	Pasasi Sel/p	$\Sigma$ Botol	$\Sigma$ sel x 10 <sup>5</sup> /ml	Waktu (hari)	Hasil %	Perlakuan splitting/ W / M / Seed	Kromosom Stabil	Inti sel Stabil
14	P14 / 1	2 R	10	3	90 (c)	P15 / 1 M	+	+
	P14 / 2		10		90	P15 / 2 W		
15	P15 / 1	2 R	12	3	90 (c)	P16 / 1 M	+	+
	P15 / 2		14		90	P16 / 2 W		
16	P16 / 1	2 R	14	3	90 (c)	P17 / 1 M	+	+
	P16 / 2		14		90	P17 / 2 W		
17	P17 / 1	2 R	13	3	90 (c)	P18 / 1 M	+	+
	P17 / 2		11		90	P18 / 2 W		
18	P18 / 1	2 R	12	3	90 (c)	P19 / 1 M	+	+
	P18 / 2		11		90	P19 / 2 W		
19	P19 / 1	2 R	14	3	90 (c)	P20 / 1 M	+	+
	P19 / 2		12		90	P20 / 2 W		
20	P20 / 1	2 R	14	3	90 (c)	P21 / 1 M	+	+
	P20 / 2		13		90	P21 / 2 W		
21	P21 / 1	2 R	11	3	90 (c)	P22 / 1 M	+	+
	P21 / 2		11		90	P22 / 2 W		
22	P22 / 1	2 R	11	3	90 (c)	P23 / 1 M	+	+
	P22 / 2		12		90	P23 / 2 W		
23	P23 / 1	2 R	10	3	90 (c)	P24 / 1 M	+	+
	P23 / 2		14		90	P24 / 2 W		
24	P24 / 1	2 R	12	3	90 (c)	P25 / 1 M	+	+
	P24 / 2		12		90	P25 / 2 W		
25	P25 / 1	2 R	12	3	90 (c)	P26 / 1 M	+	+
	P25 / 2		13		90	P26 / 2 W		
26	P26 / 1	2 R	13	3	90 (c)	P27 / 1 M	+	+
	P26 / 2		13		90	P27 / 2 W		
27	P27 / 1	2 R	14	3	90 (c)	P28 / 1 M	+	+
	P27 / 2		11		90	P28 / 2 W		
28	P28 / 1	2 R	12	3	90 (c)	P29 / 1 M	+	+
	P28 / 2		13		90	P29 / 2 W		
29	P29 / 1	2 R	15	3	90 (c)	P30 / 1 M	+	+
	P29 / 2		14		90	P30 / 2 W		
30	P30 / 1	2 R	14	3	90 (c)	P31 / 1 M	+	+
	P30 / 2		14		90	P31 / 2 W		

Dilanjutkan pada halaman 143

**Lampiran 3 : Hasil Pengembangan *Cell-Line OL***

No.	Pasasi Sel/p	$\Sigma$ Botol	$\Sigma$ sel x 10 <sup>5</sup> /ml	Waktu (hari)	Hasil %	Pertakuan splitting/ W / M / Seed	Kromosom Stabil	Inti sel Stabil
31	P31 / 1	2 R	12	3	90	P32 / 1 M	+	+
	P31 / 2		14		(c) 90	P32 / 2 W		
32	P32 / 1	2 R	12	3	90	P33 / 1 M	+	+
	P32 / 2		15		(c) 90	P33 / 2 W		
33	P33 / 1	2 R	15	3	90	P34 / 1 M	+	+
	P33 / 2		15		(c) 90	P34 / 2 W		
34	P34 / 1	2 R	15	3	90	P35 / 1 M	+	+
	P34 / 2		14		(c) 90	P35 / 2 W		
35	P35 / 1	2 R	16	3	90	P36 / 1 M	+	+
	P35 / 2		13		(c) 90	P36 / 2 W		
36	P36 / 1	2 R	14	3	90	P37 / 1 M	+	+
	P36 / 2		14		(c) 90	P37 / 2 W		
37	P37 / 1	2 R	15	3	90	P38 / 1 M	+	+
	P37 / 2		12		(c) 90	P38 / 2 W		
38	P38 / 1	2 R	11	3	90	P39 / 1 M	+	+
	P38 / 2		15		(c) 90	P39 / 2 W		
39	P39 / 1	2 R	15	3	90	P40 / 1 M	+	+
	P39 / 2		14		(c) 90	P40 / 2 W		
40	P40 / 1	2 R	12	3	90	P41 / 1 M	+	+
	P40 / 2		13		(c) 90	P41 / 2 W		
41	P41 / 1	2 R	14	3	90	P42 / 1 M	+	+
	P41 / 2		14		(c) 90	P42 / 2 W		
42	P42 / 1	2 R	13	3	90	P43 / 1 M	+	+
	P42 / 2		11		(c) 90	P43 / 2 W		
43	P43 / 1	2 R	15	2	90	P44 / 1 M	+	+
	P43 / 2		14		(c) 90	P44 / 2 W		
44	P44 / 1	2 R	15	2	90	P45 / 1 M	+	+
	P44 / 2		14		(c) 90	P45 / 2 W		
45	P45 / 1	2 R	13	2	90	P46 / 1 M	+	+
	P45 / 2		11		(c) 90	P46 / 2 W		
46	P46 / 1	2 R	14	2	90	P47 / 1 M	+	+
	P46 / 2		15		(c) 90	P47 / 2 W		
47	P47 / 1	2 R	13	2	90	P48 / 1 M	+	+
	P47 / 2		14		(c) 90	P48 / 2 W		
48	P48 / 1	2 R	14	2	90	P49 / 1 M	+	+
	P48 / 2		14		(c) 90	P49 / 2 W		
49	P49 / 1	2 R	15	2	90	P50 / 1 M	+	+
	P49 / 2		13		(c) 90	P50 / 2 W		

Dilanjutkan pada halaman 144

**Lampiran 3 : Hasil Pengembangan Cell-Line OL**

No.	Pasasi Sel/p	$\Sigma$ Botol	$\Sigma$ sel x 10 <sup>6</sup> /ml	Waktu (hari)	Hasil %	Perakuan spliting/ W / M / Seed	Kromosom Stabil	Inti sel Stabil
50	P50 / 1	2 R	12	2	95 (c)	P51 / 1 M	+	+
	P50 / 2		13		95	P51 / 2 W		
51	P51 / 1	2 R	15	1	95 (c)	P52 / 1 M	+	+
	P51 / 2		15		95	P52 / 2 W		
52	P52 / 1	2 R	12	1	95 (c)	P53 / 1 M	+	+
	P52 / 2		12		95	P53 / 2 W		
53	P53 / 1	2 R	12	1	95 (c)	P54 / 1 M	+	+
	P53 / 2		13		95	P54 / 2 W		
54	P54 / 1	2 R	14	1	95 (c)	P55 / 1 M	+	+
	P54 / 2		15		95	P55 / 2 W		
55	P55 / 1	2 R	15	1	95 (c)	P56 / 1 M	+	+
	P55 / 2		15		95	P56 / 2 W		
56	P56 / 1	2 R	14	1	95 (c)	P57 / 1 M	+	+
	P56 / 2		12		95	P57 / 2 W		
57	P57 / 1	2 R	15	1	95 (c)	P58 / 1 M	+	+
	P57 / 2		14		95	P58 / 2 W		
58	P58 / 1	2 R	15	1	95 (c)	P59 / 1 M	+	+
	P58 / 2		15		95	P59 / 2 W		

**Keterangan :**

C = Confluen (penuh)

M = Master seed

W = Working seed

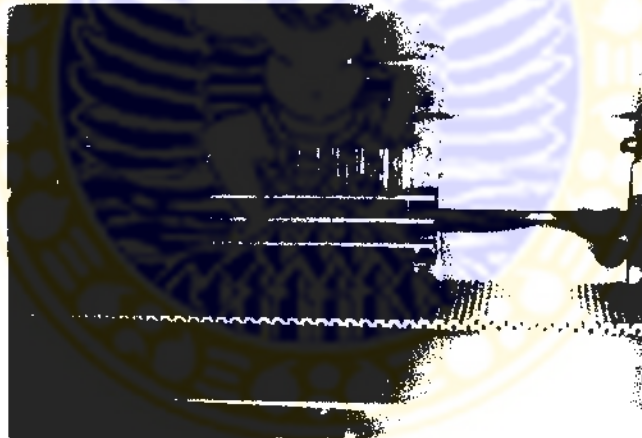
**Lampiran 4 : Hasil Pasase dan Hasil Titration Virus EBL****Tabel 5.2**

No.	Pasasi	Waktu (Hari)	CPE (%)	Titer/Metode Karber/ TCID <sub>50</sub>
1	P15/1	7	50	10 <sup>4.4</sup>
2	P16/1	6	50	10 <sup>4.8</sup>
3	P17/1	6	60	10 <sup>4.8</sup>
4	P18/1	6	70	10 <sup>5.2</sup>
5	P19/1	5	70	10 <sup>5.4</sup>
6	P20/1 P20/2	5	70	10 <sup>6.2</sup>
7	P21/1 P21/2	5	78	10 <sup>4.4</sup>
8	P22/1 P22/2	5	80	10 <sup>6.8</sup>
9	P23/1 P23/2	4	90	10 <sup>7.4</sup>
10	P24/1 P24/2	4	90	10 <sup>7.6</sup>
11	P25/1 P25/2	3	90	10 <sup>7.4</sup>
12	P26/1 P26/2	3	90	10 <sup>7.6</sup>
13	P27/1 P27/2	2	90	10 <sup>7.8</sup>
14	P28/1 P28/2	2	90	10 <sup>7.8</sup>
15	P29/1 P29/2	2	90	10 <sup>7.8</sup>

**Lampiran 5 Gambar Ultracentrifuge yang digunakan untuk pemurnian virus**



**Suspensi virus EBL yang dimurnikan di dalam ultracentrifuge**



**Hasil Suspensi virus EBL yang telah dimurnikan**



**Lampiran 6 : Gambar alat sonikator yang digunakan untuk memecah protein E virus EBL**



**Hasil pemecahan protein E virus EBL dengan menggunakan alat sonikator**

**Lampiran 7 : Hasil Uji Serum Netralisasi****Tabel 5.5. Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok I Hari Ke 7**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Titer 7,4 log<sup>SN</sup>/ml**Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok I Hari Ke 21**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Titer 8 log<sup>SN</sup>/ml

Dilanjutkan pada halaman 149

**Tabel 5.6. Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok IIa (P2) Hari Ke 7**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 1,6 log<sup>SN/ml</sup>**Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok IIa (P2) Hari Ke 21**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 0,8 log<sup>SN/ml</sup>

Keterangan : + CPE = - antibodi  
 - CPE = + antibodi

Dilanjutkan pada halaman 150

**Tabel 5.7. Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok IIb (P3) Hari Ke 7**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 1,6 log<sup>SN/ml</sup>**Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok IIb (P3) Hari Ke 21**

<b>Cell Monolayer</b>											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 0,4 log<sup>SN/ml</sup>

Dilanjutkan pada halaman 151

**Tabel 5.8. Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok II c (P3) Hari Ke 7**

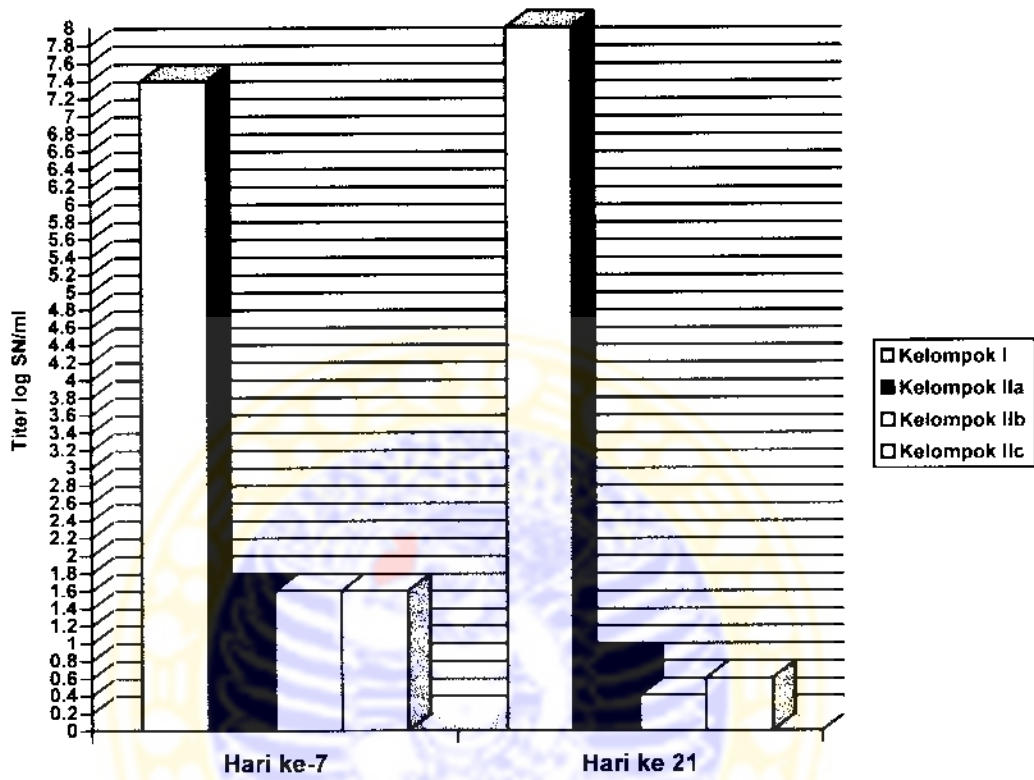
Cell Monolayer											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 1,6 log<sup>SN</sup>/ml**Hasil Uji Serum Netralisasi Kelompok II c (P3) Hari Ke 21**

Cell Monolayer											
Kontrol Virus		Pengeceran								Kontrol Cell	
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>		
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Titer 0,6 log<sup>SN</sup>/ml

Lampiran 5 : Hasil Uji Serum Netralisasi



**Lampiran 8 : Hasil Uji *Ouchterlony* Serum Kelinci Sebelum Vaksinasi dengan menggunakan antigen tes kit produk Pusvetma dan produk Kanada (*import*)**

**Tabel 5.9.**

Kel	Kode Serum Kelinci	antigen tes kit	
		Pusvetma	<i>Import</i> (Kontrol)
I 1	I.1	-	-
2	I.2	-	-
3	I.3	-	-
4	I.4	-	-
5	I.5	-	-
II a 1	II a.1	-	-
2	II a.2	-	-
3	II a.3	-	-
4	II a.4	-	-
5	II a.5	-	-
II b 1	II b.1	-	-
2	II b.2	-	-
3	II b.3	-	-
4	II b.4	-	-
5	II b.5	-	-
II c 1	II c.1	-	-
2	II c.2	-	-
3	II c.3	-	-
4	II c.4	-	-
5	II c.5	-	-

**Lampiran 9 : Hasil Pemeriksaan Limfosit****Tabel 5.10.**

Hari ke	Kelompok				
	I	II a	II b	II c	
5	1	19295	400	399	396
	2	18875	410	387	399
	3	18898	409	394	401
	4	18899	410	400	399
	5	18250	400	399	408
<b>Rata-rata</b>		<b>18843.40</b>	<b>405.80</b>	<b>395.80</b>	<b>400.60</b>

Hari ke	Kelompok				
	I	II a	II b	II c	
10	1	19328	416	401	400
	2	18999	413	399	408
	3	18995	418	399	407
	4	18333	410	400	400
	5	18100	410	401	400
<b>Rata-rata</b>		<b>18751.00</b>	<b>413.40</b>	<b>400.00</b>	<b>403.00</b>

Hari ke	Kelompok				
	I	II a	II b	II c	
15	1	19481	410	400	400
	2	19006	410	400	406
	3	19200	418	401	401
	4	18469	410	402	401
	5	18236	410	400	401
<b>Rata-rata</b>		<b>18878.40</b>	<b>411.60</b>	<b>400.60</b>	<b>401.80</b>

Dilanjutkan pada halaman 155



		I	II a	II b	II c
<b>20</b>	<b>1</b>	19500	410	400	400
	<b>2</b>	19169	410	399	401
	<b>3</b>	19385	417	400	410
	<b>4</b>	18598	413	400	409
	<b>5</b>	18435	410	399	411
<b>Rata-rata</b>		<b>19017.40</b>	<b>412.00</b>	<b>399.60</b>	<b>406.20</b>

		I	II a	II b	II c
<b>25</b>	<b>1</b>	19675	410	400	400
	<b>2</b>	19255	410	400	401
	<b>3</b>	19498	419	401	406
	<b>4</b>	18622	412	399	400
	<b>5</b>	18696	411	399	400
<b>Rata-rata</b>		<b>19149.20</b>	<b>412.40</b>	<b>399.80</b>	<b>401.40</b>

		I	II a	II b	II c
<b>30</b>	<b>1</b>	19788	412	400	400
	<b>2</b>	19369	419	400	409
	<b>3</b>	19685	409	398	407
	<b>4</b>	18768	408	398	399
	<b>5</b>	18739	410	393	399
<b>Rata-rata</b>		<b>19269.80</b>	<b>411.60</b>	<b>397.80</b>	<b>402.80</b>

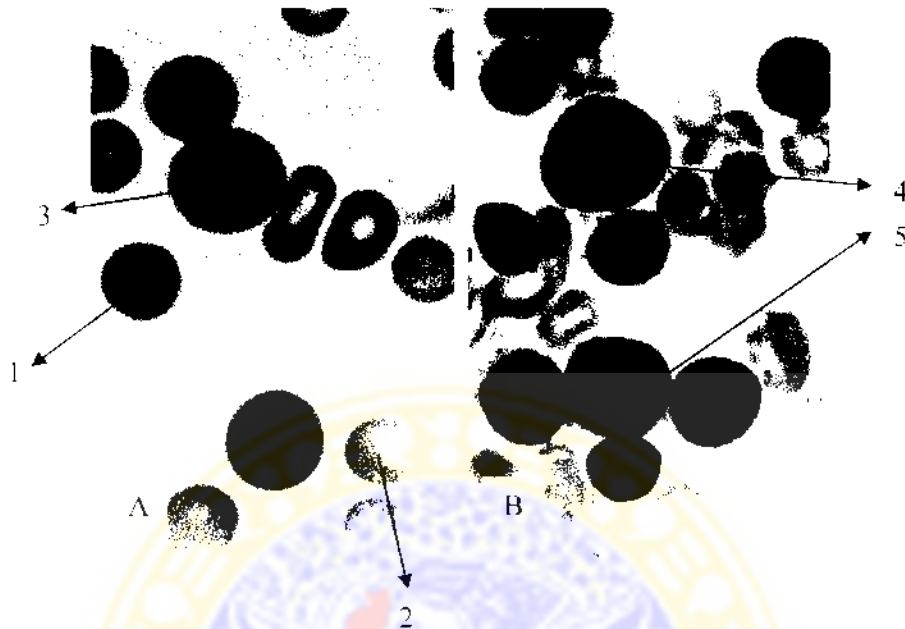
		I	II a	II b	II c
<b>35</b>	<b>1</b>	19896	411	399	400
	<b>2</b>	19438	419	400	412
	<b>3</b>	19796	410	400	400
	<b>4</b>	18832	410	399	399
	<b>5</b>	18979	319	401	398
<b>Rata-rata</b>		<b>19388.20</b>	<b>393.80</b>	<b>399.80</b>	<b>401.80</b>

Dilanjutkan pada halaman 156

		<b>I</b>	<b>II a</b>	<b>II b</b>	<b>II c</b>
<b>40</b>	<b>1</b>	19987	411	399	400
	<b>2</b>	19625	410	401	410
	<b>3</b>	19873	400	400	399
	<b>4</b>	18969	409	400	389
	<b>5</b>	1999	410	400	389
<b>Rata-rata</b>		<b>16090.60</b>	<b>408.00</b>	<b>400.00</b>	<b>397.40</b>

		<b>I</b>	<b>II a</b>	<b>II b</b>	<b>II c</b>
<b>45</b>	<b>1</b>	20138	410	400	400
	<b>2</b>	19900	411	400	420
	<b>3</b>	20006	410	349	401
	<b>4</b>	1998	412	398	400
	<b>5</b>	20778	419	400	400
<b>Rata-rata</b>		<b>16564.00</b>	<b>412.40</b>	<b>389.40</b>	<b>404.20</b>

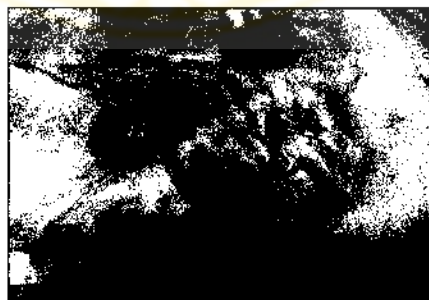
### Lampiran 10 : Gambar limfositosis pada hewan coba



### Gambar Limfositosis pada hewan coba kelinci Kelompok I

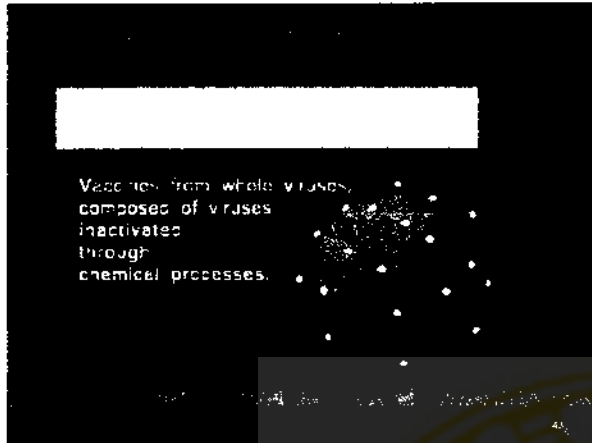
Keterangan : A. Limfosit tanpa pemberian protein *hemagglutinin E gp 51* pada fase awal (Hari ke 5)  
 B. Limfosit tanpa pemberian protein *hemagglutinin E gp 51* pada fase lanjut (Hari ke 45)

1. Sel limfosit
2. Sel eritrosit
3. Sel limfosit yang menunjukkan gejala limfositosis terlihat bagian sitoplasma yang mengecil
- 4 dan 5. Sel limfosit yang sitoplasmanya sudah tidak terlihat berarti tidak terdapat daya protektifitas pada hewan coba kelinci tersebut (Spitter and Orlik, 1996)



### Gambar nanah pada irisan bagian tumor EBL sebagai hasil limfositosis.

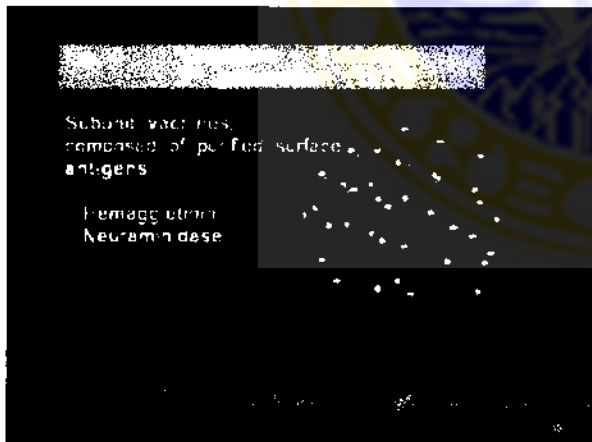
## Lampiran 11 : Perkembangan vaksin sub-unit *hemagglutinin*



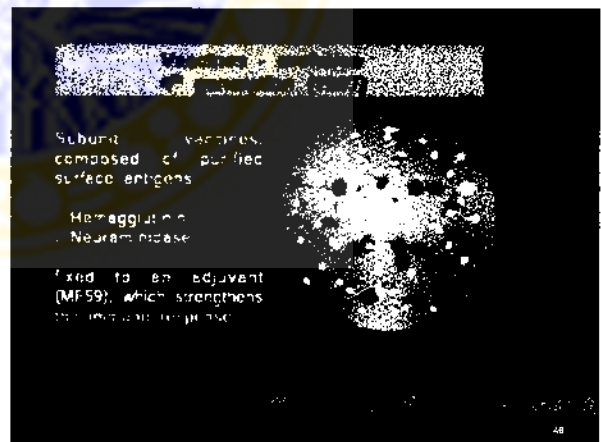
Gambar 1.



Gambar 2.



Gambar 3.



Gambar 4.

### Keterangan :

Gambar 1 Evolusi vaksin generasi 1

Gambar 2 Evolusi vaksin generasi 2

Gambar 3 Evolusi vaksin generasi 3

Gambar 4 Evolusi vaksin generasi 4

(dikutip dari Weiner *et al.*, 1999 : Vaccines Crafted From Genetic Material Might One Day Prevent AIDS)

1

**Lampiran 12 Tabel Populasi sapi Potong Menurut Propinsi**  
**Table Beef Cattle Population by Province, 2001 – 2005**

(Ekor/Head)

No.	Propinsi/Province	Tahun / Year					Pertumbuhan/ Growth 2005 over 2004 %
		2001	2002	2003	2004	2005*)	
1	Nagroe Aceh Darussalam	699.956	701.356	701.777	655.811	657.188	0.21
2	Sumatra Utara	248.078	248.275	248.673	248.971	249.269	0.12
3	Sumatra Barat	501.356	546.864	583.850	597.294	611.060	2.30
4	Riau	107.646	109.249	112.861	107.954	114.984	6.51
5	Jambi	138.398	142.550	145.845	147.917	150.017	1.42
6	Sumatra Seiatan	415.743	419.000	419.937	438.666	460.073	4.88
7	Bengkulu	70.686	76.839	77.953	80.371	82.059	2.10
8	Lampung	373.534	380.697	387.350	391.846	394.501	0.66
9	D.K.I Jakarta	-	-	-	-	-	-
10	Jawa Barat	189.518	189.518	223.818	232.494	249.582	7.14
11	Jawa Tengah	1.331.103	1.337.758	1.345.153	1.357.125	1.370.320	0.97
12	D.I Yogyakarta	211.889	217.186	224.247	236.726	239.093	1.00
13	Jawa Timur <sup>1)</sup>	3.312.015	3.312.015	2.516.777	2.519.030	2.519.534	0.02
14	Bali	521.264	523.870	539.771	576.586	576.586	0.00
15	Nusa Tenggara Barat	395.751	403.666	419.569	426.033	434.554	2.00
16	Nusa Tenggara Timur	495.051	502.589	512.999	522.929	531.817	1.70
17	Kalimantan Barat	144.538	157.040	148.303	156.569	159.860	2.10
18	Kalimantan Tengah	39.554	40.055	42.095	55.599	55.599	0.00
19	Kalimantan Selatan	146.163	153.147	166.469	173.648	181.132	4.31
20	Kalimantan Timur	53.511	56.187	56.145	60.784	62.000	2.00
21	Sulawesi Utara	132.514	134.569	124.262	98.741	100.123	1.40
22	Sulawesi Tengah	231.489	231.997	194.099	197.692	198.000	0.16
23	Sulawesi Selatan	7.22.452	751.277	737.538	627.981	638.997	1.75
24	Sulawesi Tenggara <sup>1)</sup>	300.451	300.451	208.227	208.740	216.500	3.72
25	Maluku	59.387	60.636	62.727	76.864	78.478	2.10
26	Papua	72.246	76.581	70.089	74.298	76.789	3.35
27	Bangka Belitung	4.157	4.663	15.407	3.181	3.276	2.10
28	Banten	9.236	9.467	9.936	22.872	18.418	- 19.47
29	Gorontalo	159.334	-163.747	174.460	201.678	213.960	6.09
30	Maluku Utara	44.091	46.449	33.781	34.034	35.735	5.00
<b>Indonesia</b>		<b>11.137.701</b>	<b>11.297.625</b>	<b>10.504.128</b>	<b>10.532.889</b>	<b>10.679.504</b>	<b>1.39</b>

Sumber : Direktorat Jenderal Peternakan  
Source : Directorate General of Livestock  
Keterangan : \*) Angka Sementara  
-) Data Tidak Tersedia  
Note : \*) Preliminary figure  
-) Data Not Available

**Lampiran 13 Tabel Populasi Sapi Perah Menurut Propinsi**  
*Table Beef Cattle Population by Province, 2001 – 2005*

(Ekor/Head)

No	Propinsi/Province	Tahun / Year					Pertumbuhan/ Growth 2005 over 2004 %
		2001	2002	2003	2004	2005*)	
1	Nagroe Aceh Darussalam	61	67	73	82	91	10.98
2	Sumatra Utara	6.445	6.470	6.575	6.777	6.837	0.89
3	Sumatra Barat	502	488	505	606	663	9.41
4	Riau	-	-	-	-	-	-
5	Jambi	-	26	-	-	-	-
6	Sumatra Selatan	302	275	220	250	258	3.20
7	Bengkulu	-	62	157	214	278	29.91
8	Lampung	110	105	112	118	120	1.69
9	D.K.I Jakarta	4.054	3.833	3.611	3.407	3.72	10.13
10	Jawa Barat	84.934	91.219	95.513	98.958	104.143	5.24
11	Jawa Tengah	114.915	119.026	127.658	112.155	114.971	2.51
12	D.I Yogyakarta	4.454	4.917	6.645	7.772	8.161	5.01
13	Jawa Timur**	130.922	131.262	131.827	132.789	133.719	0.70
14	Bali	67	54	28	43	43	0.00
15	Nusa Tenggara Barat	-	-	-	-	-	-
16	Nusa Tenggara Timur	-	-	-	-	-	-
17	Kalimantan Barat	69	35	14	36	36.00	0.00
18	Kalimantan Tengah	-	-	-	-	-	-
19	Kalimantan Selatan	64	74	79	70	77	10.00
20	Kalimantan Timur	23	24	-	-	-	-
21	Sulawesi Utara	-	-	-	-	-	-
22	Sulawesi Tengah	-	-	-	-	-	-
23	Sulawesi Selatan	44	306	602	713	743	4.21
24	Sulawesi Tenggara**	-	-	-	-	-	-
25	Maluku	-	-	-	-	-	-
26	Papua	-	111	97	69	70	1.45
27	Bangka Belitung	-	-	-	-	-	-
28	Banten	32	32	37	3	8	166.67
29	Gorontalo	-	-	-	-	-	-
30	Maluku Utara	-	-	-	-	-	-
<b>Indonesia</b>		<b>346.998</b>	<b>358.386</b>	<b>373.753</b>	<b>364.062</b>	<b>373.970</b>	<b>0.06</b>

Sumber : Direktorat Jenderal Peternakan


Source : Directorate General of Livestock

Keterangan : \*) Angka Sementara

-) Data Tidak Tersedia

Note : \*) Preliminary figure

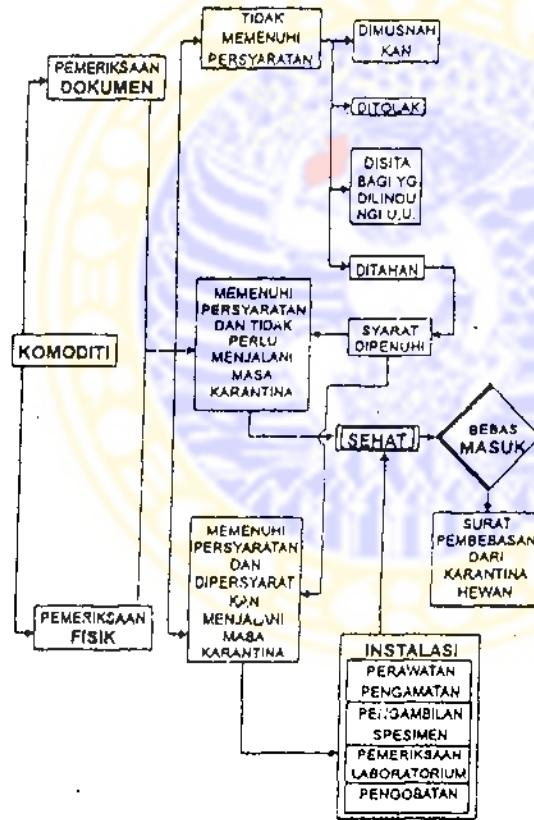
-) Data Not Available



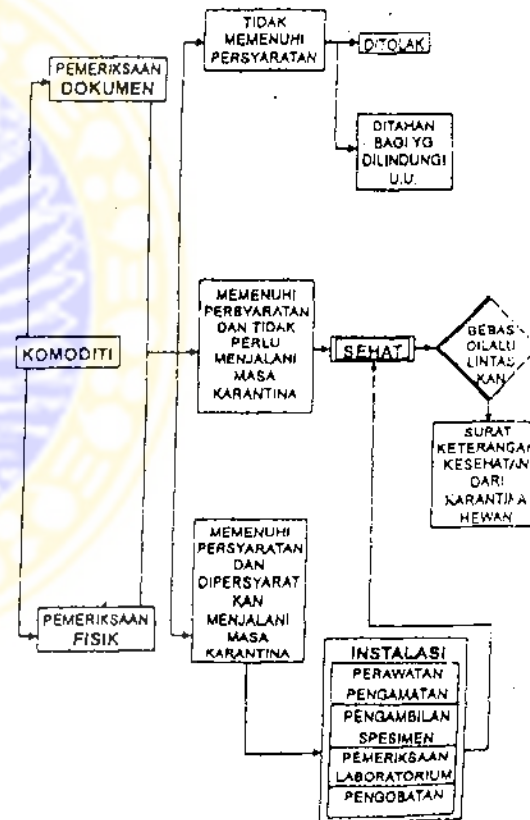
**Balai Karantina Hewan  
Tanjung Perak**

Lokasi : Pelabuhan Tanjung Perak  
 Alamat : Jl. Kutisari Selatan II / 64 Surabaya  
 Telpun : 031-819323

**PROSEDUR  
KARANTINA PEMASUKAN**



**PROSEDUR  
KARANTINA PENGELUARAN**



Lampiran 14 A : Prosedur Karantina Pemasukan dan Pengeluaran Hewan di Indonesia

Dengan terbitnya SK. Mentan Nomer 800/Kpts/OT/210/12/94 maka Balai Karantina Kehewan Wilayah III Surabaya berubah nama menjadi Balai Karantina Hewan Tanjung Perak dengan wilayah kerja yang meliputi :

1. Pelabuhan laut Tanjung Perak
2. Pelabuhan Ferry: Ketapang, Jangkar, Kalbut dan Sangkapura.
3. Bandar Udara Juanda
4. Kantor Pos Surabaya
5. Tempat pemasukan/pengeluaran lainnya di Propinsi Jawa Timur kecuali pulau Madura (Pos Karantina Hewan Kamal).

Tugas : Melaksanakan pencegahan masuk dan keluarnya hama dan penyakit hewan karantina ke dan dari Wilayah Nagara Republik Indonesia atau antar area di dalam Wilayah Negara Republik Indonesia berdasarkan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

- Fungsi :
1. Tindakan karantina terhadap media pembawa hama dan penyakit hewan.
  2. Pengembangan teknik dan metoda tindakan karantina hewan.
  3. Pemantauan daerah sebar hama dan penyakit hewan karantina.
  4. Pembuatan koleksi hama dan penyakit hewan karantina.
  5. Pengumpulan dan pengolahan data tindakan karantina.
  6. Urusan tata usaha.

#### Penyakit-penyakit Hewan Karantina :

1. Radang Paha (Black Leg, Emphysematous Gangrene)
2. Radang Limpa (Anthrax)
3. Leukosis Sapi (Bovine Leucosis)
4. Nekrosis (Septicemia Epizootica)
5. Trichomoniasis
6. Pseudorabies
7. Psedotuberculosis
8. Malaria Sapi (Anaplasmosis)
9. Theileriosis, East Coast Disease)
10. Keluron Menular (Brucellosis)
11. Selakarang (Saccharomycosis)
12. Echinococosis
13. John' Disease
14. Cysticercosis
15. Babesiosis, Piroplasmosis, Haemoglobinuria
16. Tuberculosis
17. Surra
18. Dourine
19. Leptospirosis
20. Trichinellosis, Trichinosis
21. Japanese Encephalitis
22. Listeriosis, Meningue Caphalitis
23. Vibriosis
24. Actinomycosis
25. Lepra Kerbau
26. Scabies
27. Penyakit Ingusan Sapi (Malignant Catarrhal Fever)
28. Kaskado
29. Bali Ziekte
30. Ingus Tenang
31. Orf
32. Kurap
33. Ring Worm
34. Erysipelas
35. Swine Dysentri



**Lampiran 15 : Laporan Penyakit *EBL* di Pulau Jawa dan Madura Tahun 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, dan 1999**

<b>Tahun</b>	<b>Kodya/Kab</b>	<b>Jenis Hewan</b>	<b>Jumlah Kasus</b>
1988	Sukabumi	Sapi	1
	Bandung	Sapi	6
	Cilacap	Sapi	22
	Salatiga	Sapi	1
	Malang	Sapi	1
	Surabaya	Sapi	62
1989	Cilacap	Sapi	33
	Mojokerto	Sapi	1
	Rembang	Sapi	1
	Salatiga	Sapi	1
	Surabaya	Sapi	2
1990	Bandung	Sapi	1
	Jakarta	Sapi	15
1991	Malang	Sapi	9
1992	Bandung	Sapi	1
1999	Bandung	Sapi	1

Sumber : BPPH Wilayah IV Yogyakarta (1999/2000)

Lampiran 10. **PENYAKIT PADA SAPI POTONG**

**PARASITOLOGI**

1. Apaplasmosis
2. Babesiosis
3. Theileriosis
4. Trypanosomiasis (Surra)
5. Trichomonosis ( T. Foetus)
6. Cysticercosis
7. Fasciolosis
8. Kaskado

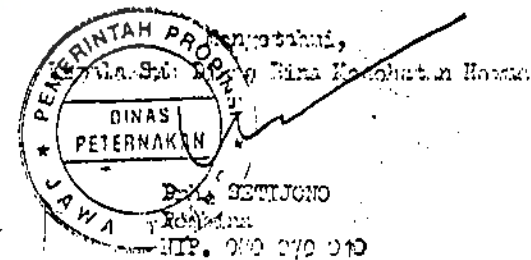
**BAKTERIOLOGI**

1. Actinobacillosis
2. Actinomycosis
3. Anthrax
4. Bovine Brucellosis
5. Contagious Bovine Pleuro Pneumonia
6. Clostridiosis
7. Colibacillosis
8. Dermatonycosis
9. Klebsiellosis
10. Selakarang (Lymphangitis Epizootica)
11. Mycoplasmosis
12. Pink Eyes
13. Septicaemia Epizootica (SE)
14. Staphylococcosis

**VIROLOGI**

1. Jembrana
2. Bovine Malignant Catarrh (BMC)
3. Rinderpest
4. Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)
5. Penyakit Akabane
6. Enzootic Bovine Leukosis
7. Lumpy Skin Disease
8. Rift Valley Fever
9. Japanese Encephalitis
10. Penyakit Aujeszky's

Lampiran 16 : Penyakit Pada Sapi Potong



Lampiran 18 :

**DAFTAR PENYAKIT HEWAN  
OIE ( OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES )**

**PENYAKIT LIST A**

Penyakit menular yang mempunyai potensi untuk penyebaran yang sangat serius dan cepat, melewati batas-batas negara yang menyebabkan konsekuensi yang serius terhadap sosio-ekonomi atau kesehatan masyarakat dan kepentingan umum pada perdagangan Hewan secara Internasional.

List A

Vesicular Stomatitis

Menyerang sapi

Swine Vesicular Disease

Penyakit Mulut Kuku (Foot and Mouth disease)

Peste des Petits Ruminants

Bovine Anaplasmosis

Lumpy Skin Disease


Bovine Babesiosis

Dermatophilosis

Bovine Brucellosis

Reft Valley Fever

Bovine Genital Campylobacteriosis



Sheep Fox and Goat Fox	Bovine Tuberculosis
Theileriosis	Bovine Cysticercosis
African Swine Fever	Contagious Bovine Pleuropneumonia
African Horse Sickness	<b><u>Enzootic Bovine Leucosis</u></b>
Classical Swine Fever	Blue Tongue
Tricomoniasis	Haemoraghic Septicaemia
Highly Pathogenic Avian Influenza	Malignant Catharal Fever
Trypanosomiasis	Bovine Rhinotrachitis

Sumber : Dinas Peternakan Jawa Timur ( 2004 )

Lampiran 19 : HASIL PENGUJIAN MUTU PRODUKSI PADA ANTIGEN KIT DIAGNOSIS PENYAKIT EBL  
 PRODUKSI PUSVETMA



DIREKTORAT JENDRAL LAYANAN  
 PUSAT VETERINARIA FARMA  
 SURABAYA

Model : A - 3

HASIL PENGUJIAN MUTU PRODUKSI

NO. ....10/PMP/XII/1995/Porsob\*)

Berkenaan dengan Permintaan Pengujian Mutu No. ...02/PMP/XII/1995...XXXX\*) tanggal .21 Juli 1995.....

bersama ini kami laporkan sbb. :

No.	Jenis Vaksin Antigen	No. Td.	Masa Uji	H a s i l - U j i					Saran	Keterangan
				Sterility/ <del>XXXX</del>	Safety	Potency	<del>XXXX</del> Property *)	Expirasi datum		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	Antigen EBL KIT	Porsob.	7 hari	Steril	Baik	Baik	Baik	-	Dapat Disedarkan	

\*) Coret yang tidak perlu

Kepada :  
 Yth. Ka. Pusvetma

cc : 1. Yth. Ka. Bid. ~~XXXXXX~~ P.M.P.P. ....  
 2. Arsip. -

Surabaya, 11 Desember 1995

Ka. Bid. Penilaian Mutu Produksi,

(Dr. Harry Behar S., BU.)

**Lampiran 20 : Cara Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Pertanda**

Kode	Panjang (mm)	Rf	BM (kDa)	Log
A	0,1	0,00141	292,2	2,65
B	10	0,141	212	2,326
C	11	0,155	158	2,199
D	16	0,225	116	2,064
E	19	0,268	97,2	1,988

Dengan menggunakan persamaan *linear* maka didapatkan :

$$a = 2,499$$

$$b = -1,837$$

$$r = -0,97$$

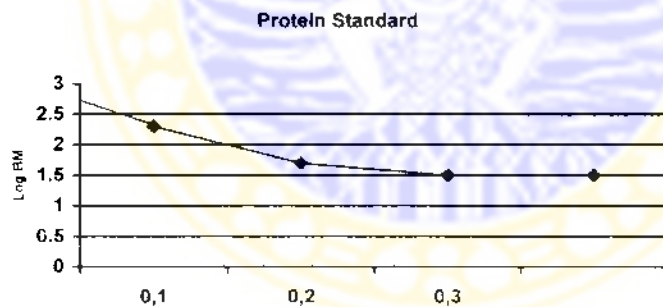
$$\text{Rumus : } y = a + bx \text{ } (-1,837)x$$

Keterangan :

$$Rf = \frac{\text{panjang(mm)}}{\text{jarak terjauh turunnya, protein, dalam, gelombang, elektroforesis}}$$

$$\text{Jarak terjauh} = 71 \text{ mm}$$

Kurva Berat Molekul :



$$\text{Panjang gelombang} = 2,6 \text{ mm}$$

$$2,6 : 71 = 0,0366$$

$$Y = a + bx = 2,499 + (-1,837) 0,0366$$

$$= 2,499 - 0,067$$

$$= 2,4318$$

Sumber : Fitri L.E. (2005)

## Multiple Comparisons

Measure: MEASURE\_1

LSD

(I) 1 = 1, 2 = IIa, 3 = IIb, 4 = IIc	(J) 1 = 1, 2 = IIa, 3 = IIb, 4 = IIc	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
1	2	18666.92	19082.33
	3	18677.83	19093.24
	4	18673.78	19089.19
2	1	-19082.33	-18666.92
	3	-196.79	218.62
	4	-200.84	214.57
3	1	-19093.24	-18677.83
	2	-218.62	196.79
	4	-211.75	203.66
4	1	-19089.19	-18673.78
	2	-214.57	200.84
	3	-203.66	211.75

Based on observed means.

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

Profile Plots

Dependent variable.. IIA Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .07801  
 R Square .00609  
 Adjusted R Square -.01703  
 Standard Error 14.51425

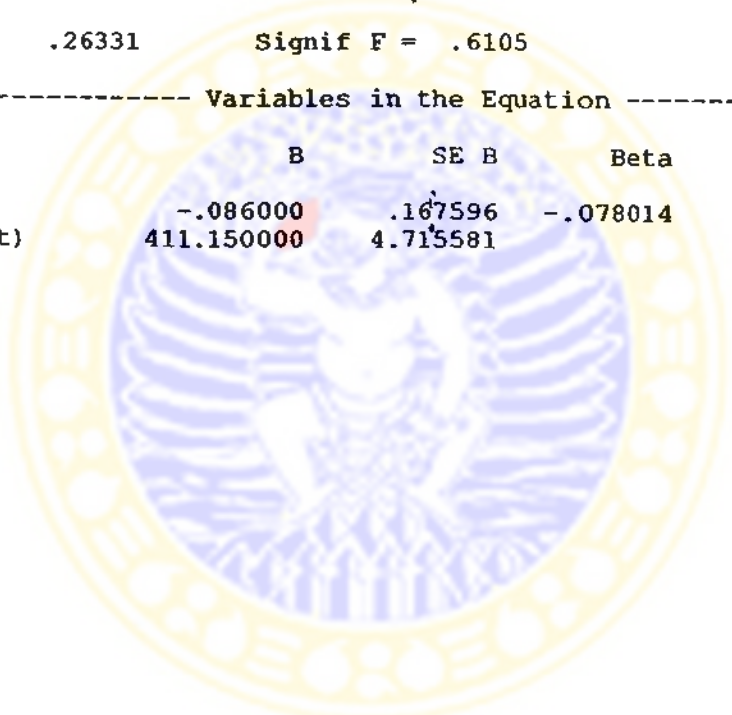
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	55.4700	55.47000
Residuals	43	9058.5300	210.66349

F = .26331 Signif F = .6105

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
WAKTU	-.086000	.167596	-.078014	-.513	.6105
(Constant)	411.150000	4.715581		87.190	.0000





Dependent variable.. IIA

Method.. QUADRATI

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .07938  
 R Square .00630  
 Adjusted R Square -.04102  
 Standard Error 14.68443

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	57.4343	28.71714
Residuals	42	9056.5657	215.63252

F = .13318                      Signif F = .8757

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
WAKTU	-.014571	.767356	-.013218	-.019	.9849
WAKTU**2	-.001429	.014968	-.066438	-.095	.9244
(Constant)	410.495238	8.356067		49.125	.0000

Dependent variable.. IIB                                  Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R                                  .16041  
R Square                                    .02573  
Adjusted R Square                        .00307  
Standard Error                            7.85562

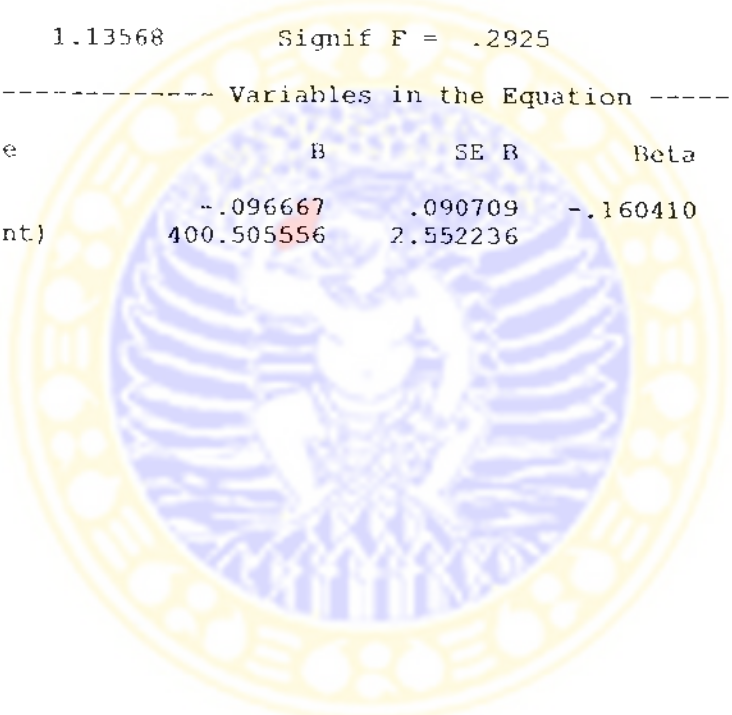
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	70.0833	70.083333
Residuals	43	2653.5611	61.710724

F =                                  1.13568                                  Signif F =                                  .2925

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
WAKTU	-.096667	.090709	-.160410	-1.066	.2925
(Constant)	400.505556	2.552236		156.923	.0000



Dependent variable.. IIB Method.. QUADRATI

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .34074  
 R Square .11610  
 Adjusted R Square .07401  
 Standard Error 7.57098

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	316.2167	158.10837
Residuals	42	2407.4277	57.31971

F = 2.75836 Signif F = .0749

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
WAKTU	.702900	.395632	1.166405	1.777	.0829
WAKTU**2	-.015991	.007717	-1.360444	-2.072	.0444
(Constant)	393.176190	4.308209		91.262	.0000

Dependent variable.. IIC

Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .04482  
 R Square .00201  
 Adjusted R Square -.02120  
 Standard Error 5.69046

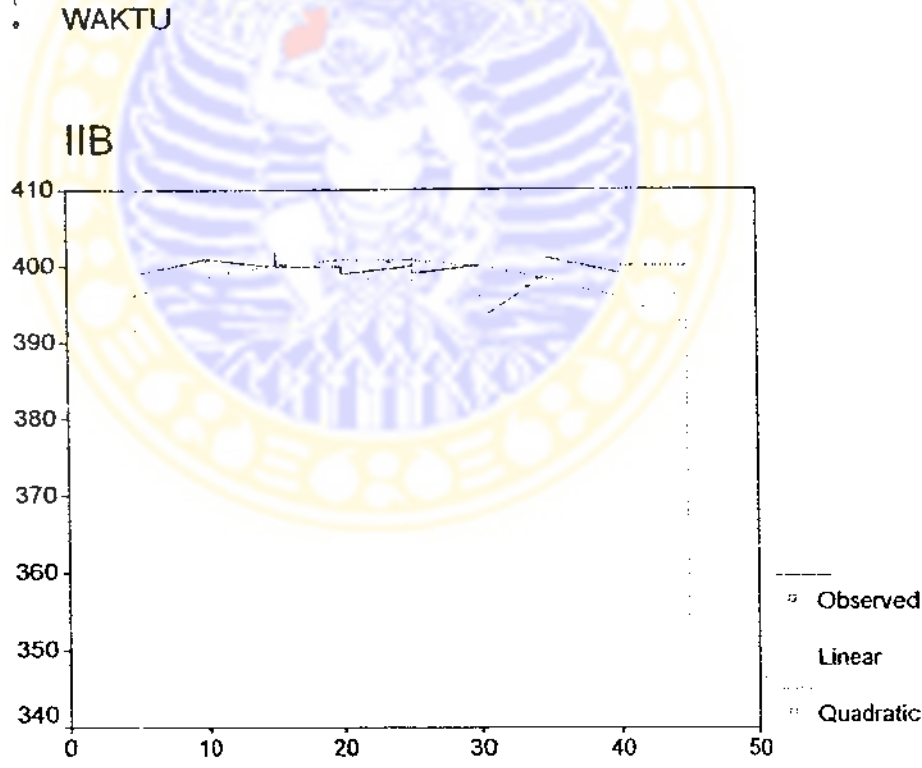
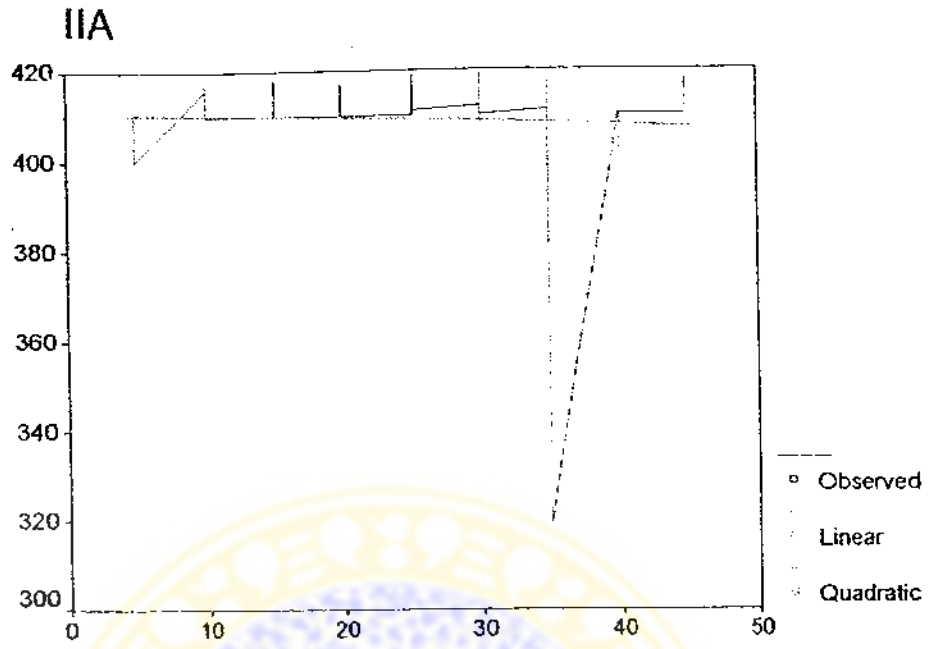
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	2.8033	2.803333
Residuals	43	1392.3967	32.381318

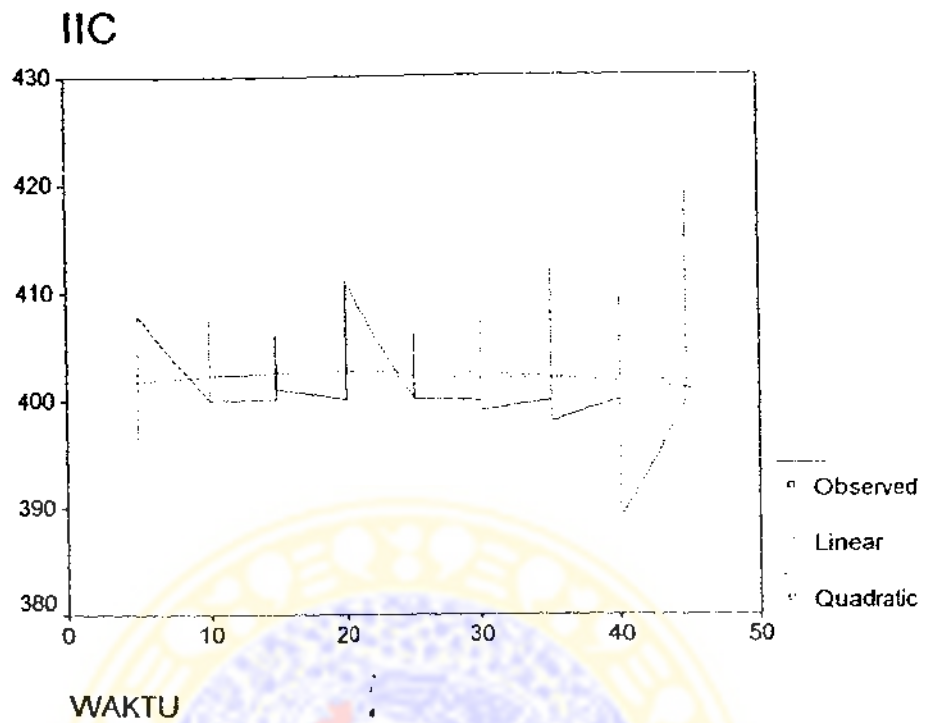
F = .08657      Signif F = .7700

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
WAKTU	-.019333	.065708	-.044825	-.294	.7700
(Constant)	402.616667	1.848791		217.773	.0000



WAKTU



**Multiple Comparisons**

Measure: MEASURE\_1

LSD

(I) 1 = 1, 2 = IIa, 3 = IIb, 4 = IIc	(J) 1 = 1, 2 = IIa, 3 = IIb, 4 = IIc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
1	2	18874.62*	97.98	.000
	3	18885.53*	97.98	.000
	4	18881.49*	97.98	.000
2	1	-18874.62*	97.98	.000
	3	10.91	97.98	.913
	4	6.87	97.98	.945
3	1	-18885.53*	97.98	.000
	2	-10.91	97.98	.913
	4	-4.04	97.98	.968
4	1	-18881.49*	97.98	.000
	2	-6.87	97.98	.945
	3	4.04	97.98	.968

Based on observed means.