

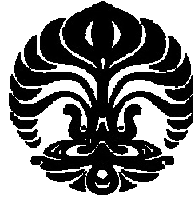
UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBENTUKAN ANTIBODI POLIKLONAL Matriks 1
VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009**

SKRIPSI

**RIZKI HUTAMI
0706264280**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBENTUKAN ANTIBODI POLIKLONAL MATRIKS 1
VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**RIZKI HUTAMI
0706264280**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Rizki Hutami

NPM : 0706264280

Tanda Tangan : 





Tanggal : 13 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rizki Hutami
NPM : 0706264280
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Pembentukan Antibodi Poliklonal Matriks 1 Virus
Influenza A H1N1 2009

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr.dr. Budiman Bela, SpMK (K) ()
Pembimbing II : Dr. Abinawanto ()
Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo ()
Penguji II : Dra. Setiorini, M.Kes. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 13 Juni 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas semua nikmat, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Begitu banyak bantuan moril, material, dan bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat penulis balas. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Budiman Bela, SpMK (K) dan Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan II. Terima kasih atas segala bimbingan dan saran sehingga penulis dapat menuntaskan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc selaku Penguji I dan Pembimbing Akademik atas segala saran dan semangat yang selalu diberikan, serta Dra. Setiorini, M.Kes selaku Penguji II, atas segala saran dan perbaikan-perbaikan dalam pembuatan skripsi ini.
3. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Koordinator Seminar, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas segala ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi.
4. Seluruh laboran dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, terutama kepada Mbak Asri, Ibu Ros, Ibu Ida atas segala bantuan.
5. dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., SpMK sebagai Ketua IHVCB-UI, Bu Silvi, Bu Sofie, Ka Eka, Ka Wuri, Mba Henny, Bu Aroem, Ka Nia, Ka Alyd, Ka Aul, Liza, Chryсна, Nisa, Ka Atep, Ka Kober, Mba Wendra, Mba Sri, Mas Heru, dan Mas Ade, atas segala bantuan dalam mendapatkan data maupun ilmu yang sangat bermanfaat.
6. Keluarga tercinta, Ibu (Sa'danah), Bapak (Alm. Suyitno) dan kakak-kakak (Mba Wiwit, Mba Dwi, Mba Widi), atas kasih sayang, dukungan dan doa

yang selalu diberikan kepada penulis. Semoga penulis dapat membuat Bapak bangga dan tersenyum di sana.

7. Keluarga Om Mulyadi (Bule Narti, Mas Bella, Mas Bello, dan Mas Belli) atas segala bantuan yang sangat besar kepada penulis.
8. Putri Rizqy Amaliah, Ade Tri Aryani, dan Bama, sahabat terbaik penulis, Mba fika, rekan kerja dalam satu lembaga penelitian, Kimbod, Karno, bayu, Maridha, Iik, Tami, Indah, Fajar dan anggota Lab.Genetika lainnya. Terima kasih atas segala semangat dan dukungan. Keluarga Blossom 07 yang tercinta, terima kasih banyak untuk persahabatan dan dukungan yang telah diberikan selama ini.

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 13 Juli 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizki Hutami
NPM : 0706264280
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pembentukan Antibodi Poliklonal Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 13 Juli 2011
Yang menyatakan



(Rizki Hutami)

ABSTRAK

Nama : Rizki Hutami
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Pembentukan Antibodi Poliklonal Matriks 1 Virus
Influenza A H1N1 2009

Antibodi poliklonal matriks 1 Virus Influenza A H1N1 dapat dimanfaatkan untuk pendeteksian antigen matriks 1 dalam pengembangan sistem diagnostik maupun pengembangan vaksin virus influenza A. Antibodi poliklonal antara lain dapat diperoleh dengan imunisasi kelinci menggunakan antigen rekombinan M1. Protein rekombinan M1 yang digunakan sebagai antigen diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21 dan dipurifikasi menggunakan resin Ni-NTA, kemudian digunakan dalam imunisasi 1 ekor kelinci betina, *Oryctolagus cuniculus*, galur *New Zealand White*. Respon antibodi spesifik M1 diuji dengan ELISA dan *western blot*. Hasil uji ELISA yang dinilai pada panjang gelombang 450 nm, menunjukkan titer antibodi yang tinggi pada serum paska imunisasi terhadap antigen M1 rekombinan (0,544) dibandingkan dengan serum pra imunisasi (0,102). Hasil uji *western blot* menunjukkan adanya reaktivitas serum kelinci paska imunisasi dengan pita protein berukuran ~27 kDa, yang diartikan sebagai adanya respon antibodi spesifik terhadap antigen M1, sedangkan serum kelinci pra imunisasi tidak memperlihatkan reaksi dengan pita protein berukuran 27 kDa tersebut. Terlihat pula adanya reaksi non spesifik yang relatif lemah terhadap pita protein lainnya, baik pada serum paska imunisasi maupun pra imunisasi yang menunjukkan adanya residu protein *Escherichia coli* BL21 pada sediaan antigen M1 hasil purifikasi. Antibodi poliklonal yang diperoleh dapat digunakan untuk mendeteksi antigen M1 baik untuk pengembangan uji diagnostik maupun vaksin influenza A H1N1.

Kata kunci : Pembentukan antibodi poliklonal, protein rekombinan M1,
Virus Influenza A H1N1 2009.
xii + 71 halaman : 17 gambar ; 5 lampiran
Daftar Referensi : 68 (1974--2010)

ABSTRACT

Name : Rizki Hutami
Study Programme : Regular Biology S1
Title : Formation of Matriks 1 Polyclonal Antibody of Influenza A Virus H1N1 2009

Polyclonal antibody against influenza A H1N1 matrix 1 protein can be utilized for detection of matrix 1 antigen in the development of Influenza A diagnostic system and vaccine. Polyclonal antibody can be obtained by rabbit immunization using M1 recombinant antigen. M1 recombinant proteins that will be used as antigen was expressed in *Escherichia coli* BL21 and purified using Ni-NTA resin. This recombinant antigen was used for immunization of female rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, *New Zealand White* strain. M1-specific antibody responses were tested by ELISA and *western blot*. ELISA test results at a wavelength of 450 nm, showed a high antibody titer in the post-immunization serum against the recombinant antigen M1 (0,544) compared with the pre-immunization serum (0,102). *Western blot* test results showed reactivity of post-immunized serum against a band of ~ 27 kDa protein, which indicate the presence of specific antibody response against M1 antigen, whereas pre-immunization rabbit serum showed no reaction with the 27 kDa protein band. The existence of non-specific reactions that are relatively weak against other protein bands was also observed, both in the post-immunization and pre-immunization sera, indicating the presence of residual *E. coli* protein in the purified M1 antigen preparation. The Polyclonal antibody obtained in this study can be used to detect M1 antigen, for development of H1N1 Influenza A diagnostic test and vaccine.

Keywords : Formation of polyclonal antibody, M1 recombination protein, influenza AH1N1 2009 virus
xii + 71 pages : 17 pictures ; 5 appendages
Reference list : 68 (1974--2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Virus Influenza A.....	5
2.1.1 Struktur dan Genom Virus Influenza A.....	5
2.1.2 Epidemiologi Virus Influenza A.....	6
2.1.3 Patogenesis Virus Influenza A	7
2.2 Protein matriks (M).....	9
2.3 <i>Escherichia coli</i> BL21	9
2.4 Plasmid pQE-80L.....	10
2.5 Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i> L.).....	13
2.6 Ekspresi protein.....	14
2.7 Purifikasi protein rekombinan 6xHis-tag.....	15
2.8 Antibodi.....	18
2.9 Uji Serologis.....	19
2.9.1 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	19
2.9.2 <i>Western Blot</i>	20
2.10. Elektroforesis Gel SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>	21
3. METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	23
3.2 Alat.....	23
3.3 Bahan	23
3.3.1 Sampel.....	23
3.3.2 Hewan Uji.....	24
3.3.3 Medium.....	24
3.3.4 Bahan Kimia.....	25
3.4 Cara Kerja	25
3.4.1 Pembuatan Larutan, medium, dan <i>Buffer</i>	26
3.4.2 Ekspresi Gen Matriks 1 (M1).....	26
3.4.3 Purifikasi Protein Matriks 1 (M1).....	27

3.4.4	Pengukuran Konsentrasi Protein Matriks 1 (M1)	28
3.4.5	Analisis Protein Rekombinan Matriks 1 (M1)	28
3.4.5.1	Analisis dan Visualisasi Protein Matriks 1 (M1) dengan SDS-PAGE 12%	28
3.4.5.2	Analisis perhitungan berat molekul protein Rekombinan M1 secara manual dari hasil dari hasil elektroforesis SDS-PAGE	30
3.4.6	Imunisasi Kelinci dan Pengambilan Darah (Serum)	31
3.4.7	Uji Serologis	
3.4.7.1	ELISA	31
3.4.7.2	<i>Western Blot</i>	32
3.4.8	Analisis Data	34
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1	Ekspresi Gen Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009	35
4.2	Isolasi Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 dengan Sonikasi	39
4.3	Purifikasi Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 dengan Resin Ni-NTA	43
4.4	Visualisasi dan Analisis Berat Molekul Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009	46
4.4.1	Visualisasi Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 dengan Elektroforesis Gel SDS-PAGE	46
4.4.2	Analisis Perhitungan Berat Molekul Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 secara Manual dari Hasil Elektroforesis SDS-PAGE	48
4.5	Penentuan Konsentrasi Protein Hasil Purifikasi	49
4.6	Imunisasi Hewan Uji dan Pengambilan Sampel Darah	50
4.7	Uji Serologis	51
4.7.1	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	51
4.7.2	<i>Western Blot</i>	55
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1	Kesimpulan	57
5.2	Saran	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1	Struktur Virus Influenza	6
Gambar 2.1.3	Skema Replikasi Virus Influenza	8
Gambar 2.4	Peta Genom pQE-80L	12
Gambar 2.5	Kelinci Galur <i>New Zealand White</i>	13
Gambar 2.6	Mekanisme Operon Laktosa (<i>Lac</i>).....	15
Gambar 2.7	Interaksi antara 6xHis dalam Protein Rekombinan dengan Matriks Ni-NTA	16
Gambar 2.8	Struktur Antibodi	18
Gambar 3.4	Skema Kerja Penelitian.....	25
Gambar 4.1	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Ekspresi Gen M1	36
Gambar 4.2	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Protein M1 yang disonikasi	39
Gambar 4.3.1	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Protein M1 yang dipurifikasi.....	44
Gambar 4.3.2	Struktur Kimia Resin Ni-NTA	45
Gambar 4.4.2	Kurva Standar Berat Molekul Marka Protein (<i>Unstained Protein Ladder</i>)	49
Gambar 4.5	Kurva Standar BSA yang digunakan dalam Penentuan Konsentrasi Antigen M1	50
Gambar 4.7.1.1	Kurva Hasil ELISA Serum Kelinci sebelum Imunisasi dengan Serum Kelinci setelah Imunisasi	52
Gambar 4.7.1.2	Kurva Hasil ELISA Serum Kelinci setelah imunisasi dengan berbagai Kontrol	53
Gambar 4.7.2	Reaktivitas Serum Kelinci terhadap Antigen M1	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan Larutan, Medium, dan <i>Buffer</i>	65
Lampiran 2	Perhitungan Berat Molekul Protein M1 dari Hasil SDS-PAGE ..	68
Lampiran 3	Penentuan Konsentrasi Protein Hasil Purifikasi	69
Lampiran 4	Hasil ELISA beberapa Pengenceran Serum Kelinci sebelum dan sesudah Imunisasi dengan Antigen M1	70
Lampiran 5	Hasil ELISA berbagai Kontrol	71

BAB 1 PENDAHULUAN

Virus influenza termasuk ke dalam anggota *Orthomyxoviridae* dan diklasifikasikan menjadi tipe A, B, dan C. Virus influenza A terdiri atas beberapa subtipe berdasarkan dua jenis glikoprotein yang terdapat pada permukaan virus, yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Hemaglutinin berperan dalam memulai infeksi dengan cara menempel pada reseptor sialioligosakarida pada permukaan sel inang, sedangkan neuraminidase berperan dalam penetrasi virus ke dalam sel inang (Yuen & Wong 2005: 189).

Virus influenza A adalah virus yang mempunyai genom RNA bersegmen yang sangat mudah mengalami mutasi *drift* dan *shift*, sehingga terbentuk subtipe virus influenza A yang baru. Salah satu subtipe virus influenza A adalah subtipe H1N1 (Mulyadi & Prihatini 2005: 71). Tahun 1918, dunia dikejutkan oleh wabah pandemi yang disebabkan virus influenza subtipe H1N1 yang telah mengakibatkan 20--40 juta orang meninggal dunia. Virus tersebut ditemukan pada babi dan dibawa oleh tentara Amerika Serikat dari Amerika Utara ke Eropa. Wabah tersebut dikenal dengan nama *Spanish Flu* atau *Swine Flu* (Mulyadi & Prihatini 2005: 71; WHO 2010: 1).

Virus *swine flu* pertama kali diisolasi dari babi pada tahun 1930 di Amerika Serikat dan menyebabkan infeksi pada babi di seluruh dunia. Peternak, pengolah daging babi dapat mulai terinfeksi oleh *swine flu* dari babi yang terinfeksi. Sifat materi genetik virus influenza dapat mengalami evolusi dan adaptasi secara cepat, sehingga dapat melewati *barrier* spesies dan menyebabkan pandemi di Indonesia (Naffakh & Van der Werf. 2009: 1).

Pada tahun 2009 ditemukan suatu galur virus influenza A H1N1 baru, yang dilaporkan menyebabkan pandemi di lebih dari 214 negara di dunia. *World Health Organization* menyatakan bahwa sampai dengan tanggal 13 Juni 2010, kasus infeksi virus tersebut telah menyebabkan 18.172 orang meninggal dunia, sedangkan di Indonesia dilaporkan telah terjadi 1000 kasus infeksi virus tersebut dan 5 di antaranya meninggal dunia (WHO 2010: 29).

Kasus transmisi yang terjadi dari hewan ternak ke manusia dan menyebabkan pandemik diduga disebabkan oleh mutasi yang terjadi pada virus influenza A H1N1. Mutasi terjadi karena materi genetik virus yang tidak stabil. Ketidakstabilan tersebut disebabkan oleh kurangnya mekanisme perbaikan yang terjadi pada saat replikasi, sehingga memengaruhi pola penyebaran dan transmisi virus (Melidou *dkk.* 2009: 1). Kasus transmisi pada manusia dapat dicegah dengan cara membuat vaksin. Oleh karena itu, dilakukan berbagai penelitian materi genetik virus influenza A H1N1 untuk mendapatkan vaksin.

Penelitian mengenai pembuatan vaksin influenza A telah dilakukan oleh Tompkins *dkk.* (2007: 428--435) dengan menggunakan antigen yang berasal dari protein matriks 2 (M2) virus influenza A H5N1. Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI) sedang berupaya mengembangkan vaksin influenza A H1N1 2009. Vaksin yang dikembangkan antara lain berupa vaksin DNA dan vaksin “*Virus Like Particle*” (VLP). Untuk menilai ekspresi antigen vaksin, diperlukan pelacak spesifik berupa antibodi yang dapat mengenali antigen virus. Salah satu antigen virus yang dikembangkan sebagai komponen vaksin influenza A H1N1 2009 adalah protein matriks 1 (M1). Susunan asam amino dari protein M1 bersifat *conserved* pada semua subtipe virus influenza A (Heiny *dkk.* 2007: 2). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan antibodi poliklonal sebagai respon terhadap protein rekombinan M1.

Antibodi poliklonal M1 dapat diperoleh dengan cara melakukan imunisasi kelinci dengan protein rekombinan M1 yang diekspresikan melalui sistem ekspresi prokariota. Protein rekombinan M1 dihasilkan dengan cara mengekspresikan klon *Escherichia coli* BL21 yang mengandung DNA sisipan gen M1 dalam plasmid pQE-80L. Ekspresi gen M1 dalam penelitian menggunakan plasmid pQE-80L berukuran 4.700 pb. Beberapa penelitian terdahulu, seperti yang dilakukan oleh Perkasa pada tahun 2009, ia telah berhasil mengkonstruksi gen *h5* Virus Influenza A ke dalam plasmid pQE-80L. Plasmid pQE-80L telah dikonstruksi dapat digunakan sebagai vektor ekspresi untuk mengekspresikan protein rekombinan dalam sel inang seperti *E. coli*, karena vektor tersebut memiliki sekuen promotor T5 yang dapat mengenali RNA polimerase *E. coli*.

Vektor tersebut memiliki pengendalian ekspresi gen seperti dalam mekanisme operon *lac* sehingga proses ekspresi protein rekombinan M1 dalam *E. coli* BL21 dapat dilakukan dengan induksi IPTG. Vektor ekspresi pQE-80L juga memiliki dua sekuen operator *lac* dan gen *lacI^q* yang berfungsi dalam pengontrolan ekspresi gen ketika tidak terdapat suatu inducer (IPTG). Selain hal tersebut, vektor ekspresi pQE-80L memiliki sekuen 6xHis-tag yang berfungsi dalam deteksi dan purifikasi protein rekombinan M1 dari proses ekspresi gen M1 (QIAexpressionist 2001: 15 & 17). Oleh karena itu, hasil protein rekombinan M1 dari proses ekspresi gen M1 dapat dipurifikasi dengan metode *Immobilized Affinity Chromatography* (IMAC) menggunakan resin Ni-NTA.

Berdasarkan studi pendahuluan, gen M1 yang digunakan dalam penelitian telah berhasil disisipkan ke dalam vektor ekspresi pQE-80L dan dikloning pada *E. coli* TOP 10 (Perkasa, *unpublished*). Berdasarkan prapenelitian, vektor rekombinan yang dihasilkan juga telah diisolasi dari *E. coli* TOP 10 dan berhasil ditransformasi ke dalam *E. coli* BL21.

Penelitian diawali dengan mensintesis protein rekombinan M1 kemudian dilakukan proses purifikasi, lalu protein rekombinan M1 yang telah murni diimunitasikan pada kelinci dan diakhiri dengan melakukan pengujian serum kelinci yang dihasilkan menggunakan metode ELISA dan *western blot*. Sintesis protein rekombinan M1 dilakukan dengan cara mengekspresikan DNA rekombinan pQE-80L+M1 dalam sel *E. coli* BL21. Sel bakteri *E. coli* BL21 pembawa DNA rekombinan pQE-80L+M1 ditumbuhkan pada medium LB cair yang mengandung ampisilin. Kultur sel selanjutnya diinduksi menggunakan IPTG 0,1 mM dan dilakukan proses sonikasi untuk melisiskan dinding dan membran sel *E. coli* BL21 sehingga protein rekombinan M1 yang telah berhasil diekspresikan dapat diisolasi.

Protein rekombinan M1 yang telah diisolasi kemudian dipurifikasi menggunakan resin Ni-NTA. Purifikasi diawali dengan melakukan pengikatan antara protein rekombinan M1 dan resin Ni-NTA, selanjutnya dilakukan proses pencucian. Tahapan pencucian berfungsi menghilangkan pengotor atau kontaminan lain sehingga didapatkan protein rekombinan M1 yang lebih murni.

Penglepasan ikatan antara protein rekombinan M1 dan resin atau disebut tahap elusi dilakukan dengan menggunakan imidazol pada konsentrasi tinggi (250 mM).

Protein rekombinan M1 yang dihasilkan dari proses ekspresi dan purifikasi dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE. Protein rekombinan yang telah dipurifikasi selanjutnya dapat langsung digunakan sebagai antigen dalam imunisasi kelinci untuk mendapatkan antibodi poliklonal M1 Virus Influenza A H1N1 2009. Pengulangan imunisasi pada hewan uji sebenarnya dilakukan sebanyak tiga kali, namun penelitian ini hanya sampai pada imunisasi pertama.

Permasalahan dalam penelitian masih belum diketahui apakah protein rekombinan M1 dapat membangkitkan respon imun berupa antibodi poliklonal M1 Virus Influenza A H1N1 2009. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk mendapatkan antibodi poliklonal matriks 1 (M1) Virus Influenza A H1N1 2009, serta menilai respon spesifik terhadap antigen M1 yang diamati berdasarkan kenaikan titer antibodi. Hipotesis penelitian yaitu, antibodi poliklonal Virus Influenza A H1N1 2009 dapat terbentuk dari protein rekombinan matriks 1 (M1) sebagai antigennya dan terjadi peningkatan titer antibodi.

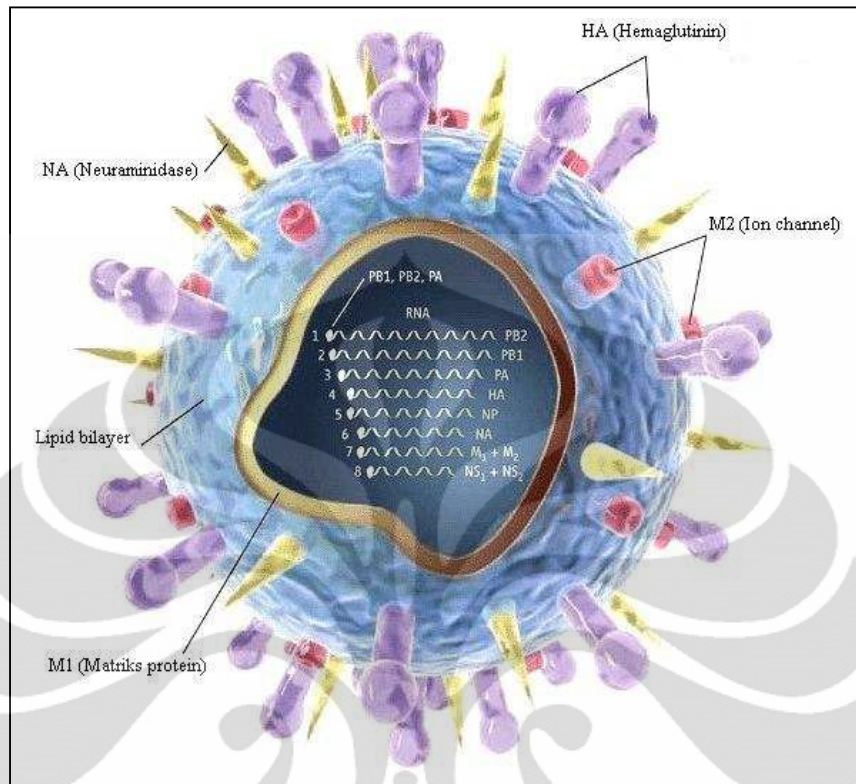
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 VIRUS INFLUENZA A

2.1.1 Struktur dan genom Virus Influenza A

Virus influenza A termasuk ke dalam famili *Orthomyxoviridae* yang terdiri atas tiga tipe, yaitu virus influenza A, B, dan C. Pengelompokan tersebut berdasarkan perbedaan antigenik pada nukleoprotein (NP) dan protein matriks (M). Virus influenza A selanjutnya diklasifikasikan menjadi beberapa subtipe berdasarkan dua jenis glikoprotein permukaan, yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sebanyak 16 HA dan 9 NA telah diidentifikasi. Semua subtipe virus influenza A dapat ditemukan pada unggas air atau unggas yang telah didomestikasi, dan hanya beberapa subtipe yang dapat ditemukan pada mamalia atau manusia. Virus influenza B dan C hanya menginfeksi manusia. Namun virus influenza B dapat pula ditemukan pada anjing laut dan virus influenza C pada babi (Mulyadi & Prihatini 2005: 72).

Virus influenza A memiliki RNA untai tunggal berpolaritas negatif dengan diameter partikel 80--120 nm dan diameter inti 9 nm. Virus tersebut memiliki selubung (*enveloped*) dan bersifat *pleiomorphic* (Liu & Ye 2002: 13055). Genom virus influenza A terdiri atas delapan segmen RNA yang mengkode 10 protein (Gambar 2.1.1), yaitu hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), matriks (M1 dan M2), nukleoprotein (NP), *polymerase basic 1* (PB1), *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase acidic* (PA), non-struktural 1 (NS1), dan non-struktural 2 (NS2). Kedelapan segmen RNA akan berasosiasi dengan nukleoprotein (NP) dan tiga subunit *polymerase* (PA, PB1, dan PB2) menjadi kompleks ribonukleoprotein yang berperan dalam replikasi dan transkripsi RNA (Harimoto & Kawaoka 2001: 132).



Gambar 2.1.1. Struktur virus influenza
[Sumber: White 2004: 6.]

2.1.2 Epidemiologi virus influenza A

Wabah influenza terjadi biasanya setiap tahun dengan tingkat keparahan yang berbeda. Kejadian dari penyakit tersebut terjadi setiap musim dingin/hujan dan dapat mengakibatkan tingginya angka kematian di antara pasien. Peristiwa epidemi atau pandemi terjadi setiap 10--15 tahun sejak pandemi tahun 1918--1919 (Dolin 2005: 1066). Studi tentang virus menunjukkan beberapa pandemi tersebut disebabkan oleh virus H1N1 (1918), H2N2 (1957), H3N2 (1968), H3N8 (1900), dan H5N1 (1997). Pandemi tersebut mengakibatkan penyakit yang kronis bahkan kematian pada anak-anak dan orang dewasa (Yuen & Wong 2005: 190).

Pandemi *Swine Influenza* H1N1 pertama kali menyerang dan menewaskan 20--40 juta orang pada tahun 1918. Peristiwa epidemiologik terjadi pada tahun 1957 (H2N2) dan 1968 (H3N2), keduanya berasal dari Asia yang menyebabkan kematian 1 juta orang (Mulyadi & Prihatini 2005: 71). Menurut WHO (2010: 1),

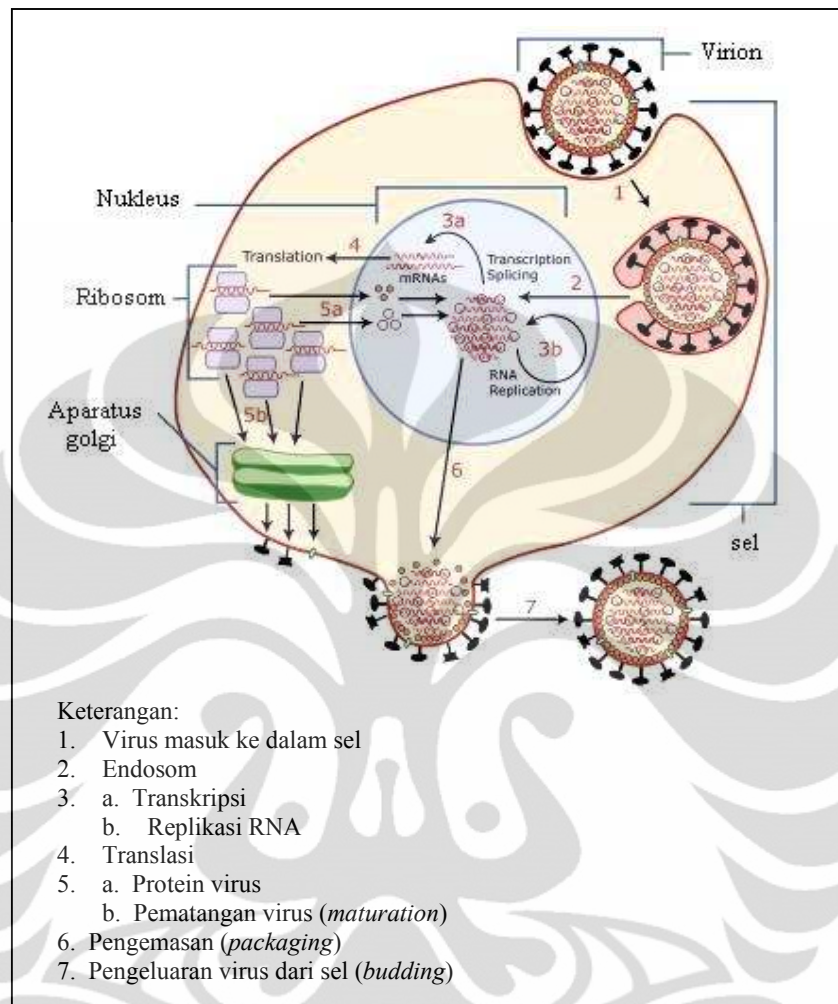
pandemi virus influenza di Asia terjadi di Malaysia, Singapura, sebagian India, Bangladesh dan Bhutan.

Pandemi yang terjadi diakibatkan adanya mutasi genetik pada virus influenza A. Mutasi yang terjadi menyebabkan perubahan kecil maupun besar. *Antigenic drift* merupakan perubahan kecil yang disebabkan oleh kesalahan pengkodean protein polimerase sehingga menyebabkan mutasi titik pada glikoprotein hemagglutinin dan neurominidase. *Antigenic drift* meliputi perubahan komposisi antigenik virus influenza A yang terjadi setiap saat dan bersifat konstan dan permanen (Capua & Alexander 2002: 2).

Proses kedua penyebab perubahan genetik adalah *antigenic shift*. *Antigenic shift* merupakan perubahan besar dari virus. *Antigenic shift* terjadi apabila suatu sel terinfeksi oleh dua jenis subtipe virus influenza yang berbeda. Hal tersebut akan mengakibatkan dibentuknya virus influenza jenis baru yang merupakan gabungan dari segmen RNA parentalnya (Cinti 2005: 61). Penggabungan dua materi genetik dari dua subtipe virus yang berbeda dan menginfeksi satu sel, sehingga terbentuk virus dengan subtipe baru disebut *reassortment gene* (Harimoto & Kawaoka 2001: 133). *Antigenic shift* terjadi pada frekuensi yang sedikit namun lebih berbahaya. Hal tersebut mengakibatkan angka kematian lebih tinggi dibandingkan dengan epidemik influenza (Cinti 2005: 61).

2.1.3 Patogenesis virus influenza A

Reservoir utama virus influenza A adalah unggas air. Transmisi yang terjadi di antara unggas, terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui kontaminasi *fecal*. Virus influenza A tidak menyebabkan gejala pada unggas. Namun, pada beberapa kasus menyebabkan gejala gangguan sistem pernafasan yang ringan dan beberapa di antaranya menyebabkan gangguan sistemik yang fatal. Virus yang berada pada reservoir utama, pada waktu tertentu dapat bertransmisi ke hewan lainnya, termasuk manusia dan unggas yang telah didomestikasi (Beigel *dkk.* 2006: 1377).



Gambar 2.1.3. Skema replikasi virus influenza
[Sumber: Behrens & Stoll 2006: 95.]

Infeksi virus (Gambar 2.1.3) dimulai dari pengikatan partikel virus (virion) dengan reseptor asam sialat di permukaan sel inang dan dimediasi oleh hemagglutinin. Derajat pH yang rendah pada endosom menyebabkan penggabungan virus dan membran endosomal. Hal tersebut menyebabkan kompleks ribonukleoprotein virus (VRNP) akan dikeluarkan di sitoplasma dan nukleus. Peristiwa transkripsi dan replikasi virus berlangsung di nukleus, sedangkan translasi dari molekul mRNA virus terjadi di sitoplasma. Sintesis kompleks *polymerase*, NP, NS2, dan protein M1 yang terikat pada molekul RNA virus (kompleks M1-VRNP) terjadi di daerah nukleus. Protein selubung dan kompleks M1-VRNP kemudian tersusun pada plasma membran (Sidorenko & Bocharov 2001: 1; Behrens & Stoll 2006: 95).

2.2 PROTEIN MATRIKS (M)

Virus influenza mempunyai empat jenis antigen yang terdiri dari protein nukleokapsid (NP), hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), dan protein matriks (M). Gen matriks (M) virus influenza A memiliki 1.027 nukleotida dan mengkode dua macam protein, yaitu M1 dan M2, protein yang dikode oleh RNA virus influenza A segmen ketujuh. Gen M1 memiliki *open reading frame* mulai dari nukleotida ke 26--781, yang mengkode protein M1. Gen M2 memiliki +1 *open reading frame* pada nukleotida ke 26--51 dan 740--1.004, yang mengkode protein M2 (Ito *dkk.* 1991: 5491).

Protein internal M1 yang terdiri atas 252 asam amino merupakan daerah paling *conserved* dan merupakan komponen utama pada partikel virus. Protein M1 terkonservasi mencapai 80% dari 95--100% isolat-isolat virus influenza A (Heiny *dkk.* 2007: 2). Protein M1 berperan dalam pengaturan replikasi sampai penyusunan virus dan *budding*. Protein M2 merupakan protein transmembran, terdiri atas 97 asam amino. Protein tersebut memiliki aktivitas pengaturan ion H⁺ dan dapat berfungsi melindungi integritas struktural dari glikoprotein yang sensitif terhadap pH yang rendah (Ito *dkk.* 1991: 5491). Rendahnya tingkat pH pada endosoma membuat bagian dalam virus menjadi asam, sehingga akan memfasilitasi proses *uncoating* virus (Horimoto & Kawaoka 2001: 132).

2.3 *Escherichia coli* BL21

Escherichia coli merupakan kelompok bakteri gram negatif yang berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob, serta mempunyai kromosom yang berbentuk sirkular. Bakteri *E. coli* banyak digunakan dalam teknologi rekayasa genetika dan biasa digunakan sebagai *host* vektor untuk selanjutnya gen-gen yang telah berhasil disisipi ke dalam vektor dapat diekspresikan dalam *host*/inangnya. Pemilihan *E. coli* tersebut berhubungan dengan tingkat ekspresi protein *E. coli* yang tinggi, memungkinkan untuk dimanipulasi genomnya, serta proses pengkulturan yang dilakukan cukup mudah (Ausubel *dkk.* 1990: 1.1.1; Bernard & Payton 1995: 5.2.5).

E. coli BL21 terdiri atas beberapa jenis, yaitu *E. coli* BL21, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysE, dan *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene 2004: 7). Strain yang digunakan untuk ekspresi protein matriks (M) virus influenza A H1N1 2009 adalah *E. coli* BL21. *E. coli* BL21 digunakan karena tidak memiliki protease sehingga dapat dilakukan ekspresi protein rekombinan dengan optimal dan dapat digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan dalam jumlah besar (*high-level expression*) (Biocompare 2009: 1). Genotipe dari *E. coli* BL21 adalah F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm*. Tanda F- mempunyai arti bahwa sel *E. coli* BL21 tersebut tidak mempunyai *fertility factor* sehingga dapat menerima plasmid yang diintroduksi ke dalamnya. Gen *OmpT* berfungsi dalam menghasilkan protein rekombinan yang tinggi sedangkan *hsdSB* berfungsi untuk mengkode enzim restriksi yang mengenali sekuens DNA inang. Gen *gal* berperan dalam memetabolisme galaktosa, rB-mB- memungkinkan vektor yang dimasukkan dapat membawa gen *insert*, serta *dcm* berfungsi dalam mengkode DNA *cytosine methylase* (Fairbanks & Andersen 1999: 191--192; Stratagene 2004: 7).

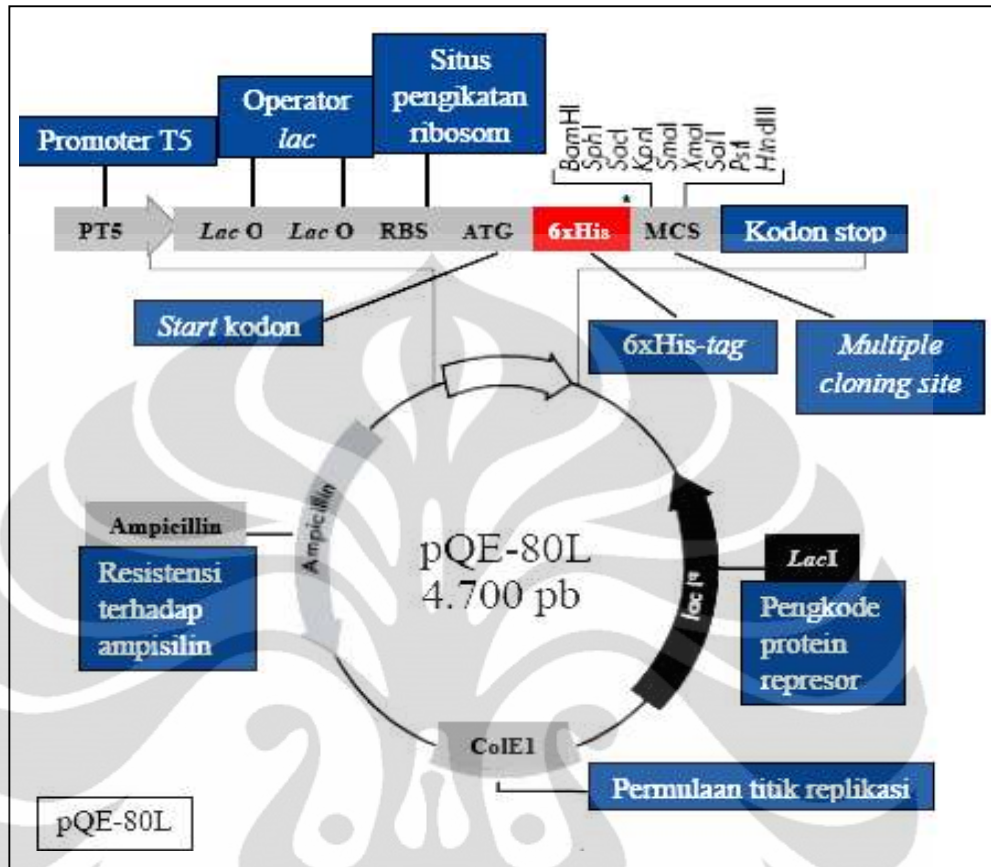
2.4 PLASMID pQE-80L

Semua plasmid dapat digunakan sebagai vektor klonasi, tetapi ada beberapa plasmid tertentu yang dapat digunakan juga sebagai vektor ekspresi. Plasmid yang berfungsi sebagai vektor ekspresi umumnya mempunyai suatu promoter sehingga produksi protein target dapat dikontrol dan menghasilkan sejumlah besar protein yang diinginkan. Oleh karena itu, plasmid vektor ekspresi mempunyai sekuens pengatur transkripsi dan translasi untuk ekspresi protein (Sambrook & Russell 2001: 1.13).

Plasmid pQE-80L merupakan plasmid yang dibuat untuk mengekspresikan protein asing yang dapat dikenali oleh sel inang seperti *E. coli*. Pengenalan sinyal protein asing oleh *E. coli* akan memberikan informasi mengenai adanya gen *insert* yang telah dimasukkan ke dalam vektor ekspresi, contohnya plasmid pQE-80L. Gen *insert* tersebut selanjutnya akan ditranskripsi dan ditranslasikan untuk menghasilkan protein rekombinan di bawah kontrol sinyal ekspresi *E. coli* (Brown

1991: 221--223). Plasmid rekombinan merupakan plasmid yang telah mengandung gen *insert* yang diinginkan untuk selanjutnya dapat dilakukan pengklonasi serta ekspresi gennya (Dellis 2009: 2).

Plasmid pQE-80L merupakan plasmid yang dirancang sebagai vektor ekspresi dan berukuran 4.700 pb (4,7 kb). Plasmid pQE-80L (Gambar 2.4) mempunyai (1) promotor T5 yang dapat dikontrol atau dikenali oleh RNA polimerase *E. coli*; (2) dua sekuen operator *lac*, yang berfungsi untuk meningkatkan pengikatan terhadap represor *lac*; (3) *multiple cloning site* (MCS) dan *stop codon*, merupakan daerah yang mempunyai urutan nukleotida yang dapat didigesti oleh enzim-enzim restriksi tertentu dan translasi untuk semua kerangka baca dalam persiapan penyusunan ekspresi protein; (4) *ribosome binding site* (RBS), yang berfungsi untuk meningkatkan laju translasi; (5) *CoIE1*, merupakan daerah permulaan titik replikasi; (6) gen β -*lactamase* (gen *bla*), yang berfungsi dalam resistensi terhadap antibiotik ampisilin, sehingga dapat dikontrol dan dikendalikan pada berbagai strain *E. coli* yang sensitif terhadap ampisilin; (7) sekuen *6xHis-tag*, yang berfungsi untuk purifikasi atau pemurnian protein; (8) gen *lacIq*, pengkode protein represor *lac* (QIAexpressionist 2001: 15 & 17).



Gambar 2.4. Peta genom pQE-80L
[Sumber: QIAexpressionist 2001: 116.]

2.5 KELINCI (*Oryctolagus cuniculus* L.)

Kelinci merupakan hewan uji yang sering digunakan dalam penelitian biomedis. Hal tersebut disebabkan kelinci memiliki aktivitas reproduksi yang panjang (5 tahun) dan dapat hidup hingga 6 tahun (Rubben 2003: 1). Kelinci (*Oryctolagus cuniculus* L.) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Mammalia
Order : Lagomorpha
Family : Leporidae
Genus : *Oryctolagus*
Species : *Oryctolagus cuniculus* L. (Linnaeus, 1758)

(Banks *dkk.* 1987: 79).



Gambar 2.5. Kelinci galur *New Zealand White*
 [Sumber: Livestock industries 2003: 1.]

Kelinci galur *New Zealand White* (Gambar 2.5) merupakan kelinci albino yang tidak memiliki pigmen pada rambutnya. Rambut menutup rata seluruh tubuhnya. Daerah yang tidak tertutup rambut terdapat pada ujung hidung, daerah inguinal, dan daerah skrotum jantan (Kozma *dkk.* 1974: 50). Kelinci galur *New Zealand White* memiliki rambut yang putih mulus, padat, tebal, dan kasar bila

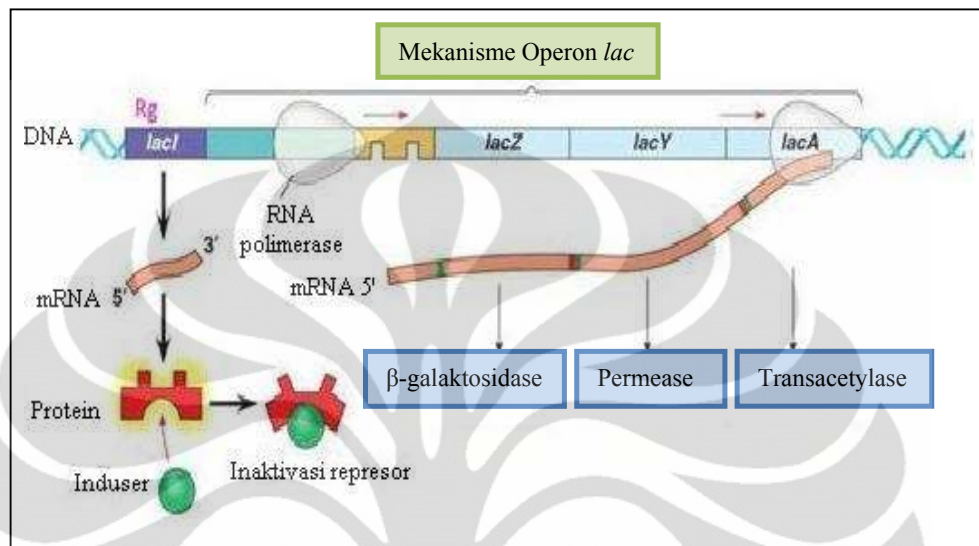
diraba. Kelinci tersebut biasanya memiliki berat 2--5 kg. Telinganya tegak dan berujung membulat, serta ekstrimitas posterior cenderung lebih berkembang. Kelinci galur *New Zealand White* termasuk kelinci yang cepat berkembang biak, sehingga sering digunakan sebagai hewan ternak penghasil daging ataupun kelinci percobaan di laboratorium (Rubben 2003: 1).

2.6 EKSPRESI PROTEIN

Sistem ekspresi protein yang banyak digunakan antara lain bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut dikarenakan *E. coli* dapat dimanipulasi genomnya, pengkulturan bakterinya mudah dilakukan, dapat mengekspresikan protein asing, serta dapat mentoleransi protein asing yang diekspresikan (Bernard & Payton 1995: 5.2.5). Bakteri *E. coli* dapat menerima DNA asing, bersifat stabil, mudah untuk mendeteksinya, serta mempunyai kontrol terhadap ekspresi gennya. Strain *E. coli* yang umum digunakan dalam ekspresi protein rekombinan adalah strain *E. coli* BL21 karena mempunyai stabilitas dan kontrol yang tinggi serta kemampuannya dalam mengekspresikan protein dalam jumlah yang banyak (Bernard & Payton 1995: 5.2.5; Invitrogen 2002: 1 & 4).

Mekanisme ekspresi protein (Gambar 2.6) dalam sel prokariot seperti *E. coli* dapat dilakukan melalui induksi *Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Proses induksi IPTG dimulai dengan terikatnya IPTG pada situs pengikatan induser yang terdapat pada protein represor. Adanya kompleks induser (IPTG)-represor menyebabkan terjadinya perubahan struktural yang dapat mengubah situs pengikatan protein represor dengan situs pengikatan represor yang terdapat pada operator. Hal tersebut menyebabkan tidak adanya interaksi yang terjadi antara protein represor dengan operator, sehingga gen struktural dapat menghasilkan RNA polimerase dan berikatan dengan promoter yang selanjutnya dapat memulai transkripsi dan translasi protein yang diinginkan (Snustad & Simmons 2003: 578--579). Jika tidak terdapat suatu induser (IPTG) maka protein represor akan berikatan dengan operator dan mencegah RNA polimerase untuk dapat mentranskripsi gen asing sehingga tidak dapat ditranslasi menjadi suatu

protein rekombinan (Fairbanks & Andersen 1999: 219--220; QIAexpressionist 2001: 17).



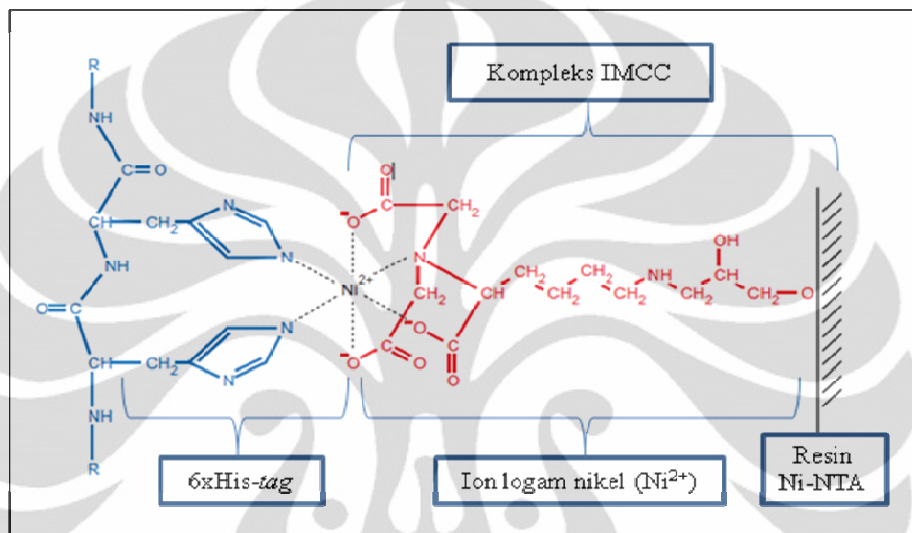
Gambar 2.6. Mekanisme operon laktosa (*lac*)
[Sumber: Philip 2010: 1.]

2.7 PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN 6xHis-tag

Purifikasi adalah suatu proses untuk memurnikan protein rekombinan dengan protein lain yang juga diekspresikan dan dihasilkan oleh sel inang. *Immobilized Metalchelate Affinity Chromatography* (IMAC) atau dikenal dengan nama kromatografi afinitas merupakan salah satu cara yang cukup baik untuk memurnikan suatu protein. Teknik tersebut didasarkan pada sifat beberapa asam amino seperti histidin, triptofan, tirosin, atau fenilalanin, yang dapat berikatan secara spesifik dan reversibel dengan suatu ion logam yang biasa disebut dengan ligan. Ligan-ligan tersebut dapat berikatan secara kovalen pada suatu matriks yang disusun dalam suatu kolom kromatografi (Carlton & Zachariou 2008: 26 & 138).

Protein rekombinan yang memiliki penanda histidin (6xHis-tag) dapat dipurifikasi dengan metode IMAC menggunakan tiga macam resin, yaitu *nitriloacetic acid* (NTA), *iminodiacetic acid* (IDA), dan BD TALONTM. Resin tersebut berfungsi sebagai fase stasioner (*chelator*) yang menangkap ion logam

kemudian membentuk *immobilized metal chelate complex* (IMCC) (Gambar 2.7) (Carlton dan Zachariou 2008: 138). Pengikatan protein rekombinan yang memiliki penanda 6xHis-tag dengan IMCC terjadi dengan cara memberikan kelebihan elektron dari residu histidin kepada ion logam yang kekurangan elektron (Petty 1996: 9.4.12).



Gambar 2.7. Interaksi antara 6xHis-tag dengan resin Ni-Nta
[Sumber: QIAexpressionist 2001: 19.]

Tahap awal dari proses purifikasi protein rekombinan adalah melisis sel untuk mendapatkan protein intraselular yang diinginkan. Protein intraselular umumnya terdapat di dalam sitoplasma sel dan periplasmik (Scope & Smith 1998: 10.0.7). Proses pelisisan sel dapat dilakukan secara fisik maupun kimiawi. Pelisisan sel secara fisik dapat dilakukan melalui metode mekanis dan nonmekanis. Pelisisan sel secara nonmekanis dapat dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan kimia yang dapat menguraikan dinding sel dan melarutkannya (Pierce Biotechnology 2009: 3--5).

Protein rekombinan yang berhasil didapatkan dari proses pelisisan sel selanjutnya diikat dengan Ni²⁺ menggunakan metode IMAC. Proses pengikatan protein rekombinan pada IMAC terjadi ketika sampel dicampurkan bersama dengan resin Ni-NTA. Resin NTA yang digunakan telah berikatan dengan ion logam Ni²⁺ membentuk *immobilized metal chelate complex* atau IMCC. Sampel

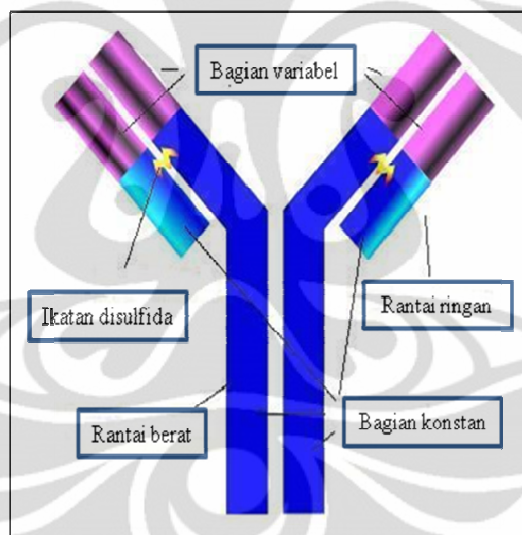
protein yang memiliki penanda 6xHis-*tag* selanjutnya akan berikatan dengan ion logam yang terdapat pada IMCC (Carlton & Zachariou 2008: 138).

Protein yang telah terikat pada resin selanjutnya dicuci. Proses pencucian/*washing* dalam purifikasi protein rekombinan berfungsi untuk menghilangkan protein lainnya yang juga berikatan dengan resin. Proses tersebut dapat dilakukan dengan kondisi biasa atau secara ketat (*stringent*). Proses pencucian secara ketat dapat dilakukan jika terdapat protein lain yang juga memiliki residu histidin terpurifikasi bersama-sama dengan protein rekombinan 6xHis-*tag*. Hal tersebut dapat diatasi dengan cara mengurangi pH sampai 6,3 atau menambahkan sedikit konsentrasi imidazol (10--20 mM), serta dengan mengurangi banyaknya resin yang digunakan (Kimple & Sondek 2004: 9.9.2).

Tahapan terakhir dalam purifikasi protein yaitu elusi. Elusi protein merupakan tahap penganalisisan protein rekombinan target yang memiliki 6xHis-*tag* dari resin. Elusi protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu menggunakan senyawa kimia seperti imidazol dan EDTA serta merubah kondisi pH pada buffer elusi. Penggunaan imidazol tersebut dikarenakan strukturnya mirip dengan residu histidin, sehingga penggunaan imidazol pada konsentrasi tinggi (lebih dari 200 mM) dapat menyebabkan protein rekombinan 6xHis-*tag* terdisosiasi. Hal tersebut dikarenakan protein 6xHis-*tag* tidak mampu lagi berkompetisi dengan imidazol untuk berikatan pada situs pengikatan resin (Petty 1996: 9.4.13; QIAexpressionist 2001: 71). Penurunan pH sampai 4,5 juga dapat menyebabkan protein rekombinan 6xHis-*tag* tidak mampu lagi berikatan dengan kompleks ion logam-resin sehingga akan terlepas dari resin, sedangkan penggunaan reagen seperti EDTA dapat melepaskan ion logam dari resin sehingga protein rekombinan 6xHis-*tag* dapat terlepas sebagai kompleks protein-logam. Berdasarkan ketiga metode yang dapat digunakan dalam proses elusi protein maka penggunaan imidazol lebih disarankan dalam proses elusi dikarenakan tidak akan merusak protein rekombinan akibat penurunan pH (Kneusel *dkk.* 2000: 932) maupun penggunaan EDTA yang dapat memengaruhi hasil purifikasi protein rekombinan 6xHis-*tag* akibat adanya ion logam yang terlepas dari resin dan berikatan dengan protein (Petty 1996: 9.4.13).

2.8 ANTIBODI

Antibodi adalah protein serum yang terbentuk sebagai respon keberadaan antigen dan akan bereaksi secara spesifik dengan antigen tersebut secara *in vivo* atau *in vitro*. Antibodi terdiri atas glikoprotein plasma yang bersirkulasi dan dapat berinteraksi secara spesifik dengan determinan antigenik, dan disekresikan oleh sel plasma yang terbentuk melalui proliferasi dan diferensiasi limfosit B (Harlow & Lane 1988: 7). Molekul antibodi terdiri atas 4 rantai polipeptida (Gambar 2.8), yaitu 2 rantai berat (*heavy chain*) dan 2 rantai ringan (*light chain*). Rantai ringan terdiri atas rantai Kappa (K) dan Lamda (L). Rantai berat dan rantai ringan dihubungkan oleh ikatan sulfida (Baratawidjaja 2006: 74--75).



Gambar 2.8. Struktur antibodi
[Sumber: Cummings 2007: 24-12.]

Antibodi diproduksi dalam bentuk imunoglobulin dan mempunyai efek sitotoksik. Imunoglobulin (Ig) dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi dan diferensiasi sel B yang terjadi setelah kontak dengan antigen. Antigen yang masuk kedalam tubuh inang akan memicu respon imun non spesifik yang melibatkan sel efektor, molekul, dan faktor yang berperan dalam penghambatan penyebaran infeksi virus. Komponen efektor respon imun mulai berfungsi dalam beberapa hari sejak infeksi terjadi, khususnya di mukosa saluran nafas. Sebagian besar virus influenza yang menginfeksi saluran nafas akan

terdeteksi dan dihancurkan oleh respon imun non spesifik dalam beberapa jam sejak terjadinya infeksi. Respon imun spesifik atau adaptif terbentuk kemudian untuk eliminasi infeksi virus. Sel T sitotoksik dan sel antibodi yang dihasilkan oleh sel B berfungsi sebagai efektor yang bersifat spesifik terhadap virus (Kresno 2001: 178--180).

2.9 UJI SEROLOGIS

2.9.1 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

ELISA merupakan suatu tehnik imunologi untuk menentukan atau mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Keberadaan antibodi diukur melalui kenaikan titer antibodi spesifik dalam serum sampel. Antigen mula-mula diikatkan dengan antibodi spesifik, lalu ditambahkan lagi antibodi yang berlabel enzim, seperti peroksidase dan fosfatase. Substrat kromogenik selanjutnya ditambahkan, yang bila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari (Baratawidjaja 2006: 492--493).

Secara umum, teknik ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu teknik ELISA kompetitif yang menggunakan konjugat antigen-enzim atau konjugat antibodi-enzim, dan teknik ELISA nonkompetitif yang menggunakan dua antibodi (primer dan sekunder). Pada teknik ELISA nonkompetitif, antibodi kedua (sekunder) akan dikonjugasikan dengan enzim yang berfungsi sebagai signal. Teknik ELISA nonkompetitif ini seringkali disebut sebagai teknik ELISA *sandwich* (Ausubel *dkk.* 1990: 11.2.4--11.2.5).

Teknik ELISA telah berkembang menjadi berbagai macam jenis teknik. Perkembangan tersebut didasari pada tujuan dari dilakukannya uji dengan teknik ELISA tersebut sehingga dapat diperoleh hasil yang optimal. Berikut adalah beberapa macam teknik ELISA yang sering digunakan, antara lain ELISA *direct*. Teknik ELISA tersebut merupakan teknik ELISA yang paling sederhana. Teknik tersebut seringkali digunakan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi

antigen pada sampel. ELISA *direct* menggunakan suatu antibodi spesifik (monoklonal) untuk mendeteksi keberadaan antigen yang diinginkan pada sampel yang diuji (Ausubel *dkk.* 1990: 11.2.1--11.2.3).

Metode ELISA memiliki beberapa keuntungan yaitu, (1) cukup sensitif; (2) reagen relatif murah dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama; (3) dapat memeriksa beberapa parameter sekaligus; (4) peralatan mudah didapat; dan (5) tidak menggunakan zat radiasi (Anwar 2005: 15--16).

2.9.2 *Western Blot*

Western blot merupakan suatu metode untuk mengetahui reaktivitas antibodi dan antigen dengan cara mentransfer protein dari gel ke membran. *Western blot* sangat berguna pada beberapa aplikasi biologi molekuler. Ekspresi dari protein selama perkembangan suatu organisme dapat dimonitor dengan *Western blot*. *Western blot* berguna untuk mendeteksi ekspresi dari gen yang diklona pada sel heterolog. Proses *posttranslational* dan degradasi protein juga dapat dilakukan dengan metode *Western blot* (Becker 1996: 157--158).

Kunci dari teknik *Western blot* adalah hibridisasi. Hibridisasi adalah proses penggabungan molekul untai tunggal DNA antara untai tunggal pada *probe* dengan untai tunggal pada DNA target. Ciri khusus dari hibridisasi adalah transfer molekul yang telah dipisahkan oleh gel elektroforesis ke membran nilon atau nitroselulosa (Fakhroni 2005: 3). Metode hibridisasi selain *Western blot* yaitu, *Northern blot* dan *Southern blot* (Becker 1996: 157; Campbell *dkk.* 2002: 329 & 399).

Metode *Southern blot* dapat digunakan dalam berbagai aplikasi, antara lain untuk mengetahui tidak hanya urutan tertentu pada sampel DNA, tetapi juga fragmen restriksi yang mengandung urutan tersebut. *Southern blot* juga dapat digunakan untuk mengetahui ukuran fragmen DNA target, mendeteksi alel yang termutasi, dan DNA *fingerprinting* (Campbell *dkk.* 2002: 397).

Northern blot memiliki prosedur serupa dengan *Southern blot*, hanya saja pada *Northern blot* yang digunakan sebagai subjek analisis hibridisasi adalah mRNA (molekul utuh dan bukan berupa fragmen). Umumnya *Northern blot*

bertujuan untuk menentukan apakah gen tertentu telah ditranskripsi dan berapa banyak mRNA yang ada. *Northern blot* telah menjadi pendorong penelitian pada pengontrolan ekspresi gen (Campbell *dkk.* 2002: 399).

2.10 ELEKTROFORESIS SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

Elektroforesis merupakan suatu teknik untuk memisahkan atau menguraikan molekul bermuatan di dalam medan listrik (Brown 1991: 43). Elektroforesis digunakan untuk memisahkan protein spesifik dan fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda. Teknik tersebut banyak digunakan untuk menentukan ukuran dari suatu fragmen DNA, menentukan berat molekul suatu protein, menentukan titik isoelektrik protein, dan menentukan kemurnian suatu protein yang telah diisolasi (Seidman & Moore 2000: 582).

Gel yang umum digunakan sebagai matriks dalam elektroforesis, yaitu agarosa dan poliakrilamid. Masing-masing gel memiliki kelebihan dan kekurangan. Agarosa umum digunakan untuk memisahkan fragmen DNA. Agarosa adalah polisakarida alami yang berasal dari agar, suatu substansi yang diekstraksi dari makroalga laut (Seidman & Moore 2000: 582). Gel agarosa dapat memisahkan fragmen DNA dengan ukuran 50--20.000 pb (pasang basa). Keakuratan dan kekuatan pemisahan gel agarosa lebih rendah dibandingkan gel poliakrilamid karena rentang pemisahan molekul yang besar (Sambrook & Russells 2001: 5.2).

Gel poliakrilamid umum digunakan untuk memisahkan protein. Poliakrilamid terbuat dari akrilamid (bersifat neurotoksin) dan bisakrilamid. Kedua bahan tersebut akan dipolimerisasi dengan adanya ammonium persulfat dan dikatalis dengan bantuan N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Seidman & Moore 2000: 583). Gel poliakrilamid dapat memisahkan molekul dengan ukuran 10--1.500 pb (Brown 1999: 62), lebih kecil daripada gel agarosa dan memiliki kekuatan pemisahan yang lebih baik, namun lebih sulit dalam proses persiapan gel dibandingkan gel agarosa (Sambrook & Russells 2001: 5.2).

Berbeda dengan molekul DNA, protein memiliki muatan yang berbeda berdasarkan asam amino pembentuknya. Oleh karena itu, digunakan SDS

(*sodium dodecyl sulfate*), yaitu sejenis detergen yang bermuatan negatif. *Sodium dodecyl sulfate* akan berikatan pada daerah hidrofobik dari molekul protein, menyebabkan protein tidak melipat dan membentuk struktur paling sederhana (struktur primer), serta memberikan muatan negatif pada protein. Gel poliakrilamid yang menggunakan SDS sering disebut dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) (Albert dkk. 2002: 485).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium IHVCB-UI (*Institute of Human Virology and Cancer Biology University of Indonesia*), Gedung IASTH Salemba, Jakarta Pusat. Penelitian dilakukan selama 5 bulan, yaitu dari bulan Januari sampai Mei 2011.

3.2 ALAT

Alat-alat yang digunakan adalah mikropipet berbagai ukuran (20 μ l, 200 μ l, dan 1000 μ l) [Bio-rad], tip (1000 μ l, 200 μ l, dan 10 μ l) [Sorenson], tabung mikrosentrifus 1,5 ml [Axygen], erlenmeyer [Schott Duran], *incubator* [Inco 2], *shaker incubator* [Ratex Adelab Scientific], *sonicator* [Branson Sonifier 250], sentrifugator [Sorvall Biofuge Primo], *bio safety cabinet* (BSC) [Esco], *spin* [Bio-rad], mesin *vortex* [Heidolph reaxtop], perangkat elektroforesis [Bio-rad], *timer* [Bio-Rad], autoklaf [Hirayama], apparatus elektrofresis [Bio-Rad], timbangan elektrik [Adventurer™ Ohaus], lemari pendingin [Sanyo], *freezer* -20° C [LG], *ice maker* [Hoshizaki], tabung ukuran 15 ml & 50 ml [Becton Dickinson & Corning], gelas ukur [Iwaki Pyrex], *scanner* [Canon], komputer [Samsung], sarung tangan [Sensi gloves], masker [Pro-mask], parafilm [Sigma], *Elisa reader* [Bio-Rad].

3.3 BAHAN

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah sel *Escherichia coli* BL21 [Amersham Pharmacia] yang mengandung vektor ekspresi pQE-80L [Qiagen] pembawa DNA sisipan gen matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009. Gen matriks 1 Virus

Influenza A H1N1 2009 yang digunakan dalam penelitian berukuran 756 pb (Ito *dkk.* 1991: 5491).

3.3.2 Hewan uji

Hewan uji yang digunakan berupa satu ekor kelinci *Oryctolagus cuniculus* L. betina strain *New Zealand White*. Penggunaan hewan uji dalam penelitian ini mendapatkan persetujuan dari Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, sebagai bagian dari penelitian “Pengembangan Vaksin DNA Influenza A H5N1 dan H1N1 Berikut Sistem Aplikasinya Dalam Rangka Persiapan Pandemi Influenza A Galur Baru” yang mendapatkan pendanaan Insentif Riset 2010 dari Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia. Persetujuan dari Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian FKUI diberikan dalam bentuk surat Keterangan Lolos Kaji Etik nomor 346/PT02.FK/Etik/2010.

3.3.3 Medium

Medium yang digunakan adalah medium Luria Bertani (LB) cair [Himedia Laboratories Pvt.Ltd].

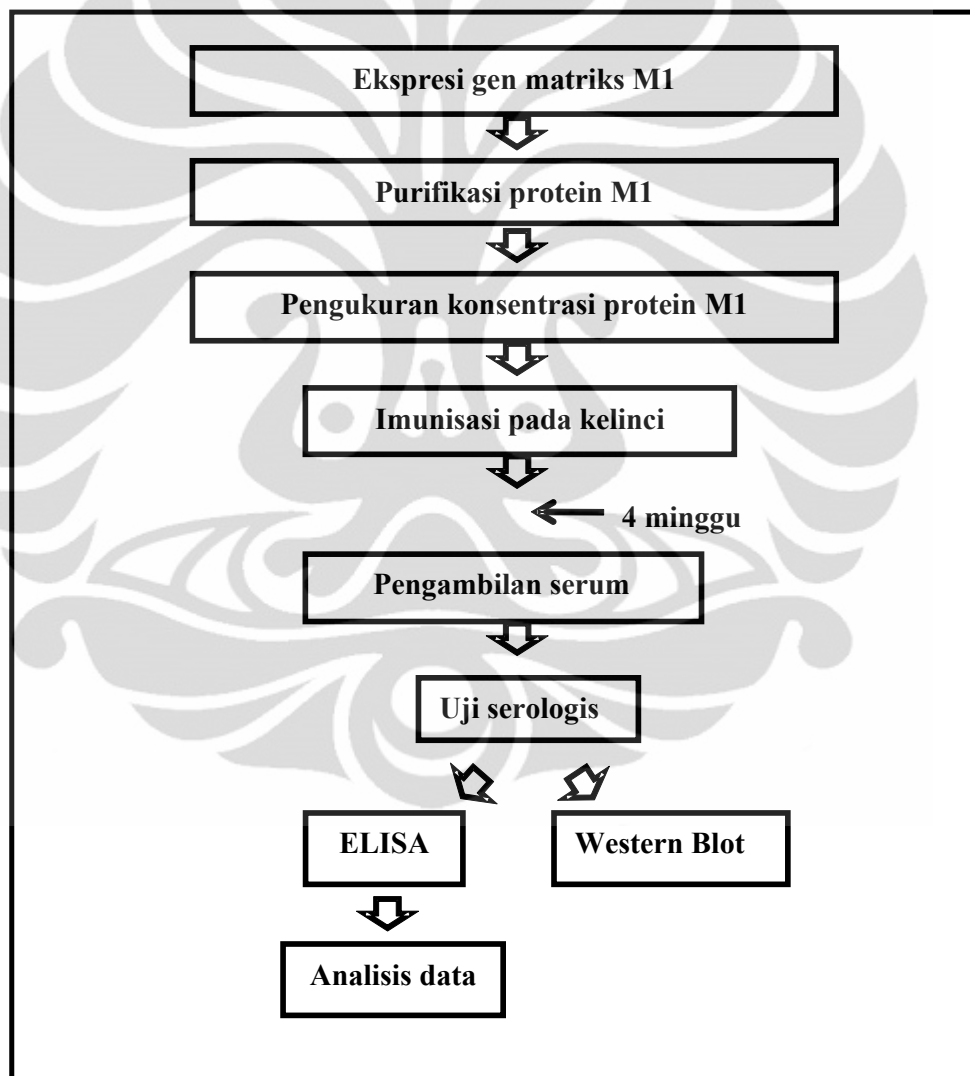
3.3.4 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan meliputi akuades, alkohol 70% [Evita Pharmaceutical Laboratories], ampicilin [ViccillinR 100], NaCl padat [Merck], tripton [Sigma], tripton [Bio Basic Inc.], *phosphate buffered saline* (PBS) [Sigma], HCl [Merck], *loading buffer* 1x [Biolabs], asam asetat glasial (CH₃COOH) [Merck], gliserol [Promega], sodium dodesil sulfat (SDS) 10% [Promega], akrilamid 30% [Promega], *bis-acrylamide* [Promega], TEMED [Bio-Rad], ammonium persulfat 10% (APS) [Promega], metanol [Merck], asam sitrat [Sigma], asam karbonat [Sigma], asam bikarbonat [Sigma], *tris base* [Promega], *commasie brilliant blue* 0,2% [Bio-Rad], IPTG [Vivantis], Ni-NTA *agarose* [Qiagen], imidazole [Qiagen], marka *unstained* protein [Fermentas], membran

nitroselulosa [Amersham bioscience], PVDF *membrane* 0.45 μm [Invitrogen], Tween-20 [Cat], Glycine [Promega], *complete freud's adjuvant* [Sigma], streptavidine-HRP [Chemicon], Gelatin [Bio-Rad], antiserum kelinci.

3.4 CARA KERJA

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4



Gambar 3.4. Skema Kerja Penelitian

3.4.1 Pembuatan larutan, medium, dan *buffer*

Pembuatan larutan, medium, dan *buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.2 Ekspresi gen matriks 1 (M1)

Ekspresi gen matriks 1 (M1) virus influenza A H1N1 2009 dilakukan berdasarkan metode QIAexpressionist (2001: 61). Sebanyak satu ose kultur *E. coli* BL21 yang mengandung DNA rekombinan, vektor ekspresi pQE-80L *wildtype*, dan *E. coli* BL21 *wildtype* masing-masing diinokulasikan ke dalam 10 ml medium LB cair yang sebelumnya telah ditambahkan 10 µl ampisilin (100 µl/ml). Perbandingan medium dan ampisilin adalah 1000 : 1. Kultur sel selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama ± 16 jam (*overnight*).

Sebanyak 10 ml kultur hasil inkubasi (*overnight*) dimasukkan ke dalam 200 ml medium LB cair berisi 20 ml KH₂PO₄ dan 200 µl ampisilin (100 µl/ml). Kultur diinkubasi kembali ke dalam *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 2 jam atau OD₆₀₀ mencapai 0,3. Sebanyak 1 ml kultur diambil setelah OD₆₀₀ mencapai 0,3 sesaat sebelum dilakukan induksi dengan IPTG (sebagai kontrol negatif induksi). Sampel kontrol negatif induksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan selanjutnya dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan 80 µl 1x *sample buffer* SDS PAGE. Pelet sampel yang tidak diinduksi disimpan pada suhu -20 °C sampai akan digunakan.

Sisa kultur diinduksi dengan 19,9 µl IPTG 1 M sampai konsentrasi akhir 0,1 mM. Kultur selanjutnya diinkubasi selama 4 jam (OD₆₀₀ ± 1) dalam *shaker incubator* pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm. Kultur sel yang telah diinduksi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disimpan pada suhu -20 °C untuk selanjutnya dilakukan visualisasi dengan SDS-PAGE 12% dan dilakukan proses purifikasi protein rekombinan yang dihasilkan.

3.4.3 Purifikasi protein matriks 1 (M1)

Proses purifikasi protein matriks 1 (M1) Virus Influeza A H1N1 dilakukan berdasarkan metode QIAexpressionist (2001: 82--83). Pelet sel yang dihasilkan dari proses ekspresi ditambahkan dengan 2--5 ml lisis *buffer* per gram berat basah pelet. Sel selanjutnya disonikasi selama 6 x 10 detik dengan interval selama 10 detik pada 200--300 Watt. Semua pengerjaan dilakukan di atas es. Sampel yang telah disonikasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada 4 °C selama 20--30 menit. Pelet yang dihasilkan dibuang dan supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru. Sebanyak 1 ml resin Ni-NTA ditambahkan dengan 4 ml lisat sel. Campuran selanjutnya diaduk dengan *shaker* selama 60--120 menit pada suhu 4 °C. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.

Supernatan disimpan pada suhu -20 °C untuk divisualisasi dengan SDS-PAGE. Sebanyak 4 ml *wash buffer* ditambahkan pada pelet sebagai tahapan pencucian dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Proses pencucian dilakukan sebanyak enam kali pengulangan. Supernatan yang terbentuk disebut dengan (W₁--W₆). Semua supernatan hasil pencucian (W₁--W₆) disimpan pada suhu -20 °C yang selanjutnya dapat digunakan untuk visualisasi SDS-PAGE. Protein rekombinan Matriks 1 (M1) yang telah terikat pada resin dielusi dengan 500 µl *elution buffer* (EB). Sampel yang telah dielusi diinkubasi 30--60 menit dengan *shaker* pada suhu 4 °C. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru. Proses elusi dilakukan sebanyak tiga kali. Supernatan yang merupakan hasil supernatan pertama, *washing* (W₁--W₆), dan elusi (E₁--E₃) selanjutnya divisualisasikan dengan SDS-PAGE 12%. Protein Matriks 1 (M1) yang telah dipurifikasi selanjutnya diukur konsentrasi protein matriks nya (M1). Pengujian pembentukan antibodi poliklonal dari protein tersebut dilakukan dengan cara menyuntikkan pada hewan kelinci dan sebagian dapat disimpan dalam *storage buffer* pada -20 °C.

3.4.4 Pengukuran konsentrasi protein matriks 1 (M1)

Konsentrasi protein M1 diukur dengan menggunakan Metode *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Sebanyak 20 mg BSA dilarutkan dengan 1 ml PBS 1x. Larutan tersebut kemudian diencerkan 1/10 untuk memperoleh BSA 2 mg/ml. Larutan BSA 20 mg/ml diambil sebanyak 750 μ l dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan 250 μ l PBS 1x, kemudian untuk memperoleh BSA 1,5 mg/ml, 666 μ l larutan BSA 2 mg/ml dipindahkan ke dalam tabung berikutnya dan dicampurkan dengan 334 μ l PBS 1x. Larutan BSA 1,5 mg/ml diambil 500 μ l lalu dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan 500 μ l PBS 1x, sehingga diperoleh BSA 1 mg/ml. Larutan BSA 1 mg/ml diambil sebanyak 500 μ l lalu dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan 500 μ l PBS 1x, sehingga didapatkan larutan BSA 0,5 mg/ml. Larutan *elution buffer* (EB) juga disiapkan sebagai blanko.

Larutan BSA dengan berbagai konsentrasi, larutan EB, dan protein hasil purifikasi yang akan diukur dimasukkan sebanyak 5 μ l ke dalam *plate 96 well*. Sebanyak 25 μ l Reagen A (*alkaline copper tartrate solution*) dan 200 μ l Reagen B (*dilute foline reagent*) diteteskan ke dalam masing-masing sumur. Sampel kemudian diinkubasi selama 30 detik dengan *shaker*. Sampel kemudian kembali diinkubasi selama kurang lebih 5 menit pada suhu ruang (25 °C). *Plate* kemudian dimasukkan ke dalam *ELISA Reader*. Nilai absorbansi dibaca menggunakan panjang gelombang 655 nm.

3.4.5 Analisis protein rekombinan matriks 1 (M1)

3.4.5.1 Analisis dan visualisasi protein rekombinan matriks (M1) dengan SDS-PAGE 12%

Analisis dan visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein matriks 1 (M1) dilakukan dengan SDS-PAGE berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 5.44--5.45). Cara kerja SDS-PAGE diawali dengan pembuatan gel (*separating gel* dan *stacking gel*). *Glass plate sandwich* (*short plate & spacer plate*) dicuci

terlebih dahulu menggunakan sabun dan dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dikeringkan. *Glass plate sandwich* digunakan untuk tempat cetakan dalam pembuatan gel. *Short plate* ditempatkan di depan kaca *spacer plate*. Kedua kaca kemudian dimasukkan ke dalam *casting frame* dengan posisi bagian bawah kedua kaca sama rata kemudian dikunci dengan menekan *cams*. *Glass plate sandwich* yang telah siap pada *casting frame* selanjutnya dipasang pada *casting stand*. Pembuatan *separating gel* dapat dilakukan sesuai keperluan (Lampiran 1). Larutan *separating gel* yang telah dibuat selanjutnya dimasukkan di antara celah kaca *short plate* dan *spacer plate* sampai dua pertiga bagian dengan menggunakan mikropipet. Penuangan larutan *separating gel* dilakukan tanpa adanya gelembung udara kemudian larutan akuades ditambahkan sampai batas atas kaca, larutan dibiarkan selama kurang lebih 20 menit hingga *separating gel* mengeras.

Selama menunggu gel mengeras (± 20 menit), dapat dilakukan pembuatan larutan *stacking gel* sesuai keperluan (Lampiran 1). Air yang terdapat pada bagian atas *separating gel* dibuang, kemudian dibersihkan dengan tisu agar air tersebut benar-benar telah hilang. Larutan *stacking gel* dituangkan sampai batas atas kaca *glass plate sandwich* kemudian *comb* dimasukkan. Gel dibiarkan mengeras selama kurang lebih 20 menit. *Gel-glass plate sandwich* tersebut selanjutnya dipindahkan dari *casting frame* dan dipasang pada *electrode assembly* dengan posisi *short plate* menghadap ke dalam, kemudian ditempatkan ke dalam *lower inner chamber* dan kedua *camp levers*nya ditutup. *Lower inner chamber* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam *tank* elektroforesis. *Tank buffer* 1x kemudian dimasukkan ke dalam *tank elektroforesis*.

Sampel hasil ekspresi dan purifikasi protein matriks 1 (M1) diambil sebanyak 16 μl lalu dicampur dengan 4 μl *sample buffer* 4x di dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit pada *heat block* lalu sentrifus campuran tersebut untuk menurunkan cairan yang menempel di dinding tabung. Semua sampel harus berada di dalam es. Tabung mikrosentrifus baru dan marker protein *PageRuler*TM disiapkan. Masing-masing sampel dan marker protein sebanyak 18 μl dimasukkan ke dalam sumur. Perangkat elektroforesis kemudian ditutup dan

dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 150 V selama 70 menit. Gel kemudian diangkat dari *glass plate sandwich* lalu direndam dalam larutan *Coomassie brilliant blue R-250 staining solution* selama 30 menit. Gel kemudian dibilas dengan larutan *destaining solution* selama satu malam. Gel dibilas kembali dengan larutan *destaining solution* selama \pm 30--60 menit jika latar dari gel masih belum jernih. Gel lalu direndam dalam akuades yang selanjutnya dapat disimpan dalam plastik mika sampai kering agar dapat didokumentasikan dengan *scanner*.

3.4.5.2 Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan M1 secara manual dari hasil elektroforesis SDS-PAGE

Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan M1 dapat dilakukan menggunakan persamaan garis linier yang dihasilkan dari kurva standar marka protein yang digunakan. Perhitungan berat molekul protein rekombinan M1 diawali dengan membandingkan nilai mobilitas relatif (R_f) dari sampel protein rekombinan M1 dengan nilai R_f marker protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Nilai R_f merupakan nilai yang diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi pita protein dari bagian atas gel dengan jarak migrasi larutan pada bagian bawah gel (*tracking gel*), sedangkan nilai logaritma berat molekul protein standar diperoleh dengan cara menghitung masing-masing nilai logaritma dari berat molekul protein *molecular weight marker* yang digunakan (*unstained protein ladder*) [Fermentas] (Lampiran 2).

Persamaan garis linier ditentukan dari kurva standar yang diperoleh dengan cara memasukkan nilai R_f (x) dan nilai logaritma berat molekul (y) marka protein standar. Nilai logaritma berat molekul sampel didapatkan dengan cara memasukkan nilai R_f protein rekombinan M1 ke dalam persamaan linier dari kurva standar yang telah diperoleh. Nilai logaritma sampel yang telah diperoleh kemudian dikonversi (dianti-log) untuk mendapatkan ukuran berat molekul protein rekombinan M1 yang sebenarnya dalam satuan kDa (Laemmli 1970 lihat Gallagher 1995: 10.1.30).

3.4.6 Imunisasi kelinci dan pengambilan darah (serum)

Kelinci yang digunakan dalam penelitian berumur 10 bulan. Penelitian menggunakan 1 ekor kelinci *New Zealand White* berjenis kelamin betina. Imunisasi diawali dengan pembuatan emulsi dari antigen yang akan disuntikkan. Pertama-tama protein rekombinan M1 yang telah dipurifikasi disiapkan. PBS 1x kemudian ditambahkan ke dalam protein tersebut sampai konsentrasi akhir protein 500 µg/ml. Protein tersebut kemudian dicampurkan dengan *Complete Freud's Adjuvant* dengan perbandingan protein dan adjuvant adalah 1:1. Protein dan adjuvant tersebut dimasukkan ke dalam syringe lalu keduanya dicampurkan dengan cara *up and down* secara bergantian sampai terbentuk emulsi dan siap untuk disuntikkan.

Kelinci yang belum diberi perlakuan diambil darah vena marginalisnya sebanyak 2 ml, darah tersebut digunakan sebagai kontrol negatif. Sebelum imunisasi dilakukan sedasi menggunakan campuran ketamine 80-120 mg/kg dan xylazine 5-10 mg/kg yang diberikan secara intramuskular. Imunisasi kemudian dilakukan pada otot paha secara intramuskular dengan volume 0,5 ml.

Empat minggu kemudian serum diambil untuk dianalisis dengan ELISA dan *Western blot*. Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah vena di telinga sebanyak 2 ml. Darah selanjutnya diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam kemudian disentrifus 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diambil merupakan serum dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml, lalu disimpan pada -20⁰ C untuk perlakuan lebih lanjut.

3.4.7 Uji serologis

3.4.7.1 ELISA

Cara kerja ELISA diawali dengan pengenceran berseri dari antigen M1 sebanyak 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, dan 12,5 µg/ml dalam *coating buffer*, kemudian masing-masing dimasukkan sebanyak 50 µl ke dalam sumur pelat ELISA. Pelapisan antigen dilakukan pada suhu 4 °C selama semalam. Pelat

yang telah diinkubasi selama semalam kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan 60 µl larutan pencuci untuk menghilangkan sisa antigen yang tidak menempel pada pelat. Setelah proses pelapisan pelat selesai, kemudian antigen diblok dengan menambahkan 60 µl *buffer blocking*, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Pelat selanjutnya dicuci sebanyak 3 kali dengan 70 µl larutan pencuci.

Sebanyak 50 µl serum kelinci yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam sumur ELISA. Optimasi konsentrasi serum dilakukan dengan pengenceran berseri 1/25, 1/50, 1/100, dan 1/200. Antibodi pertama diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Setelah satu jam kemudian pelat dicuci sebanyak 3 kali dengan 70 µl larutan pencuci. Selanjutnya ke dalam setiap sumur dimasukkan 50 µl larutan antibodi kedua berlabel biotin yang mengenali Immunoglobulin G kelinci dengan pengenceran 1/500. Reaksi dilakukan pada suhu 37 °C selama 1 jam. Baik antibodi pertama maupun antibodi kedua dilarutkan dalam larutan 0,1 % gelatin dalam PBS 1x untuk meningkatkan spesifisitas ikatan antigen-antibodi. Setelah dilakukan 3 kali pencucian, ke dalam setiap sumur dimasukkan 50 µl larutan streptavidin-HRP dengan pengenceran 1/1000 dalam PBS. Pelat ELISA diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Setelah dilakukan 3 kali pencucian, lalu 50 µl substrat OPD ditambahkan ke dalam pelat ELISA. Pelat didiamkan pada suhu ruang sampai terbentuk warna (5-15 menit), kemudian ditambahkan 25 µl 2,5 M H₂SO₄. Intensitas warna diukur dengan ELISA *reader* dan pembacaan *optical density* (OD) dilakukan pada panjang gelombang 450 nm.

3.4.7.2 *Western blot*

Uji *Western blot* diawali dengan pemisahan protein dari gel SDS-PAGE pada membran menggunakan *Trans Blot Semy Dry Electrophoresis Transfer Cell* [Bio-Rad] sesuai instruksi *Current protocols in molecular biology* tahun 1990. Gel, kertas transfer (*Extra thick Blot Paper* [Bio-Rad]) dan membran (Hybond-C extra [Bio-Rad]) direndam dalam *transfer buffer* selama 15-30 menit. Kertas filter tebal berukuran sama dengan gel diletakkan pada anoda platinum. Permukaan kertas filter diratakan dengan pipet serologi untuk mengeluarkan gelembung udara. Membran nitroselulosa diletakkan diatas kertas filter,

kemudian dibasahi dengan *transfer buffer* dan bila terdapat gelembung udara dilakukan pengeluaran gelembung udara dengan menggelindingkan pipet serologi pada permukaan membran nitroselulosa. Gel akrilamid diletakkan dan diratakan pada membran nitroselulosa dengan bantuan pipet serologi, sambil memastikan gelembung udara yang terjebak diantara membran nitroselulosa dan gel akrilamid telah dikeluarkan. Gel akrilamid diletakkan di bawah kertas filter dan gelembung udara dikeluarkan sebelum katoda ditutupkan di atas lapisan filter-membran nitroselulosa-gel-filter. Pemindahan atau transfer protein dilakukan selama 30 menit pada 20 V.

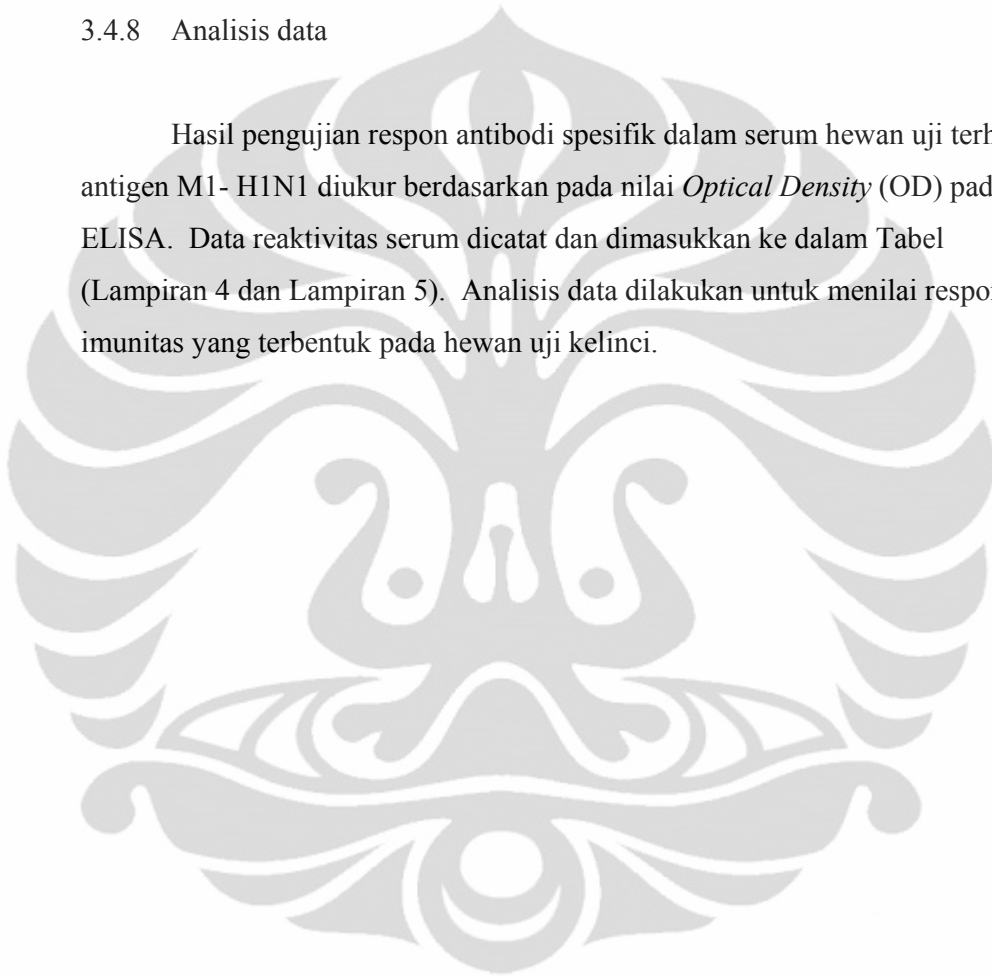
Setelah proses transfer selesai, dilakukan pewarnaan nitroselulosa menggunakan larutan *Ponceus* untuk melihat efisiensi pemindahan protein ke membran nitroselulosa. Bila hasil pewarnaan dengan larutan *Ponceus* memperlihatkan adanya pita protein berwarna merah pada membran dan tidak terdapat gangguan transfer oleh gelembung udara yang menyebabkan pita protein tidak terlihat atau terputus, maka membran yang mengandung protein hasil transfer dari gel dapat digunakan untuk analisis.

Setelah protein ditransfer dari gel ke membran “Hybond-C extra [Bio-Rad], kemudian membran diblok menggunakan *blocking buffer* (1% *skim milk* dalam PBS 1x) sambil digoyang dengan kecepatan 40 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Larutan *blocking buffer* dibuang lalu dicuci dengan larutan pencuci (PBS-Tween 0.05%) sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Membran kemudian direaksikan dengan antibodi primer (serum kelinci) dengan pengenceran 1/20 sambil digoyang dengan kecepatan 40 rpm pada 4° C selama ± 16 jam (*overnight*). Setelah semalaman, larutan serum kemudian dibuang dan membran dicuci 3 kali dengan larutan pencuci (PBS-Tween 0.05%) dengan interval waktu 5 menit. Membran direaksikan dengan antibodi sekunder yang berlabel biotin dengan konsentrasi akhir 1/500 sambil digoyang dengan kecepatan 40 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Larutan antibodi sekunder dibuang, kemudian membran dicuci kembali dengan *buffer* pencuci sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Membran selanjutnya direaksikan dengan streptavidine berlabel peroksidase dengan konsentrasi akhir 1/1000 sambil digoyang dengan kecepatan 40 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Larutan streptavidine dibuang,

kemudian membran dicuci kembali dengan larutan pencuci sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit, lalu terakhir diberikan larutan substrat *DAB solution* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit. Pita protein yang terbentuk kemudian didokumentasikan.

3.4.8 Analisis data

Hasil pengujian respon antibodi spesifik dalam serum hewan uji terhadap antigen M1- H1N1 diukur berdasarkan pada nilai *Optical Density* (OD) pada uji ELISA. Data reaktivitas serum dicatat dan dimasukkan ke dalam Tabel (Lampiran 4 dan Lampiran 5). Analisis data dilakukan untuk menilai respon imunitas yang terbentuk pada hewan uji kelinci.



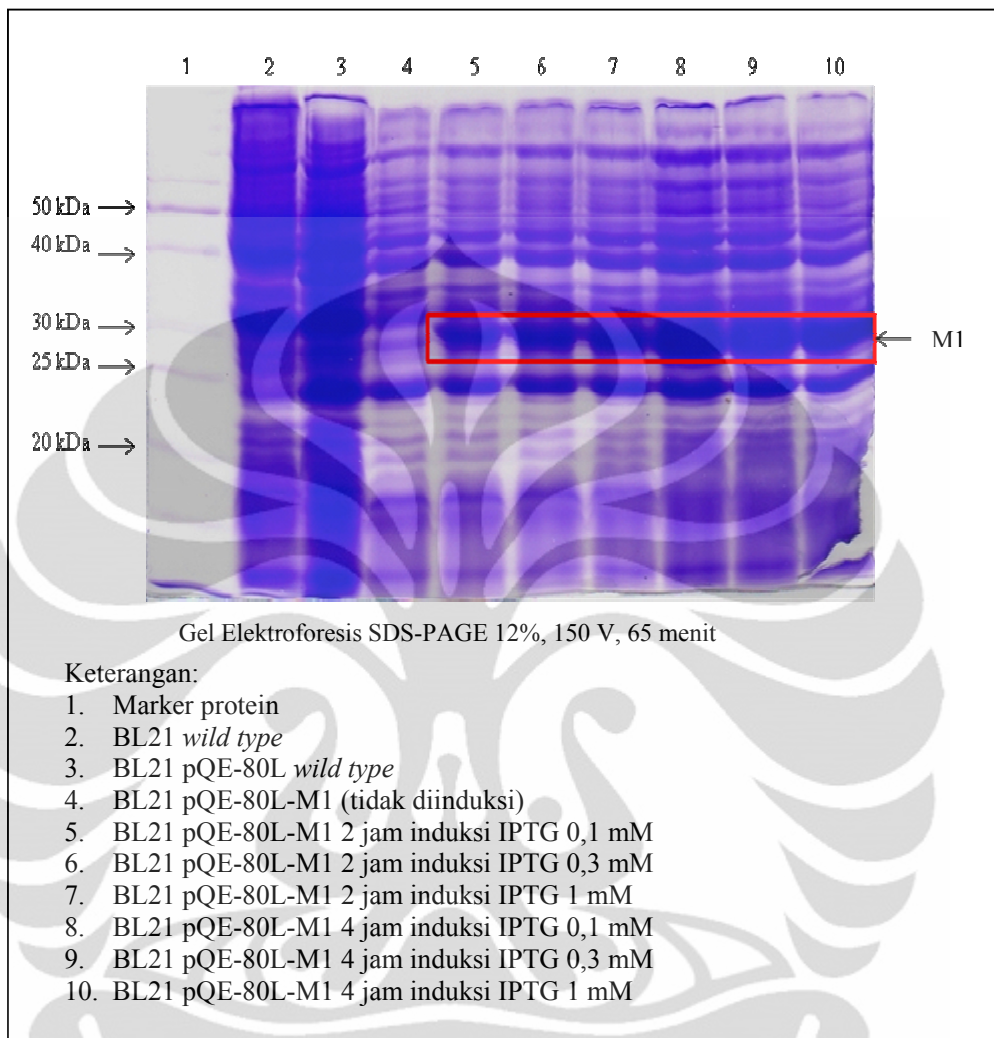
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 EKSPRESI GEN MATRIKS 1 VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009

Berdasarkan prapenelitian vektor rekombinan (pQE-80L+M1) telah berhasil diisolasi dan ditransformasi ke dalam sel *E. coli* BL21. Ekspresi gen M1 selanjutnya dilakukan dengan cara menumbuhkan sel *E. coli* BL21 pembawa DNA rekombinan M1 dalam medium LB cair dan menginduksi ekspresinya dengan IPTG.

Proses ekspresi gen M1 dilakukan menggunakan sel *E. coli* BL21 pembawa DNA rekombinan M1 dengan induksi IPTG dan pembanding (kontrol) berupa sel *E. coli* BL21 pembawa DNA rekombinan M1 tanpa diinduksi IPTG. Keberhasilan proses ekspresi gen M1 dengan induksi IPTG ditandai dengan terbentuknya pita protein rekombinan target pada posisi yang diinginkan (Gambar 4.1 lajur 5,6,7,8,9, dan 10), sedangkan lajur yang berisi pembanding (kontrol) tidak menunjukkan adanya pita protein rekombinan M1 (Gambar 4.1 lajur 4).

Berdasarkan hasil elektroforesis SDS-PAGE 12% setelah proses induksi dengan IPTG menunjukkan adanya pita protein rekombinan target pada setiap 2 jam induksi dari sampel *E. coli* BL21 yang mengandung gen M1 Virus Influenza A H1N1 2009. Oleh karena itu, ekspresi gen M1 Virus Influenza A H1N1 2009 dalam penelitian telah berhasil dilakukan. Pita protein rekombinan M1 yang terbentuk berukuran ~27 kDa dan intensitas produksi protein rekombinan M1 tertinggi dan paling tebal berada pada induksi jam ke-4 (Gambar 4.1 lajur 8).



Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Ekspresi Gen M1

Mekanisme ekspresi protein rekombinan M1 dengan induksi IPTG dimulai dengan terikatnya IPTG pada situs pengikatan induser yang terdapat pada protein represor. Adanya kompleks induser (IPTG)-represor menyebabkan terjadinya perubahan struktural pada situs pengikatan protein represor dengan situs pengikatan represor pada operator. Hal tersebut menyebabkan tidak adanya interaksi yang terjadi antara protein represor dan operator, sehingga memungkinkan RNA polimerase sel inang yang telah berikatan dengan promoter T5 dapat memulai transkripsi dan translasi gen M1 menjadi protein rekombinan M1 (Snustad & Simmons 2003: 578--579). Oleh karena itu, adanya IPTG akan

memengaruhi produksi protein rekombinan M1 pada sel inang, karena IPTG berfungsi sebagai induser dalam sintesis protein (Glick & Pasternak 2003: 122).

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari sampel tanpa induksi IPTG (kontrol negatif ekspresi) tidak menunjukkan adanya pita protein rekombinan M1 (Gambar 4.1 lajur 4). Hal tersebut memperlihatkan bahwa ekspresi dari gen M1 dihambat dengan adanya sekuen gen *lacI^q* dari vektor ekspresi pQE-80L. Sekuen gen *lacI^q* adalah gen *lacI* yang mengalami mutasi. Gen *lacI* merupakan gen pengkode protein represor yang akan menghambat transkripsi jika tidak terdapat induser seperti IPTG (Saluta & Bell 1998: 1). Selama tidak ada proses induksi, protein represor akan selalu menempel pada operator *lac*. Meskipun demikian RNA polimerase tetap dapat menempel pada promoter, tetapi tidak dapat melakukan proses transkripsi karena terhambat dengan adanya molekul protein represor yang berikatan pada daerah operator (Snustad & Simmons 2003: 578--579).

Akibat adanya gen *lacI^q* maka protein represor yang dihasilkan oleh gen *lacI* juga semakin banyak. Hal tersebut menyebabkan semakin banyak protein represor yang akan berikatan dengan operator *lac* sehingga akan mencegah RNA polimerase untuk melakukan transkripsi dan translasi gen M1 menjadi protein M1. Dengan demikian, adanya sekuen gen *lacI^q* dan dua sekuen operator *lac* dalam vektor ekspresi pQE-80L yang digunakan berperan dalam mengendalikan ekspresi gen ketika tidak ada induksi. Oleh karena itu, ketika tidak ada induksi IPTG maka tidak ada protein rekombinan M1 yang dihasilkan sehingga diperlukan induser IPTG untuk memaksimalkan ekspresi protein M1 pada vektor ekspresi pQE-80L dalam sel *E. coli* BL21 (QIAexpressionist 2001: 17).

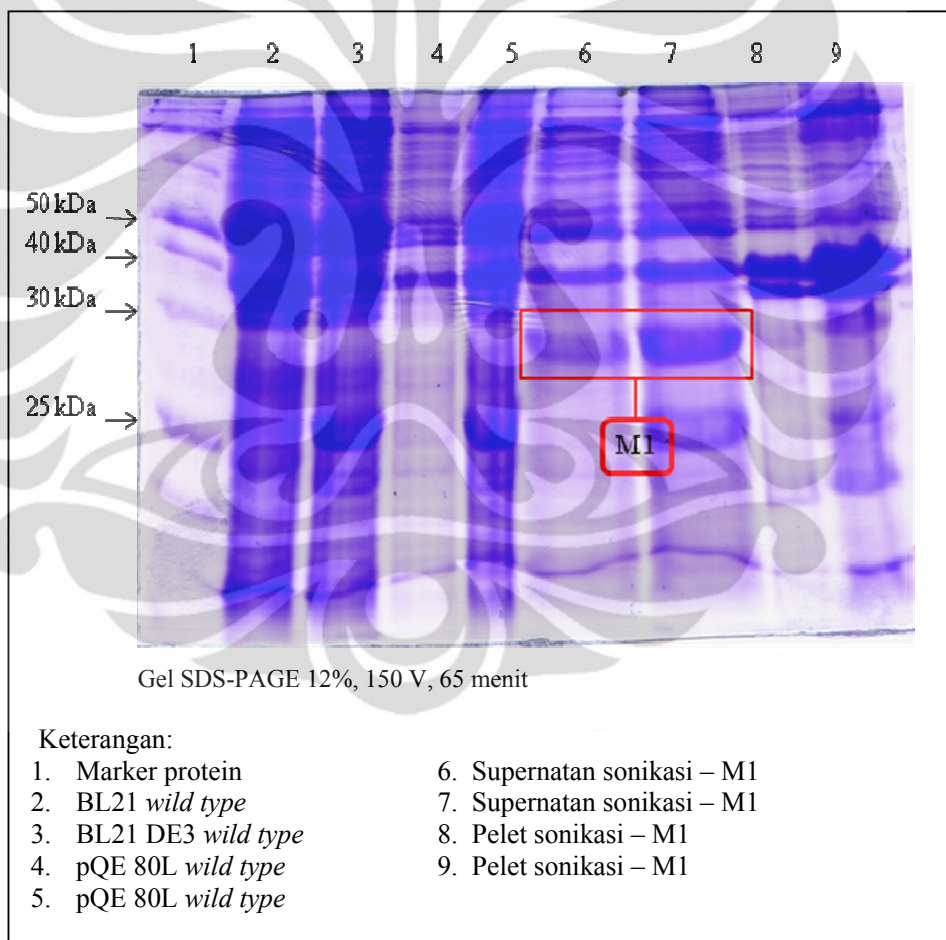
Kultur sel *E. coli* BL21 diinduksi dengan IPTG sampai konsentrasi akhir 0,1 mM, kemudian kultur sel diinkubasi kembali selama 4 jam hingga nilai OD₆₀₀ ± 1. Hal tersebut dilakukan agar sel *E. coli* mencapai fase stasioner karena pertumbuhan dan kematian sel pada fase stasioner sama, tetapi fungsi sel masih terus berlanjut seperti melakukan metabolisme sekunder dan proses biosintesis (Madigan *dkk.* 2009: 150). Nilai OD₆₀₀ ± 1 dicapai oleh kultur sel *E. coli* BL21 dalam waktu sekitar ± 4 jam. Oleh karena itu, dari hasil elektroforesis SDS-PAGE dapat dilihat bahwa intensitas ekspresi protein rekombinan M1 tertinggi ketika berada pada 4 jam induksi (Gambar 4.1 lajur 8).

Penelitian ini selain melakukan optimasi terhadap waktu induksi juga melakukan optimasi konsentrasi IPTG. Konsentrasi IPTG yang digunakan yaitu sebesar 0,1 mM, 0,3 mM, dan 1 mM. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa konsentrasi IPTG optimal untuk menginduksi ekspresi gen M1 Virus Influenza A H1N1 2009 adalah sebesar 0,1 mM. Hal tersebut disebabkan pada konsentrasi IPTG 0,1 mM produksi protein rekombinan M1 yang dihasilkan optimum (Gambar 4.1 lajur 8). Pita protein rekombinan M1 yang dihasilkan dengan penggunaan konsentrasi IPTG 0,3 mM dan 1 mM hampir sama dengan penggunaan IPTG 0,1 mM, namun lebih baik untuk menggunakan konsentrasi IPTG 0,1 mM karena produksi protein sudah cukup optimum sehingga penggunaan IPTG dapat lebih efisien. Kondisi optimal yang digunakan dalam penelitian untuk mengekspresikan protein rekombinan M1 Virus Influenza A H1N1 2009, yaitu dengan menggunakan induksi IPTG 0,1 mM selama 4 jam pada suhu 37 °C.

Pengkulturan sel *E. coli* BL21 dilakukan pada suhu 37 °C karena pada suhu tersebut merupakan suhu optimal bagi *E. coli* untuk tumbuh dan melakukan aktivitas metabolismenya (Holt *dkk.* 1994: 179). Penginkubasian dalam *shaker incubator* bertujuan untuk memperbesar kontak yang terjadi antara medium dan *E. coli* sehingga nutrisi yang didapatkan merata dan *E. coli* dapat tumbuh secara optimal (Cappucino & Sherman 2002: 6). Sel prokariot bakteri *E. coli* strain BL21 merupakan sel bakteri yang memiliki mutasi pada gen *ompT* dan *lon* sehingga menyebabkan defisiensi terhadap enzim protease (Sorensen & Mortensen 2004: 117). Penelitian terdahulu, seperti Baudin *dkk.* (1997: 1593), telah berhasil mengekspresikan gen M1 dalam vektor ekspresi pET pada *E. coli* BL21. Oleh karena itu, penggunaan sel *E. coli* BL21 dalam proses ekspresi gen target dapat menghasilkan protein rekombinan yang tinggi dengan cara mengurangi terjadinya degradasi protein rekombinan oleh protease dalam sel inang (Invitrogen 2002: v). Pengkulturan sel *E. coli* juga cukup mudah dilakukan dalam media minimal, serta dapat memperbanyak diri dalam waktu singkat sehingga dapat menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah yang banyak (LaVallie 1995: 5.1.1).

Kultur sel hasil induksi selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan medium dengan sel bakteri. Tahapan sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (4 °C) untuk mencegah terjadinya denaturasi dan degradasi protein rekombinan yang berhasil diekspresikan (QIAexpressionist 2001: 69). Pelet sel tersebut diduga membawa protein rekombinan M1 dan selanjutnya dapat digunakan dalam tahap purifikasi.

4.2 ISOLASI PROTEIN REKOMBINAN Matriks 1 VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009 DENGAN SONIKASI



Gambar 4.2. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Protein M1 yang telah disonikasi. Hasil visualisasi dengan SDS-PAGE 12% memperlihatkan bahwa protein rekombinan M1 dapat ditemukan pada bagian supernatan (*soluble*) (Gambar 4.2 lajur 6 dan 7). Protein rekombinan tersebut dihasilkan oleh bagian periplasmik.

Universitas Indonesia

Hal tersebut dikarenakan protein rekombinan yang dihasilkan pada bagian periplasmik dapat larut dan berada dalam bentuk aktif sehingga protein rekombinan dari supernatan dapat langsung digunakan untuk tahapan purifikasi selanjutnya (Wingfield 20002: 6.1.10).

Pengisolasian protein rekombinan M1 diawali dengan melisiskan membran dan dinding sel *E. coli* BL21 menggunakan metode sonikasi. Tahapan pelisisan dinding sel dan membran sel *E. coli* BL21 merupakan tahap penting untuk mengisolasi protein rekombinan M1 karena protein tersebut merupakan produk intraselular (Scope & Smith 1998: 10.0.7--10.0.8). Pelet sel yang telah diresuspensi dengan lisis *buffer* kemudian disonikasi dengan menggunakan gelombang suara berfrekuensi tinggi untuk melisiskan sel. Gelombang suara tersebut berasal dari *vibrating probe* pada sonikator yang akan menginisiasi terbentuknya gelembung uap air mikroskopik sementara dan kemudian pecah. Hal tersebut menyebabkan terjadinya kejutan gelombang (*waves shock*) yang memancar melewati sel pada seluruh sampel sehingga menyebabkan sel lisis. Metode sonikasi digunakan karena lebih efisien dan proses pengerjaannya dilakukan dalam waktu singkat. Pengerjaan sonikasi dilakukan hanya dalam beberapa detik dan harus dilakukan pada suhu dingin (-4 °C). Hal tersebut dilakukan untuk mencegah dihasilkannya panas yang berlebihan sehingga dapat mendenaturasi dan mendegradasi protein (Pierce Biotechnology 2009: 4).

Larutan lisis *buffer* digunakan untuk meresuspensi pelet sebelum dilakukan proses sonikasi. Larutan tersebut mengandung Tris-Cl yang berfungsi sebagai larutan penyangga (*buffer*), NaCl berfungsi untuk mencegah terjadinya denaturasi enzim dengan cara menarik muatan negatif dari ion-ion yang dapat mendenaturasi enzim, serta sodium *lauryl* yang berfungsi untuk melarutkan protein rekombinan. Selain itu, lisis *buffer* juga mengandung Triton X-100 yang berfungsi mengurangi ikatan nonspesifik pada matriks Ni-NTA karena adanya interaksi hidrofobik nonspesifik atau interaksi ionik. Triton X-100 pada lisis *buffer* juga berfungsi untuk menghilangkan protein yang mungkin berasosiasi dengan asam nukleat sehingga dapat mengurangi adanya kontaminan protein lainnya (Kneusel *dkk.* 2000: 931; Seidman & Moore 2000: 492 & 496). Adanya detergen nonionik (Triton x-100, Tween, NP-40) dan kadar garam tinggi dalam

lisis *buffer* dibutuhkan untuk melarutkan protein sehingga dapat mencegah terjadinya agregasi protein pada proses purifikasi (Roth *dkk.* 1985: 9328).

Sel yang telah dilisis dengan sonikator kemudian disentrifugasi untuk memisahkan supernatan dan pelet, selanjutnya divisualisasi dengan SDS-PAGE 12%. Pelisisan sel *E. coli* setelah proses sentrifugasi akan menghasilkan bagian supernatan yang mengandung protein terlarut (*soluble*) dan pelet mengandung *inclusion bodies*, komponen membran luar dan peptidoglikan, serta sel-sel *E. coli* yang tidak mengalami lisis (Wingfield 2002: 6.1.10 & 6.1.14). Supernatan atau lisat sel hasil sonikasi diduga berisi protein rekombinan target dan protein lainnya yang juga dihasilkan oleh sel *E. coli* (Saluta & Bell 1998: 2). Protein target yang berada dalam supernatan bersifat dapat larut (*soluble*), sedangkan protein yang terdapat pada bagian pelet merupakan protein yang tidak dapat larut (*insoluble*).

Eksresi protein rekombinan dalam sel inang seperti *Escherichia coli* biasanya dapat ditemukan pada bagian sitoplasma, periplasmik, serta medium kultur (Sorenson & Mortensen 2004: 123). Protein rekombinan yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* sering kali juga terdapat dalam bentuk *inclusion bodies*, yaitu kumpulan protein target yang terakumulasi di dalam sel (sitoplasma), bersifat tidak dapat larut (*insoluble*), dan tidak aktif (Scope & Smith 1998: 10.0.8). *Inclusion bodies* yang terbentuk dapat disebabkan oleh beberapa hal meliputi ekspresi protein rekombinan yang berlebihan, tidak terjadinya pelipatan protein (*misfolding protein*) yang sesuai menjadi protein aktif dan matang dalam lingkungan sel *E. coli*, serta ada kemungkinan terjadinya pengurangan ikatan disulfida dalam lingkungan intraselular sel *E. coli* (Glick & Pasternak 2003: 142).

Adanya proses ekspresi yang berlebihan dapat membebani dan menghambat sekresi protein rekombinan oleh sel. Hal tersebut menyebabkan banyak protein tidak dapat disekresikan ke bagian periplasmik sehingga akan membentuk kumpulan atau agregat dari protein yang tidak dapat larut (*inclusion bodies*). Bagian periplasmik pada *E. coli* merupakan tempat terjadinya pembentukan ikatan disulfida dan pelipatan protein menjadi protein aktif dan matang (Sorenson & Mortensen 2004: 118 & 123).

Protein rekombinan aktif sebenarnya dapat dihasilkan dari *inclusion bodies* secara *in vitro*, tetapi membutuhkan waktu untuk dapat melarutkan protein

dan melakukan pelipatan protein kembali (*refolding protein*), sehingga akan dihasilkan protein rekombinan aktif yang dapat larut (Glick & Pasternak 2003: 142). Protein rekombinan dari *inclusion bodies* (pelet) dapat diekstraksi dan dilarutkan menggunakan agen pendenaturasi seperti 6--8 M guanidin-HCl atau 8 M urea. Protein rekombinan pada *inclusion bodies* selanjutnya dapat langsung dipurifikasi atau dilakukan pelipatan protein terlebih dahulu sebelum dilakukan proses purifikasi (Wingfield 2002: 6.1.17).

Proses pelipatan protein (*refolding*) dari *inclusion bodies* dilakukan dengan menghilangkan agen pendenaturasi melalui proses dilusi atau dialisis (Sorensen & Mortensen 2004: 119). Penggunaan *buffer cosolvent* yang mengandung detergen nonionic, lipid, detergen kationik, dan *polyethylene glycol* dapat berperan dalam menjaga kelarutan protein selama proses pelipatan kembali (*refolding*). Penggunaan ammonium sulfat, gliserol (5--20%), sukrosa (10%) diketahui juga dapat meningkatkan proses pelipatan protein (Wingfield 2002: 6.1.19 ; QIAexpressionist 2001: 106). Oleh karena itu, purifikasi protein rekombinan dari *inclusion bodies* juga dapat dilakukan, tetapi membutuhkan prosedur dan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan purifikasi protein rekombinan dari bagian supernatan (*soluble*) (Glick & Pasternak 2003: 142).

Purifikasi protein dari bagian supernatan (*soluble*) dapat dilakukan dengan cara yang lebih mudah dan dengan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan purifikasi protein rekombinan yang berasal dari *inclusion bodies* (Glick & Pasternak 2003: 151). Protein rekombinan yang dihasilkan dalam bentuk *soluble* namun sangat rentan terhadap degradasi oleh protein sel inang. Pendegradasian tersebut bisa terjadi sebelum atau sesudah ekstraksi protein rekombinan dari sel inang. Oleh karena itu, pemilihan sel inang seperti *E. coli* BL21 yang memiliki mutasi pada gen *ompT* dan *lon* dalam penelitian digunakan untuk mengurangi adanya protease sehingga dapat meminimalkan terjadinya degradasi protein rekombinan dalam sel inang oleh protease (Wingfield 2002: 6.1.3; Sorenson & Mortensen 2004 2004: 117).

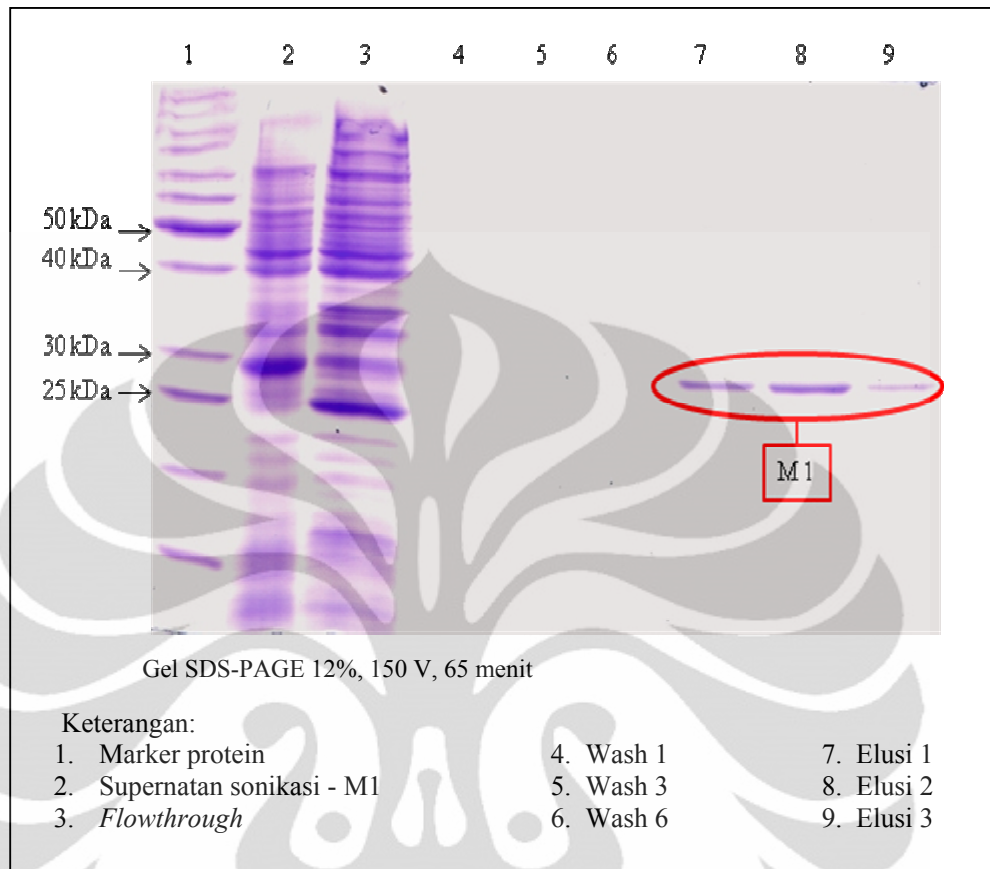
Protein dalam supernatan hasil sonikasi tidak hanya mengandung protein rekombinan target tetapi juga berisi protein lain yang dihasilkan oleh sel *E. coli* BL21. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil elektroforesis SDS-PAGE yang

menunjukkan pada supernatan hasil sonikasi masih terdapat pita-pita protein lain selain pita protein target (*multiband*) (Gambar 4.2 lajur 6 dan 7). Oleh karena itu, supernatan hasil sonikasi perlu dilakukan proses pemurnian atau purifikasi untuk menghilangkan protein lain atau kontaminan, sehingga akan didapatkan protein rekombinan target yang lebih murni (Scope & Smith 1998: 10.0.7--10.0.10).

4.3 PURIFIKASI PROTEIN REKOMBINAN MATRIKS 1 VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009 DENGAN RESIN Ni-NTA

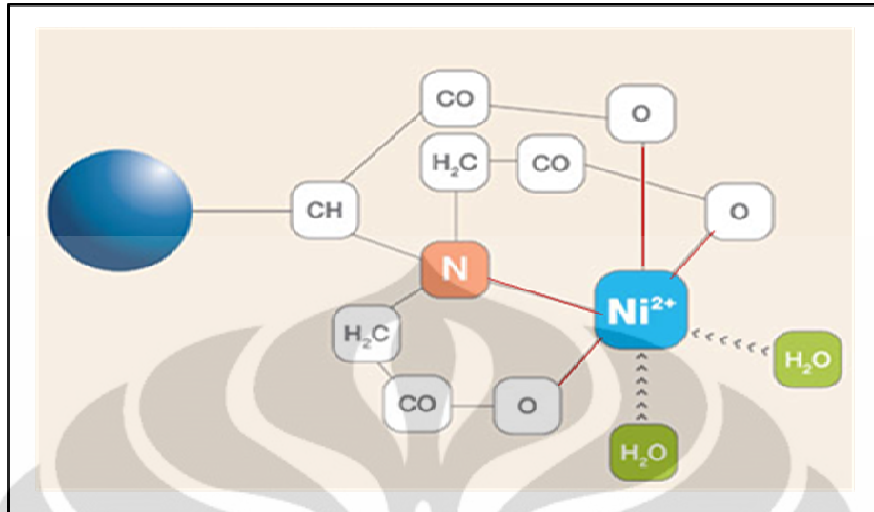
Protein rekombinan M1 yang telah diisolasi selanjutnya dipurifikasi menggunakan metode *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC). Metode IMAC dilakukan berdasarkan adanya asam amino tertentu yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan ion logam. Asam amino histidin (*6xHis-tag*) diketahui dapat memediasi pengikatan protein rekombinan terhadap ion logam secara selektif (Carlton & Zachariou 2008: 26 & 138). Gen M1 yang digunakan dalam penelitian telah dilabel dengan *6xHis-tag* (*tag* protein dengan 6 residu histidin) pada N-terminus dari vektor ekspresi pQE-80L sehingga proses purifikasi dapat dilakukan menggunakan resin Ni-NTA (QIAexpressionist 2001: 18).

Keuntungan penggunaan *6xHis-tag* pada proses purifikasi protein rekombinan antara lain, yaitu *6xHis-tag* berukuran lebih kecil dibandingkan dengan *tag* lainnya (*tag* glutathionine S-transferase/GST), tidak memengaruhi struktur dan fungsi protein rekombinan yang dihasilkan, serta tidak memiliki sifat *immunogenic* khusus sehingga protein rekombinan yang dihasilkan dapat langsung digunakan tanpa harus dilakukan proses penghilangan *tag* (LaVallie 1995: 5.1.4--5.1.5; Kneusel *dkk.* 2000: 921). Sekuen *6xHis-tag* tersebut tidak dapat membantu meningkatkan tingkat ekspresi atau kelarutan dari protein rekombinan yang dihasilkan. Sekuen *6xHis-tag* tersebut dapat digunakan untuk deteksi dan purifikasi protein rekombinan dengan spesifik dan cepat karena *tag* tersebut dapat menyediakan pengikatan spesifik dengan ion-logam pada resin Ni-NTA yang digunakan (LaVallie 1995: 5.1.5).



Gambar 4.3.1 Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Protein M1 yang dipurifikasi

Protein M1 yang telah dipurifikasi menggunakan resin Ni-NTA dan telah dianalisis dengan SDS-PAGE 12% menunjukkan adanya pita protein tunggal pada elusi 1,2, dan 3 (Gambar 4.3.1 lajur 7, 8, dan 9) dengan berat molekul ~27 kDa. Hal tersebut menunjukkan bahwa protein rekombinan M1 dalam penelitian telah berhasil dipurifikasi menggunakan resin Ni-NTA. Resin Ni-NTA lebih sering digunakan dalam purifikasi protein karena resin Ni-NTA lebih stabil dibandingkan resin lainnya. Hal tersebut disebabkan karena resin Ni-NTA memiliki empat situs pengikatan dengan ion logam Ni^{2+} (Gambar 4.3.2). Oleh karena itu, resin Ni-NTA akan berikatan lebih kuat dan stabil dengan ion logam sehingga pengikatan terhadap protein 6xHis-tag pun juga akan lebih kuat (Petty 1996: 9.4.13; Kneusel *dkk.* 2000: 924).



Gambar 4.3.2. Struktur kimia resin Ni-NTA
[Sumber: QIAexpressionist 2001: 17.]

Pengoptimalan pengikatan resin Ni-NTA terhadap protein 6xHis-tag yang terdapat pada protein rekombinan M1 dilakukan dengan mengaduk campuran resin Ni-NTA dan protein 6xHis-tag menggunakan *shaker* pada suhu 4 °C selama 60--120 menit. Protein lain yang tidak berikatan dengan resin Ni-NTA dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Hasil dari SDS-PAGE menunjukkan masih terdapat pita-pita protein (*multiband*) pada pemisahan protein 6xHis-tag dan protein yang tidak berikatan dengan resin (*Flowthrough*) (Gambar 4.3.1 lajur 3).

Protein yang tidak berikatan dengan resin disebabkan protein tersebut tidak membawa sekuen 6xHis-tag sehingga tidak dapat dikenali dan berikatan dengan resin. Hal tersebut kemungkinan disebabkan *overload*-nya protein target yang melebihi jumlah resin yang digunakan sehingga tidak semua protein target dapat diikat oleh resin (Gambar 4.3.1 lajur 2).

Protein M1 yang telah berikatan dengan resin perlu dilakukan proses pencucian (*washing*) untuk mendapatkan protein M1 yang lebih murni. Penelitian ini melakukan optimasi terhadap banyaknya pengulangan pada proses *washing*. Tahapan pencucian berfungsi untuk menghilangkan protein lain yang juga memiliki residu histidin serta kontaminan lain yang juga berikatan dengan resin Ni-NTA. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa proses *washing* yang optimal untuk memurnikan protein M1 Virus Influenza A H1N1 2009 adalah sebanyak enam kali. Hal tersebut disebabkan pada pencucian keenam sudah tidak

terdapat protein lain lagi (Gambar 4.1 lajur 6). Proses pencucian tersebut dilakukan dengan menambahkan sedikit konsentrasi imidazol, yaitu sebesar 20 mM. Proses elusi dalam penelitian dilakukan dengan menambahkan imidazol dengan konsentrasi tinggi (250 mM) pada *elution buffer* (EB). Penggunaan imidazol pada proses elusi disebabkan karena strukturnya mirip dengan residu histidin, sehingga penggunaan imidazol dengan konsentrasi tinggi (lebih dari 200 mM) dapat menyebabkan protein rekombinan 6xHis-tag terdisosiasi karena tidak mampu lagi berkompetisi dengan imidazol untuk berikatan pada situs pengikatan resin (Petty 1996: 9.4.13).

Penggunaan imidazol dalam tahap elusi protein memiliki keunggulan, yaitu dapat digunakan pada kondisi asli (*native condition*) maupun kondisi terdenaturasi (*denaturing condition*). Penggunaan imidazol juga tidak akan merusak protein target akibat adanya penurunan pH maupun keberadaan ion logam (ion nikel/ Ni^{2+} atau ion kobalt/ Co^{2+}) yang terlepas dari resin ketika protein dipurifikasi pada kondisi asli (*native condition*) (Kneusel *dkk.* 2000: 931--932).

Protein rekombinan M1 yang telah dipurifikasi dapat langsung digunakan sebagai antigen dalam imunisasi kelinci. Hal tersebut dilakukan untuk membentuk antibodi poliklonal M1 virus influenza A H1N1 2009. Protein rekombinan M1 juga dapat disimpan dalam *storage buffer* pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam jangka waktu yang cukup lama (6 bulan) (Gerard & D'Alessio 1993: 75).

4.4 VISUALISASI DAN ANALISIS BERAT MOLEKUL PROTEIN MATRIKS 1 VIRUS INFLUENZA A H1N1 2009

4.4.1 Visualisasi Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 dengan Elektroforesis Gel SDS-PAGE

Visualisasi protein rekombinan M1 dilakukan menggunakan SDS-PAGE (Sodium dodesil sulfat-poliakrilamid gel elektroforesis). Gel poliakrilamid baik digunakan untuk memisahkan oligonukleotida dan protein karena mempunyai ukuran pori-pori gel yang lebih kecil jika dibandingkan dengan gel agarosa (Gallagher 1995: 10.1.1). Visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein rekombinan M1 dilakukan dengan SDS-PAGE sistem *discontinuous* yang

menggunakan larutan *separating gel* 12% pH 8,8 dan larutan *stacking gel* 4% pH 6,8. Semakin kecil ukuran pori-pori gel akrilamid maka konsentrasi akrilamid yang digunakan harus ditingkatkan (Gallagher 1995: 10.1.1; Dellis 2009: 14). Larutan gel yang digunakan umumnya mengandung Tris-HCl, akrilamid, amonium persulfat, TEMED, dan H₂O, serta ditambahkan dengan SDS 10% (Gallagher 1995: 10.1.12; Coligan *dkk.* 2003: 10.1.13--10.1.16).

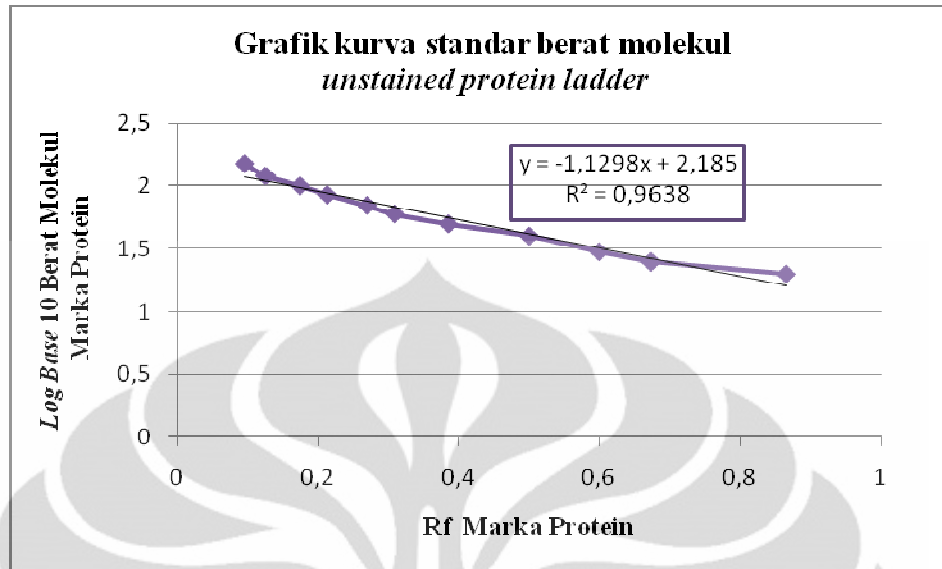
Komponen yang terdapat pada larutan gel mempunyai beberapa fungsi antara lain, yaitu Tris-HCl berfungsi sebagai larutan penyangga atau *buffer*, amonium persulfat berfungsi dalam menginisiasi terjadinya polimerisasi dari monomer akrilamid menjadi poliakrilamid, TEMED berfungsi untuk mengkatalis radikal bebas yang dihasilkan oleh APS, sedangkan H₂O berfungsi sebagai pelarut (Gallagher 1995: 10.1.29). Sodium dodesil sulfat merupakan sejenis deterjen yang dapat melarutkan molekul hidrofobik, yang berfungsi mendenaturasi struktur protein sekunder, tertier, dan kuartener menjadi bentuk yang lebih sederhana lagi (struktur primer). Hal tersebut dilakukan dengan cara merusak ikatan hidrogen yang terdapat pada molekul protein dan memberikan muatan negatif pada protein yang telah terdenaturasi. Hal tersebut mengakibatkan protein yang telah bermuatan negatif akan bermigrasi ke kutub positif jika dialiri arus listrik (Caprette 2005: 1).

Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE selanjutnya diwarnai dengan larutan *Coomassie Brilliant Blue Staining R-250*. Pewarnaan tersebut memberikan warna biru pada seluruh gel. *Coomassie blue staining* yang bermuatan negatif akan berikatan dengan protein yang bermuatan positif melalui interaksi elektrostatis. Gel yang telah diwarnai dengan *Coomassie blue staining* selanjutnya direndam dalam larutan *destaining solution* yang mengandung asam asetat, metanol, dan akuades (Lampiran 1). Perendaman dalam larutan *destaining solution* tersebut berfungsi untuk menghilangkan warna biru yang terdapat pada latar belakang gel, namun tetap memertahankan warna biru pada pita-pita protein karena adanya ikatan yang lebih kuat. Gel selanjutnya dapat dikeringkan dalam plastik mika atau didokumentasikan menggunakan *scanner* (Echan & Speicher 2002: 10.5.3--10.5.5).

4.4.2 Analisis perhitungan berat molekul Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 secara manual dari hasil elektroforesis SDS-PAGE

Analisis perhitungan berat molekul Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 dapat dilakukan menggunakan persamaan garis linier yang dihasilkan dari kurva standar marka protein yang digunakan. Perhitungan berat molekul protein M1 diawali dengan membandingkan nilai mobilitas relatif (Rf) dari sampel protein M1 dengan nilai Rf marka protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Nilai Rf merupakan nilai yang diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi pita protein dari bagian atas gel dengan jarak migrasi larutan pada bagian bawah gel (*tracking gel*), sedangkan nilai logaritma berat molekul protein standar diperoleh dengan cara menghitung masing-masing nilai logaritma dari berat molekul protein standar yang digunakan (*unstained protein ladder*) (Lampiran 2).

Persamaan garis linier ditentukan dari kurva standar yang diperoleh dengan cara memasukkan nilai Rf (x) dan nilai logaritma berat molekul (y) marka protein standar. Nilai logaritma berat molekul sampel didapatkan dengan cara memasukkan nilai Rf protein M1 ke dalam persamaan linier dari kurva standar yang telah diperoleh (Gambar 4.4.2). Nilai logaritma sampel yang telah diperoleh kemudian dikonversi (*danti-log*) untuk mendapatkan ukuran berat molekul protein yang sebenarnya dalam satuan kDa. Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan bahwa berat molekul protein M1 adalah sebesar ~27 kDa (Lampiran 2) (Laemmli 1970 *lihat* Gallagher 1995: 10.1.30). Hal tersebut sesuai dengan Zhirnov *dkk.* (2003), yang mengemukakan bahwa protein M1 berukuran sekitar 27 kDa.



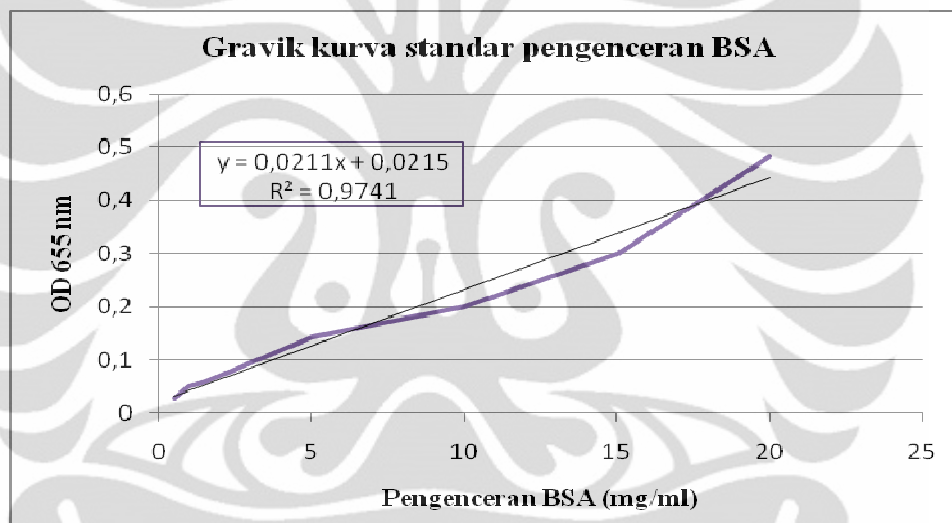
Gambar 4.4.2. Kurva standar berat molekul marka protein (*Unstained Protein Ladder*)

4.5 PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN HASIL PURIFIKASI

Penentuan konsentrasi protein hasil purifikasi dilakukan dengan menggunakan Metode *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Konsentrasi protein ditentukan berdasarkan kurva standar BSA. Pemilihan standar protein merupakan penentu keberhasilan analisis kuantitatif. Bovine Serum Albumin (BSA) adalah protein yang umum digunakan sebagai standard dalam penetapan kadar protein. BSA banyak dipilih karena tingkat kemurniannya yang tinggi dan harganya relatif murah (Pierce Biotechnology 2009: 1).

Penentuan konsentrasi protein diawali dengan membuat pengenceran BSA konsentrasi 20 mg/ml, 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml dan 0,5 mg/ml. Pengenceran BSA dilakukan dalam PBS 1X. Metode *DC Protein Assay* menggunakan 2 jenis reagen yaitu, Reagen A (*alkaline copper tartrate solution*) dan Reagen B (*dilute foline reagent*) (Pierce Biotechnology 2009: 1). Protein rekombinan M1, standar BSA, dan blanko berupa larutan *elution buffer* yang telah direaksikan dengan Reagen A dan Reagen B kemudian dimasukkan ke dalam *ELISA reader* dan diukur dengan panjang gelombang 655 nm. Nilai *optical density* (OD) dari standar BSA yang dihasilkan kemudian

dikurangi dengan nilai OD dari *elution buffer*. Hal tersebut dilakukan untuk menormalisasi standar yang digunakan agar sebanding dengan pelarut sampel yang akan diukur. Persamaan garis linier didapatkan dengan cara memasukkan nilai pengenceran BSA (x) dan nilai OD BSA yang telah dikurangi dengan nilai OD *elution buffer* (y). Nilai konsentrasi protein rekombinan M1 didapatkan dengan cara memasukkan nilai OD sampel ke dalam persamaan linier dari kurva standar yang telah diperoleh (Gambar 4.5) (Pierce Biotechnology 2009: 1--6). Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan bahwa konsentrasi protein rekombinan M1 adalah sebesar 4,218 mg/ml (Lampiran 3).



Gambar 4.5. Kurva standar BSA yang digunakan dalam penentuan konsentrasi antigen M1.

4.6 IMUNISASI HEWAN UJI DAN PENGAMBILAN SAMPEL DARAH

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah 1 ekor kelinci *Oryctolagus cuniculus* betina strain *New Zealand White*. Kelinci yang digunakan dalam penelitian berumur 8 bulan. Kesejahteraan hewan uji diperhatikan selama pemeliharaan. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Untuk menunjang kesehatan hewan uji ditambahkan multivitamin pada minuman. Tempat minum, kandang dan alas kandang juga dibersihkan serta diganti secara teratur 1 kali setiap 3 hari (2--3 kali seminggu). Suhu udara dan kelembapan

diatur dengan menyalakan penyejuk ruangan selama 24 jam. Kipas pengatur aliran udara (*Exhaust Fan*) juga dipasang untuk menjamin adanya pertukaran udara dari dalam kandang dan kamar hewan dengan udara di luar kamar hewan.

Protein rekombinan M1 yang disuntikkan pada hewan uji sebesar 500 µg/ml. Penentuan dosis 500 µg/ml didasarkan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan di lab IHVCB-UI. Dosis tersebut sudah dioptimasi terlebih dahulu dan terbukti tidak menyebabkan kematian pada hewan. Protein tersebut dibuat emulsi dengan 1 ml *Freund's complete adjuvant*. Emulsi tersebut disuntikkan pada otot paha secara intramuskular dengan volume 0,5 ml. Penggunaan *Freund's complete adjuvant* bertujuan untuk meningkatkan respon imun tubuh inang agar antibodi yang terbentuk cukup banyak. Adjuvan berfungsi sebagai pembawa antigen menuju lokasi sistem imun dan melepaskannya sedikit demi sedikit, sehingga masa pembentukan antibodi berlangsung lebih lama (Baratawidjaja 2006: 432).

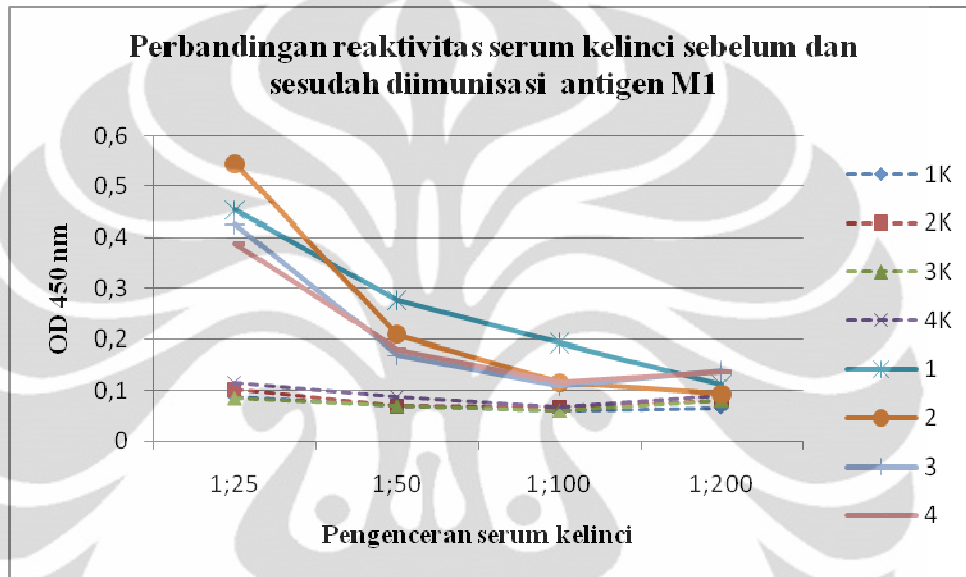
Sedasi menggunakan campuran ketamine 80-120 mg/kg dan xylazine 5-10 mg/kg yang diberikan secara intramuskular dilakukan untuk menghasilkan sedikit depresi pada tingkat kesadaran, sehingga menimbulkan rasa mengantuk dan menghilangkan kecemasan saat akan dilakukan penyuntikan (Ausubel *dkk.* 1990: 11.12.1). Empat minggu kemudian darah kelinci diambil untuk dianalisis antibodinya. Pengambilan darah kelinci dilakukan pada pembuluh darah vena di telinga sebanyak 3 ml. Pemisahan serum dari sel darah merah dilakukan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Serum selanjutnya diambil dan disimpan pada -20 °C untuk perlakuan lebih lanjut.

4.7 UJI SEROLOGIS

4.7.1 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

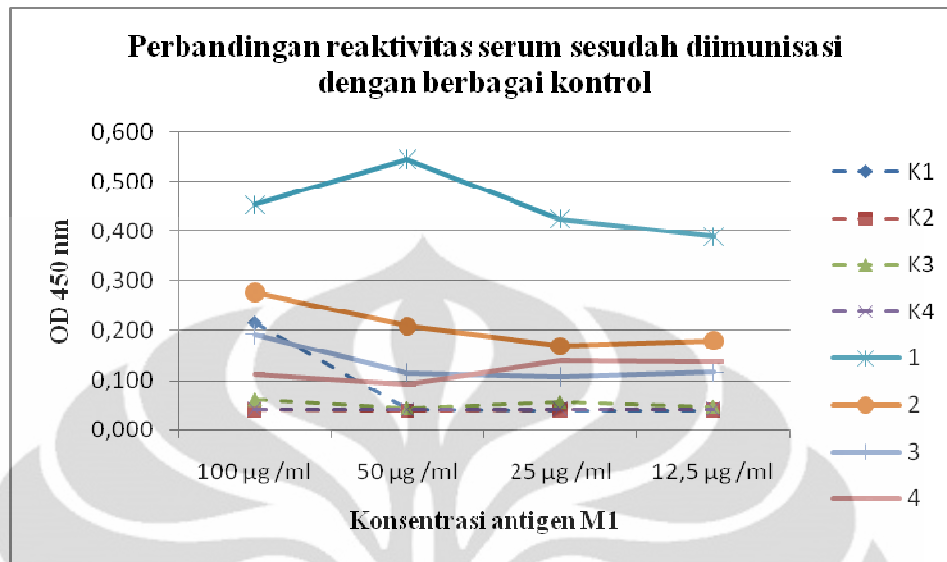
ELISA digunakan untuk menganalisis adanya interaksi antara antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pendeteksi (*reporter label*) (Baratawidjaja 2006: 492--493). ELISA dapat mendeteksi antibodi dengan spesifik dan dalam jumlah sampel yang banyak

(Murphy *dkk.*1983: 285). Murphy *dkk.* (1983: 284) sebelumnya juga telah berhasil menggunakan uji ELISA untuk mendeteksi dan menghitung titer antibodi monoklonal matriks virus influenza. Hasil analisis optimasi konsentrasi antigen dan serum untuk penilaian reaktivitas serum kelinci terhadap antigen M1 dapat dilihat pada Gambar 4.7.1.1 dan Gambar 4.7.1.2



Gambar 4.7.1.1 Kurva hasil ELISA serum kelinci sebelum diimunisasi dengan serum kelinci sesudah diimunisasi.

Angka 1, 2, 3, dan 4 pada gambar kurva 4.7.1.1 secara berturutan menggambarkan reaktivitas serum kelinci terhadap konsentrasi antigen 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, dan 12,5 µg/ml. Angka tanpa huruf K menandakan serum kelinci sesudah diimunisasi sedangkan serum kelinci sebelum diimunisasi ditandai oleh huruf K di belakang angka.



Gambar 4.7.1.2 Kurva hasil ELISA serum kelinci sesudah diimunisasi dengan berbagai kontrol.

Angka 1, 2, 3, dan 4 secara berturut-turut menggambarkan reaktivitas serum kelinci terhadap pengenceran serum 1/25, 1/50, 1/100, dan 1/200. Angka tanpa huruf K menandakan serum kelinci sesudah diimunisasi sedangkan berbagai kontrol ditandai oleh huruf K di depan angka. Simbol K1, K2, K3, dan K4 secara berurutan menggambarkan kontrol antibodi kedua, streptavidine, *buffer blocking*, dan gliserol dengan pengenceran 1/25 sebagai ganti antibodi pertama.

Hasil ELISA serum kelinci sesudah diimunisasi protein rekombinan M1 terhadap antigen M1 secara umum memperlihatkan nilai OD yang tinggi (OD berkisar antara 0,093--0,544) pada berbagai konsentrasi antigen M1 dan berbagai pengenceran serum. Nilai rata-rata aktivitas respon antibodi M1 tertinggi (0,544) terdapat pada serum kelinci yang diimunisasi oleh protein rekombinan M1 ditunjukkan pada serum kelinci pengenceran 1/25 dengan konsentrasi antigen 50 µg/ml, yaitu 0,544. Nilai tersebut jauh lebih tinggi dibandingkan dengan nilai OD serum kelinci sebelum diimunisasi dan kelompok berbagai kontrol. Nilai OD serum yang dihasilkan kelinci sebelum diimunisasi hanya berkisar antara 0,06--0,116 dan nilai OD yang dihasilkan berbagai kontrol hanya berkisar antara 0,038--0,215. Hal tersebut membuktikan bahwa telah terjadi peningkatan respon imun di dalam tubuh kelinci terhadap antigen yang diimunisasikan ke dalam tubuh kelinci.

Respon imun yang dihasilkan kelinci tersebut berupa antibodi poliklonal terhadap protein rekombinan matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009.

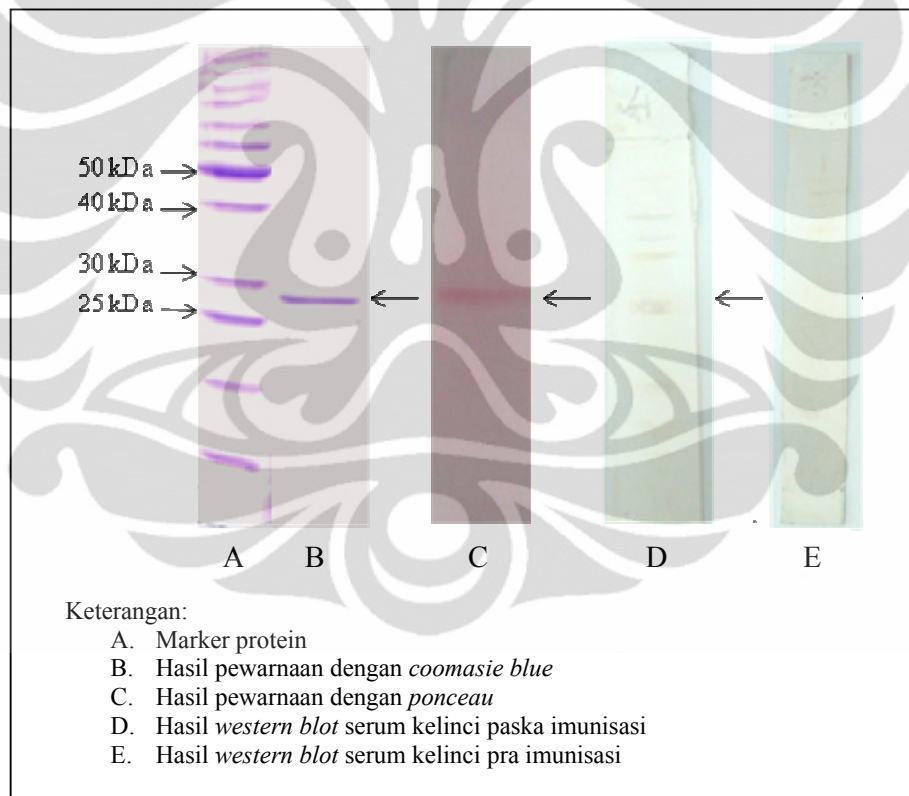
Konsentrasi antigen yang diperlukan untuk pelapisan lajur pelat ELISA pendeteksi antibodi M1 menggunakan pengenceran antigen M1 dengan konsentrasi 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, dan 12,5 µg/ml. Antigen tersebut diencerkan di dalam *coating buffer*. *Coating buffer* yang digunakan mengandung sodium carbonat, sodium bicarbonat, dan sodium azide (Ausubel *dkk.* 1990: 11.2.5).

Variasi pengenceran serum kelinci perlakuan dan serum kelinci kontrol digunakan untuk menilai konsentrasi antigen yang mampu membedakan titer antibodi spesifik M1 pada kelinci yang diimunisasi dengan antigen rekombinan dan kelinci yang tidak diimunisasi dengan antigen rekombinan. Serum kelinci diencerkan secara serial dalam 0,1% gelatin dengan pengenceran 1/25, 1/50, 1/100 dan 1/200. Pengenceran serum kelinci dengan 0,1% gelatin dalam PBS 1x bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas ikatan antara antigen dan antibodi (Ausubel *dkk.* 1990: 11.2.5).

Antibodi kedua yang digunakan dalam penelitian yaitu, antibodi berlabel biotin yang mengenali Imunoglobulin G kelinci. Antibodi kedua tersebut akan menempel pada antibodi sampel atau serum kelinci yang sebelumnya telah menempel pada antigen, sehingga dapat terjadi interaksi antara antigen dan antibodi yang bersesuaian. Kemudian ke atas permukaan tersebut dicampurkan suatu substrat yang dapat bereaksi dengan enzim sinyal. Pada saat substrat tersebut dicampurkan ke permukaan, enzim yang berikatan dengan antibodi atau antigen spesifik yang berinteraksi dengan antibodi atau antigen sampel akan bereaksi dengan substrat dan menimbulkan suatu sinyal yang dapat dideteksi. Substrat yang digunakan dalam penelitian adalah substrat OPD (o-Phenylenediamine) yang dilarutkan dalam hidrogen peroksida. Sinyal yang dihasilkan berupa perubahan warna campuran dalam pelat yang sebelumnya bening menjadi berwarna kuning-oranye (Ausubel *dkk.* 1990: 11.2.6 & Kresno 2001: 412). Intensitas warna campuran diukur dengan spektrofotometer yang disebut ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm, sehingga didapatkan hasil berupa nilai OD (Lampiran 3).

4.7.2 Western blot

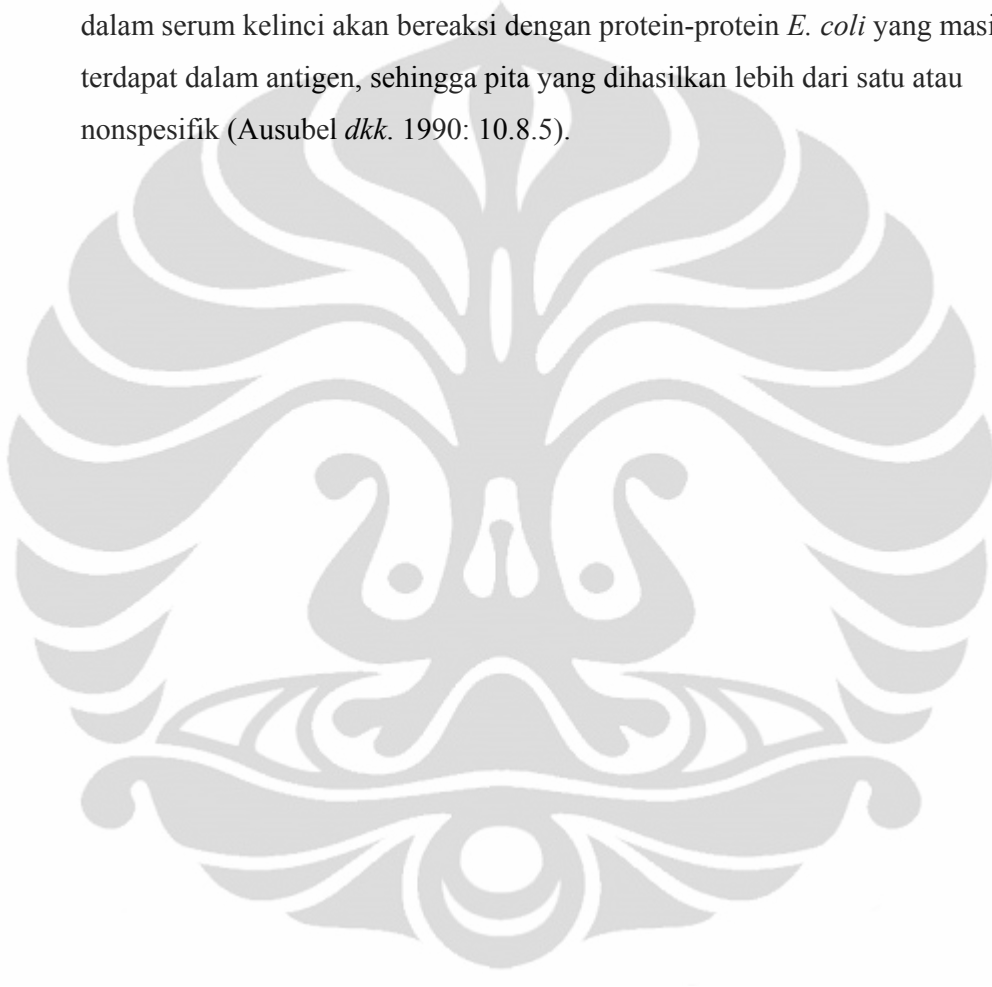
Western blot merupakan suatu metode untuk mengetahui reaktivitas antibodi dan antigen dengan cara mentransfer protein dari gel ke membran. *Western blot* perlu dilakukan untuk menilai spesifisitas yang diperlihatkan dari hasil ELISA (Becker 1996: 157--158). Hasil uji *western blot* menunjukkan serum kelinci bereaksi positif terhadap antigen M1 (Gambar 4.7.2). Hal tersebut ditunjukkan dengan terdapatnya satu pita reaktif dengan migrasi yang sesuai dengan protein rekombinan (~27 kDa) pada membran nitroselulosa yang diwarnai dengan pewarnaan *ponceau*.



Gambar 4.7.2. Reaktivitas serum kelinci terhadap antigen M1.

Selain pita tersebut tampak adanya beberapa pita lain yang reaktif dengan serum kelinci yang diimunisasi protein rekombinan M1. Adanya kontaminasi pada pita hasil *western blot* kemungkinan disebabkan karena proses purifikasi yang kurang murni, sehingga masih terdapat protein lain selain protein

rekombinan M1. Dilusi antibodi primer (serum kelinci diimunisasi protein rekombinan M1) yang digunakan juga terlalu besar. Selain hal tersebut, di dalam tubuh kelinci juga sudah terdapat antibodi terhadap *E. coli*, sehingga serum yang dihasilkan juga tidak murni hanya mengandung antibodi M1 Virus Influenza A H1N1. Pada saat proses *western blot* antibodi terhadap *E. coli* yang terdapat dalam serum kelinci akan bereaksi dengan protein-protein *E. coli* yang masih terdapat dalam antigen, sehingga pita yang dihasilkan lebih dari satu atau nonspesifik (Ausubel *dkk.* 1990: 10.8.5).



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Antibodi poliklonal matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 telah berhasil dibentuk.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penyuntikan *booster* pada hewan uji, untuk meningkatkan respon imun yang terbentuk.
2. Perlu dilakukan reabsorpsi antibodi *E. coli* agar antibodi yang dihasilkan murni hanya mengandung antibodi M1 saja.

DAFTAR REFERENSI

- Albert, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2002. *Molecular biology: The cell*. Garland Science, New York: xxxiv + 1463 hlm.
- Anwar, R. 2005. *Sintesis, fungsi dan interpretasi pemeriksaan hormon reproduksi*. Bagian Obstetri Dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Unpad. Bandung: 30 hlm.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1990. *Current protocols in molecular biology*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xx + 1.0.1--9.9.3.
- Banks, R.C., R.W. McDiarmid & A.L. Gardner. 1987. *Checklist of Vertebrates of The United States, The U.S. Territories, and Canada*. Smithsonian Institution Press. Wasington, DC, USA: xiv + 204 hlm.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi dasar*. Edisi ke-7. Balai Penerbit FK UI, Jakarta: v + 572 hlm.
- Baudin, F., C. Elster, J. Gagnon, K. Larsen & R.W.H. Ruigrok. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *Journal of General Virology* **78**(?): 1589--1596.
- Becker, J.M., G.A. Caldwell & E.A. Zachgo. 1996. *Biotechnology: A laboratory course*. Academic Press Inc. California: xx + 261 hlm.
- Behrens, G. & M. Stoll. 2006. Pathogenesis and immunology. *Dalam*: Kamps, B. S., C. Hoffman & W. Preiser (eds). 2006. *Influenza report 2006*. 225 hlm. <http://www.influenzareport.com>, 20 Februari 2011, pk. 19.08.
- Beigel, J.H., J. Farrar, A.M. Han, F.G. Hayden, R. Hyer, M.D. de jong & K-Y. Yuen. 2006. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *New England Journal of Medicine* **353**: 1374--1385.
- Bernard, A. & M. Payton. 1995. Selection of *Escherichia coli* expression system. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D. w. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 1998. *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc., Washington: 5.2.1--5.2.18.

- Biocompare. 2009. *Escherichia coli* BL21 from GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences. 1 hlm.
<http://www.biocompare.com/ProductDetails/38819/E-coli-BL21.html>, 21 Februari 2011, 17.00.
- Brown, T.A. 1991. *Genome*. BIOS Scientific Publisher Ltd., Oxford: xxviii + 472 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terj. dari *Biology*, oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, W.F. Wibowo, & W. Manalu. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 + A-6 + F-2 + G-29 + I-7 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. 6th ed. Benjamin Cummings, San Fransisco: xvi + 491 hlm.
- Caprette, D.R. 2005. Introduction to SDS-PAGE. 24 Mei: 2 hlm.
<http://www.raf.rice.edu/~biolabs/studies/sds-page/gella2.html>. 3 November 2009, pk. 14.28 WIB.
- Capua, I. & D.J. Alexander. 2002. Avian influenza and human health. *Acta Tropica* **83**(?): 1--6.
- Carlton, A. & M. Zachariou. 2008. Immobilized metal ion affinity chromatography of native proteins and histidine tagged fusion proteins. Dalam: Zachariou, M. 2008. *Affinity chromatography methods and protocols*. 9th ed. Humana Press, Totowa: 25--34 & 137--148.
- Cinti, S. 2005. Pandemic influenza: Are we ready? *Disaster manage response* **3**(3): 61--67.
- Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. 3th ed. John Willey & Sons, Inc., Washington: ix + 23.4.8 + A.5A.40 + S-34 hlm.
- Cummings, B. 2007. *Antibody structure*. Pearson education Inc., England: 24-20.
- Dellis, S. 2009. Molecular lab experiment molecular biology. Restriction digest, gel electrophoresis, and DNA ligation. (?): 22 hlm.
<http://dellis.people.corf.edu/biol312L/virtualbook.html>, 5 Februari 2011, pk. 13.45 WIB.
- Dolin, R. 2005. Influenza. Dalam: Braunwald, E., D. Kasper, A.S. Fanci, S. Hanser, D. Longo & L. Jamenson (eds.). 2005. *Harrison's principles of*

- internal medicine*. 16th ed. McGraw-Hill Companies Inc., New York: 1066--1071 hlm.
- Echan, L.A. & D.W. Speicher. 2002. Proteins detection in gels using fixation. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 10.5.1--10.5.18.
- Fairbanks, D.J & W.R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Wadsworth Publishing Company, New York: xiii + 438 hlm.
- Fakhroni, I. 2005. *Southern blotting*. 15 hlm.
<http://www.faperta.ugm.ac.id>, 25 Januari 2011. pk. 21.45.
- Gallagher, S.R. 1995. One-dimentional SDS gel electrophoresis protein. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 10.1.1--10.1.34.
- Gerard, G.F. & J.M. D'Alessio. 1993. Reverse transcriptase. *Dalam*: Burell, M.M. *Enzyme of molecular biology*. 1993. Vol.16. Humana Press Inc., Totowa: 356 hlm.
- Glick, B.R. & J.J. Pasternak. 2003. *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, Washington DC: xxiii + 760 hlm.
- Harimoto, T. & Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clinical Microbiology Reviews* **14**(1): 129--149.
- Harlow, E., & D. Lane. 1988. *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: xiii+726 hlm.
- Heiny, A.T., O. Miotto, K.N. Srinivasan, A.M. Khan, G.L. Zhang, V. Tan & J.T. August. 2007. Evolutionary conserved protein sequences of influenza A viruses, avian vaccines targets. *Journal of Publication Medical Centre* **2**(12): 1--14.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley & S.T. Williams. 1994: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th.ed. Williams & Wilkins, Baltimore: xviii + 787 hlm.
- Invitrogen. 2002. BL21 Star.(DE3) One Shot, BL21 Star.(DE3)pLysS One

- Shot, Chemically Competent Cells. 17 September: 22 hlm.
<http://www.invitrogen.com>, 7 Desember 2010 pk. 20.20 WIB.
- Ito, T., O.T. Gorman, Y. Kawaoka, W.J. Bean, & R.G. Webster. 1991.
 Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of
 the M1 and M2 proteins. *Journal of Virology* **65**(10): 5491--5498.
- Kimple, M.E. & J. Sondek. 2004. Overview of affinity tags for protein
 purification. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W.
 Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein
 science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 9.9.1--9.9.19.
- Kneusel, R.E., J. Crowe, M. Wulbeck & J. Ribbe. 2000. Procedures for analysis
 and purification of His-tagged proteins. *Dalam*: Rapley, R. 2000. *The
 nucleic acid protocols handbook*. Humana Press Inc., Totowa: 921--934.
- Kozma, C., W. Macklin, L. M. Cummins, & R. Mauer. 1974. Anatomy,
 Physiology and Biochemistry of the rabbit. *Dalam*: Weisbroth, S. H, R. E.
 Flatt, & A. L. Kraus (eds.) 1974. *The biology of the laboratory rabbit*.
 Academic Press, New York: 49--69.
- Kresno, S.B. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Balai
 Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: xiii + 431.
- LaVallie, E.R. 1995. Production of recombinant proteins in Escherichia coli.
Dalam: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T.
 Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey
 & Sons, Inc., Washington: 5.1.1--5.1.8.
- Liu, T. & Z. Ye. 2002. Restriction of viral replication by mutation of the
 influenza virus matrix protein. *Journal of Virology* **76**(24): 13055--13061.
- Livestock industries. 2003. *New Zealand White rabbit*.
<http://www.scienceimage.csiro.au/index.cfm?event=site.image.detail&id=2192>. 22 Maret 2011, pk 15.30 WIB.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology
 of microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings publishing Inc., San
 Francisco: xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + I-36 hlm.

- Melidou, A., G. Gioula, M. Exindari, D. Hatzidimitriou & E. Diza-Mataftsi. 2009. Influenza A (H5N1): An overview of the current situation. *Eurosurveillance* **14**: 1--4.
- Mulyadi, B. & Prihatini. 2005. Diagnosis laboratorik flu burung (H5N1). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory* **12**(2): 71--81.
- Murphy, B.R., L.J. Reck, K.L. Wyke & J.W. Yewdell. 1984. Antigenic characterization of influenza A virus matrix protein with monoclonal antibodies. *Journal of Virology* **49**(1): 248—252.
- Naffakh, N. & S. Van der Werf. 2009. April 2009: An outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human-to-human transmission. *Microbes and Infection* *xx* (2009) 1--4.
- Perkasa, A. 2009. Konstruksi vektor rekombinan pembawa fragmen 140 pb gen *h5* avian influenza virus A subtipe H1N1. Skripsi-S1. Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: xi + 102 hlm.
- Petty, K.J. 1996. Metal-chelate affinity chromatography. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 9.4.1--9.4.16.
- Philip, P. 2010. Regulation of gene expression. 1 hlm. <http://dnainfo.wikispaces.com/Gene+Regulation>. 10 Februari 2011, pk. 15.06 WIB.
- Pierce Biotechnology. 2009. Thermo scientific Pierce Cell lysis technical handbook: Featuring cell lysis reagent and detergent. Thermo Fisher Scientific, Inc., United States: 50 hlm.
- QIAexpressionist. 2001. *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged protein*. 5th ed. Qiagen, Valencia: 126 hlm.
- Roth, M.J., N. Tenese & S.P. Goff. 1985. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **260**(16): 9326--9335.

- Rubben, D. 2003. *Choosing a New Zealand Rabbit*. 2 hlm.
<http://www.PetPlace.com/articles/artshow.asp?art1D=315.htm>, 18 Maret 2011 pk. 10.15 WIB.
- Saluta, A & P.A. Bell. 1998. *Troubleshooting GST fusion protein expression in E. coli*. Amersham Biosciences, Piscataway NJ: 3 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A. 14.1 + R.22 + 1.44 hlm.
- Scope, R.K. & J.A. Smith. 1998. Analysis of proteins. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 10.0.1--10.0.20.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic laboratory for biotechnology: textbook and laboratory reference*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: 751 hlm.
- Sidorenko, Y. & G. Bocharov. 2001. Virus Replication in MDCK Cells. 1 lm.
<http://www.mpimagdeburg.mpg.de/research/projects/1010/1137/1030.html>
 . 20 Februari 2011, pk 12.31.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Sorensen, H.P. & K.K. Mortensen. 2004. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128
- Stratagene. 2004. BL21 (DE3) *competent cells*, BL21 (DE3) pLysS *competent cells*, and BL21 *competent cells*, Stratagene, California: 15 hlm.
- Tompkins, S.M., Z. Shan Zhao, Lo, Chia-Yun, J.A. Misplon, T. Liu, Zhiping. Ye, R.J. Hogan, Zhengqi Wu, K.A. Benton, T.M. Tumpey, & S.L. Epstein. 2007. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, Including subtype H5N1. *Emerging Infectious Diseases* 13(3): 428--435.
- White, J. 2004. *Influenza*. 6 hlm.
<http://www.medicalecology.org/disease/influenza/influenza.htm#sectOutline>, 20 Februari 2011, pk. 12.09.

- WHO (=World Health Organization). 2009. Fase-fase pandemi. 5 Mei: 10 hlm. http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=fase-fase_pandemi.index&admin=0. 5 Juni 2011, pk. 19.10.
- WHO (=World Health Organization). 2010. H1N1 avian influenza: Timeline of major event. 27 Juli: 34 hlm. http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=weekly_report_index&admin=0. 15 Desember 2010, pk. 12.10.
- Wingfield, P.T. 2002. Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 6.1.1--6.1.37.
- Yuen, K.Y. & S.S.Y. Wong. 2005. Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Medical Journal* **11**(3): 189--199.
- Zhirnov, O.P., I.V. Vorobjeva, A.V. Ovcharenko, & H.D. Klenk. 2003. Intracellular cleavage of human influenza A virus hemagglutinin and its inhibition. *Biochemistry (Moscow)* **68** (9): 1247--1255.

Lampiran 1

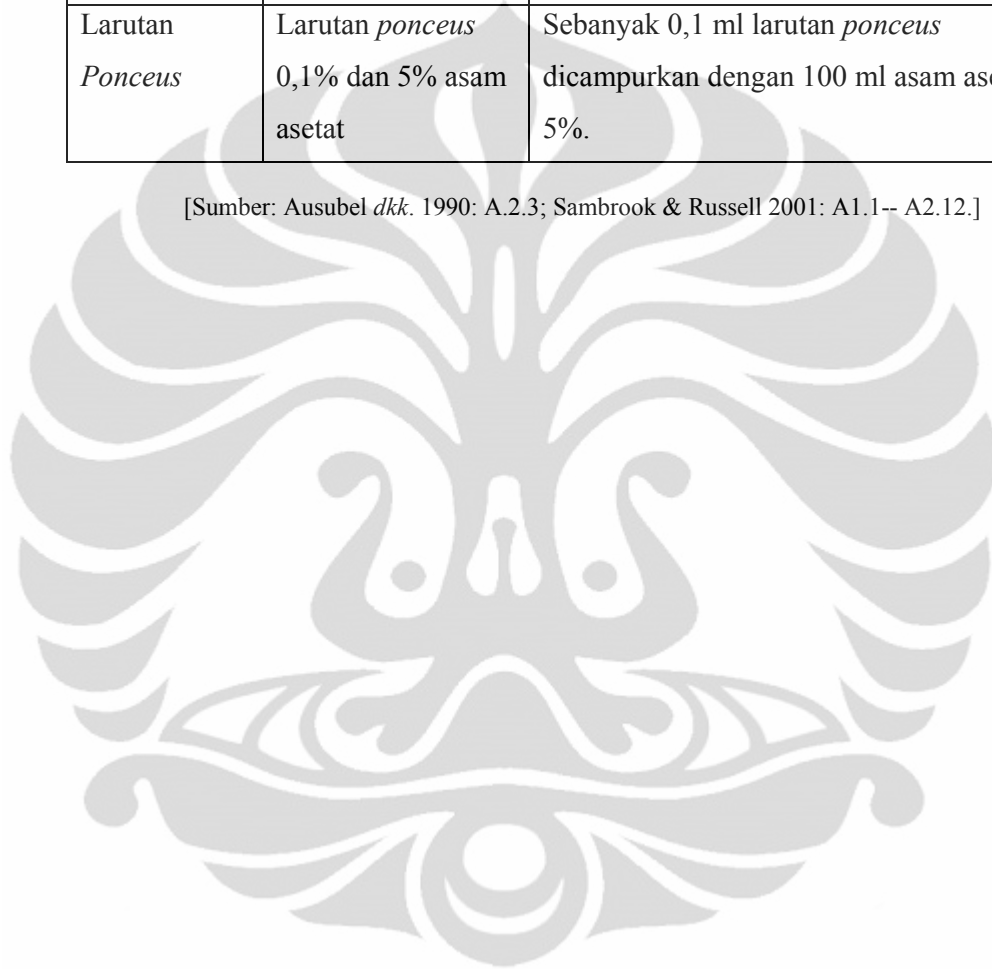
Pembuatan larutan, *buffer* dan medium yang digunakan

Larutan, <i>buffer</i> dan medium	Komposisi	Cara pembuatan
Luria Bertani (LB) cair 250 ml	Trypton, <i>Yeast extract</i> , NaCl, dan akuades	Sebanyak 2,5 g tripton, 1,25 g <i>yeast extract</i> , 1,25 g NaCl dicampurkan dan dilarutkan dengan akuades steril, kemudian campuran disterilisasi dengan autoklaf pada 121 °C, tekanan 1 atm, selama 15 menit.
Ampisilin 100 µg/µl	Ampisilin 10 g, akuades 100 ml	Ampisilin dilarutkan dalam akuades.
4x Tris-HCl pH 8,8 [1,5 M Tris-HCl containing 0,4% SDS]	Tris-base, 1 N HCl, SDS, H ₂ O	Tris-base 9,1 g dicampurkan dalam 300 ml H ₂ O kemudian ukur pH 8,8 dengan 1 M HCl. Campuran ditambahkan dengan H ₂ O sampai 500 ml. Larutan disaring dengan filter 0,45 µm kemudian ditambahkan 2 g SDS
4x Tris-HCl pH 6,8 [0,5 M Tris-HCl containing 0,4% SDS]	Tris-base, 1 N HCl, SDS, H ₂ O	Tris-base 6,05 g dicampurkan dalam 40 ml H ₂ O kemudian diukur pH 6,8 dengan 1 M HCl. Campuran ditambahkan dengan H ₂ O sampai dengan 100 ml. Larutan disaring dengan filter 0,45 µm kemudian ditambahkan 0,4 g SDS
<i>Separating gel</i> 12%	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; SDS 10%; akrilamid 30%; APS 10%; TEMED; dan H ₂ O	Semua bahan dicampur menjadi satu, namun TEMED dicampurkan terakhir

<i>Stacking gel</i> 4%	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; SDS 10%; akrilamid 30%; APS 10%; TEMED; dan H ₂ O	Semua bahan dicampur menjadi satu, namun TEMED dicampurkan terakhir
<i>Commassie blue G-250 staining solution</i> 0,2% (100 ml)	<i>Commassie Brilliant Blue</i> , asam asetat glasial, metanol absolut, dan akuabides	0,2 g <i>Commassie brilliant blue</i> dicampurkan dengan 7,5 ml asam asetat glasial dan 40 ml metanol. Semua bahan yang telah dicampur ditambahkan akuabides sampai 100 ml
<i>Wash buffer</i> (1 Liter)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, dan akuabides	Sebanyak 7,8 g NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O, 17,5 g NaCl, dan 1,36 g imidazol dicampurkan ke dalam 800 ml akuabides dan diaduk hingga rata. Campuran diatur pHnya sampai 8 menggunakan NaOH 1 M
<i>Elution buffer</i> (1 liter)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, dan akuabides	Sebanyak 7,8 g NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O, 17,5 g NaCl, dan 1,36 g imidazol dicampurkan ke dalam 800 ml akuabides dan diaduk hingga rata. Campuran diatur pHnya sampai 8 menggunakan NaOH
PBS-Tween	PBS 1x dan Tween-20	Sebanyak 500 µl Tween-20 dicampurkan ke dalam 1 liter PBS 1x
<i>Carbonate coating buffer</i> pH 9,6	0,15 M Sodium karbonat, 0,35 M Sodium bikarbonat, 0,03 M Sodium azide, dan akuades steril	Sebanyak 5,86 g Na ₂ CO ₃ , 3,18 g NaHCO ₃ , dan 0,4 g NaN ₃ dicampurkan dengan aquades steril sampai volumenya 200 ml.
<i>Blocking solution</i>	PBS 1x dan gelatin 1%	Sebanyak 1 g gelatin dilarutkan ke dalam 100 ml PBS 1x

Substrat OPD	OPD, sodium sitrat, Na ₂ HPO ₄ , ddH ₂ O, dan H ₂ O ₂ 3%	Sebanyak 2,6 g sodium sitrat dan 6,9 g Na ₂ HPO ₄ dilarutkan di dalam 50 ml aquades steril. Sebanyak 50 mg OPD dicampurkan ke dalam larutan tersebut, lalu ditambahkan 1,2 ml H ₂ O ₂ 3%
Larutan <i>Ponceus</i>	Larutan <i>ponceus</i> 0,1% dan 5% asam asetat	Sebanyak 0,1 ml larutan <i>ponceus</i> dicampurkan dengan 100 ml asam asetat 5%.

[Sumber: Ausubel *dkk.* 1990: A.2.3; Sambrook & Russell 2001: A1.1-- A2.12.]



Lampiran 2

Perhitungan berat molekul protein M1 dari hasil SDS-PAGE

Berat molekul (MW) marka protein standar (kDa)	Jarak pita protein dari atas gel <i>separating/resolving</i>	R _f (x)	Log base 10 dari MW (y)
200	0,4	0,078	2,301
150	0,5	0,096	2,176
120	0,65	0,125	2,079
100	0,9	0,173	2,000
85	1,1	0,212	1,929
70	1,4	0,269	1,845
60	1,6	0,308	1,778
50	2,0	0,385	1,698
40	2,6	0,500	1,602
30	3,1	0,600	1,477
25	3,5	0,673	1,398
20	4,5	0,865	1,301

Jarak migrasi larutan = 5,2 cm

Panjang pita sampel dari bagian atas *separating gel* sebesar 3,5 cm

$$\begin{aligned} R_f \text{ sampel (x)} &= \text{jarak migrasi sampel} : \text{jarak migrasi larutan} \\ &= 3,5 \text{ cm} : 5,2 \text{ cm} \\ &= 0,673 \end{aligned}$$

Kurva standar (Gambar 4.4.2.1) dari R_f(x) vs Log MW (y) menghasilkan persamaan kuadrat: $y = -1,2108x + 2,2309$

berdasarkan persamaan kuadrat tersebut maka diperoleh

$$\begin{aligned} y \text{ (Log MW)} &= (-1,2108 \times 0,673) + 2,2309 \\ &= 1,416 \end{aligned}$$

$$MW = 27,016$$

Kesimpulan: Protein Matriks 1 Virus Influenza A H1N1 2009 mempunyai berat molekul sebesar ~ 27 kDa

Lampiran 3

Penentuan konsentrasi protein hasil purifikasi

Konsentrasi BSA (mg/ml)	OD BSA I	OD BSA II	Rata-rata OD BSA	ODEB+ Gliserol	Rata-Rata OD BSA-OD EB+Gliserol	OD Protein M1
0,5	0,152	0,149	0,1505	0,1215	0,029	0,1105
1	0,169	0,174	0,1715	0,1215	0,05	
1,5	0,181	0,178	0,1795	0,1215	0,058	
2	0,204	0,178	0,191	0,1215	0,0695	
5	0,271	0,259	0,265	0,1215	0,1435	
10	0,32	0,322	0,321	0,1215	0,1995	
15	0,417	0,426	0,4215	0,1215	0,3	
20	0,625	0,584	0,6045	0,1215	0,483	

Persamaan linear yang dihasilkan dari kurva standar (Gambar 4.5.1):

$$y = 0,0211x + 0,0215$$

$$\text{OD protein M1} = 0,1105$$

Maka, konsentrasi protein M1 :

$$0,1105 = 0,0211x + 0,0215$$

$$0,1105 - 0,0215 = 0,0211x$$

$$0,089 = 0,0211x$$

$$x = 4,218 \text{ mg/ml}$$

Lampiran 4

Hasil ELISA beberapa pengenceran serum kelinci sebelum dan setelah diimunisasi dengan antigen M1

1. Antigen M1 100 µg/ml dengan beberapa pengenceran antibodi*									
Antibodi kelinci sebelum diimunisasi					Antibodi kelinci diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200
	0,107	0,075	0,070	0,073		0,104	0,312	0,196	0,117
	0,067	0,062	0,047	0,058		0,801	0,241	0,189	0,107
Rata-rata	0,087	0,069	0,059	0,066	Rata-rata	0,453	0,277	0,193	0,112
2. Antigen M1 50 µg/ml dengan beberapa pengenceran antibodi*									
Antibodi kelinci sebelum diimunisasi					Antibodi kelinci diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200
	0,083	0,075	0,075	0,085		0,52	0,186	0,127	0,105
	0,120	0,063	0,06	0,075		0,567	0,232	0,105	0,081
Rata-rata	0,102	0,069	0,068	0,08	Rata-rata	0,544	0,209	0,116	0,093
3. Antigen M1 25 µg/ml dengan beberapa pengenceran antibodi*									
Antibodi kelinci sebelum diimunisasi					Antibodi kelinci diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200
	0,072	0,068	0,065	0,089		0,445	0,142	0,114	0,123
	0,098	0,069	0,055	0,07		0,405	0,196	0,102	0,156
Rata-rata	0,085	0,069	0,06	0,08	Rata-rata	0,425	0,169	0,108	0,14
4. Antigen M1 12.5 µg/ml dengan beberapa pengenceran antibodi*									
Antibodi kelinci sebelum diimunisasi					Antibodi kelinci diimunisasi				
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	1:100	1:200
	0,136	0,083	0,055	0,070		0,387	0,135	0,11	0,072
	0,095	0,09	0,079	0,11		0,39	0,225	0,124	0,204
Rata-rata	0,116	0,087	0,067	0,09	Rata-rata	0,389	0,18	0,117	0,138

* Antibodi dilarutkan dalam 0,1% gelatin

Lampiran 5

Hasil ELISA berbagai kontrol

Konsentrasi antigen	Berbagai kontrol			
	Antibodi ke-2	Streptavidine	<i>Buffer blocking</i>	Gliserol 1/25 (sebagai ganti antibodi ke-1)
100 µg/ml	0,390	0,04	0,074	0,039
	0,04	0,041	0,047	0,047
Rata-rata	0,215	0,041	0,061	0,043
50 µg/ml	0,041	0,041	0,056	0,041
	0,04	0,038	0,044	0,042
Rata-rata	0,0405	0,0395	0,05	0,0415
25 µg/ml	0,039	0,039	0,054	0,041
	0,041	0,042	0,058	0,044
Rata-rata	0,04	0,0405	0,056	0,0425
12,5 µg/ml	0,04	0,041	0,046	0,041
	0,037	0,041	0,047	0,044
Rata-rata	0,0385	0,041	0,0465	0,0425