



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBENTUKAN ANTIBODI POLIKLONAL *GLOBULAR*
HEAD NEURAMINIDASE VIRUS INFLUENZA A H5N1**

SKRIPSI

**FIKA RAHMADEWI
0706263883**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBENTUKAN ANTIBODI POLIKLONAL *GLOBULAR*
HEAD NEURAMINIDASE VIRUS INFLUENZA A H5N1**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**FIKA RAHMADEWI
0706263883**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Fika Rahmadewi

NPM : 0706263883

Tanda tangan : 

Tanggal : 4 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Fika Rahmadewi
NPM : 0706263883
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Pembentukan Antibodi Poliklonal *Globular Head*
Neuraminidase Virus Influenza A H5N1

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 : 4 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan hanya kepada Allah SWT atas segala nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Budiman Bela, SpMK (K) dan Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan II yang telah membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih atas segala bimbingan, waktu, pengertian, pengarahan, kesabaran, dan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc dan Dra. Setiorini, M.Kes selaku Penguji I dan II serta Koordinator Seminar atas segala saran, perbaikan-perbaikan, dan dukungan yang diberikan kepada penulis dalam pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI dan Penasehat Akademik atas saran-saran dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis. Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc.selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti S.U selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas segala ilmu pengetahuan yang diberikan kepada penulis selama berada di Biologi.
4. Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc, Retno Lestari, M.Si, yang telah memberikan semangat dan bimbingan selama menjadi asisten genetika dan perkuliahan.
5. Seluruh laboran dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, terutama Mbak Asri, Ibu Ros, dan Ibu Ida atas segala bantuan dan dukungan kepada penulis.

6. dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., SpMK sebagai ketua IHVCB-UI, Bu Silvi, Bu Sofy, Bu Aroem, Ka Eka, Ka Alyd, Kiki, Ka Wuri, Mba Rini, Ka Nia, Ka Aul, Mba Henny, Mba Wendra, Mba Sri, Ka Atep, Irwan, dan Mas Heru, atas segala bantuan, ilmu, dan dukungan yang diberikan kepada penulis selama penelitian dan menulis skripsi ini.
7. Keluarga tercinta, Papah (Mamat Rahmat, S.E), Mamah (Nunung Farida), dan keluarga besar atas kasih sayang, cinta, dukungan, semangat, nasehat, dan doa yang selalu diberikan kepada penulis.
8. Sahabat-sahabatku Merry, Naba, Bibil, Iik, Gita, Pepeb, Tewe, Putsan, Ade, Tiara, Uti, Ine, Wahyu, Bayu, Kimbod, Eja, Indah, Karno, Maridha, dan seluruh BLOSSOM atas segala kebersamaan, canda tawa, semangat, dan semua hal yang selalu menghibur penulis selama di Biologi.
9. Terima kasih buat Aa (Masrulloh, S.KM) atas seluruh cinta, kasih sayang, doa, nasihat, semangat, dan dukungan yang diberikan kepada penulis selama ini.

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

Depok, 4 Januari 2012

Penulis

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

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

Nama : Fika Rahmadewi
NPM : 0706263883
Program Studi : S1 Biologi
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 *Globular Head* Neuraminidase Virus Influenza A H5N1

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 karya ilmiah 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 : 4 Januari 2012

Yang menyatakan



(Fika Rahmadewi)

ABSTRAK

Nama : Fika Rahmadewi
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Pembentukan Antibodi Poliklonal *Globular Head*
Neuraminidase Virus Influenza A H5N1

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan antibodi poliklonal kelinci yang distimulasi oleh protein rekombinan *globular head* neuraminidase (NA) dan mengukur titer antibodi poliklonal. Protein rekombinan *globular head* NA berhasil diekspresikan secara intraseluler pada sel *E.coli* BL21 *codon plus* dengan induksi IPTG 0,1 mM dan dipurifikasi menggunakan resin Ni-NTA. Protein rekombinan *globular head* NA yang telah dipurifikasi digunakan sebagai antigen untuk menstimulasi antibodi poliklonal kelinci. Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah dihasilkan antibodi poliklonal terhadap *globular head* neuraminidase dan titer antibodi paling tinggi dihasilkan sebesar 1,352.

Kata kunci : Antibodi poliklonal, ekspresi protein, dan protein rekombinan *globular head* NA

xiii + 64 halaman ; 21 gambar; 6 lampiran; 2 tabel
Daftar Referensi : 61 (1987--2011)

ABSTRACT

Nama : Fika Rahmadewi
Program Studi : S1 Biology
Judul : Polyclonal Antibody Formation of Neuraminidase
Globular Head Influenza A Virus H5N1

The aim of this study was to determine rabbit polyclonal antibody stimulated by neuraminidase (NA) *globular head* recombinant protein and also to measure the polyclonal antibody titer. NA *globular head* recombinant protein has been expressed in *E.coli* BL21 *codon plus* intracellularly induced by 0,1 mM IPTG and has been purified by Ni-NTA resin. The purified of NA *globular head* recombinant was used as antigen to stimulate rabbit polyclonal antibody. The result shows that rabbit polyclonal antibody of neuraminidase *globular head* was produced and the highest antibody titer was 1,352.

Keywords : Polyclonal antibody, protein expression, and recombinant protein of NA *globular head*

xiii + 64 pages; 6 appendixes; 21 pictures; 2 tables
Bibliography : 61 (1987--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1 PENDAHULUAN.....	1
2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Virus Influenza A.....	4
2.1.1 Struktur dan genom virus influenza A	4
2.2 <i>Avian influenza</i>	5
2.3 Patogenisitas <i>avian influenza</i>	7
2.4 Replikasi virus <i>avian influenza</i>	8
2.5 Protein neuraminidase.....	10
2.6 Vektor ekspresi pQE80L.....	12
2.7 <i>E.coli</i> BL21 <i>codon plus</i>	13
2.8 Ekspresi protein.....	14
2.9 Antibodi	15
2.10 Purifikasi protein.....	16
2.11 Kelinci <i>American Dutch</i>	18
2.12 Uji serologis	19
2.12.1 ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	19
2.12.2 <i>Western Blot</i>	20
2.12 <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>	21
3 METODE PENELITIAN	23
3.1 Lokasi dan waktu penelitian	23
3.2 Alat dan bahan.....	23
3.2.1 Alat	23
3.2.2 Bahan.....	24
3.2.2.1 Bahan uji	24
3.2.2.2 Medium	24
3.2.2.3 Bahan kimia	24
3.3 Cara kerja	25
3.3.1 Pembuatan larutan, medium, dan <i>buffer</i>	25

3.3.2	Ekspresi protein rekombinan <i>globular head</i> NA.....	26
3.3.3	Isolasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan metode sonikasi.....	26
3.3.4	Purifikasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA.....	27
3.3.5	Visualisasi dan analisis berat molekul protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan SDS-PAGE	28
3.3.6	Penentuan konsentrasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	30
3.3.7	Imunisasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA ke kelinci ...	31
3.3.8	Pengambilan darah kelinci	32
3.3.9	Uji serologis serum kelinci	33
3.3.9.1	ELISA	33
3.3.9.2	<i>Western Blot</i>	34
4	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1	Ekspresi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	36
4.2	Isolasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan metode sonikasi	39
4.3	Purifikasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	40
4.4	Visualisasi dan analisis berat molekul protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan SDS-PAGE	42
4.5	Penentuan konsentrasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	43
4.6	Imunisasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA ke kelinci.....	44
4.7	Uji Serologis serum kelinci	45
4.7.1	ELISA	45
4.7.2	<i>Western blot</i>	47
5	KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran.....	49
	DAFTAR REFERENSI	50

DAFTAR GAMBAR

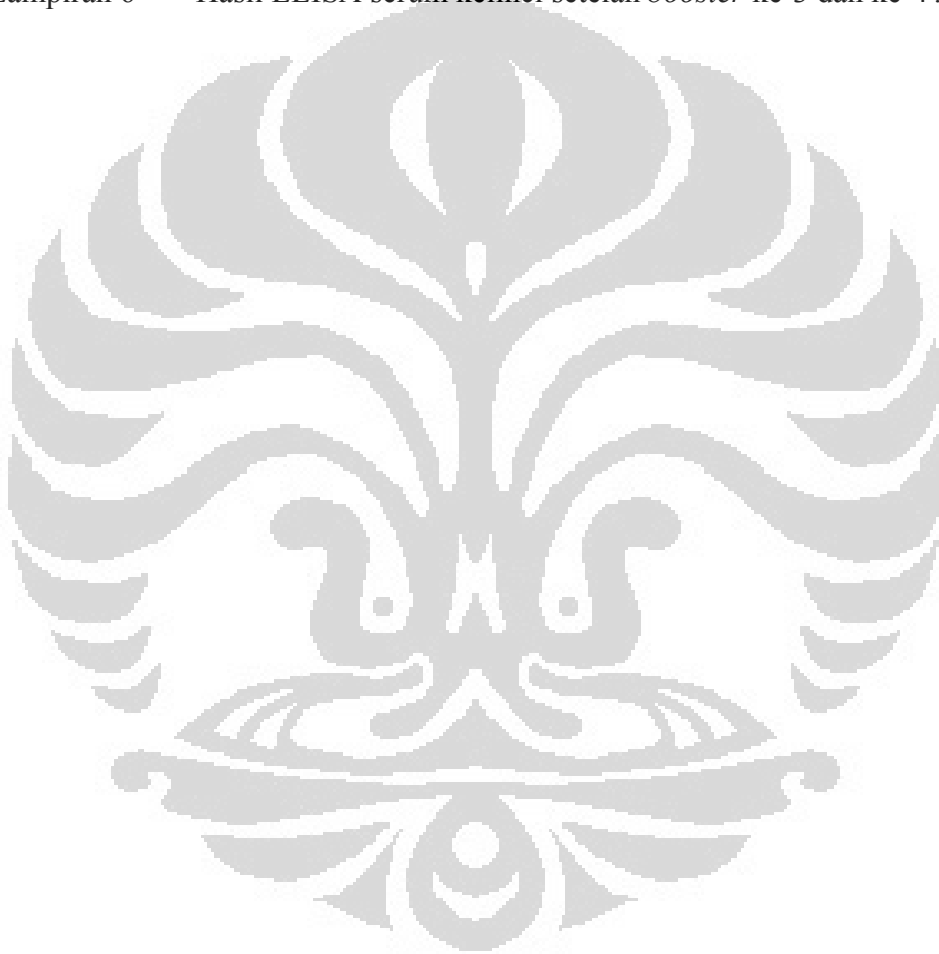
Gambar 2.1.1.1	Struktur virus influenza A	5
Gambar 2.3.1	Peristiwa pandemi akibat <i>reassortment genetic</i>	8
Gambar 2.4.1	Siklus replikasi virus influenza.....	10
Gambar 2.5(1)	Proses pelepasan virus influenza	11
Gambar 2.5(2)	Tiga bagian neuraminidase	12
Gambar 2.6.1	Peta genom vektor ekspresi pQE80L	13
Gambar 2.8.1	Mekanisme ekspresi protein	15
Gambar 2.9.1	Struktur antibodi	16
Gambar 2.10.1	Pengikatan protein rekombinan berlabel 6x His-tag dengan Ni-NTA	17
Gambar 2.11.1	Kelinci <i>American Dutch</i>	19
Gambar 2.12.1	Tiga macam metode ELISA	20
Gambar 3.3.1	Skema kerja penelitian.....	25
Gambar 4.1(1)	Hasil SDS-PAGE ekspresi protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan induksi IPTG 1--4 jam.....	37
Gambar 4.1(2)	Hasil SDS-PAGE ekspresi protein rekombinan <i>globular head</i> NA dengan berbagai konsentrasi IPTG.....	38
Gambar 4.2.1	Hasil SDS-PAGE protein rekombinan <i>globular head</i> NA setelah sonikasi.	40
Gambar 4.3.1	Hasil SDS-PAGE purifikasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	42
Gambar 4.4.1	Kurva standar berat molekul marka protein (<i>Unstained Protein Ladder</i>)	43
Gambar 4.5.1	Grafik kurva standar BSA	44
Gambar 4.7.1(1)	Grafik perbandingan reaktivitas serum sebelum dan setelah diimunisasi antigen protein <i>globular head</i> NA	46
Gambar 4.7.1(2)	Hasil optimasi reaktivitas serum sebelum dan setelah imunisasi.....	47
Gambar 4.7.2.1	Hasil <i>western blot</i> protein <i>globular head</i> NA dengan serum kelinci sebelum dan sesudah imunisasi	48

DAFTAR TABEL

Tabel 3.3.5(1)	Komposisi <i>resolving gel</i> (untuk 7 ml*)	29
Tabel 3.3.5(2)	Komposisi <i>Stacking gel</i>	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan larutan, <i>buffer</i> , dan medium.....	56
Lampiran 2	Perhitungan berat molekul protein rekombinan <i>globular head</i> NA	60
Lampiran 3	Penentuan konsentrasi protein rekombinan <i>globular head</i> NA	61
Lampiran 4	Hasil ELISA serum kelinci sebelum dan setelah imunisasi primer	62
Lampiran 5	Hasil ELISA serum kelinci setelah <i>booster</i> ke-1 dan ke-2	63
Lampiran 6	Hasil ELISA serum kelinci setelah <i>booster</i> ke-3 dan ke-4	64



BAB 1 PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) adalah penyakit menular pada unggas yang disebabkan oleh virus influenza tipe A. Virus AI subtipe H5N1 merupakan virus berpatogenisitas tinggi pada unggas karena menyebabkan penyakit serius pada sistem pernapasan, penurunan produksi telur, dan menyebabkan kematian 90--100% populasi unggas (Capua & Alexander 2002: 3; Spickler 2009:1--2). Wabah AI subtipe H5N1 pertama kali terjadi pada tahun 1997 di Hongkong yang menyebabkan kematian 1,4 juta ayam (Kamps *dkk* 2006: 48).

Virus AI H5N1 menular dari unggas ke manusia karena virus mampu melewati *barrier spesies*. Penularan virus terjadi akibat sentuhan langsung dengan unggas atau melalui udara yang tercemar virus H5N1 yang berasal dari kotoran unggas yang terinfeksi (Santoso *dkk.* 2005: 21). Sejak tahun 2003 sampai November 2011, telah tercatat sebanyak 569 kasus AI H5N di 15 negara, sebanyak 181 kasus terjadi di Indonesia dengan jumlah kematian sebanyak 149 kasus (WHO 2011: 1).

Virus AI H5N1 termasuk ke dalam famili Orthomyxoviridae. Partikel virus memiliki struktur bulat dengan diameter 80--120 nm (De Jong *dkk.* 2000: 218; Galwankar & Clem 2009: 99--100). Genom virus influenza berupa RNA untai tunggal negatif (-ssRNA), dengan panjang nukleotida sekitar 13588 bp yang tersusun ke dalam 8 segmen dan mengkode 10 macam protein, yaitu PB1 (*Polymerase Basic 1*), PB2 (*Polymerase Basic 2*), PA (*Polymerase Acidic*), HA (hemagglutinin), NP (nukleoprotein), NA (neuraminidase), M1 (matriks 1), M2 (matriks 2), NS1 dan NS2 (Setiawan 2009: 114--115).

Salah satu glikoprotein pada *envelope* virus AI diidentifikasi sebagai neuraminidase (NA). Neuraminidase merupakan molekul tetramer dengan struktur globular dan memiliki berat molekul 60 kDa yang tersusun atas 1.413 nukleotida (Cox *dkk.* 2005: 643). Neuraminidase memiliki situs aktif enzim yang berperan dalam proses pelepasan virus dari sel inang, yaitu dengan cara memutuskan ikatan α -ketosidik antara terminal asam sialat (*N-acetylneuraminic-*

acid) dengan residu glikosil pada glikoprotein (Varghese 1999: 178; Tarigan *dkk.* 2007: 154).

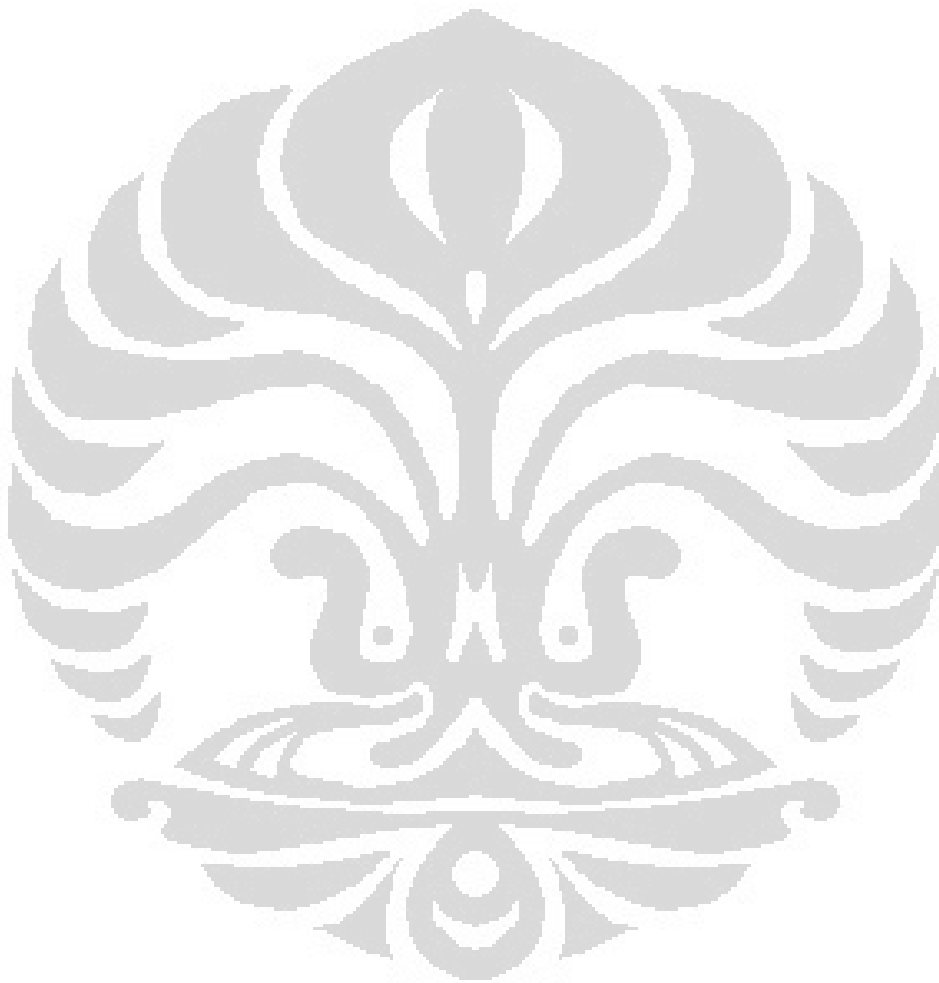
Mengingat pentingnya aktivitas enzim NA, maka telah dikembangkan obat anti virus influenza yang menghambat kerja enzim NA (neuraminidase *inhibitor*), yaitu zanamivir, dan oseltamivir (McKimm-Breschkin 2000: 2). Namun, pada tahun 2004 telah dilaporkan bahwa virus AI H1N1 resisten terhadap obat antiviral oseltamivir karena adanya perubahan asam amino pada situs aktif NA (Moscona 2009: 954--955). Oleh karena itu, diperlukan alternatif lain untuk menghambat kerja enzim neuraminidase, salah satunya dengan cara pengikatan antibodi spesifik pada daerah *globular head* NA.

Situs aktif enzim neuraminidase terletak pada daerah kepala atau *globular head*. Menurut Sultana *dkk.* (2011:2), daerah *globular head* diprediksi sebagai antigen yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan antibodi. Antibodi yang dihasilkan tersebut diharapkan dapat menghambat aktivitas enzimatis NA, sehingga pelepasan progeni virus dari sel inang dapat dihambat.

Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology* (IHVCB-UI) sedang berupaya mengembangkan vaksin *avian influenza* H5N1. Salah satu antigen virus yang dikembangkan sebagai komponen vaksin H5N1 adalah daerah *globular head* neuraminidase. Susunan asam amino *globular head* NA bersifat *conserved*, sehingga proses terjadinya mutasi relatif lebih kecil (Castrucci & Kawaoka 1993: 759 & 763; Cox *dkk.* 2005: 654--655). Berdasarkan hal tersebut, IHVCB-UI telah melakukan penelitian dan berhasil memperoleh DNA rekombinan *globular head* NA. DNA rekombinan *globular head* NA selanjutnya diekspresikan dalam sistem ekspresi prokariot. Setelah itu, ekspresi antigen *globular head* NA dinilai dengan menggunakan pelacak spesifik berupa antibodi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan antibodi poliklonal sebagai respon terhadap protein rekombinan *globular head* NA.

Antibodi poliklonal yang spesifik terhadap *globular head* NA dapat diperoleh dari protein rekombinan *globular head* NA yang diimunisasi ke hewan uji. Antibodi poliklonal yang dihasilkan dalam penelitian diharapkan dapat digunakan untuk uji diagnostik pada pasien atau ayam yang terinfeksi virus AI H5N1 dan untuk deteksi antigen NA pada sel secara *in vitro*. Namun demikian,

belum diketahui apakah protein rekombinan *globular head* NA virus AI H5N1 dapat menghasilkan respons imun berupa antibodi poliklonal. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk mendapatkan antibodi poliklonal, serta menilai respons spesifik antibodi terhadap antigen *globular head* NA virus AI H5N1 berdasarkan kenaikan titer antibodi yang dianalisa menggunakan ELISA. Hipotesis yang diajukan adalah antibodi poliklonal dapat dihasilkan dari protein rekombinan *globular head* NA virus AI H5N1 disertai dengan kenaikan titer antibodi.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus influenza A

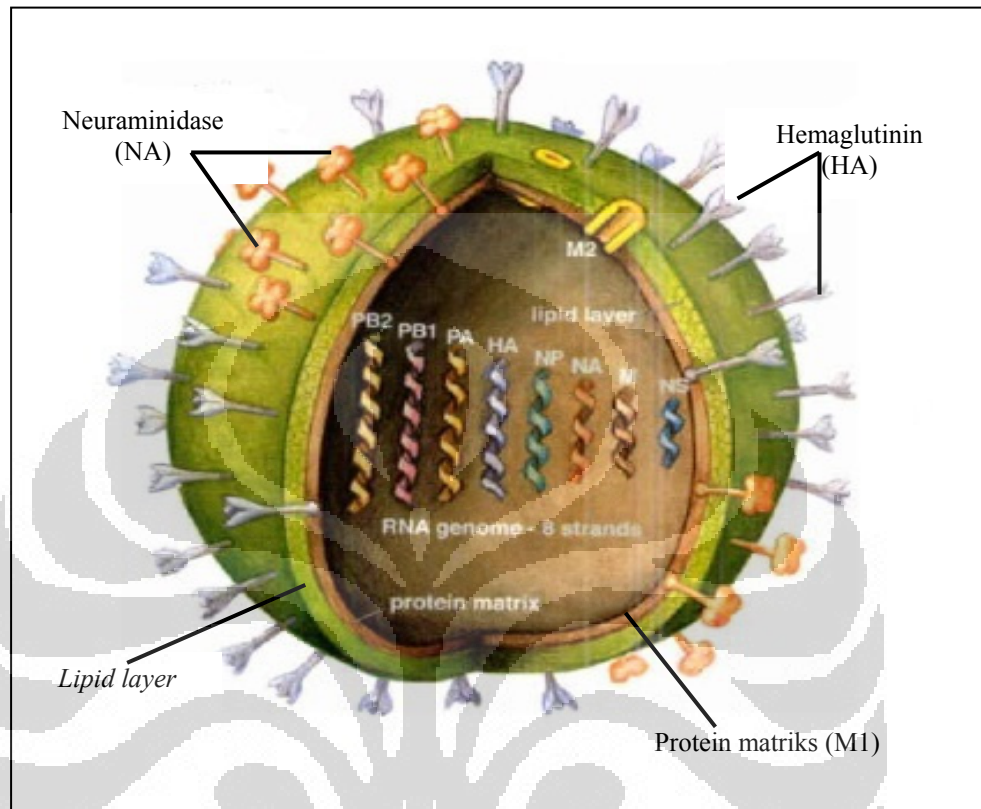
Virus influenza termasuk ke dalam famili Orthomyxoviridae yang terdiri atas tiga tipe, yaitu virus influenza tipe A, B, dan C. Pengelompokan tersebut berdasarkan perbedaan antigenik pada nukleoprotein (NP) dan protein matriks (M1). Virus influenza A selanjutnya diklasifikasi ke dalam sub tipe berdasarkan sifat antigenitas dari glikoprotein yang terdapat pada permukaan luar virus, yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sebanyak 16 sub tipe gen *HA* (H1--H16) dan 9 sub tipe gen *NA* (N1--N9) telah diidentifikasi dan menghasilkan beberapa sub tipe virus yang menyebabkan epidemi dan pandemi. Seluruh sub tipe virus influenza A ditemukan pada unggas air dan hanya beberapa sub tipe yang ditemukan pada mamalia seperti manusia (H1N1, H1N2, dan H3N2), babi (H1N1), dan kuda (H3N8 dan H7N7) (Peiris *dkk.* 2007: 244; Harimoto & Kawaoka 2010: 9)

2.1.1 Struktur dan genom virus influenza A

Partikel virus influenza A berbentuk bulat dan berdiameter 80--120 nm. Partikel virus memiliki selubung (*envelope*) yang terdiri atas dua lapisan, yaitu *lipid bilayer* pada lapisan luar dan protein matriks (M1) pada lapisan dalam. Permukaan luar partikel virus mengandung antigen glikoprotein, yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Bagian dalam partikel virus mengandung RNA yang dilapisi oleh matrix protein (Gambar 2.1.1.1) (Gong *dkk.* 2007: 114; Racaniello 2009: 1).

Genom virus influenza berupa RNA untai tunggal, *negative sense*, dengan panjang nukleotida sekitar 13588 yang tersusun ke dalam 8 segmen dan mengkode 10 macam protein, yaitu PB1 (*Polymerase Basic 1*), PB2 (*Polymerase Basic 2*), PA (*Polymerase Acidic*), HA (hemaglutinin), NP (nukleoprotein), NA

(neuraminidase), M1 (matriks 1), M2 (matriks 2), NS1 dan NS2 (Thanh *dkk.* 2008: 2671--2672; Setiawan 2009: 114--115).



Gambar 2.1.1.1 Struktur virus influenza A
[Sumber: Webster & Walker 2003: 125.]

2.2 Avian influenza

Avian influenza (AI) adalah penyakit infeksi pada sistem pernapasan unggas yang disebabkan oleh virus influenza dari famili *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A*. Virus AI memiliki banyak variasi antigen glikoprotein pada permukaan *envelope*, yaitu hemagglutinin yang dikode oleh gen *HA* dan neuraminidase yang dikode oleh gen *NA*. Hemagglutinin (HA) berperan dalam proses penempelan virus pada reseptor permukaan sel inang. Neuraminidase (NA) berperan dalam pelepasan progeni virus dari sel inang dengan cara memutuskan ikatan α -ketosidik antara terminal asam sialat (*N-acetylneuraminic acid*) dengan residu glikosil pada glikoprotein (Varghese 1999: 178; Tarigan *dkk.* 2007: 154).

Virus AI memiliki spesifisitas terhadap reseptor *sialic acid α -2,6 galactose* (SA α -2,6 Gal) pada manusia dan reseptor *sialic acid α -2,3 galactose* (SA α -2,3 Gal) pada ayam (Peiris *dkk.* 2000: 245; Thanh *dkk.* 2008: 2672). Penelitian molekular menunjukkan bahwa reseptor *sialic acid α -2,3 galactose* terdapat pada jaringan *tracheobronchial*, epitel bersilia pada bronkus, dan pneumosit alveoli manusia. Keberadaan reseptor tersebut menyebabkan virus AI yang menginfeksi ayam dapat melewati *barrier* spesies untuk menginfeksi manusia (Nicholls *dkk.* 2007: 3).

Berdasarkan virulensi pada unggas, virus AI dibedakan menjadi *low pathogenic avian influenza* (LPAI) dan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI). Virus HPAI memiliki hemaglutinin yang sangat peka terhadap protease endogen sel inang, sedangkan virus LPAI membutuhkan protease ekstraseluler seperti tripsin (Capua & Alexander 2002: 3; Peiris *dkk.* 2007: 245). Selain itu, virus LPAI dan HPAI memiliki perbedaan sekuens asam amino pada *hemagglutinin cleavage site*. Virus LPAI hanya memiliki 2 *basic amino acid*, sedangkan virus HPAI memiliki *multiple basic amino acid* (5 arginin dan 2 lisin) pada *hemagglutinin cleavage site* (Capua & Alexander 2002: 3).

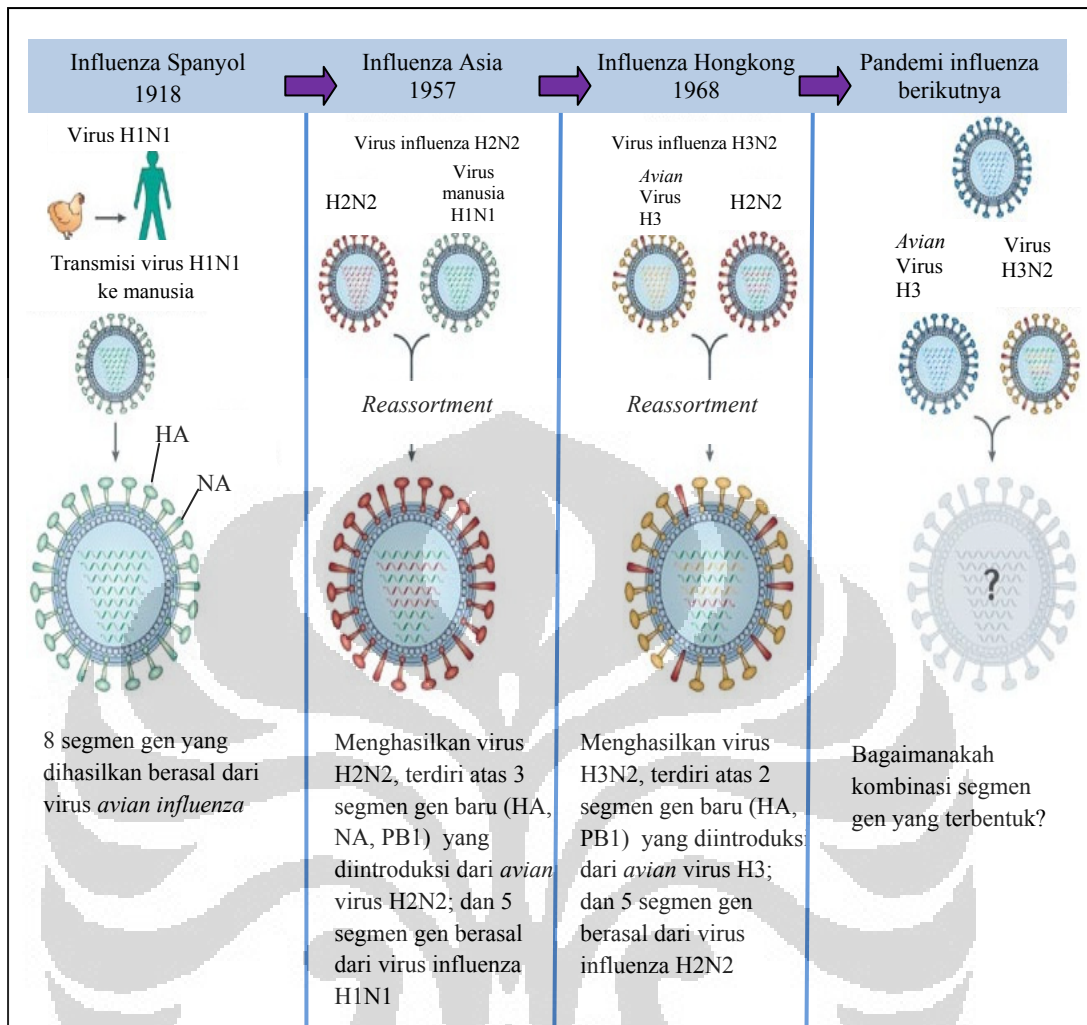
Virus AI subtipe H5N1 merupakan virus berpatogenisitas tinggi (HPAI). Infeksi virus H5N1 pada unggas menyebabkan penyakit serius pada sistem pernapasan, penurunan produksi telur, penurunan berat badan, dan menyebabkan kematian 90--100% populasi unggas (Capua & Alexander 2002: 3; Spickler 2009:1--2). Gejala klinis pada unggas yang terinfeksi virus AI (H5N1) ditandai dengan perubahan warna jengger menjadi warna biru, kepala bengkak, sekitar mata bengkak, demam, diare, mengalami gangguan pernafasan, serta mengalami gangguan reproduksi berupa penurunan produksi telur. Infeksi virus AI (H5N1) pada manusia memperlihatkan gejala awal berupa demam tinggi (biasanya lebih dari 38°C), dan gejala flu, serta kelainan saluran pernapasan. Gejala lain yang timbul adalah diare, sakit perut, sakit dada, dan terjadi perdarahan dari hidung dan gusi (Mulyadi & Prihatini 2005: 75).

2.3 Patogenisitas *avian influenza*

Patogenisitas adalah kemampuan yang dimiliki oleh agen penyakit untuk membuat seseorang atau sekelompok penduduk terinfeksi menjadi sakit. Virus AI dapat menyebabkan epidemi dan pandemi. Epidemi adalah timbulnya suatu penyakit yang menyerang sekelompok masyarakat dalam suatu wilayah yang sama dengan angka kejadian melebihi angka normal dari kejadian penyakit tersebut, sedangkan pandemi merupakan wabah penyakit yang menyerang masyarakat pada beberapa wilayah yang lebih luas (Capua & Alexander 2002: 2--3).

Wabah epidemi dan pandemi disebabkan oleh perubahan antigen glikoprotein pada permukaan sel virus influenza A akibat mutasi. Mutasi tersebut menyebabkan terbentuknya variasi antigen glikoprotein virus influenza (Gong *dkk.* 2007: 113). Terdapat dua macam variasi antigen pada virus influenza, yaitu *antigenic drift* dan *antigenic shift*. Epidemi influenza disebabkan oleh fenomena *antigenic drift*. Menurut Uez *dkk.* (1998: 405) *antigenic drift* atau mutasi titik merupakan peristiwa perubahan kecil pada susunan antigen, misalnya perubahan satu asam amino pada gen *HA* atau *NA*.

Wabah pandemi disebabkan oleh fenomena *antigenic shift*. *Antigenic shift* ditandai dengan perubahan genetik secara mendadak pada hemagglutinin (HA) dan atau neuraminidase (NA), sehingga menimbulkan *strain* virus influenza baru dengan kombinasi genom yang baru. Menurut George & Issac (2009: 472) dan Spickler (2009:2), *antigenic shift* disebabkan oleh *reassortment genetic* (Gambar 2.3.1), yaitu ketika dua jenis virus berbeda menginfeksi sel secara bersamaan, maka akan menghasilkan keturunan virus baru yang mengandung sebagian gen dari virus parental dan sebagian gen lagi berasal dari virus yang lainnya. Hal tersebut disebabkan karena genom virus influenza terdiri dari segmen-segmen gen yang terpisah, sehingga sangat mudah terjadi pertukaran segmen gen secara genetik. Peristiwa *reassortment genetic* tersebut akan menghasilkan subtipe virus yang baru (Setiawan 2009: 115).

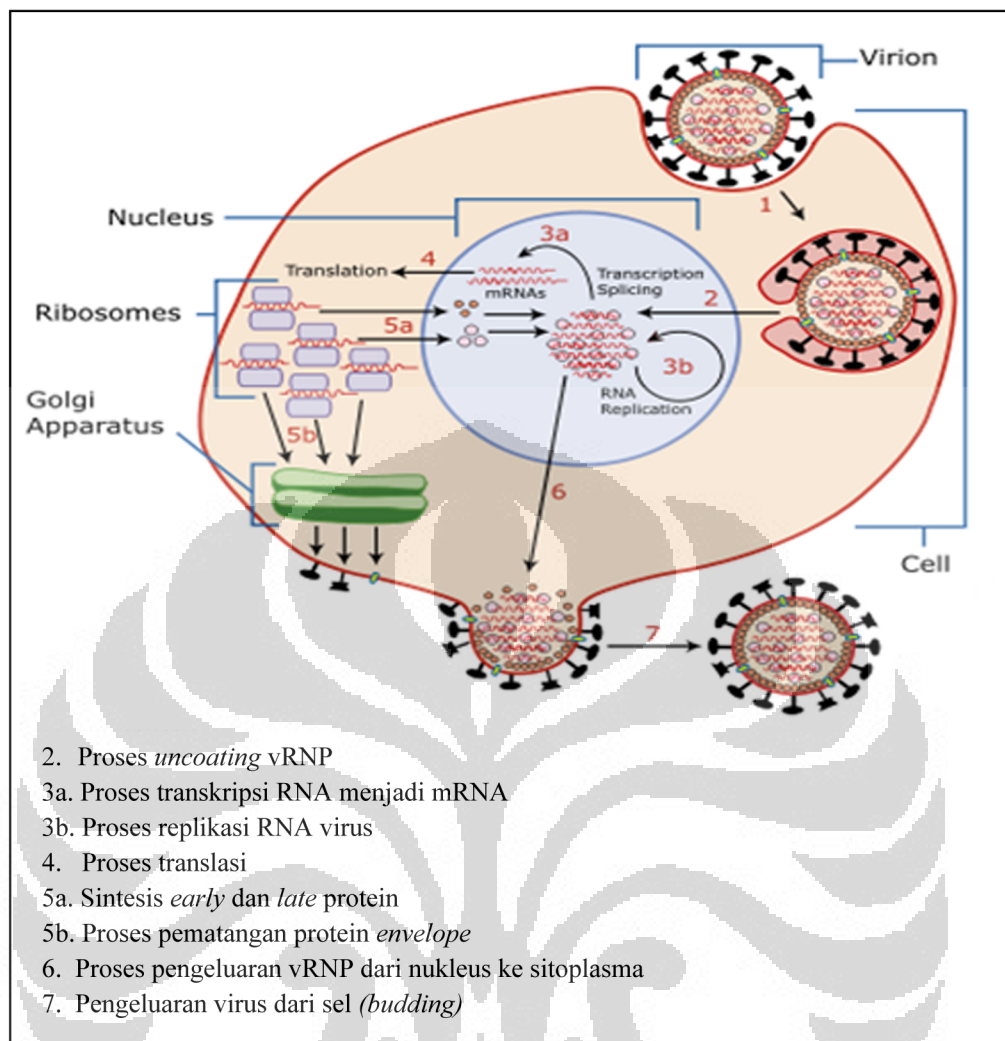


Gambar 2.3.1 Peristiwa pandemi akibat *reassortment genetic*
[Sumber: De Clercq 2006: 1015, diterjemahkan dari aslinya.]

2.4 Replikasi virus *avian influenza*

Replikasi virus AI diawali dengan masuknya virus ke dalam membran sel inang melalui endositosis yang diperantarai reseptor (*receptor-mediated endocytosis*) (Gambar 2.4.1). Proses endositosis dimulai dengan pengikatan hemagglutinin (HA) pada *envelope* virus dengan reseptor asam sialat membran sel. Rendahnya pH endosom menyebabkan terjadinya fusi antara membran endosom dan membran virus. Hal tersebut menyebabkan terjadinya proses *uncoating* virus, yaitu pengeluaran kompleks ribonukleoprotein virus (vRNP) ke dalam sitoplasma menuju nukleus (Cox *dkk.* 2005: 642).

Kompleks ribonukleoprotein virus (vRNP) selanjutnya mengalami replikasi dan transkripsi di dalam nukleus. Replikasi RNA virus menghasilkan cRNA (*complementary* RNA) yang selanjutnya diubah kembali menjadi vRNA . Transkripsi vRNA akan menghasilkan mRNA atau *messenger* RNA virus yang selanjutnya akan ditranslasi di sitoplasma dan di retikulum endoplasma. Translasi di sitoplasma menghasilkan sintesis *early* dan *late* protein. *Early* protein terdiri atas protein *polymerase* (PA, PB1, dan PB2), nukleoprotein (NP), dan NS1. *Late* protein terdiri atas M1 dan NS2. *Early* dan *late* protein akan dieksport ke dalam nukleus untuk membentuk kompleks vRNP. Translasi yang terjadi di retikulum endoplasma menghasilkan sintesis protein *envelope* yang terdiri atas HA, NA, dan M2. Protein *envelope* akan mengalami proses pematangan di aparatus golgi kemudian akan membentuk susunan *envelope* virus pada membran plasma. Kompleks vRNP di dalam nukleus dieksport ke sitoplasma oleh protein NS2. Protein *envelope* dan kompleks vRNP yang telah tersusun pada membran plasma selanjutnya melakukan *budding* untuk keluar dari sel inang (Cox *dkk.* 2005: 644--647).



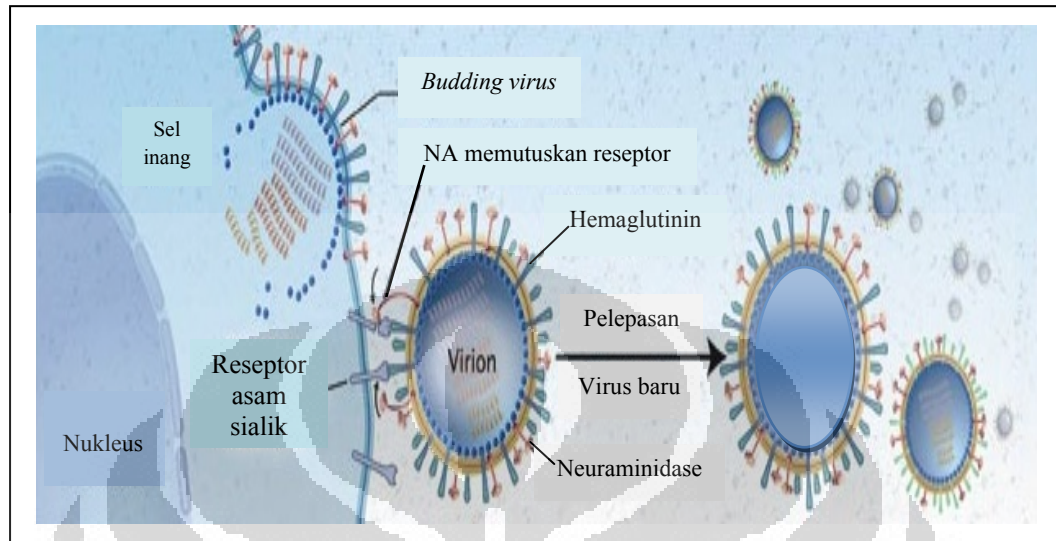
Gambar 2.4.1 Siklus replikasi virus influenza
 [Sumber: Lindenmayer 2007: 1.]

2.5 Protein neuraminidase

Neuraminidase (NA) merupakan antigen glikoprotein yang terdapat pada permukaan *envelope* virus influenza. Neuraminidase merupakan molekul tetramer dengan struktur globular, memiliki berat molekul 60 kDa yang tersusun atas 1.413 nukleotida (Cox *dkk.* 2005: 643 & Gong *dkk.* 2007: 113).

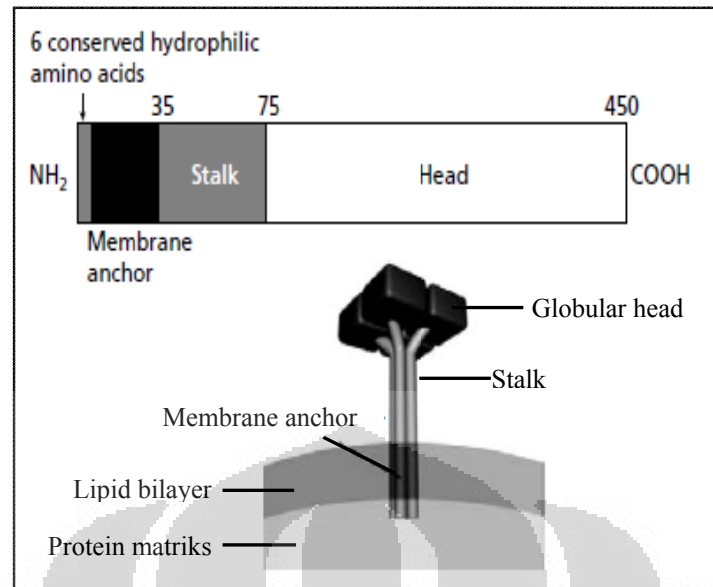
Neuraminidase berperan dalam pelepasan progeni virus yang baru terbentuk dari permukaan sel yang mensintesisnya, sehingga memungkinkan virus untuk menginfeksi sel-sel yang baru. Proses pelepasan progeni virus (virion) diawali dengan pemutusan ikatan α -ketosidik antara terminal asam sialat (*N*-

acetylneuraminic acid) dengan residu glikosil pada glikoprotein (Gambar 2.5(1)) (Varghese 1999: 178; Tarigan *dkk.* 2007: 154).



Gambar 2.5(1) Proses pelepasan virus influenza
[Sumber: Moscona 2005: 1364, diterjemahkan dari aslinya.]

Molekul protein neuraminidase (NA) terdiri atas 3 daerah, yaitu daerah kepala atau *globular head*, daerah batang atau *stalk*, dan daerah hidropobik. Asam amino penyusun neuraminidase pada daerah hidropobik terletak pada posisi 0--35, daerah batang pada posisi 35--75, dan daerah kepala pada posisi 75--450 (Gambar 2.5(2)) (Castrucci & Kawaoka 1993: 759 & 763; Cox *dkk.* 2005: 654--655). Bagian neuraminidase yang berperan penting dalam proses pelepasan progeni virus adalah daerah *globular head*. Hal tersebut disebabkan karena pada daerah *globular head* terdapat situs aktif enzim NA yang dapat memutuskan ikatan antara HA dengan reseptor sel inang (Tisoncik *dkk.* 2011: 1--2; Sultana *dkk.* 2011: 2). Daerah batang atau *stalk* pada neuraminidase juga memiliki peran penting dalam meningkatkan patogenisitas virus AI H5N1. Patogenisitas virus akan meningkat jika terjadi mutasi pada daerah *stalk* tersebut (Tisoncik *dkk.* 2011: 1).



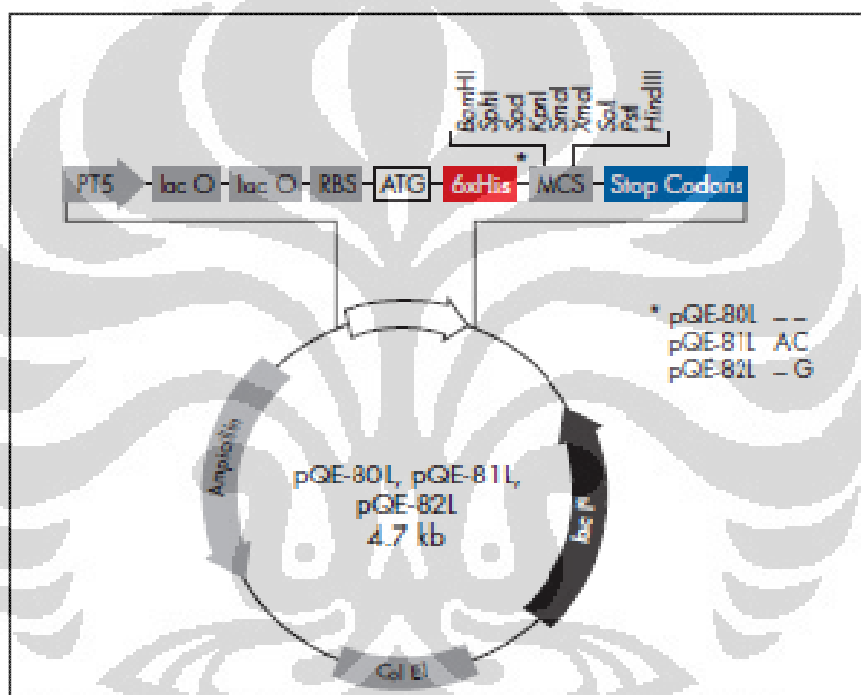
Gambar 2.5(2) Tiga bagian neuraminidase
[Sumber: Cox *dkk.* 2005: 643, dimodifikasi dari aslinya.]

2.6 Vektor ekspresi pQE80L

Vektor pQE80L merupakan salah satu vektor ekspresi, yaitu vektor yang mengandung sinyal-sinyal ekspresi, sehingga gen yang diklon akan ditranskripsi menjadi mRNA kemudian ditranslasi menjadi protein. Tiga sinyal ekspresi yang paling penting antara lain promotor, terminator, dan tempat pengikatan ribosom (Brown 1987: 191).

Vektor pQE80L (Gambar 2.6.1) merupakan vektor ekspresi berukuran 4.751 pb. Vektor pQE80L memiliki (1) promotor T5 yang dikenali oleh RNA polimerase *E. coli*; (2) dua buah sekuens operator *lac* yang berfungsi untuk meningkatkan pengikatan terhadap represor *lac*; (3) *Ribosome Binding Site* berfungsi untuk meningkatkan laju translasi; (4) pada daerah kloning 5' atau 3' terdapat sekuens pengkode *6xHis-tagged* yang berfungsi untuk deteksi dan purifikasi protein target; (5) *Multiple Cloning Site* merupakan daerah yang mengandung situs pengenalan enzim restriksi dan *stop codon* yang merupakan daerah persiapan untuk konstruksi ekspresi protein yang sesuai; (6) dua buah terminator transkripsi yang kuat, yaitu terminator *t0* dari fage lambda dan terminator T1 operon *rrnB* dari *E. coli* untuk mencegah pembacaan terbalik pada saat transkripsi dan untuk memastikan kestabilan konstruksi ekspresi protein; (7)

gen β -lactamase (*bla*) yang berfungsi sebagai gen resistensi terhadap antibiotik ampisilin dan gen *chloramphenicol acetyl transferase* (*cat*) yang terletak di antara terminator *t0* dan T1 tanpa promoter dan dalam keadaan normal tidak diekspresikan; (8) *ColE1* sebagai titik awal terjadinya replikasi (8) Gen *lacI^f* yang terdapat pada daerah *cis*-represor, berfungsi untuk mengkode protein represor *lac* (QIAexpressionist 2001: 15 & 17). Vektor pQE lainnya yang sering digunakan untuk ekspresi protein antara lain pQE9, pQE30--32, pQE40, pQE60, pQE70, pQE81--82L, dan pQE100 (QIAexpressionist 2001: 15).



Gambar 2.6.1 Peta genom vektor ekspresi pQE80L
[Sumber: QIAexpressionist 2001: 33.]

2.7 *E.coli* BL21codon plus

Escherichia coli merupakan salah satu sel inang prokariot yang umum digunakan dalam pengklonaan, baik untuk memperbanyak DNA rekombinan maupun untuk mengeskpresikan gen asing yang diklon. *Escherichia coli* banyak digunakan sebagai sel inang untuk rekombinasi DNA karena *E. coli* dapat mempertahankan stabilitas DNA yang diintroduksi dan dapat berkembang biak secara cepat (Invitrogen 2002: 230). *Strain E. coli* yang banyak digunakan dalam

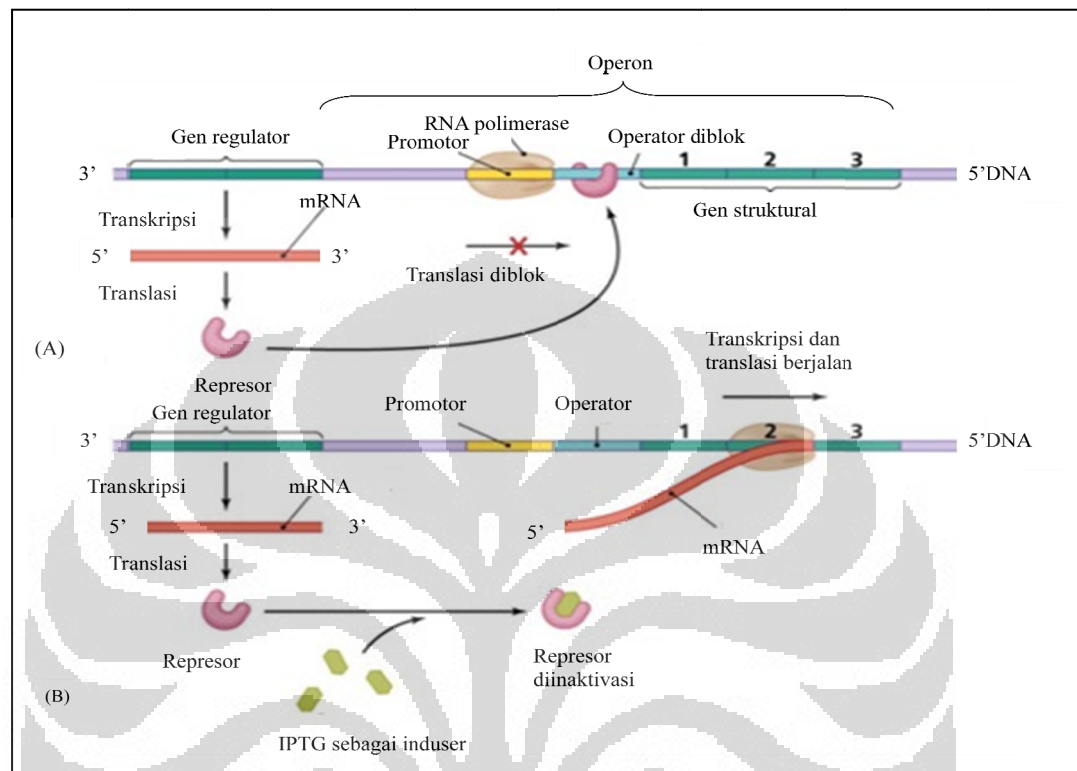
rekayasa genetik antara lain BL21, DH1 α , DH5 α , JM103, XL1-Blue, *codon plus* dan JM109 (Sambrook & Russell 2001: 15.2; A3.6--A3.10).

Sistem ekspresi *E.coli* banyak digunakan dalam pembuatan protein rekombinan karena mudah dimanipulasi dengan gen asing, proses ekspresinya cepat, dan menghasilkan protein dalam jumlah banyak. Akan tetapi, terkadang *E.coli* mengalami kesalahan ekspresi akibat kodon bias, yaitu kesalahan pembacaan kodon yang mengkode asam amino. Kodon bias banyak terjadi akibat kodon arginin yang dikode oleh AGA dan AGG. Kodon AGA dan AGG merupakan kodon yang jarang ditemukan pada sistem ekspresi *E.coli*. Salah satu strain *E.coli* yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah kodon bias adalah *E.coli* BL21 *codon plus*. Hal tersebut disebabkan karena strain *E.coli* BL21 *codon plus* mengandung kodon tambahan pada tRNA seperti *argU*, *ileY*, and *leuW*. Kodon tambahan tersebut dapat mengenali kodon pengkode arginin (AGA dan AGG), isoleusin (AUA), dan leusin (CUA) yang diketahui dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas protein yang dihasilkan oleh *E.coli* (Stratagene 2005: 3).

2.8 Ekspresi protein

Sistem ekspresi prokariot banyak digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan. Hal tersebut disebabkan karena ekspresi gen asing dikontrol oleh sistem represi pada operator, protein dihasilkan pada bagian periplasmik, dan protein yang diekspresi umumnya stabil (Walker & Rapley 2000: 138). Mekanisme ekspresi protein (Gambar 2.8.1) dalam sel prokariot seperti *E.coli* dapat dilakukan melalui induksi *isoprophil- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG). Proses induksi IPTG diawali dengan terikatnya IPTG pada situs pengikatan induser yang terdapat pada protein represor. Pengikatan IPTG pada protein represor tersebut menyebabkan protein represor menjadi tidak aktif. Kompleks induser (IPTG)-protein represor menyebabkan terjadinya perubahan struktural pada situs pengikatan protein represor yang terdapat pada operator. Hal tersebut menyebabkan RNA polimerase dapat berikatan dengan promoter, sehingga terjadi

proses transkripsi dan translasi gen protein yang diinginkan (Gambar 2.7.2) (Walker & Rapley 2000: 129--132; Yuwono 2002: 153--165).



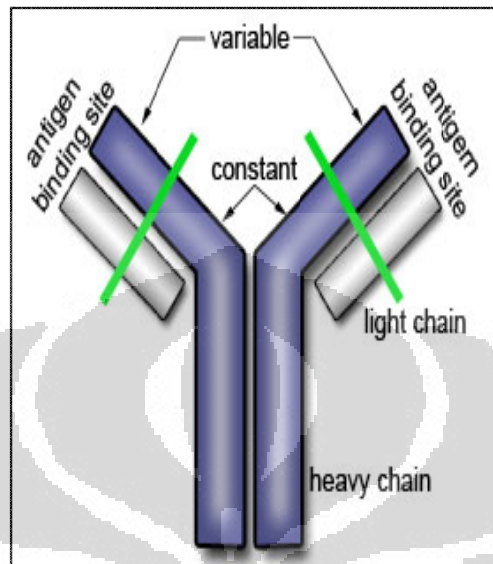
Gambar 2.8.1 Mekanisme ekspresi protein

[Sumber: Prince George Community College: 2006: 2, diterjemahkan dari aslinya.]

2.9 Antibodi

Antibodi adalah substansi yang diproduksi oleh tubuh akibat dari terjadinya suatu respon imun dan bereaksi secara spesifik dengan antigen. Antibodi dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi dan diferensiasi sel B sebagai respon terhadap paparan antigen. Fungsi utama antibodi adalah mengikat antigen dan menghantarkannya ke sistem efektor pemusnahan (Baratawidjaja & Rengganis 2009: 158). Antibodi mempunyai struktur yang terdiri atas dua rantai ringan (*light chain*) dan dua rantai berat (*heavy chain*) yang dihubungkan dengan ikatan disulfida membentuk huruf “Y” (Gambar 2.9.1). Rantai berat terdiri atas daerah variabel yang berfungsi sebagai daerah pengikatan

antigen dan daerah konstan yang berfungsi untuk berikatan dengan permukaan sel reseptor (Baratawidjaja & Rengganis 2009: 74--75; Slonane 2005: 256).



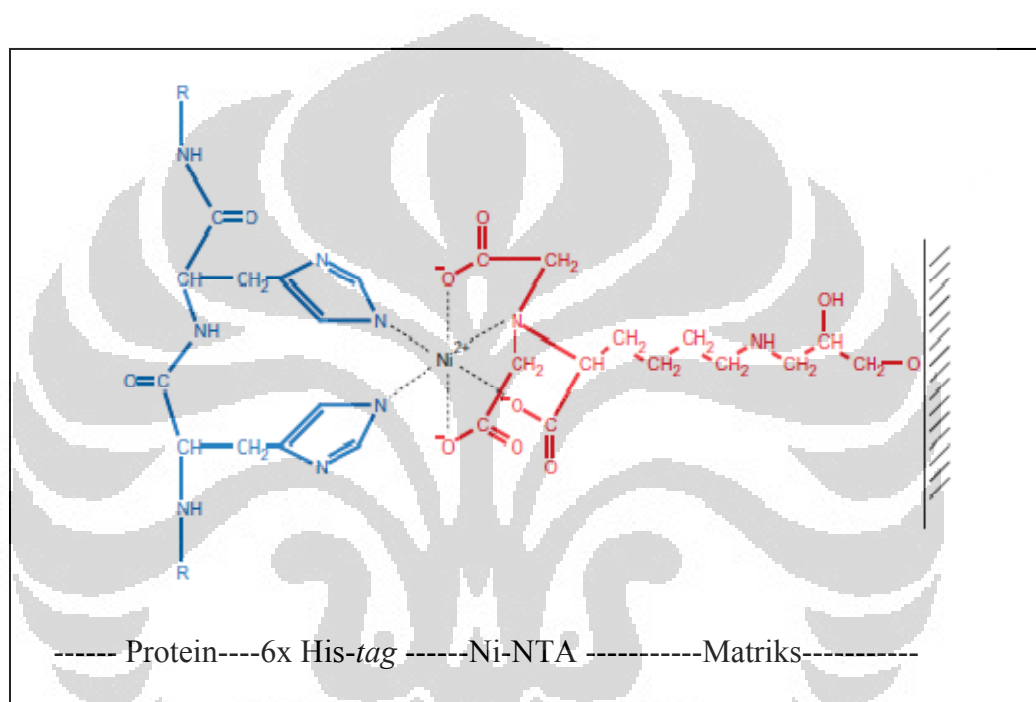
Gambar 2.9.1 Struktur antibodi
[Sumber: Raghava 2010: 1.]

2.10 Purifikasi protein

Purifikasi adalah suatu proses pemurnian protein rekombinan dari protein lain yang juga diekspresikan dan dihasilkan oleh sel inang. Salah satu metode purifikasi protein rekombinan adalah dengan metode *Immobilized-metal affinity chromatography* (IMAC). IMAC merupakan suatu metode purifikasi protein berdasarkan kemampuan asam amino untuk berikatan dengan ion logam. Ion logam yang digunakan dalam metode IMAC diantaranya Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , dan Zn^{2+} . Asam amino seperti histidin, sistein, triptofan, dan arginin memiliki kelompok elektron pendonor pada rantai samping. Kelompok elektron pendonor tersebut merupakan faktor penting untuk dapat berikatan dengan ion logam (Petty 1996: 9.4.12; Zachariou 2008: 38).

Purifikasi protein dengan metode IMAC dapat dilakukan dengan menggunakan resin Ni-NTA. Purifikasi protein dengan resin Ni-NTA berdasarkan pengikatan protein rekombinan yang berlabel 6x His-tag dengan ion nikel (Gambar 2.10.1) (QIAexpressionist 2001:18--19). Proses purifikasi protein

rekombinan menggunakan resin Ni-NTA dilakukan melalui 3 tahapan. Tahap pertama merupakan tahap pengikatan 6x-Histag pada ujung terminal protein rekombinan dengan ion Ni^{2+} pada resin NI-NTA. Tahap kedua purifikasi adalah tahapan pencucian untuk menghilangkan protein non target yang juga memiliki residu histidin. Tahap terakhir purifikasi adalah tahap elusi, yaitu pelepasan protein rekombinan target yang mengandung 6x-Histag dari resin Ni-NTA (QIAexpressionist 2001: 69--71).



Gambar 2.10.1 Pengikatan protein rekombinan berlabel 6x His-tag dengan Ni-NTA

[Sumber: Macherey-Nagel 2011: 7.]

2.11 Kelinci *American Dutch*

Menurut sistem Binomial *Linnaeus* (NCBI 2011: 1), kelinci *American Dutch* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kerajaan	: Animalia
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Lagomorpha
Famili	: Leporidae
Sub famili	: Leporine
Genus	: <i>Oryctolagus</i>
Spesies	: <i>Oryctolagus cuniculus</i>

Kelinci *American Dutch* merupakan salah satu jenis kelinci yang berasal dari Belanda dan berkembang di Amerika Serikat dan Australia. Kelinci *American Dutch* memiliki karakteristik tubuh berwarna hitam dengan garis putih di sekeliling leher, bermata hitam dengan telinga tegak, memiliki rambut yang halus dan tidak tebal (Gambar 2.11.1). Kelinci *American Dutch* dewasa memiliki berat tubuh 4,5--5 kg dan beranak 7--8 ekor (Verlannahill Rabbits 2011: 1--3)

Kelinci *American Dutch* banyak digunakan dalam uji serologis karena dapat memproduksi serum antibodi spesifik sebagai respon terhadap antigen. Pemeliharaan kelinci *American Dutch* tidak membutuhkan biaya yang besar, siklus hidup pendek, memiliki daya tahan yang sangat kuat terhadap penyakit, mudah beradaptasi dengan tempat lingkungan yang baru, dan tidak memerlukan tempat yang luas (Pusat Pengembangan Penyuluhan Pertanian 2010: 2).



Gambar 2.10.1. Kelinci *American Dutch*
[Sumber: Verlanahill Rabbity2011: 4.]

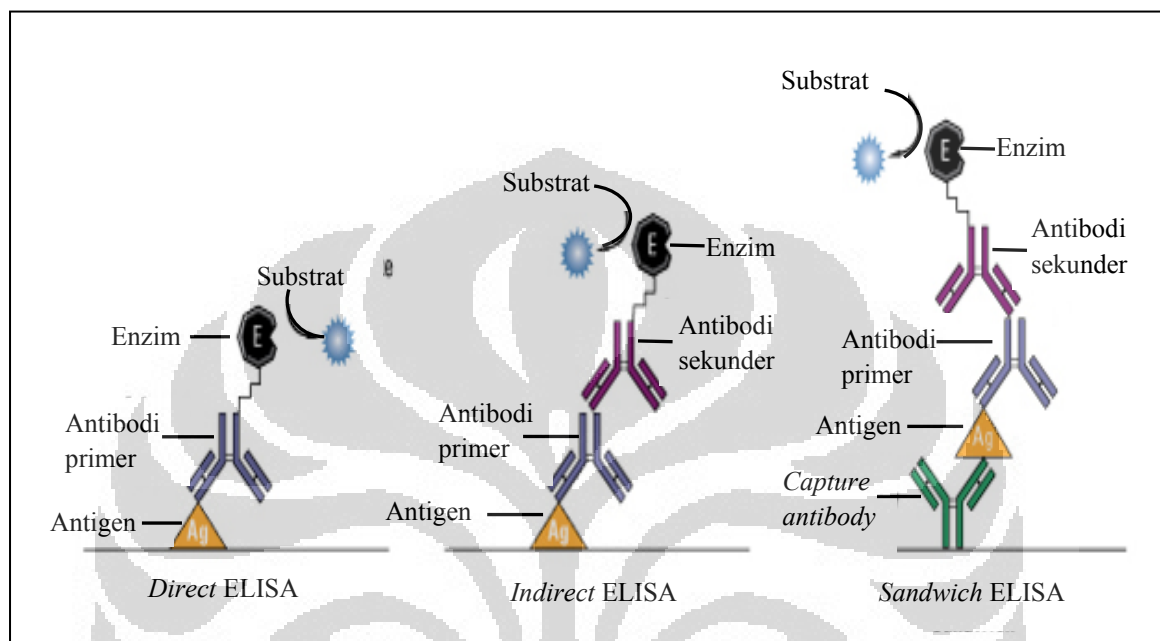
2.12 Uji serologis

2.12.1 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA merupakan suatu metode atau teknik imunologi berdasarkan ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. ELISA berfungsi untuk mengidentifikasi keberadaan antigen atau antibodi dalam sampel, untuk mengukur konsentrasi antigen atau antibodi dalam sampel, dan sebagai alat diagnostik suatu penyakit. Uji serologis dengan metode ELISA memiliki beberapa keuntungan, di antaranya proses pengerjaannya relatif cepat, memiliki sensitifitas yang tinggi, dapat menguji sampel dalam jumlah banyak, dan volume sampel yang digunakan sangat sedikit (Muflihanah 2009: 303).

Pengujian ELISA dibagi ke dalam tiga metode, yaitu ELISA langsung (*direct ELISA*), ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*), dan *sandwich ELISA* (Gambar 2.12.1.1). Metode *direct ELISA* dilakukan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antigen. Pada metode *direct ELISA*, antibodi yang dilabeli enzim berikatan langsung dengan antigen. Metode *indirect ELISA* dilakukan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antibodi. Pada metode *indirect ELISA*, antibodi yang dilabeli enzim tidak berikatan langsung dengan antigen. *Sandwich ELISA* merupakan metode pendeteksian antigen yang dikenali oleh dua

buah antibodi yang spesifik. Antibodi pertama berfungsi sebagai antibodi penangkap (*capture antibody*) dan antibodi kedua berfungsi sebagai antibodi pendeteksi yang berkonjugasi dengan enzim (Muflihanah 2009: 304; Thermo Scientific 2011: 3).



Gambar 2.12.1.1 Tiga macam metode ELISA
[Sumber: Thermo Scientific 2011:2, diterjemahkan dari aslinya.]

2.12.2 Western Blot

Western blot merupakan suatu metode untuk mengetahui reaktivitas antibodi dan antigen dengan cara mentransfer protein dari gel SDS-PAGE ke membran. Membran yang digunakan dalam metode *western blot* di antaranya membran nitroselulosa, *polyvinylidene difluoride* (PVDF), atau membran nilon. Ketiga jenis membran tersebut memiliki sifat yang lebih fleksibel daripada gel, sehingga protein yang terblot pada membran dapat dideteksi dengan cara visual maupun fluoresensi. *Western blot* merupakan metode yang pengerjaannya relatif cepat dan memiliki sensitifitas yang tinggi terhadap pendeteksian reaktivitas antigen-antibodi dalam suatu sampel (Gallagher 1996: 10.10.1).

Proses deteksi antigen-antibodi pada metode *western blot* dapat dilakukan dengan beragam cara seperti berikut: 1) *Colorimetric detection*, yaitu deteksi

menggunakan substrat yang dapat bereaksi dengan *reporter enzyme* pada antibodi, sehingga terjadi perubahan warna substrat pada membran nitroselulosa;

2) *Chemiluminescent*, yaitu deteksi menggunakan substrat yang akan teriluminasi jika bereaksi dengan *reporter enzyme* pada antibodi, kemudian hasilnya diukur dengan densitometri untuk mengetahui jumlah protein yang terwarnai;

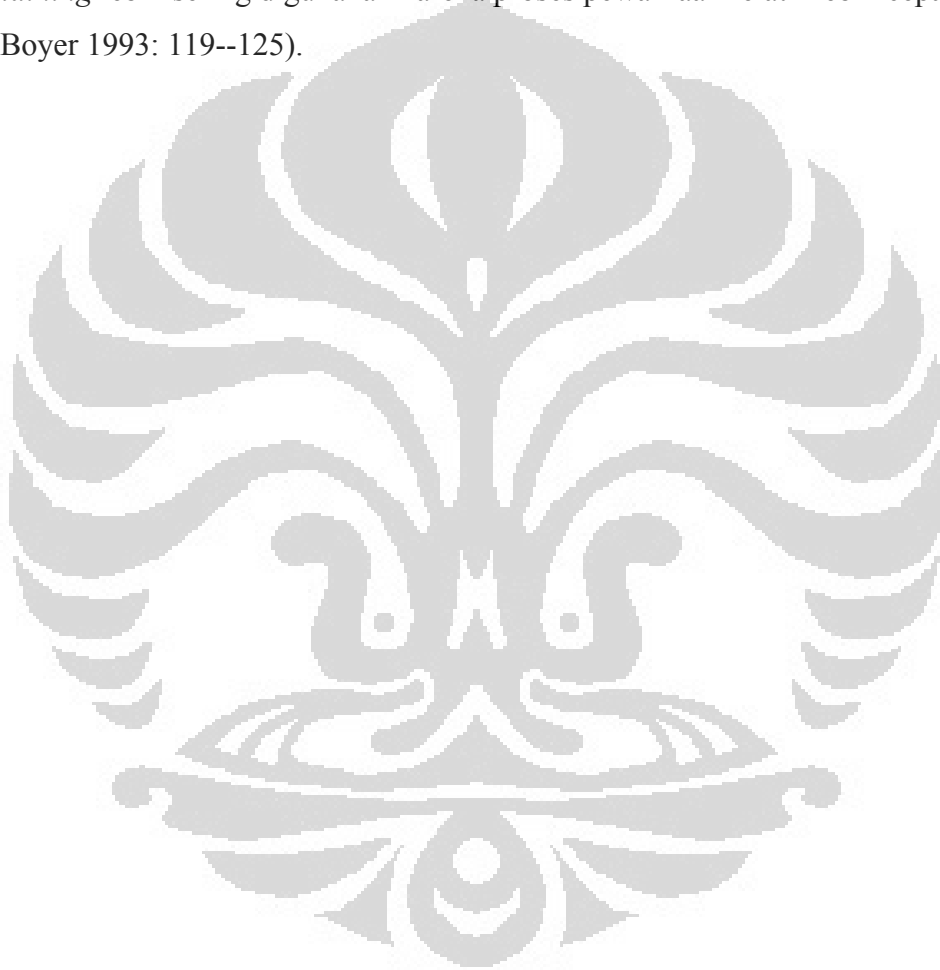
3) *Radioactive detection*, yaitu deteksi menggunakan X-ray, reaksi antigen dengan antibodi yang dilabeli radioaktif akan menghasilkan daerah gelap pada X-ray; 4) *Fluorescent detection*, yaitu deteksi menggunakan *fluorescence dye*, reaksi antigen dengan antibodi yang dilabeli dengan *fluorescence dye* akan mengalami fluoresensi kemudian dideteksi oleh fotosensor seperti kamera CCD yang menangkap *image* digital dari *western blot* (Gallagher 1996: 10.10.1--10.10.5).

2.13 *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah suatu metode elektroforesis yang menggunakan poliakrilamid sebagai medium yang digunakan untuk membuat gel dan *sodium dodecyl sulphate* yang berfungsi untuk mendenaturasi protein dalam bentuk protein sekunder, tersier, dan kuaterner menjadi struktur yang lebih sederhana. Fungsi lain dari *sodium dodecyl sulphate* adalah untuk menghambat interaksi hidrofobik dan merusak ikatan *hydrogen* (Davis dkk. 1994: 157).

Metode yang digunakan dalam sistem elektroforesis gel protein adalah metode *continous* dan *discontinous*. Metode *continous* adalah metode yang menggunakan satu jenis buffer pada sistemnya, sedangkan metode *discontinous* adalah metode yang menggunakan dua jenis *buffer* pada sistemnya saat proses elektroforesis. *Buffer* yang digunakan dalam metode *discontinuous* ialah *stacking buffer* dan *resolving buffer* (*separating buffer*). *Stacking buffer* berperan pada proses awal elektroforesis, memiliki kemampuan untuk menahan sampel yang di-*loading* dalam posisi yang sama sebelum dipisahkan pada *resolving buffer*, sedangkan *resolving buffer* (*separating buffer*) berfungsi untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya (Boyer 1993: 117).

Proses penting dalam SDS-PAGE adalah pewarnaan (*staining*). Beberapa jenis pewarnaan yang dapat digunakan dalam melihat sampel, di antaranya *commasie blue staining*, *silver salt staining*, dan *cyber green*. Pewarnaan dengan *silver salt staining* akan menghasilkan pita protein berwarna keperakan. Pewarnaan dengan *cyber green* akan menghasilkan pita protein berwarna hijau *fluorescence*. Pewarnaan protein dengan *commasie blue staining* akan menghasilkan pita protein berwarna biru. Pewarnaan dengan *commasie blue staining* lebih sering digunakan karena proses pewarnaan relatif lebih cepat (Boyer 1993: 119--125).



BAB 3 METODE 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 lantai 8, Jakarta Pusat. Penelitian dilakukan selama 6 bulan, yaitu dari bulan Maret sampai Agustus 2011.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian antara lain, mikropipet berbagai ukuran (2 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l, 200 μ l, dan 1.000 μ l) [Bio-rad]; tips mikropipet [Sorenson Bioscience, Inc.]; *shaker incubator* [New Brunswick Scientific]; inkubator [Inco 2]; *sonicator* [Branson Sonifier 250]; sentrifugator [Allegra™ X-12 Centrifuge Beckman Coulter & Sorvall Biofuge Primo]; *vortex* [Heidolph reaxtop]; *heat-block* (multi-line heater)[Lab-line]; perangkat elektroforesis [Bio-rad]; autoklaf [Hirayama]; timbangan elektrik [Adventurer™ Ohaus]; *magnetic stirrer* [Lab. Companion HP-3000]; lemari pendingin [GEA & SANYO]; *freezer -20° C* [LG]; *bio safety cabinet* (BSC) [ESCO]; *ice maker* [Hoshizaki]; rak tabung [Nalgene]; cawan petri [Normax & Kimax]; tabung Falcon ukuran 15 ml & 50 ml [Becton Dickinson & Corning]; tabung mikrosentrifugasi [Axygen]; labu Erlenmeyer dan botol berbagai ukuran [Schott Duran]; gelas ukur berbagai ukuran (10 ml, 25 ml, 50 ml, & 100 ml) [Iwaki Pyrex]; perangkat komputer [LG]; *scanner* [Canon]; *Trans Blot Semy Dry Electrophoresis Transfer Cell* [Bio-Rad]; *Elisa reader* [Bio-Rad]; sarung tangan [SENSI gloves]; masker [Pro-mask]; *plastic seal* [KP]; parafilm [Sigma-aldrich]; aluminium foil; dan alat tulis.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan uji

Sampel yang digunakan adalah sel *Escherichia coli* BL21 *Codon Plus* [Amersham Pharmacia] yang membawa sekuens gen *globular head NA* dalam plasmid pQE-80L [Qiagen] dan 1 ekor kelinci (*American Dutch Rabbit*).

3.2.2.2 Medium

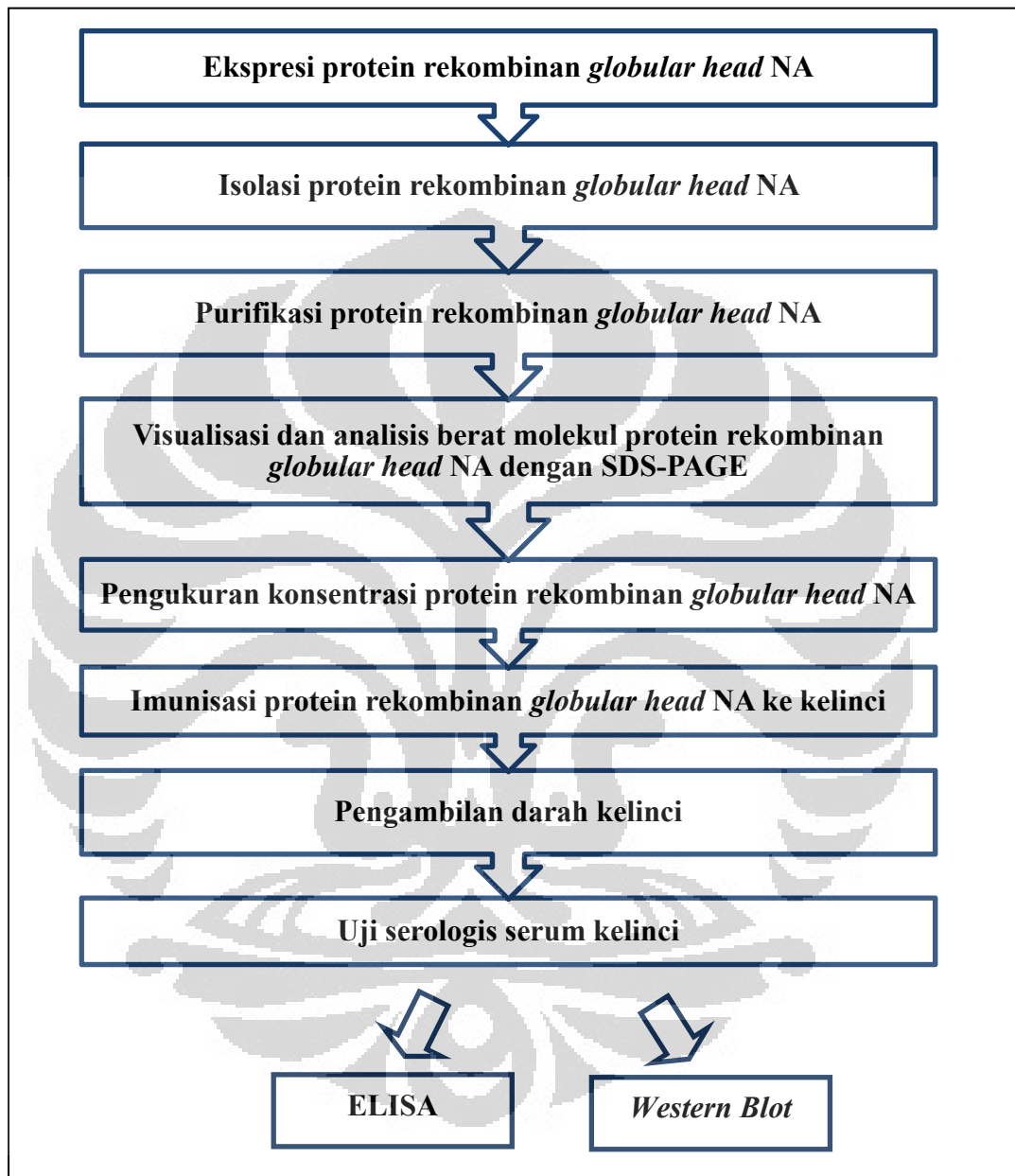
Medium yang digunakan adalah medium LB (Luria Bertani) cair, dan medium LB (Luria Bertani) agar.

3.2.2.3 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain *yeast extract* [Bio Basic Inc.]; NaCl [Merck]; tripton [Bio Basic Inc.]; ampisilin [ViccillinR 100]; akuades; alkohol 70%; LB agar [Sigma]; Sodium Dedosil Sulfat (SDS) 10% [Promega]; akrilamid 30% [Promega]; TEMED; Ammonium Persulfat (APS) 10% [Promega], Tris HCl, Tris *Base* [Promega]; glicin [Promega]; *loading buffer* 1x [Biolabs]; *running buffer* [Biolabs]; asam asetat glasial (CH₃COOH) [Merck]; metanol [Merck]; *Commasie brilliant blue* 0,2% [Bio-Rad]; IPTG 1M; EDTA [Biobasic]; Marka protein (*Unstained Protein Ladder*) [Fermentas]; gliserol [Sigma]; imidazol [Fermentas]; membran nitroselulosa [Amersham bioscience]; PBS [Sigma]; *o-phenylenediamine* (OPD) [Sigma]; H₂SO₄ [Merck]; reagen A & B [Bio-Rad]; Tween-20 [Sigma]; Streptavidine-HRP [Chemicon]; *goat antirabbit* Igg berlabel biotin [Chemicon]; gelatin [Bio-Rad] substrat DAB [Sigma].

3.3 Cara kerja

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.3.1



Gambar 3.3.1 Skema kerja penelitian

3.3.1 Pembuatan larutan, medium, dan *buffer*

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

3.3.2 Ekspresi protein rekombinan *globular head* NA

Prosedur ekspresi protein rekombinan *globular head* NA virus influenza A H5N1 dilakukan berdasarkan Sambrook & Russel (2001: 15.16). Sebanyak satu ose kultur *E. coli* BL21 *codon plus* yang mengandung DNA rekombinan, vektor ekspresi pQE-80L *wildtype*, dan *E. coli* BL21 *codon plus wildtype* diinokulasikan ke dalam 10 ml medium LB cair yang sebelumnya telah ditambahkan 10 μ l ampisilin. Kultur sel diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37⁰ C dengan kecepatan 200 rpm selama \pm 16 jam (semalaman).

Sebanyak 400 μ l kultur sel hasil inkubasi (*overnight*) dimasukkan ke dalam 20ml medium LB cair. Kultur diinkubasi kembali di dalam *shaker incubator* pada suhu 37⁰ C dengan kecepatan 200 rpm selama 3 jam atau saat OD₆₀₀ sel mencapai 0,3. Sebanyak 1 ml kultur diambil setelah OD₆₀₀ mencapai 0,3 sebelum dilakukan induksi IPTG. Kultur tersebut digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan sisa kultur sebanyak 19 ml akan diinduksi dengan IPTG (kontrol positif). Sampel kontrol negatif selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 100 μ l 1x *sample buffer* SDS PAGE. Resuspensi pelet sampel kontrol negatif disimpan pada suhu -20⁰ C sampai dibutuhkan untuk elektroforesis SDS-PAGE.

Sisa kultur sebanyak 19 ml diinduksi dengan 1,9 μ l IPTG 0,1 mM. Kultur selanjutnya diinkubasi selama 1--4 jam (OD₆₀₀ \pm 1) dalam *shaker incubator* pada suhu 37⁰ C dengan kecepatan 200 rpm. Setiap 1 jam, kultur diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung baru. Kultur selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disimpan pada suhu -20⁰C untuk selanjutnya dilakukan visualisasi dengan SDS-PAGE dan purifikasi protein rekombinan menggunakan Ni-NTA.

3.3.3 Isolasi protein rekombinan *globular head* NA

Prosedur isolasi protein rekombinan *globular head* NA virus AI H5N1 menggunakan metode sonikasi berdasarkan metode QIAexpressionist (2001: 78).

Isolasi protein rekombinan dilakukan dengan menggunakan metode sonikasi. Pelet sel yang dihasilkan dari proses ekspresi diresuspensikan dengan 2--5 ml lisis *buffer* per gram berat basah pelet. Pelet sel selanjutnya disonikasi selama 10 x 10 detik dengan interval waktu selama 10 detik pada 200--300 Watt. Semua pengerjaan sonikasi dilakukan di atas es. Sampel yang telah disonikasi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4° C. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung baru untuk selanjutnya digunakan sebagai bahan untuk purifikasi protein rekombinan *globular head* NA menggunakan resin Ni-NTA.

3.3.4 Purifikasi protein rekombinan *globular head* NA

Prosedur purifikasi protein rekombinan *globular head* NA virus AI H5N1 dilakukan berdasarkan metode QIAexpressionist (2001: 82--83). Sebanyak 5 ml supernatan hasil sonikasi ditambahkan dengan 1 ml resin Ni-NTA. Campuran selanjutnya diaduk dengan hati-hati menggunakan *shaker* selama 60--120 menit pada suhu 4° C. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan disimpan pada suhu -20° C untuk perlakuan selanjutnya. Sebanyak 5 ml *wash buffer* ditambahkan pada pelet sebagai tahapan pencucian. Campuran pelet dan *wash buffer* diaduk menggunakan *shaker* selama 5--15 menit pada suhu 4° C. Setelah inkubasi, sampel 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 *washing* (W₁--W₆). Seluruh supernatan hasil pencucian (W₁--W₆) disimpan pada suhu -20° C untuk selanjutnya divisualisasi dengan SDS-PAGE.

Protein rekombinan *globular head* NA yang telah terikat pada resin Ni-NTA dielusi dengan *elution buffer* (EB) sebanyak 500µl. Sampel yang telah dielusi selanjutnya diinkubasi selama 60 menit dan digoyang di atas *shaker* pada suhu 4° C. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung baru. Proses elusi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

Supernatan hasil pencucian (W1--W3), dan hasil elusi (E₁--E₃) divisualisasi dengan SDS-PAGE 12%.

3.3.5 Visualisasi dan analisis berat molekul protein rekombinan *globular head* NA dengan SDS-PAGE

Visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein *globular head* NA dilakukan dengan SDS-PAGE berdasarkan Sambrook & Russell (2001: A8.40). *Glass plate sandwich (short plate & spacer plate)* yang akan digunakan dalam elektroforesis gel SDS-PAGE dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun dan dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dikeringkan. Persiapan perangkat elektroforesis dengan meletakkan *short plate* di depan *spacer plate*. Kedua kaca tersebut dimasukkan ke dalam *casting frame* dan bagian bawahnya dijaga agar tetap rata kemudian dikunci dengan menekan *cams*. *Casting frame* dipasang pada *casting stand* yang telah disiapkan.

Larutan *resolving gel* dibuat berdasarkan tabel 3.3.5(1). Larutan *resolving gel* kemudian dimasukkan di antara celah *short plate* dan *spacer plate* hingga dua per tiga bagian. Akuades ditambahkan hingga batas atas kaca dan ditunggu sekitar 20 menit hingga terbentuk agar. Pembuatan larutan *stacking gel* berdasarkan tabel 3.3.5(2). Akuades yang terdapat pada bagian atas *resolving gel* dibuang dan dikeringkan dengan menggunakan tisu. Larutan *stacking gel* kemudian dimasukkan sampai batas atas kaca diikuti dengan pemasangan *comb* dan ditunggu sekitar 20 menit hingga terbentuk gel.

Gel yang telah selesai dicetak, dipindahkan dari *casting stand* dengan cara memutar *cams* pada *casting frame*. *Gel cassette sandwich* diletakkan pada *electrode assembly* dengan posisi *short plate* menghadap ke arah dalam. *Gel cassette sandwich* yang telah dipasang pada *electrode assembly* dimasukkan ke dalam *clamping frame*. Bagian atas *electrode assembly* ditekan secara perlahan-lahan, lalu kedua *camp levers* dari *clamping frame* ditutup.

Lower inner chamber dimasukkan ke dalam *elektrophoresis tank* dan diisi dengan *running buffer*. Sampel hasil ekspresi dan purifikasi protein rekombinan *globular head* NA masing-masing diambil sebanyak 10 µl lalu dicampur dengan

20 μ l 1x *sample buffer*. Campuran kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 10 menit pada *heat block*. Marka protein *PageRulerTM unstained* disiapkan dengan mencampurkan 3 μ l marka protein dengan 17 μ l 1x *sample buffer*. Marka protein dan sampel protein rekombinan *globular head NA* dimasukkan ke dalam sumur gel, masing-masing sebanyak 20 μ l. Gel selanjutnya *dirunning* dalam *running buffer* pada tegangan 150 volt, 400mA selama 70 menit. Gel yang telah selesai *dirunning* selanjutnya diangkat dan direndam dalam *commassie blue* selama 15--20 menit. Gel dibilas dengan *destaining solution* selama 30 menit sampai latar belakang gel menjadi jernih, lalu gel dikeringkan dilapisi dengan plastik mika agar dapat didokumentasikan dengan *scanner*.

Tabel 3.3.5(1) Komposisi *resolving gel* (untuk 7 ml*)

Reagen	Prosentase gel (%)			
	15	12	10	7
1,5 M Tris (pH 8,8) (ml)	1.75	1.75	1.75	1.75
10% SDS (ul)	70	70	70	70
30% akrilamid (ml)	3.5	2.8	2.33	1.63
H2O (ml)	1.638	2.338	2.8047	3.504
10% APS (ul)	15	15	15	15
TEMED (ul)	3	3	3	3

* untuk 2 gel

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 5.44--5.45.]

Tabel 3.3.5(2) Komposisi *Stacking gel*

Reagen	Volume
0,5 M Tris (pH 6,8)	0.75ml
30% akrilamid	0.4ml
10% SDS	30 ul
H ₂ O	1.812 ml
10% APS	15 ul
TEMED	3 ul

* untuk 2 gel

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 5.44--5.45.]

Penghitungan berat molekul protein rekombinan *globular head* NA berdasarkan hasil SDS-PAGE dengan membuat kurva standar berat molekul marka protein. Kurva standar merupakan korelasi antara nilai Rf (*Retention factor*) dan nilai logaritma berat molekul marka protein (Gallagher 1995: 10.1.30). Nilai Rf diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi pita protein dari bagian atas *separating* gel dengan jarak migrasi larutan pada bagian bawah gel. Nilai logaritma diperoleh dengan cara menghitung masing-masing nilai logaritma dari berat molekul marka protein yang digunakan.

Persamaan garis linear ditentukan berdasarkan kurva standar yang terbentuk, yaitu dengan cara memasukkan nilai Rf (X) dan nilai logaritma berat molekul marka protein (Y). Berat molekul protein *globular head* NA didapatkan dengan cara memasukkan nilai Rf protein *globular head* NA ke dalam persamaan linier. Selanjutnya nilai yang diperoleh dari persamaan linier tersebut dikonversi dengan anti-log untuk mendapatkan ukuran berat molekul protein *globular head* NA yang sebenarnya dalam satuan kDa.

3.3.6 Penentuan konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA

Konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA ditentukan dengan metode *DC Protein Assay*, menggunakan pelat 96 well. Sebanyak 20 mg BSA dilarutkan dengan 1 ml *elution buffer*-gliserol. Larutan tersebut kemudian diencerkan 1/10 untuk memperoleh konsentrasi BSA 2 mg/ml. Larutan BSA 2

mg/ml diambil sebanyak 750 μ l dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan dengan 250 μ l *elution buffer*-gliserol. Kemudian untuk memperoleh konsentrasi BSA 1,5 mg/ml, sebanyak 666 μ l larutan BSA 2 mg/ml dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan dengan 334 μ l *elution buffer*-gliserol. Larutan BSA 1,5 mg/ml diambil sebanyak 500 μ l lalu dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan dengan 500 μ l *elution buffer*-gliserol, untuk memperoleh konsentrasi BSA 1 mg/ml. Larutan BSA 1 mg/ml diambil sebanyak 500 μ l lalu dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan dengan 500 μ l *elution buffer*-gliserol, untuk memperoleh konsentrasi BSA 0,5 mg/ml. Larutan BSA 0,5 mg/ml selanjutnya diambil sebanyak 500 μ l lalu dipindahkan ke tabung berikutnya dan ditambahkan dengan 500 μ l *elution buffer*-gliserol, sehingga didapatkan konsentrasi akhir BSA 0,125 mg/ml.

Seluruh larutan BSA, blanko (larutan *elution buffer*-gliserol) dan protein rekombinan *globular head* NA dimasukkan ke dalam sumur pelat 96 *well* sebanyak 5 μ l dan dibuat duplo. Selanjutnya sebanyak 200 μ l Reagen A dan 25 μ l Reagen B diteteskan ke dalam masing-masing sumur yang berisi larutan BSA dan protein *globular head* NA. Sampel kemudian diinkubasi selama 30 detik dengan shaker. Kemudian sampel diinkubasi selama kurang lebih 5 menit pada suhu ruang. Pelat kemudian dimasukkan ke dalam Elisa Reader. *Optical Density* (OD) larutan dibaca dengan panjang gelombang 655 nm. Kemudian nilai OD dimasukkan ke dalam tabel data absorbansi dan dibuat kurva standar konsentrasi BSA. Konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA dapat ditentukan berdasarkan kurva standar BSA dengan memasukkan nilai OD protein rekombinan *globular head* NA ke dalam persamaan linier.

3.3.7 Imunisasi protein rekombinan *globular head* NA ke kelinci

Satu ekor kelinci betina jenis *American Dutch* yang digunakan dalam penelitian berumur 8 bulan dan memiliki berat badan sekitar 2,0--2,5 kg. Imunisasi yang dilakukan berdasarkan prosedur *Current Protocols of Molecular Biology* (1998: 11.12.1--11.12.4). Kelinci dibius terlebih dahulu sebelum disuntik dengan antigen. Pembiusan atau sedasi dilakukan untuk mencegah timbulnya

luka atau stres selama perlakuan. Sedasi menggunakan campuran 50 mg/kg *ketamine* dan 5 mg/kg *xylazine* diberikan secara intramuskular ke tubuh kelinci. Pemberian *ketamine-xylazine* menyebabkan otot menjadi relaksasi (Donovan & Brown 1999: 1.4.3).

Imunisasi dilakukan dengan cara menyuntikkan protein rekombinan *globular head* NA yang telah dipurifikasi secara intramuskular pada bagian paha kaki belakang. Konsentrasi antigen yang disuntik sebesar 500 µg/ml dan tidak diemulsi dengan adjuvan. Penyuntikan dilakukan sebanyak 4 kali, yaitu 1 kali imunisasi primer dan 3 kali *booster* (pengulangan) dengan interval 2 minggu.

3.3.8 Pengambilan darah kelinci

Darah kelinci diambil sebanyak 4 kali, yaitu sebelum imunisasi, 2 minggu setelah imunisasi primer, *booster* 1, 2, dan 3. Darah kelinci diambil dari pembuluh darah vena pada bagian daun telinga kelinci menggunakan *syringe* volume 1 ml. Bagian daun telinga kelinci dibersihkan dengan alkohol 70% dan diurut terlebih dahulu sampai pembuluh vena terlihat jelas. Selanjutnya *syringe* disuntikkan pada pembuluh vena tersebut, lalu darah diambil sebanyak 1ml.

Darah selanjutnya ditampung ke dalam tabung yang steril. Darah kelinci yang telah diperoleh baik darah *preimmune*, darah setelah imunisasi primer, *booster* 1, 2, dan 3 diinkubasi pada suhu 4°C *overnight*. Serum yang telah terpisah dari sel-sel darah diambil dengan menggunakan mikropipet. Sisa serum yang masih bercampur dengan sel darah merah disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Serum yang diperoleh ditambahkan gliserol dengan perbandingan 1:1 lalu disimpan pada suhu -20°C untuk perlakuan lebih lanjut. (Suryadi *dkk.* 2006: 18)

3.3.9 Uji serologis serum kelinci

3.3.9.1 ELISA

Uji serologis serum kelinci dengan ELISA dilakukan berdasarkan prosedur *Current Protocols of Molecular Biology* (2003: 11.2.2--11.2.5). Sebanyak 4 serial dilusi antigen protein *globular head* NA dalam *coating buffer* dibuat dengan konsentrasi 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml. Serial dilusi yang telah dibuat selanjutnya dimasukkan ke dalam sumur pelat ELISA sebanyak 100 µl tiap sumur. Pelat ELISA ditutup dengan alumunium dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Usai inkubasi, pelat dicuci 3x dengan 1x PBS-*Tween* 20 sebanyak 70 µl tiap sumur. Antigen diblok dengan *blocking solution* (gelatin 1% dalam 1x PBS) sebanyak 50µl. Pelat ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Usai inkubasi, pelat dicuci 3x dengan 1x PBS-*Tween* 20 sebanyak 70µl tiap sumur.

Serum yang mengandung antibodi kelinci diencerkan dalam *dilution buffer* (0,1% gelatin dalam PBS 1x). Empat serial dilusi serum yang akan dibuat diantaranya 1/25, 1/50, 1/100, dan 1/200. Keempat serial dilusi serum tersebut ditambahkan ke dalam tiap sumur pelat ELISA sebanyak 50 µl. Pelat selanjutnya ditutup dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 37°C. Pelat kemudian dicuci 3x dengan 1x PBS-*Tween* 20 sebanyak 70 µl. Antibodi sekunder, berupa *goat anti rabbit* berlabel biotin diencerkan dalam *dilution buffer* (0,1% gelatin dalam PBS 1x), dengan pengenceran 1:500. Antibodi sekunder tersebut selanjutnya ditambahkan ke dalam sumur sebanyak 50 µl, lalu pelat ditutup dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 37°C. Pelat dicuci 3x dengan 70µl 1x PBS-*Tween* 20) setelah diinkubasi.

Sebanyak 50 µl Streptavidin-HRP (dengan pengenceran 1:1000 dalam 1x PBS) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur. Pelat ditutup dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 37°C. Pelat kemudian dicuci 3x dengan 70µl 1x PBS-*Tween* 20). Masing-masing sumur ditambahkan dengan substrat *o-phenylenediamine* (OPD) sebanyak 50 µl, lalu pelat diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Penambahan substrat OPD menyebabkan adanya perubahan

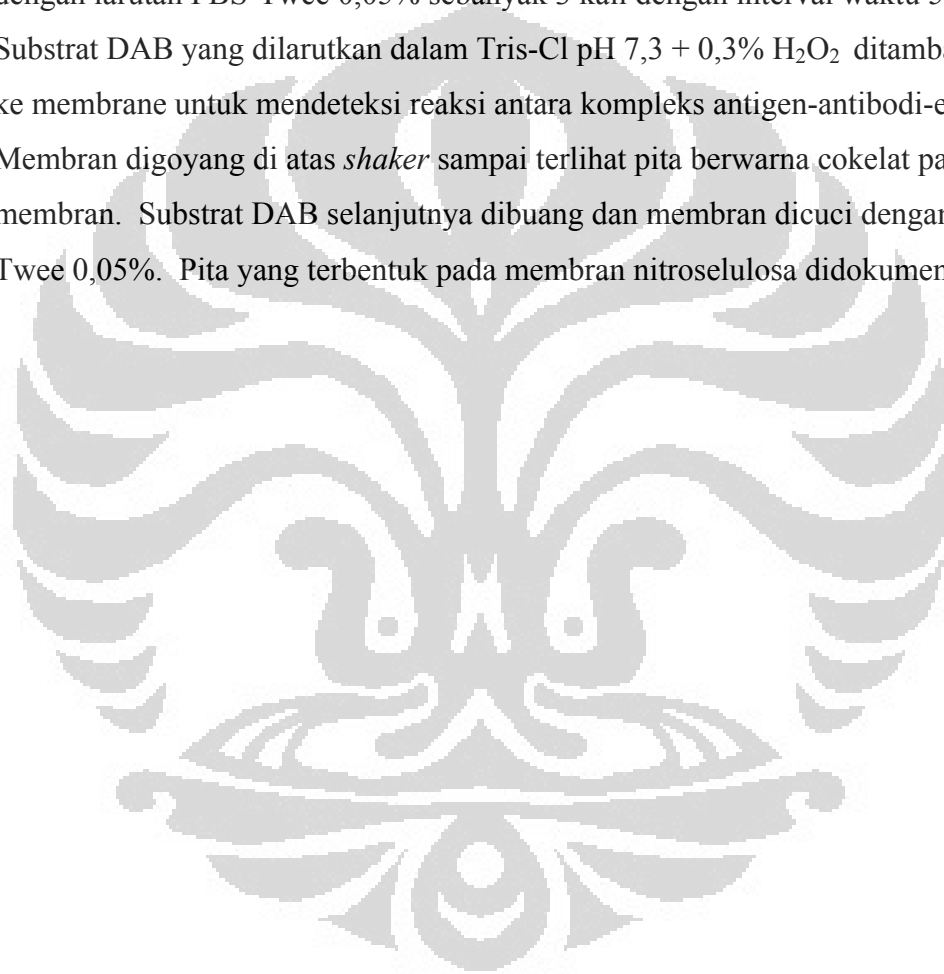
warna dari bening menjadi kuning. Reaksi enzimatik dihentikan setelah 15 menit dengan menambahkan 25 μ l H_2SO_4 2M. Penambahan H_2SO_4 menyebabkan terjadinya perubahan warna, yaitu dari warna kuning menjadi coklat. Intensitas warna diukur dengan membaca nilai *optical density* (OD) pada panjang gelombang 490 nm menggunakan ELISA reader.

3.3.9.2 Western Blot

Uji serologis serum kelinci dengan *Western blot* dilakukan berdasarkan *Current Protocols in protein Science* (2004: 10.10.1--10.10.5). Uji *Western blot* diawali dengan melakukan pemisahan protein *globular head* NA yang telah dipurifikasi dengan SDS-PAGE. Gel SDS-PAGE diambil dari *apparatus* elektroforesis, kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa yang dipotong dengan ukuran 7,5 x 11 cm dan telah direndam terlebih dahulu dalam *transfer buffer* selama 15--30 menit. Proses transfer protein dari gel SDS-PAGE ke membran nitroselulosa menggunakan *Trans Blot Semy Dry Electrophoresis Transfer Cell* [Bio-Rad]. Pita protein ditransfer dari gel ke membran nitroselulose dengan menggunakan aliran listrik, pada voltase 20 Volt selama 30 menit. Pita protein dari gel yang telah ditransfer ke membran nitroselulosa, selanjutnya diwarnai dengan pewarna *Ponceus* untuk mengetahui apakah protein sampel yang terdapat pada gel telah pindah ke membran nitroselulosa.

Membran yang telah terwarnai dengan *Ponceus* selanjutnya dibilas dengan H_2O . Protein pada membran nitroselulosa selanjutnya diblok menggunakan larutan *blocking buffer* (1% gelatin dalam 1x PBS) sambil digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 40 rpm selama 1 jam. Larutan *blocking buffer* dibuang dan membran dicuci dengan PBS-Tween 0,05%. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Membran kemudian direaksikan dengan serum kelinci yang mengandung antibodi pertama, dengan pengenceran serum 1/20 di dalam larutan 0,1% gelatin dalam 1x PBS. Membran digoyang kembali di atas *shaker* dengan kecepatan 40 rpm semalaman (*overnight*) pada suhu 4°C.

Keesokan harinya, membran dicuci dengan PBS-Twee 0,05%. Selanjutnya membran direaksikan dengan antibodi sekunder (*goat anti rabbit* berlabel biotin) sambil digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 40 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Membran dicuci kembali dengan PBS-Twee 0,05%, kemudian direaksikan dengan streptavidine-HRP (*Horse radish Peroxidase*) sambil digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 40 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Larutan streptavidine-HRP dibuang, kemudian membran dicuci kembali dengan larutan PBS-Twee 0,05% sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Substrat DAB yang dilarutkan dalam Tris-Cl pH 7,3 + 0,3% H₂O₂ ditambahkan ke membrane untuk mendeteksi reaksi antara kompleks antigen-antibodi-enzim. Membran digoyang di atas *shaker* sampai terlihat pita berwarna coklat pada membran. Substrat DAB selanjutnya dibuang dan membran dicuci dengan PBS-Twee 0,05%. Pita yang terbentuk pada membran nitroselulosa didokumentasikan.

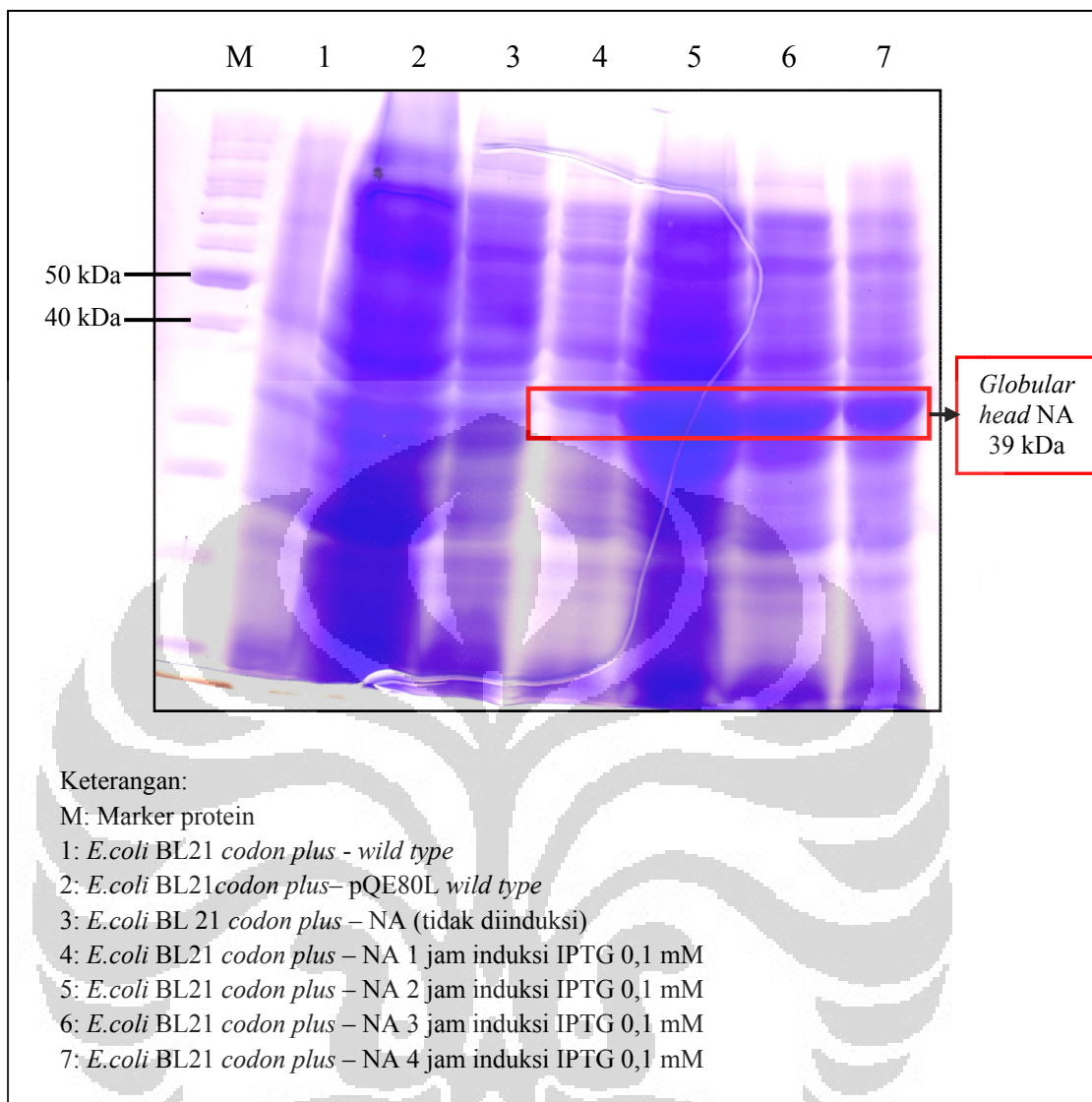


BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekspresi protein rekombinan *globular head* NA

Ekspresi protein rekombinan *globular head* NA virus influenza A H5N1 telah berhasil dilakukan menggunakan plasmid pQE80L dan sel inang *E.coli* BL21 *codon plus* yang diinduksi dengan IPTG. Ekspresi protein divisualisasi menggunakan gel SDS-PAGE 12%. Berdasarkan hasil SDS-PAGE (Gambar 4.1(1) lajur 4--7 dan Gambar 4.1(2) lajur 1--4) diperoleh pita protein rekombinan *globular head* NA dengan ukuran ~39 kDa (Lampiran 2).

Penginduksian IPTG dilakukan berdasarkan waktu induksi dan konsentrasi IPTG yang berbeda-beda. Berdasarkan waktu induksi, sel *E.coli* BL21 *codon plus* diinduksi dengan IPTG selama 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 4 jam. Menurut Sambrook & Russel (2001: 15.17), penginduksian IPTG dalam rentang waktu yang berbeda bertujuan untuk mengetahui waktu yang optimal yang dibutuhkan sel untuk mengekspresikan protein rekombinan dalam jumlah yang banyak. Hasil ekspresi dengan SDS-PAGE (Gambar 4.1(1) lajur 4--7), menunjukkan bahwa penginduksian IPTG selama 2 jam menghasilkan pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan penginduksian IPTG selama 1, 3, dan 4 jam. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekspresi protein rekombinan *globular head* NA tertinggi dihasilkan setelah penginduksian IPTG selama 2 jam.

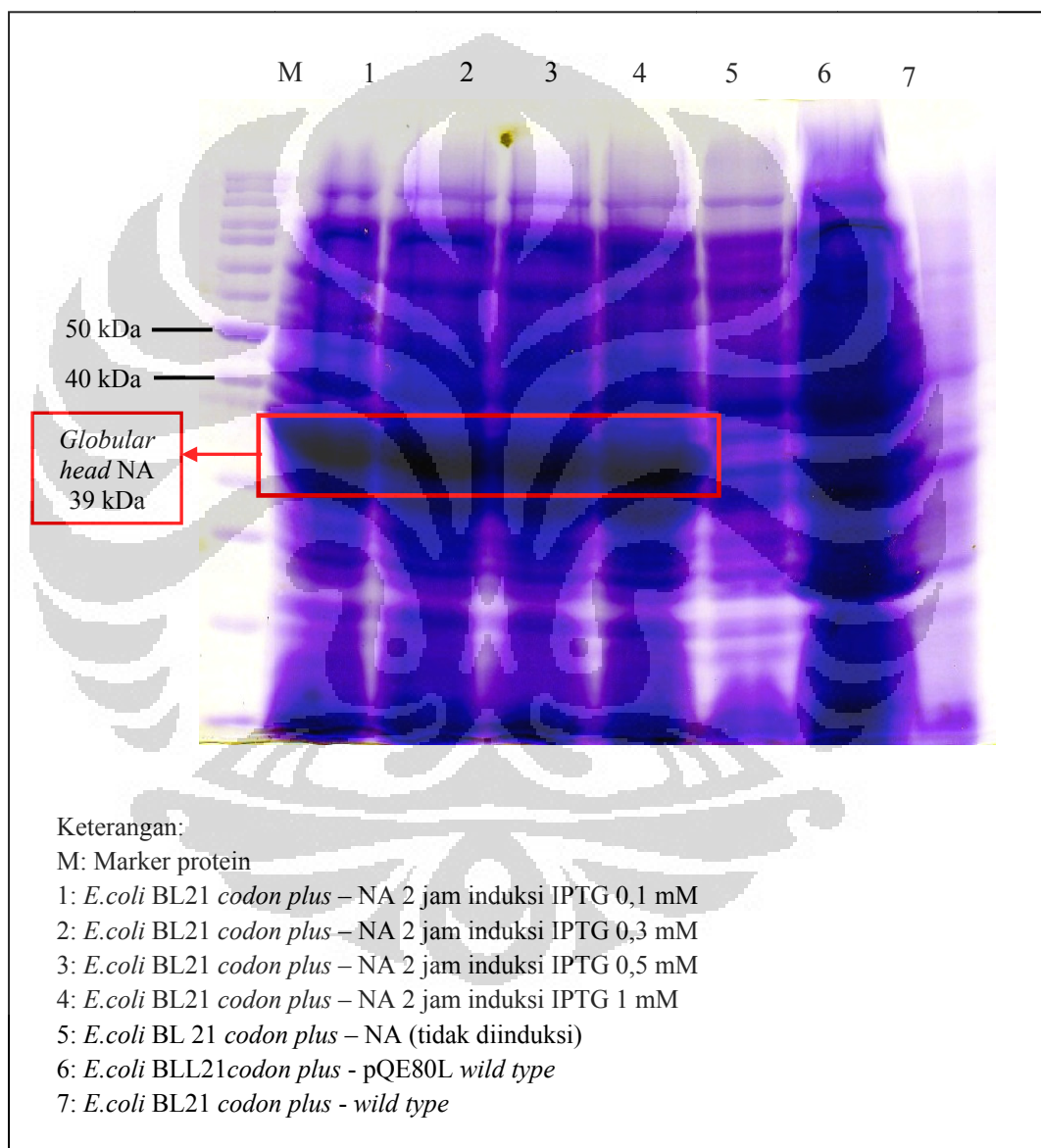


Gambar 4.1(1) Hasil SDS-PAGE ekspresi protein rekombinan *globular head* NA dengan induksi IPTG 1--4 jam

Berdasarkan konsentrasi IPTG, sel *E.coli* BL21 *codon plus* diinduksi IPTG dengan konsentrasi 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM, dan 1 mM. Penginduksian IPTG dengan konsentrasi yang berbeda bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum IPTG yang dibutuhkan sel untuk mengekspresikan protein rekombinan yang optimal. Menurut Sambrook & Russel (2001: 15.17), untuk mengetahui ekspresi protein rekombinan yang optimal, diperlukan penambahan IPTG dengan konsentrasi yang bervariasi, yaitu berkisar 0,05 mM--5,0 mM.

Hasil ekspresi protein rekombinan *globular head* NA oleh sel *E.coli* BL21 *codon plus* yang diinduksi dengan berbagai konsentrasi IPTG dapat dilihat pada

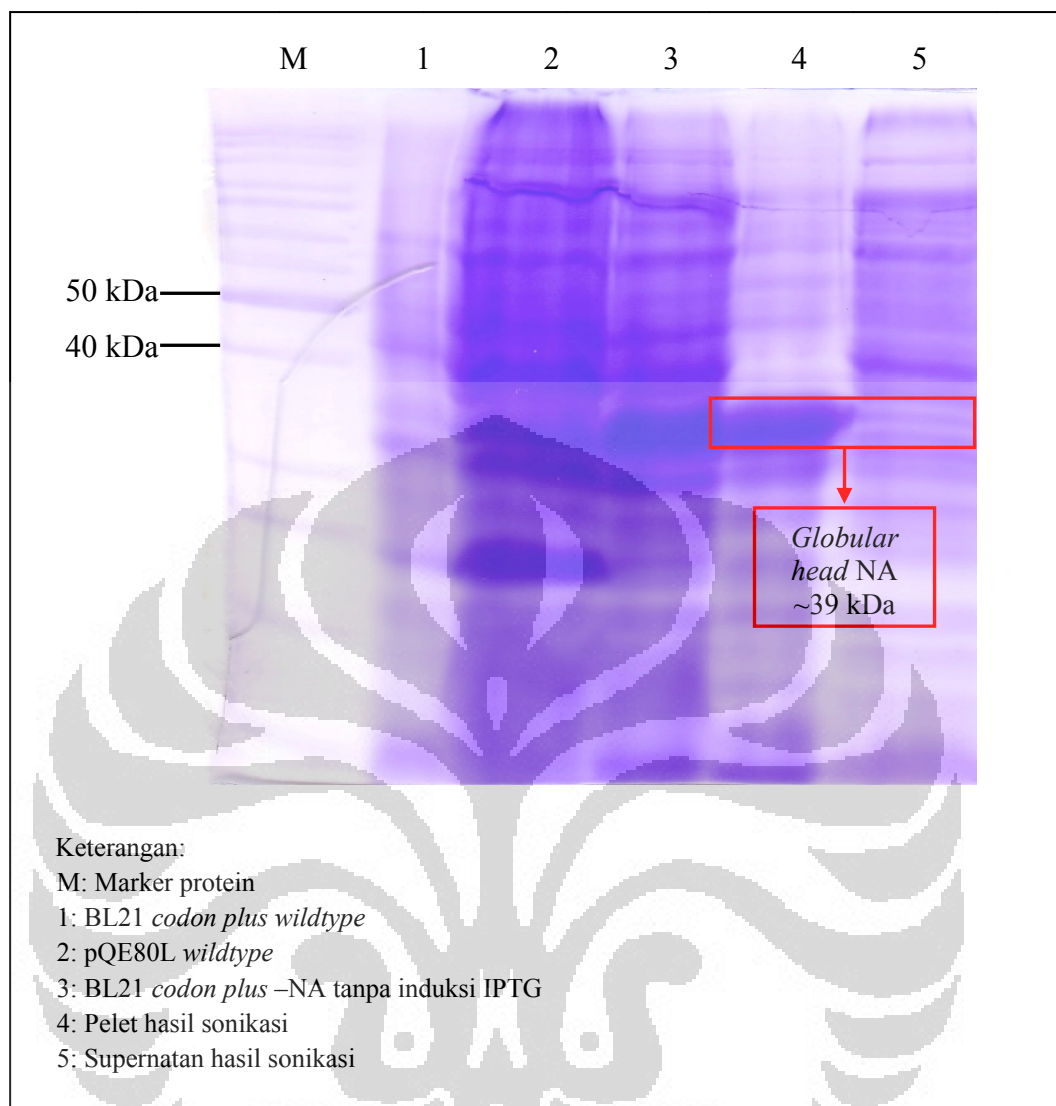
gambar 4.1(2) lajur 1--4. Berdasarkan hasil SDS-PAGE (Gambar 4.1(2) lajur 1--4), sel yang diinduksi dengan IPTG 1mM, menghasilkan pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan sel yang diinduksi IPTG 0,1 mM, 0,3 mM, dan 0,5mM. Hasil ekspresi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi IPTG yang digunakan, maka ekspresi protein rekombinan *globular head* NA semakin besar.



Gambar 4.1(2) Hasil SDS-PAGE ekspresi protein rekombinan *globular head* NA dengan berbagai konsentrasi IPTG

4.2 Isolasi protein rekombinan *globular head* NA dengan metode sonikasi

Isolasi protein rekombinan dilakukan dengan menggunakan metode sonikasi agar protein dihasilkan dalam bentuk ekstraseluler. Hasil sonikasi yang divisualisasi dengan SDS-PAGE (Gambar 4.2.1 lajur 4--5) menunjukkan bahwa terdapat banyak pita protein pada bagian pelet maupun supernatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pelet dan supernatan hasil sonikasi tidak hanya mengandung protein target (protein rekombinan *globular head* NA) tetapi juga mengandung protein *E.coli*. Hasil SDS-PAGE (Gambar 4.2.1 lajur 4) menunjukkan bahwa pelet sel menghasilkan pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan supernatan (Gambar 4.2.1 lajur 5). Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein rekombinan *globular head* NA lebih banyak dihasilkan dalam bentuk *inclusion bodies* dibandingkan dengan protein yang larut dalam supernatan. *Inclusion bodies* merupakan kumpulan protein yang terakumulasi sebagai agregat yang tidak dapat larut (*insoluble*) dan tidak aktif (Singh & Panda 2005: 303). Protein rekombinan dalam bentuk *inclusion bodies* tidak digunakan dalam proses purifikasi karena proses purifikasi *inclusion bodies* cukup sulit dan membutuhkan waktu yang cukup lama.



Gambar 4.2.1 Hasil SDS-PAGE protein rekombinan *globular head* NA setelah sonikasi

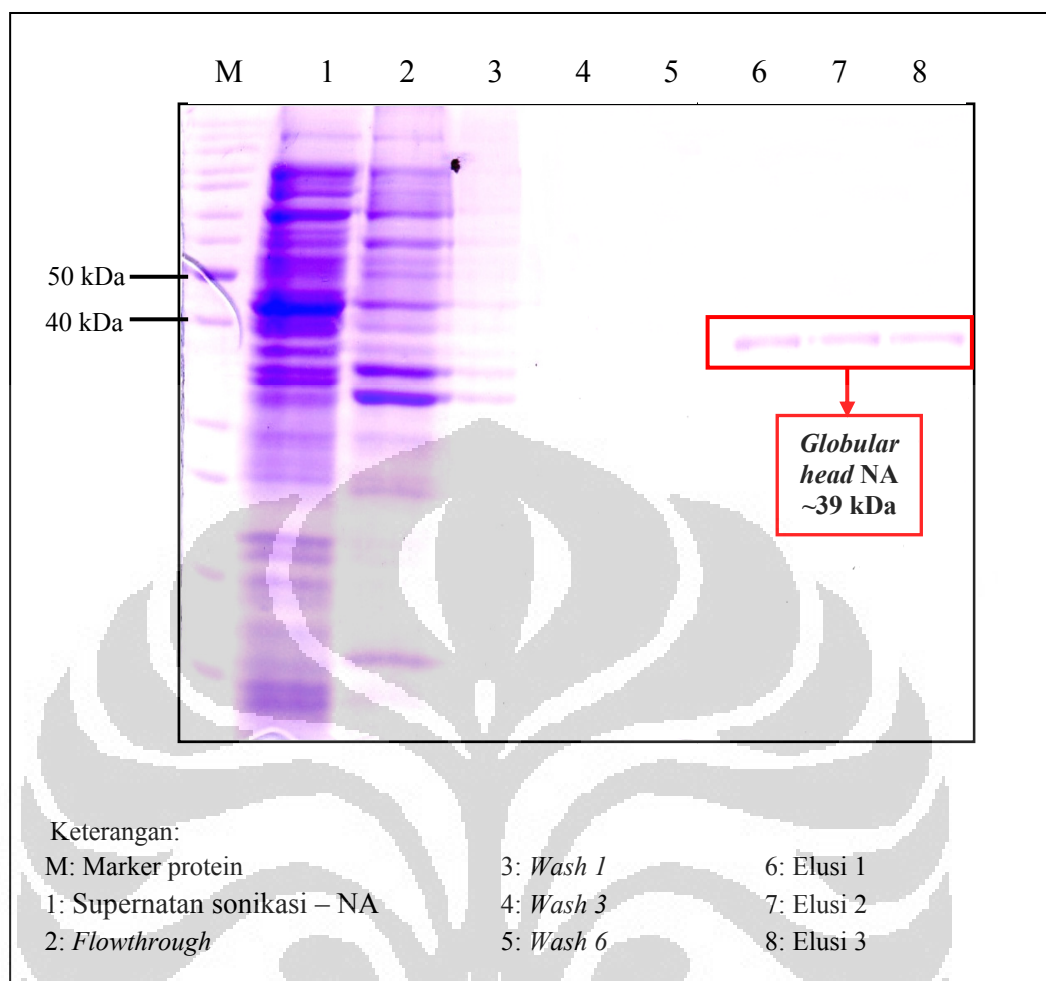
4.3. Purifikasi protein rekombinan *globular head* NA

Protein rekombinan *globular head* NA yang telah diisolasi selanjutnya dipurifikasi menggunakan metode *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), menggunakan resin Ni-NTA. Proses purifikasi protein *globular head* NA menggunakan resin Ni-NTA dilakukan melalui 3 tahapan. Tahap pertama merupakan tahap pengikatan 6x-Histag pada ujung terminal N protein *globular head* NA dengan ion Ni^{2+} pada resin Ni-NTA. Hasil purifikasi tahap pertama (Gambar 4.3.1 lajur 2) menunjukkan bahwa terdapat banyak pita protein yang

tidak berikatan dengan resin Ni-NTA. Hal tersebut disebabkan karena protein-protein tersebut tidak mengandung sekuens *6xHis-tag*.

Tahap kedua purifikasi adalah tahapan pencucian menggunakan 20mM imidazol. Tahap tersebut dilakukan untuk menghilangkan protein non target yang juga memiliki residu histidin, sehingga akan diperoleh protein target yang spesifik. Hasil pencucian (supernatan) yang dielektroforesis dengan SDS-PAGE (Gambar 4.3.1 lajur 3) menunjukkan bahwa terdapat beberapa pita protein non target pada hasil pencucian ke-1, sedangkan pada hasil pencucian ke-3 dan ke-6 (Gambar 4.3.1 lajur 4 dan 5) tidak terdapat pita protein non target. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein non target berhasil dihilangkan setelah pencucian ke-3 dan ke-6. Banyaknya protein non target pada hasil pencucian ke-1 kemungkinan disebabkan karena protein tersebut mengandung residu histidin, sehingga dapat berikatan dengan resin Ni-NTA (QIAexpressionist 2001: 70).

Tahap terakhir pada proses purifikasi adalah tahap elusi menggunakan 300 mM imidazol. Hasil elusi yang divisualisasi dengan SDS-PAGE (Gambar 4.3.1 lajur 7--9) memperlihatkan pita tunggal dengan ukuran ~39 kDa. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein rekombinan *globular head* NA telah berhasil dilepaskan dari resin Ni-NTA menggunakan imidazol 300 mM. Imidazol bersifat kompetitif terhadap histidin untuk berikatan dengan resin Ni-NTA karena imidazol memiliki struktur yang mirip dengan histidin. Peningkatan konsentrasi imidazol hingga 300 mM menyebabkan protein target yang mengandung sekuens *6xHis-tag* terdisosiasi karena tidak mampu lagi bersaing dengan imadazol untuk berikatan dengan resin Ni-NTA(QIAexpressionist 2001: 71).

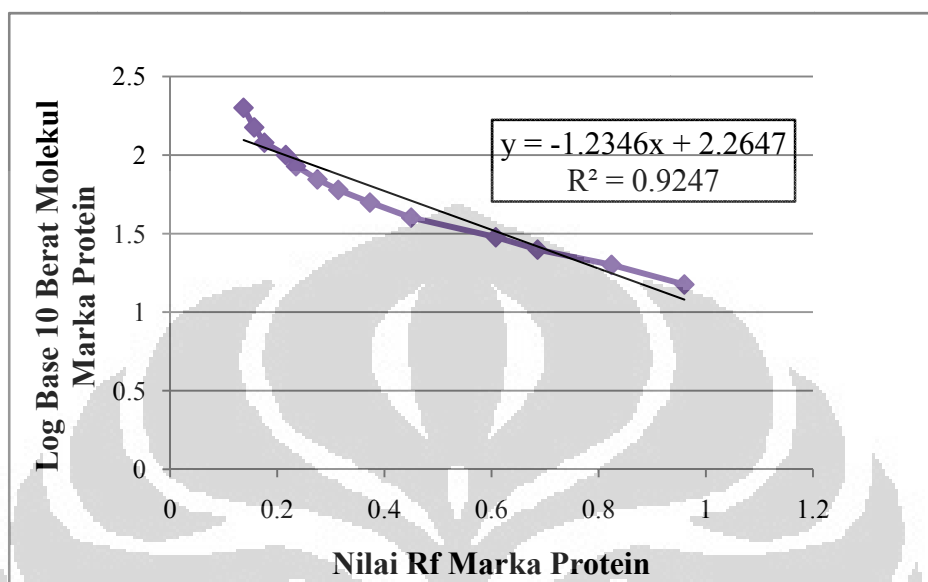


Gambar 4.3.1 Hasil SDS-PAGE purifikasi protein rekombinan *globular head* NA

4.4 Visualisasi dan analisis berat molekul protein rekombinan *globular head* NA dengan SDS-PAGE

Visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein *globular head* NA dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein rekombinan *globular head* NA bermigrasi di bawah marka 40 kDa. Berdasarkan marka protein, protein rekombinan *globular head* NA yang diekspresi dalam sel prokariot (*E.coli* BL21 *codon plus*) memiliki berat molekul ~39 kDa. Analisis berat molekul protein *globular head* NA dilakukan dengan menggunakan kurva standar berat molekul marka protein. Kurva standar merupakan korelasi antara nilai Rf (*Retention factor*) dan nilai logaritma berat molekul marka protein (Gallagher 1995: 10.1.30). Berdasarkan kurva standar berat molekul marka protein (Gambar 4.4.1), diperoleh

persamaan garis linier $y = -1,2346x + 2,2647$ dengan nilai $R^2 = 0,9247$. Hasil analisis (Lampiran 2) menunjukkan bahwa protein *globular head* NA memiliki berat molekul $38,904 \text{ kDa} \approx 39 \text{ kDa}$.

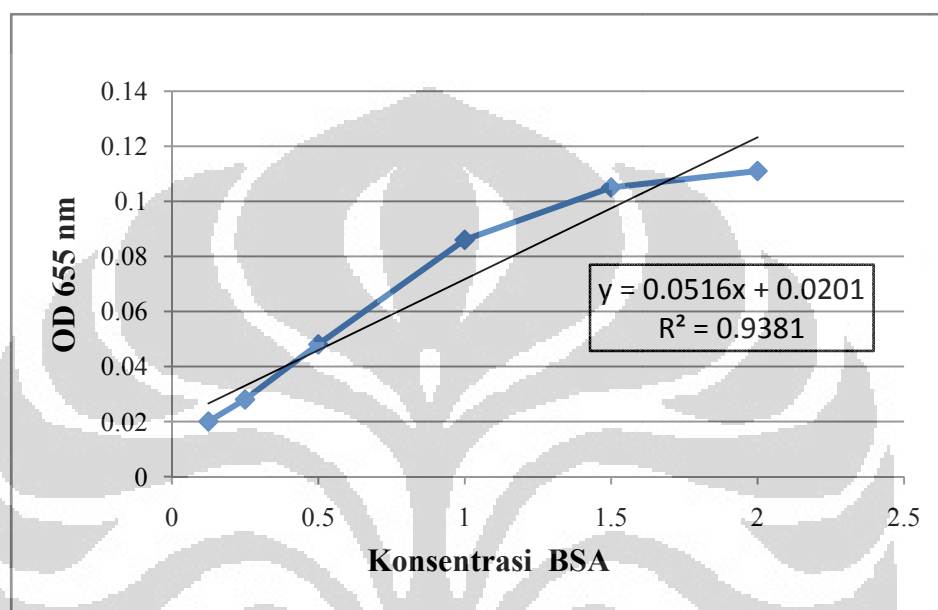


Gambar 4.4.1 Kurva standar berat molekul marka protein (*Unstained Protein Ladder*)

4.5 Penentuan konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA

Penentuan konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA hasil purifikasi dilakukan dengan menggunakan metode *DC Protein Assay*. Konsentrasi protein *globular head* NA ditentukan berdasarkan kurva standar BSA. Kurva standar dibuat berdasarkan nilai *Optical Density* dari standar BSA dikurangi dengan nilai OD blanko berupa larutan *elution buffer*-gliserol. Hal tersebut dilakukan untuk menormalisasi standar yang digunakan supaya sebanding dengan pelarut sampel yang akan diukur. Nilai OD standar BSA yang sudah dikurangi dengan nilai OD blanko (*elution buffer*-gliserol) dimasukkan ke dalam tabel data untuk selanjutnya dibuat kurva standar BSA. Persamaan garis linear ditentukan berdasarkan kurva standar yang terbentuk, yaitu dengan cara memasukkan konsentrasi pengenceran standar BSA sebagai absis (sumbu X) dan nilai OD standar BSA yang dikurangi dengan nilai OD blanko sebagai ordinat (sumbu Y). Konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA ditentukan

dengan cara memasukkan nilai OD protein *globular head* NA ke dalam persamaan linier dari kurva standar BSA yang telah diperoleh, dimana x = konsentrasi protein dan y = nilai absorbansi protein NA. Berdasarkan hasil perhitungan kurva standar (Lampiran 3), protein rekombinan *globular head* NA memiliki konsentrasi sebesar 2,149 mg/ml.



Gambar 4.5.1 Grafik kurva standar BSA

4.6 Imunisasi protein rekombinan *globular head* NA ke kelinci

Dosis protein rekombinan *globular head* NA yang akan disuntikkan ke kelinci *American Dutch* sebesar 500 µg/ml. Penentuan dosis didasarkan pada penelitian terdahulu di IHVCB UI yang telah dioptimasi secara berkala dan terbukti tidak menyebabkan kematian pada hewan uji. Penyuntikan protein *globular head* NA pada hewan uji tidak disertai dengan adjuvan. Hal tersebut disebabkan karena adjuvan mengandung *mycobacterium* yang dapat menyebabkan rasa tidak nyaman dan berbahaya bagi hewan uji (Cooper & Paterson 1999: 11.12.3).

Penyuntikan antigen protein *globular head* NA dilakukan secara intamuskular pada paha bagian belakang. Penyuntikan pada paha bagian belakang bertujuan untuk mempermudah antigen bertemu dengan sel B yang diproduksi di

sumsum tulang belakang dan berperan dalam pembentukan antibodi. Penyuntikan antigen dilakukan sebanyak 4 kali dengan interval 2 minggu. *Booster* atau pengulangan imunisasi yang dilakukan pada penelitian sebanyak 3 kali setelah imunisasi primer. Hal tersebut bertujuan untuk membentuk kondisi hiperimun pada kelinci, sehingga titer antibodi yang dihasilkan tinggi. Imunisasi pertama bertujuan untuk memperkenalkan antigen pada sel B dan imunisasi kedua sebagai *booster* atau ulangan dilakukan untuk meningkatkan produksi antibodi oleh sel B (Natih *dkk.* 2010: 103).

4.7 Uji Serologis serum kelinci

4.7.1 ELISA

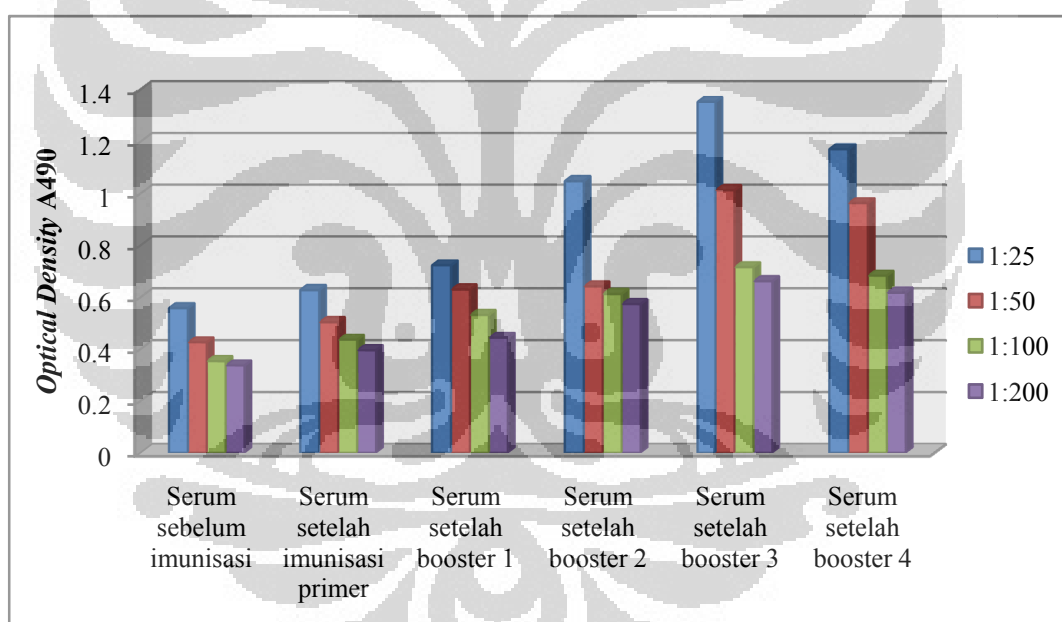
Uji serologis dilakukan untuk mendeteksi antibodi kelinci terhadap antigen protein *globular head* NA menggunakan ELISA. Hasil uji ELISA (Gambar 4.7.1(1)) menunjukkan bahwa serum setelah imunisasi primer menghasilkan titer antibodi yang lebih rendah dibandingkan dengan serum setelah *booster* 1, 2, dan 3. Hal tersebut disebabkan karena hewan uji yang dipaparkan dengan antigen pertama kali akan menghasilkan respon imun primer. Menurut Suardana *dkk.* (2009: 114), respon imun primer menghasilkan titer antibodi dalam jumlah yang relatif rendah.

Hasil uji ELISA (Gambar 4.7.1(1)) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah titer antibodi yang dihasilkan oleh serum kelinci. Grafik tersebut memperlihatkan bahwa titer antibodi mulai meningkat setelah *booster* ke-1 dan titer antibodi tertinggi dihasilkan setelah *booster* ke-3. Peningkatan jumlah titer antibodi terjadi karena adanya respon sekunder, yaitu pembentukan imunoglobulin berlangsung lebih cepat untuk kurun waktu yang lebih lama dan imunoglobulin yang dihasilkan mencapai titer tertinggi. Imunoglobulin utama yang dihasilkan pada respons sekunder adalah IgG. Produksi imunoglobulin IgG akan meningkat seiring dengan pemberian *booster* (Siregar 2006: 39).

Hasil uji ELISA (Gambar 4.7.1(1)) menunjukkan bahwa titer antibodi mengalami penurunan setelah *booster* keempat. Penurunan titer antibodi

disebabkan karena antigen sudah tidak mampu lagi menginduksi sel B untuk menghasilkan immunoglobulin IgG. Hasil tersebut menunjukkan bahwa titer IgG yang dihasilkan oleh respon sekunder mampu bertahan sampai 6 minggu dan mencapai titer tertinggi setelah *booster* ketiga, kemudian titer menurun setelah *booster* keempat.

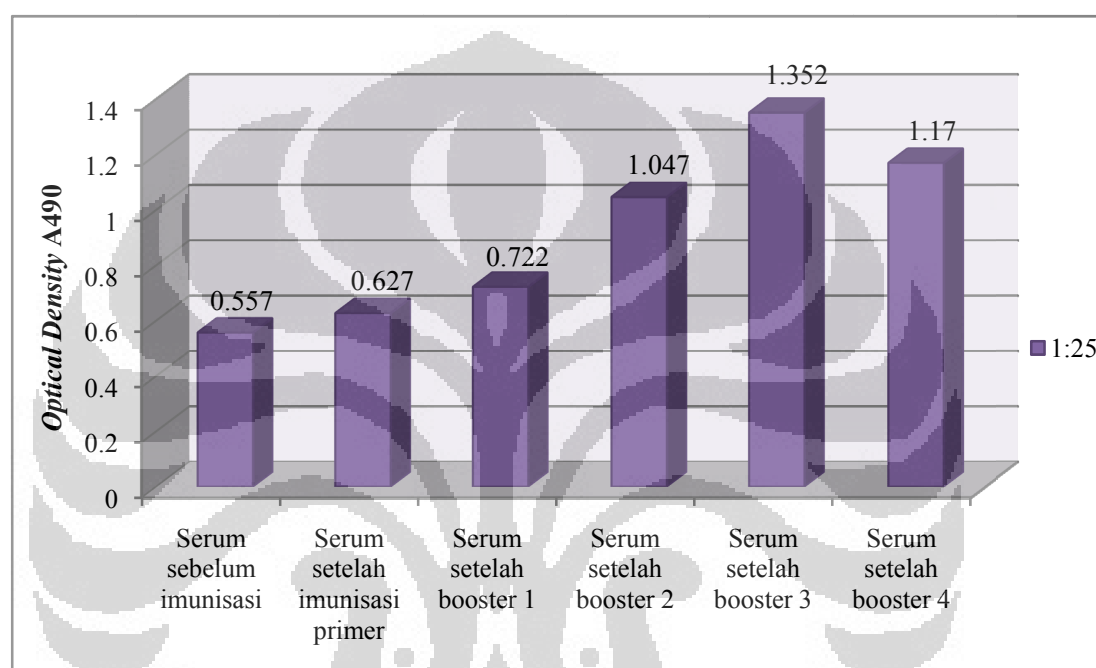
Berdasarkan gambar 4.7.1(1), serum dengan pengenceran 1: 25 menghasilkan nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan serum 1: 50, 1: 100, dan 1: 200. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin besar pengenceran serum, maka semakin rendah nilai *optical density* yang dihasilkan pada reaksi antigen-antibodi. Tingginya nilai OD pada reaksi antara antigen dengan serum 1:25 (Gambar 4.7.1(1)) disebabkan karena serum mengandung banyak antibodi poliklonal yang dapat berikatan dengan antigen protein *globular head* NA (Sudarisman 2005: 72).



Gambar 4.7.1(1) Grafik perbandingan reaktivitas serum sebelum dan setelah diimunisasi antigen protein *globular head* NA

Berdasarkan hasil ELISA (Gambar 4.7.1(1)), diketahui bahwa serum kelinci memiliki kondisi optimal pada pengenceran 1: 25. Hal tersebut disebabkan karena nilai *optical density* reaktivitas serum yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan pengenceran antibodi lainnya. Berdasarkan reaktivitasnya, serum dengan pengenceran 1: 25 menghasilkan nilai OD terendah

pada serum sebelum imunisasi sebesar 0,557 dan tertinggi pada serum setelah *booster* ketiga sebesar 1,352 (Gambar 4.7.1(2)). Serum dengan pengenceran 1:25 diduga mengandung antibodi poliklonal yang spesifik terhadap antigen protein *globular head* NA virus AI H5N1. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji *western blot* untuk melihat reaksi spesifik antara antibodi poliklonal yang dihasilkan serum dengan antigen protein *globular head* NA.

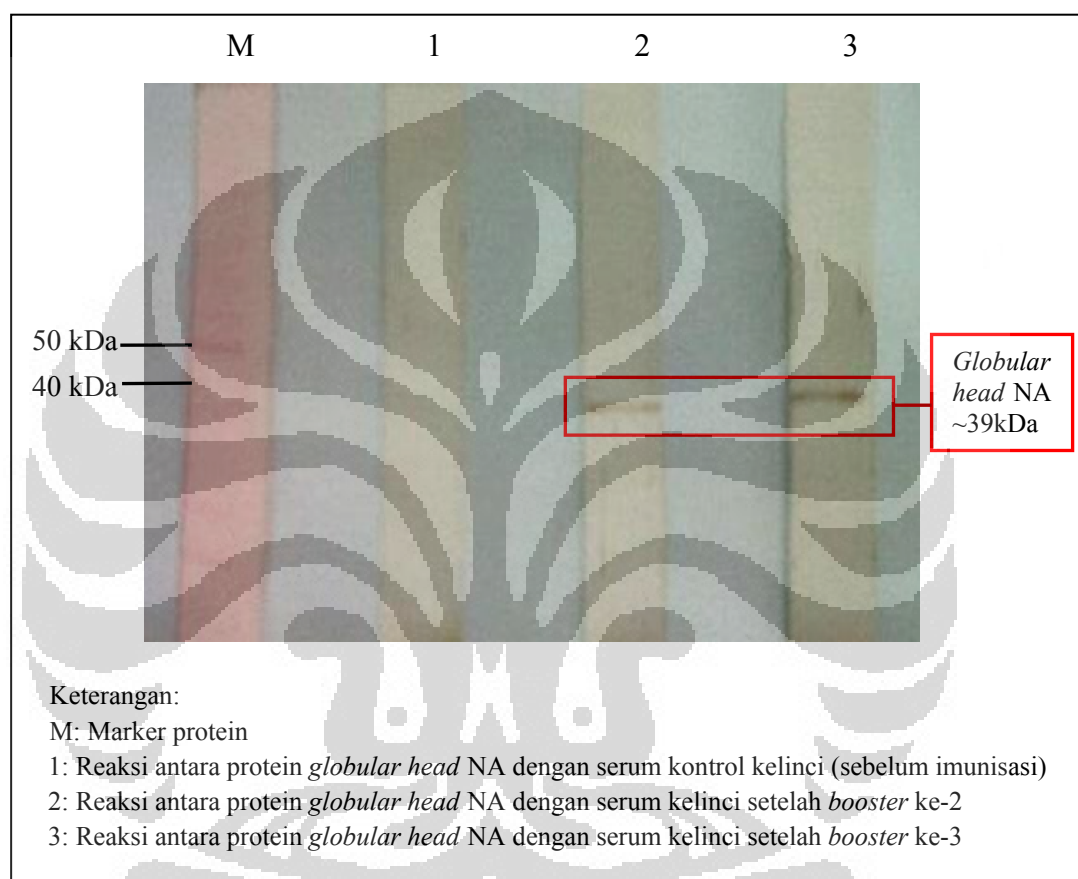


Gambar 4.7.1(2) Hasil optimasi reaktivitas serum sebelum dan setelah imunisasi

4.7.2 *Western blot*

Uji serologis dengan *western blot* dilakukan untuk mengetahui reaksi antibodi poliklonal yang dihasilkan serum kelinci terhadap antigen protein *globular head* NA virus AI H5N1. Hasil uji *western blot* menunjukkan bahwa serum kelinci bereaksi positif terhadap antigen protein *globular head* NA. Reaksi positif tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya satu pita tunggal pada membran nitroselulosa pada posisi ~39 kDa dibandingkan dengan marka protein (Gambar 4.7.2.1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang dihasilkan oleh serum kelinci spesifik terhadap antigen *globular head* NA virus AI H5N1.

Serum kelinci yang memberikan reaksi positif berasal dari serum setelah penyuntikan *booster* ke-2 dan ke-3. Hal tersebut disebabkan karena penyuntikan *booster* pada kelinci menginduksi pembentukan antibodi poliklonal dalam jumlah banyak dan bereaksi spesifik dengan antigen protein *globular head* NA (Cooper & Paterson (1999: 11.12.6).



Gambar 4.7.2.1 Hasil *western blot* protein *globular head* NA dengan serum kelinci sebelum dan sesudah imunisasi

Reaksi antara antibodi poliklonal dengan antigen protein *globular head* NA juga dipengaruhi oleh kemurnian antigen yang digunakan untuk imunisasi. Berdasarkan hasil purifikasi (Gambar 4.3.1 lajur 6--8), protein rekombinan *globular head* NA yang digunakan dalam imunisasi merupakan protein murni yang tidak terkontaminasi dengan protein *E.coli*, sehingga hasil *western blot* hanya menghasilkan satu pita reaksi yang spesifik (Cooper & Paterson 1999: 16.2.7)

BAB 5 **KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan

Antibodi poliklonal protein *globular head* NA virus influenza A H5N1 telah berhasil dibentuk dan titer antibodi paling tinggi dihasilkan sebesar 1,352.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji lanjut untuk verifikasi apakah antibodi poliklonal *globular head* NA dapat mendeteksi antigen H5N1 secara *in vitro*.
2. Perlu dilakukan uji *western blot* antara protein NA virus H1N1 dengan serum kelinci hasil penelitian, untuk mengetahui apakah terjadi reaksi pindah silang terhadap protein NA yang berasal dari virus yang berbeda.

DAFTAR REFERENSI

- Baratawidjaja, K.G. & I. Rengganis. 2009. *Imunologi dasar*. Edisi ke-8. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: ix + 721 hlm.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. Edisi ke-2. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., California: xix + 555 hlm.
- Brown, T.A. 1987. *Gene cloning an introduction*. Van Nostrand Reinhold Co.Ltd., Wokingham: vi + 233 hlm.
- Brown, T.A. 1999. *Genome*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford: xxviii + 472 hlm..
- Capua, I. & D.J. Alexander. 2002. Avian influenza and human health. *Acta Tropica* **83**: 1--6.
- Castrucci, M.R. & Y. Kawaoka. 1993. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *Journal of Virology* **67** (2): 759--764.
- Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, & P.T Wingfield. 2004. *Current Protocols in Protein Science*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., Washington: 1.1.1--A.5A.40.
- Cooper, H.M. & Y. Paterson. 1999. Preparation of polyclonal antisera. *Dalam*: Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. Volume 1. John Wiley & Sons, Inc., Canada: 11.12.1--11.12.9.
- Cox, N.J., G. Neumann, R.O. Donis, & Y. Kawaoka. 2005. Orthomyxoviruses: influenza, *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Virology* **1**: 634--698.
- Davis, L., M. Kuehl, & J. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. Appleton & Lange Paramount Publishing Business and Profesional Group., Norwalk: viii + 777 hlm.
- De Clercq, E. 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Review Drug Discovery* **5**: 1015--1025.

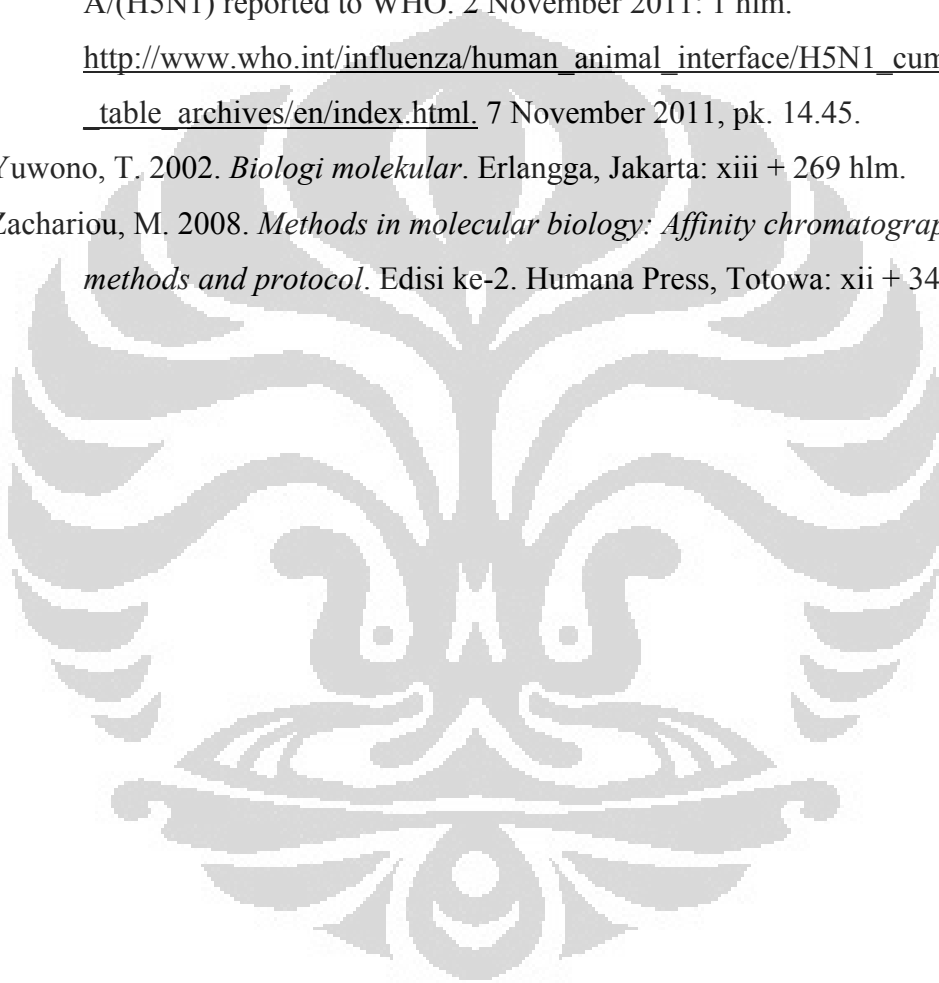
- De Jong, J.C., G.F. Rimmelzwaan, R.A.M. Fouchier, & A.D.M.E Osterhaus. 2000. Influenza virus: a master of metamorphosis. *Journal of Infection* **40**: 218--228.
- Donovan, J. & P. Brown. 1998. Anesthesia. *Dalam*: Coligan, J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, & W. Strober. 2004. *Current protocols in immunology*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., New York: 1.4.1--1.4.5.
- Gallagher, S. 1995. One-Dimensional SDS gel electrophoresis of protein. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, & P.T Wingfield. 2004. *Current protocols in protein science*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., Washington: 10.1.1--10.1.34.
- Gallagher, S. 1996. Immunoblot detection. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, & P.T Wingfield. 2004. *Current protocols in protein science*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., Washington: 10.10.1--10.10.12.
- Galwankar, S. & A. Clem. 2009. Swine influenza A (H1N1) strikes a potential for global disaster. *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock* **1** (2): 99--105.
- George Prince Community College. 2006. Index of kroberts lecture. 28 September 2006: 2 hlm.
http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/07-19_lacOperon_L. 10 Mei 2011, pk. 09.00.
- George, J. & Y.M. Issac. 2009. Swine flu-a pandemic outbreak. *Veterinary World* **2** (12): 472--474.
- Gong, J., W. Xu, & J. Zhang. 2007. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Current Medicinal Chemistry* **14** (1): 113--122.
- Harimoto, T. & Y. Kawaoka. 2010. Pandemic influenza. *The Open Antimicrobial Agents Journal* **2**: 9--14.
- Invitrogen. 2002. *Molecular biology incorporating life technologiesTM and resgenTM brand*. Invitrogen Corp, California: xvi + 727 hlm.
- Kamps, B.S., C. Hoffmann, & W. Preiser. 2006. *Influenza report*. Flying Publishers, Paris: 225 hlm.

- Lindenmayer, J.M. 2007. Influenza virus replication. 2011: 1 hlm.
http://ocw.tufts.edu/Content/46/lecturenotes/532840/532858_23
November 2011, pk. 12.02.
- McKimm-Breschkin, J.L. 2000. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors- a review. *Antiviral Research* **47**: 1--17.
- Moscona, A. 2005. Neuraminidase inhibitors for influenza. *The New England Journal of Medicine* **353**: 1363--1373.
- Moscona, A. 2009. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *The New England Journal of Medicine* **360**: 953--956.
- Muflihanah. 2009. Serological diagnostic of avian influenza infection. *The Indonesian Journal of Medical Science* **1** (5): 298--308.
- Mulyadi, B. & Prihatini. 2005. Diagnosis laboratorik flu burung (H5N1). *Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory* **12** (2): 71--81.
- Natih, K.K.N., R.D. Soejoedono, I.W.T. Wibawan, & F.H. Pasaribu. 2010. Preparasi imunoglobulin G kelinci sebagai antigen penginduksi antibodi spesifik terhadap virus *avian influenza* H5N1 strain legok. *Jurnal Veteriner* **2** (11): 99--106.
- NCBI. 2011. *Oryctolagus cuniculus*. (?): 2 hlm.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&name=Oryctolagus+cuniculus>. 11 April 2011, pk. 14.00.
- Nicholls, J.M., A.J. Bourne, H. Chen, Yi Guan, & J.S.M. Peiris. 2007. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: Evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza virus. *Respiratory Research* **8** (73): 1--6.
- Peiris, J.S.M., M.D. De Jong, & Y. Guan. 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clinical Microbiology Review* **20** (2): 243--267.
- Petty, K.J. 1996. Metal-chelate affinity chromatography. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, & P.T Wingfield. 2004. *Current protocols in protein science*. Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., Washington: 9.4.1--9.4.16.

- Pusat Pengembangan Penyuluhan Pertanian. 2010. Memilih bibit kelinci. (?): 3 hlm. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41291/0>. 11 April 2011, pk. 14.44.
- QIAexpressionist. 2001. *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged protein*. Edisi ke-5. Qiagen, Valencia: 126 hlm.
- Racaniello, V. 2009. Structure of influenza virus. 30 April 2009: 2 hlm. <http://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus>. 25 Juli 2011, pk. 12.12.
- Raghava, G.P.S. 2010. Antibody basics. 2011: 3 hlm. <http://www.imtech.res.in/raghava/absource/abasic.html>. 23 November 2011, pk. 10.15.
- Sambrook, J. & D.W. Russel 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Voume 1. Edisi ke-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1--7.94 hlm.
- Santoso, M., H. Salim, & H. Alim. 2005. Avian influenza (flu burung). *Cermin Dunia Kedokteran*. **148**: 21--24.
- Setiawan, I.M. 2009. Munculnya virus influenza A subtype baru pada manusia dan kemungkinan terjadinya pandemi. *Majalah Kedokteran Indonesia* **59** (3): 113--120.
- Singh, S.M. & A.K. Panda. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion boddy proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99** (4): 303--310.
- Siregar, T.N., Aulanni'am, Y. Linggi, G. Riady, Hamdan, & T. Armansyah. 2006. Profil titer antiserum-inhibin hasil induksi inhibin 32 kDa pada kelinci sebagai kandidat vaksin untuk induksi superovulasi. *Jurnal Sain Veterinary* **24** (1): 32--41.
- Slonane, E. 2004. *Anatomy and physiology: An easy learner*. Terj. Oleh Veldman, J. *Anatomi dan fisiologi untuk pemula*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: x + 389 hlm.
- Spickler, A.R. 2009. Influenza. *The Center for Food Security and Public Health* : 1--46.

- Stratagene. 2005. *BL21-CodonPlus® Competent Cells*. Stratagene, Kanada: 16 hlm.
- Suardana, I.B.K., N.M.R.K. Dewi, & I.G.N.K. Mahardika. 2009. Respon imun itik Bali terhadap berbagai dosis vaksin avian influenza H5N1. *Jurnal Veteriner* **10** (3): 111--116.
- Sudarisman. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assay untuk mendeteksi antibodi virus distemper anjing. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* **1** (11): 69--75.
- Sultana, I., J. Gao, L. Markoff, & M.C. Eichelberger. 2011. Influenza neuraminidase-inhibiting antibodies are induced in the presence of zanamivir. *Vaccine* **1** (47): 1--6.
- Suryadi, Y., I. Manzial, A. Akhdiya, & E. Pratiwi. 2006. Produksi dan evaluasi antibodi poliklonal untuk deteksi toksin *Photorhabdus* spp. *Jurnal Agrobiogen* **2** (1): 16--23.
- Tarigan, S., R. Indriani, & Darminto. 2007. Karakteristik aktivitas enzimatik neuraminidase virus influenza H5N1. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* **12** (2): 153--159.
- Thanh, T.T., H.N. Van Doorn, & M.D. De Jong. 2008. Human H5N1 influenza: Current insight into pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 2671--2674.
- Thermo Scientific. 2011. Overview of ELISA. (?): 5 hlm.
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>. 13 November 2011, pk. 15.25.
- Tisoncik, J.R., Y. Guo, K.S. Cordero, J. Yu, J. Wang, Y. Cao, & L. Rong. 2011. Identification of critical residues of influenza neuraminidase in viral particle release. *Virology Journal* **8** (14): 1--14.
- Uez, O.C., V. Knez, C.A.F. Pascua, M.L. Gutiérrez, L. Sánchez-Pulido, A. Valencia, & A.P. Moreira. 1998. Influenza virus epidemiological surveillance in Argentina, 1987--1993, with molecular characterization of 1990 and 1993 isolates. *Pan Am Journal Public Health* **4** (6): 405--410.
- Varghese, J.N. 1999. Development of neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus drugs. *Drug Development Research* **46**: 176--196.

- Verlannahill Rabbity. 2011. All about the dutch rabbit. (?): 7 hlm.
<http://www.verlannahill.com/AboutDutch.htm>. 1 November 2011, pk. 15.38.
- Walker, J.M. & R. Rapley. 2000. *Molecular biology and biotechnology*. Edisi ke-4. The Royal Society od Chemistry, Britain: xxiv + 563 hlm.
- Webster, R.G. & E.J. Walker. 2003. Influenza. *American Scientist* **91**: 122--129.
- WHO. 2011. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. 2 November 2011: 1 hlm.
http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html. 7 November 2011, pk. 14.45.
- Yuwono, T. 2002. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Zachariou, M. 2008. *Methods in molecular biology: Affinity chromatography methods and protocol*. Edisi ke-2. Humana Press, Totowa: xii + 343 hlm.



Lampiran 1
Pembuatan larutan, *buffer*, dan medium

Nama 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> , dan 1,25 g NaCl dicampur dan dilarutkan dengan akuades steril sampai dengan volume 250 ml. Kemudian Bahan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 1 atm, selama 15--20 menit.
Luria Bertani (LB) padat 1000 ml	bubuk LB, Trypton, dan NaCl.	Sebanyak 35 g medium bubuk LB, 5 g tripton dan 5 g NaCl dicampur dan dilarutkan dengan akuades steril sampai dengan volume 1.000 ml, kemudian sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 1 atm, selama 15--20 menit.
Ampisilin 100 µg/µl	Ampisilin dan akuades	Sebanyak 10 g ampisilin dilarutkan dengan akuades steril sampai dengan volume 100 ml.

Lanjutan lampiran 1

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Tris-base, 1 M HCl, akuades	Tris-base 9,1 g dilarutkan dengan 300 ml akuades, kemudian ukur pH larutan sampai 8,8 dengan menambahkan 1 M HCl. Larutan ditambahkan akuades kembali sampai volume 500 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Tris-base, 1 M HCl, akuades	Tris-base 6,05 g dilarutkan dengan 40 ml akuades, kemudian ukur pH larutan sampai 8,8 dengan menambahkan 1 M HCl. Larutan ditambahkan akuades kembali sampai volume 100 ml
<i>Separating</i> gel 12%	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, SDS 10%, akrilamid 30%, APS 10%, TEMED, dan akuades	Semua bahan dicampur menjadi satu, APS dan TEMED ditambahkan ke dalam campuran paling akhir
<i>Stacking</i> gel 4%	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10%, akrilamid 30%, APS 10%, TEMED, dan akuades	Semua bahan dicampur menjadi satu, APS dan TEMED ditambahkan ke dalam campuran paling akhir

Lanjutan lampiran 1

<i>Staining gel</i> <i>Commassie blue</i> 100 ml	<i>Commassies</i> <i>Briliant Blue</i> , asam asetat glacial, methanol, dan akuades	0,2 g <i>Commassie Briliant Blue</i> dicampur dengan 7,5 ml asam asetat glacial dan 40 ml methanol. Semua bahan yang telah tercampur ditambahkan dengan akuades sampai volume 100 ml
<i>Wash buffer</i> 20 mM imidazol 1 liter	500 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, dan akuades	Sebanyak 7,8 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 17,5 g NaCl, dan 1,36 g imidazol dicampurkan ke dalam 800 ml, kemudian ukur pHnya sampai 8 dengan NaOH. Lalu tambahkan akuades kembali sampai volume larutan 1000 ml
<i>Elution buffer</i> 300 mM imidazol 1 liter	500 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, dan akuades	Sebanyak 7,8 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 17,5 g NaCl, dan 20,4 g imidazol dicampurkan ke dalam 800 ml, kemudian ukur pHnya sampai 8 dengan NaOH. Lalu tambahkan akuades kembali sampai volume larutan 1000 ml
<i>Coating buffer</i> ELISA pH 9,6 200 ml	0,15 M Sodium karbonat, 0,35 M Sodium bikarbonat, 0,03 M Sodium azid, dan akuades	Sebanyak 5,86 g Na ₂ CO ₃ , 3,18 g NaHCO ₃ , dan 0,4 g NaN ₃ dicampurkan dengan akuades sampai volumenya 100 ml, lalu ukur pH sampai 9,6. Akuades ditambahkan kembali ke dalam larutan sampai volume 200 ml

Lanjutan lampiran 1

<i>Blocking buffer</i> 100 ml	PBS 1x dan 1% gelatin	Sebanyak 1 g gelatin dilarutkan ke dalam 100 ml PBS 1x
PBS-Tween	PBS 1x dan Tween-20	Sebanyak 500 µl Tween-20 ditambahkan ke dalam 1 liter PBS 1x
Substrat OPD	OPD, sodium sitrat, Na ₂ HPO ₄ , akuades, dan 3% H ₂ O ₂	Sebanyak 2,6 g sodium sitrat dan 6,9 g Na ₂ HPO ₄ dilarutkan dalam 50 ml akuades. Sebanyak 50 mg OPD ditambahkan ke dalam larutan, lalu tambahkan 1,2 ml 3% H ₂ O ₂
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%
Substrat DAB 0,05% 10 ml	Substrat DAB 0,05%, Tris-HCl pH 7,3, 0,3 % H ₂ O ₂ , dan akuades	Semua bahan dicampur menjadi satu, lalu tambahkan akuades sampai volume larutan 10 ml. H ₂ O ₂ ditambahkan paling akhir

[Sumber: Ausubel *dkk.* 2003: A.2.3; Sambrook & Russel 2001: A.1.1--A2.12.]

Lampiran 2

Perhitungan berat molekul protein rekombinan *globular head* NA

Berat Molekul (MW) Marka protein standar (kDa)	Jarak pita protein dari atas gel	Nilai Rf (X)	Log base 10 dari MW (Y)
200	0.7	0.137	2.301
150	0.8	0.157	2.176
120	0.9	0.176	2.079
100	1.1	0.216	2
85	1.2	0.235	1.929
70	1.4	0.275	1.845
60	1.6	0.314	1.778
50	1.9	0.373	1.698
40	2.3	0.45	1.602
30	3.1	0.608	1.477
25	3.5	0.686	1.398
20	4.2	0.824	1.301
15	4.9	0.96	1.176

Jarak migrasi larutan = 5,0 cm

Panjang pita sampel dari bagian atas *separating gel* sebesar 2,7 cm

Rf sampel (x) = jarak migrasi sampel : jarak migrasi larutan

$$= 2,7 \text{ cm} : 5,0 \text{ cm} = 0,54$$

Kurva standar (Gambar 4.4.1) dari Rf (x) vs Log MW (y) menghasilkan persamaan linier $y = -1,2346x + 2,2647$

Berdasarkan persamaan linier tersebut, maka diperoleh

$$Y (\text{Log MW}) = (-1,2346 \times 0,54) + 2,2647 = 1,59$$

$$\text{MW} = \text{anti-log } 1,59 = 38,904$$

Kesimpulan: Protein rekombinan *globular head* NA Virus AI H5N1 mempunyai berat molekul sebesar ~39 kDa

Lampiran 3

Penentuan konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA

Konsentrasi BSA (mg/ml)	OD BSA 1	OD BSA 2	Rata-rata OD BSA	OD EB+Gliserol	Rata-rata OD BSA-OD EB+Gliserol	OD Protein <i>globular head</i> NA
2	0.239	0.266	0.2525	0.032	0.111	0.131
1,5	0.258	0.274	0.266	0.032	0.105	
1	0.201	0.202	0.2015	0.032	0.086	
0,5	0.175	0.189	0.182	0.032	0.048	
0,25	0.169	0.17	0.1695	0.032	0.028	
0,125	0.172	0.151	0.1615	0.032	0.02	

Persamaan linier yang dihasilkan dari kurva standar (Gambar 4.5.1)

$$y = 0.0516x + 0.0201$$

$$\text{OD Protein rekombinan } \textit{globular head} \text{ NA} = 0.131$$

Maka, konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA:

$$0.131 = 0.0516x + 0.0201$$

$$0.131 - 0.0201 = 0,0516x$$

$$0,1109 = 0,0516x$$

$$x = 2,149 \text{ mg/ml}$$

Maka, konsentrasi protein rekombinan *globular head* NA sebesar 2,149 mg/ml

Lampiran 4

Hasil ELISA serum kelinci sebelum dan setelah imunisasi primer

1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci sebelum imunisasi			1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah imunisasi primer						
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200
	0.662	0.536	0.404	0.411		0.754	0.559	0.52	0.533
	0.689	0.547	0.421	0.412		0.723	0.548	0.557	0.518
Rata-rata	0.6755	0.5415	0.4125	0.4115	Rata-rata	0.7385	0.5535	0.5385	0.5255
2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci sebelum imunisasi			2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah imunisasi primer						
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200
	0.56	0.351	0.329	0.225		0.654	0.49	0.401	0.426
	0.548	0.337	0.331	0.431		0.66	0.452	0.402	0.368
Rata-rata	0.554	0.344	0.33	0.328	Rata-rata	0.657	0.471	0.4015	0.397
3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci sebelum imunisasi			3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah imunisasi primer						
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200
	0.529	0.398	0.337	0.31		0.571	0.459	0.422	0.371
	0.503	0.408	0.332	0.296		0.57	0.518	0.378	0.356
Rata-rata	0.516	0.403	0.3345	0.303	Rata-rata	0.5705	0.4885	0.4	0.3635
4. Antigen NA 12,5 µg/ml dengan serum kelinci sebelum imunisasi			4. Antigen NA 12,5 µg/ml dengan serum kelinci setelah imunisasi primer						
Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200	Pengenceran antibodi	1:25	1:50	0:100	0:200
	0.463	0.386	0.332	0.303		0.551	0.512	0.392	0.334
	0.509	0.44	0.338	0.306		0.536	0.486	0.411	0.26
Rata-rata	0.486	0.413	0.335	0.3045	Rata-rata	0.5435	0.499	0.4015	0.297

Lampiran 5

ELISA serum kelinci setelah *booster* ke-1 dan ke-2

1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 1										1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 2									
Penggencaran serum		1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum					1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum				
		0.974	0.865	0.761	0.555						1.2	0.844	0.866	0.757					
		0.977	0.905	0.555	0.557						1.21	0.912	0.844	0.773					
Rata-rata		0.9755	0.885	0.658	0.556	Rata-rata					1.205	0.878	0.855	0.765					
2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 1										2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 2									
Penggencaran serum		1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum					1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum				
		0.748	0.587	0.585	0.444						0.981	0.595	0.59	0.563					
		0.657	0.601	0.487	0.472						1.071	0.617	0.548	0.565					
Rata-rata		0.7025	0.594	0.536	0.458	Rata-rata					1.026	0.606	0.569	0.564					
3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 1										3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 2									
Penggencaran serum		1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum					1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum				
		0.652	0.627	0.589	0.485						1.043	0.579	0.537	0.526					
		0.609	0.544	0.517	0.482						1.013	0.518	0.554	0.513					
Rata-rata		0.6305	0.5855	0.553	0.4835	Rata-rata					1.028	0.5485	0.5455	0.5195					
4. Antigen NA 12.5 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 1										4. Antigen NA 12.5 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 2									
Penggencaran serum		1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum					1:25	1:50	0:100	0:200	Penggencaran serum				
		0.583	0.473	0.425	0.281						0.955	0.528	0.475	0.437					
		0.581	0.432	0.334	0.272						0.903	0.537	0.484	0.451					
Rata-rata		0.582	0.4525	0.3795	0.2765	Rata-rata					0.929	0.5325	0.4795	0.444					

Lampiran 6

Hasil ELISA serum kelinci setelah booster ke-3 dan ke-4

1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 3										
1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4	Pengenceran serum	1:25	1:50	0:100	0:200	1. Antigen NA 100 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4				
		1:653	1:344	0:977	0:882	Pengenceran serum				
		1:511	1:071	0:938	0:879	1:25	1:50	1:126	1:066	0:844
Rata-rata										
2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 3										
2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4	Pengenceran serum	1:25	1:50	0:100	0:200	2. Antigen NA 50 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4				
		1:342	1:008	0:664	0:624	Pengenceran serum				
		1:281	1:005	0:664	0:615	1:25	1:50	0:956	0:635	0:585
Rata-rata										
3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 3										
3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4	Pengenceran serum	1:25	1:50	0:100	0:200	3. Antigen NA 25 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4				
		1:275	0:988	0:65	0:611	Pengenceran serum				
		1:254	0:874	0:641	0:604	1:25	1:50	0:964	0:6	0:572
Rata-rata										
4. Antigen NA 12.5 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 3										
4. Antigen NA 12.5 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4	Pengenceran serum	1:25	1:50	0:100	0:200	4. Antigen NA 12.5 µg/ml dengan serum kelinci setelah booster 4				
		1:26	0:923	0:608	0:548	Pengenceran serum				
		1:246	0:883	0:584	0:532	1:25	1:50	0:903	0:578	0:521
Rata-rata										
Rata-rata										