

Profil Protein Hemagglutinin (Ha) Berdasarkan Berat Molekul Virus Avian Influenza Isolat Lokal**Profile Protein Hemagglutinin Of Avian Influenza Virus Local Isolate Based On The Molecular Weight**¹Helmi Adhitya, ²Rahaju Ernawati, ²Hani Plumeriatuti¹ PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga² Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

The aim of this study was to investigate protein molecular weight (mw) of Hemagglutinin of Avian Influenza virus. The influenza virus subtype H5N1 used in this study was propagated in embryonated chicken eggs and incubated at 37°C temperature for five days. The first step, the samples were identified by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate –Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). The second step, the samples were analyzed by Western Blot which was detected about protein reactivity toward AI polyclonal antibody. The result of the research showed that molecular weight of Hemagglutinin (HA) of the samples were 76,91 kDa. That protein were antigenic protein because it showed reactivity when were reacted with AI polyclonal antibody.

Keywords : Avian Influenza, Hemagglutinin, SDS-PAGE, Western blot**Pendahuluan**

Perkembangan industri perunggasan di Indonesia tampak sudah maju demikian pesat, namun seiring dengan kemajuan tersebut diikuti pula dengan perkembangan kendala yang semakin kompleks. Penyakit ayam merupakan kendala utama pada peternakan ayam intensif di lingkungan tropis termasuk di Indonesia. Virus Avian Influenza (AI) merupakan salah satu penyebab penyakit pada ayam yang dapat menimbulkan efek yang sangat besar baik dari segi ekonomi maupun psikologis bagi peternak maupun masyarakat secara luas (Widjaja, 2007).

Avian Influenza merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A dari family *Orthomyxoviridae* (Horimoto and Kawaoka, 2001). *Virus Avian Influenza sub tipe H5N1* sangat patogen yang dapat menyerang ternak unggas (burung, bebek dan ayam) di seluruh Asia Tenggara dan secara tidak terduga terjadi penularan dari burung ke mamalia (kucing, babi dan manusia) (Raharjo dan Nidom, 2004, Webster and Hulse, 2004).

Avian Influenza dapat bermutasi dan menyerang manusia yang kita kenal sebagai flu burung. Sub tipe/strain dari virus *Avian Influenza* bervariasi, namun demikian sub tipe yang perlu diwaspadai adalah H5 dan H7 karena sub tipe inilah yang bersifat patogen dan dapat menular ke manusia (Rahardjo, 2004). Saat ini telah diketahui adanya 16 jenis sub tipe virus AI tipe A berdasarkan antigen hemagglutinin (H1-H16) dan 9 sub tipe berdasar antigen neuraminidase (N1-N9) (Murphy and Webster, 1996), umumnya penyebutan sub tipe ditunjukkan dengan HxNy (Fouchier *et al.*, 2005; Tabbu, 2005; Rahardjo., 2004).

Virus ini mempunyai struktur antigen permukaan antara lain Haemagglutinin, Neuraminidase matriks protein dan nucleoprotein (NP). Haemagglutinin adalah molekul glikoprotein selubung virus yang berfungsi untuk mengikat virus ke reseptor sel target dan mengawali terjadinya infeksi. Sedangkan Neuraminidase adalah enzim yang dibutuhkan virus untuk melepas keturunan virus dari sel yang terinfeksi (Raharjo dan Nidom, 2004).

Salah satu faktor yang berperan dalam infeksi virus Avian Influenza ini adalah kecocokan antara virus Avian Influenza yang harus berikatan dengan glikoprotein atau glikolipid permukaan sel yang mengandung gugus terminal sialyl-galactosyl. Kondisi ikatan ini ikut berperan dalam spesifitas virus dengan hospes (Matrosovich et al, 2004). Setelah berikatan dengan reseptor sel hospes, maka virus akan masuk melalui fusi amplop virus dengan membran endosomal sel hospes. Proses ini memerlukan bantuan protease sel hospes untuk mengaktivasi perkusor hemagglutinin (HA0) menjadi fragmen 1 (HA1) dan fragmen 2 (HA2) yang akan memungkinkan virus melepaskan ribonukleoproteinnya, yang selanjutnya akan terjadi replikasi virus di dalam sel hospes. Perbedaan kepekaan protein HA virus Avian Influenza terhadap protease hospes akan berhubungan dengan tingkat virulensi (Alexander, 2000; Swayne and Suarez, 2003).

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Institute Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan mulai Oktober 2011 sampai Maret 2012. Unit penelitian adalah sampel virus AI sub tipe H5N1 yang diperoleh dari penelitian terdahulu. Diperbanyak pada telur ayam berembrio (TAB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama lima hari. Setelah lima hari, TAB yang hidup dan yang mati diuji dengan uji HA (Suwarno, 2006). TAB dengan titer tertinggi diambil cairan alantoisnya kemudian disimpan dalam suhu 4 derajat Celcius sampai digunakan untuk penelitian.

Bahan penelitian yang digunakan TAB, virus AI sub tipe H5N1 isolat lokal yang diperoleh dari Jombang, ayam sehat, alkohol, vaksin AI H5N1 (Capri), larutan PZ, eritrosit donor, EDTA, antigen AI (didapat dari Pusvetma), formalin, aquadest, membran nitroselulosa, marker rainbow, kertas Whatman, Bisacrylamid, Tris, SDS, TEMED, Ammonium persulfat, Gliserol, Glycine, Marker protein, Asam sitrat 10%, laemmli buffer, TBS Tween 0,5%. Vorteks, alat-alat gelas, cetakan untuk SDS, power supply, shaker GFL, Booter, gunting steril, pinset steril, magnetic bar, aluminium foil, mikropate 96 sumur, washer, pensil, spuit, almari es, inkubator, mikropipet, yellow tip, white tip, blue tip, spektrofotometer.

Perbanyakan Virus

Perbanyakan virus dilakukan pada TAB yang diinokulasi dengan virus AI sub tipe H5N1 isolat lokal yang diperoleh dari penelitian terdahulu. Setelah TAB diinkubasi selama lima hari, cairan alantois dikoleksi untuk kemudian diukur titernya melalui uji HA untuk selanjutnya digunakan dalam SDS-PAGE (Suwarno, 2006).

Uji Hemagglutinati (HA)

Uji HA digunakan untuk mengukur titer virus Avian Influenza sub tipe H5N1 yang telah dipanen dari TAB.

Pembuatan anti serum AI

Vaksin AI sub tipe H5N1 disuntikkan pada ayam setiap dua minggu sekali dan diulang sebanyak empat kali. Setiap dua minggu darah ayam diambil dan dipisahkan serumnya. Selanjutnya diukur titer antibodinya dengan menggunakan uji HI. Antiserum AI yang didapat ini nantinya digunakan untuk Western Blot.

Uji Hemagglutination inhibition (HI)

Uji HI dilakukan untuk menguji titer antibodi dari serum ayam yang telah divaksin AI. Antibodi yang digunakan dalam uji ini adalah antibodi virus AI sub tipe H5N1 yang diproduksi pada ayam setelah disuntik dengan vaksin AI H5N1.

Analisis Protein dengan SDS PAGE

SDS PAGE 12,5 % dilakukan terhadap isolat virus AI untuk mengetahui berat molekul protein Hemagglutinin yang selanjutnya protein ditransfer ke membran nitroselulosa kemudian dilakukan blotting (Wenxin, 2009) .

Menurut Schagger (2006), prosedur SDS PAGE diawali dengan mempersiapkan *glass plate* bersekat untuk mencetak *Running gel*. Pembuatan *Running gel* diawali dengan cara mencampurkan 30 % *Acrylamid* sebanyak 2,5 ml, Tris HCl pH 8,8 1,2 ml, 0,5 % SDS 1,2 ml, aquadest 1,1 ml, TEMED 5 µl, APS 10 % 30 µl. Campuran bahan-bahan ini harus homogen kemudian dengan perlahan dimasukkan ke dalam *glass plate* bersekat melalui dinding *plate* untuk menghindari adanya gelembung udara. Selanjutnya ditambahkan butanol diatas permukaan *gel* untuk meratakan permukaan atas dari *gel* memadat. Langkah selanjutnya adalah membuang butanol dan mencuci permukaan *gel*

dengan elektroforesis *buffer* yang telah diencerkan 10 kali.

Langkah selanjutnya adalah pembuatan *stacking gel* dengan mencampurkan sebanyak 0,87 ml *aquadest*, tris HCl pH 6,8 0,4 ml, 30 % *Acrylamid* 0,33 ml, 0,5 % SDS 0,4 ml, TEMED 2 μ l, APS 10 % 10 μ l. Campuran ini dimasukkan diatas cetakan gel yang pertama sehingga memenuhi *glass plate* dan diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar. Selanjutnya *comb* diambil dan permukaan *stacking gel* dibersihkan dengan elektroforesis *buffer*.

Persiapan sampel dilakukan dengan menyiapkan tabung *eppendorf* sebanyak jumlah sampel dan dimasukkan ke dalamnya masing-masing 15 μ l *laemmli buffer* kemudian ditambahkan sampel sebanyak 15 μ l. Tutup tabung *eppendorf* dilubangi dengan jarum untuk menghindari letupan-letupan saat proses denaturasi pada pemanasan 100°C selama $\pm$ lima menit.

Tahap berikutnya adalah proses elektroforesis yaitu dengan cara memasukkan *glass plate* bersekat yang berisi *Running gel* ke dalam *chamber* model biometra kemudian dituangi elektroforesis *buffer* hingga *Running gel* terendam. Selanjutnya sampel dan marker dimasukkan ke dalam sumuran-sumuran *stacking gel*. Langkah berikutnya adalah menyalakan *power supply* dengan tegangan 125 Volt, 40 mA sampai 1-2 jam. Setelah seluruh sampel dan marker turun, *power supply* dimatikan dan *glass plate* diambil kemudian gel dilepas perlahan dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi larutan pewarna.

Analisis dengan Western Blotting

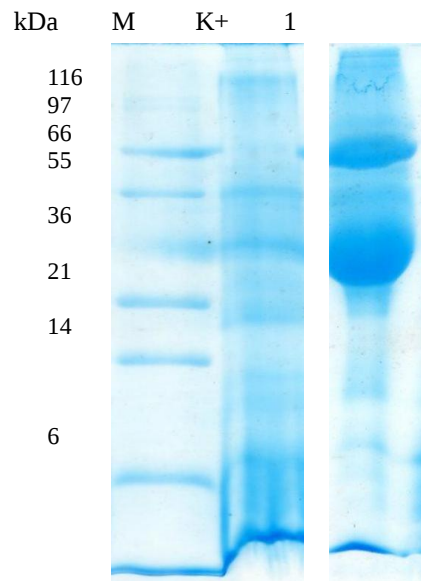
Western blotting dilakukan dengan mempersiapkan membran nitroselulosa dan kertas whatman yang direndam sebentar dalam transfer buffer serta gel berisi elektroforesis tanpa pewarnaan. Pada *blotter* diletakkan lima lapis kertas whatman yang sudah direndam dalam transfer buffer. Gel hasil elektroforesis diletakkan tepat diatas membran nitroselulosa

dan dihindarkan adanya rongga udara, kemudian diatasnya diberi lagi lima lapis kertas whatman yang sudah direndam transfer buffer, selanjutnya seluruh lapisan dibasahi lagi dengan transfer buffer.

Blotter ditutup kuat-kuat dan dilakukan running 100 Volt, 40 mA selama satu jam kemudian membran nitroselulosa diambil pelan-pelan dan dimasukkan ke dalam TBS (*Trans Buffer Salin*). Membran nitroselulosa dicuci satu kali dengan TBS kemudian dipindah ke cawan petri baru. Selanjutnya dilakukan *blocking* membran nitroselulosa dengan empat persen *skim milk* dalam TBS tween 0,5 % dan diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Setelah *blocking* membrane nitroselulosa dicuci dengan *washing buffer* sebanyak tiga kali masing-masing 30 menit dan dilakukan diatas *shaker*. Selanjutnya ditambahkan antiserum AI dalam buffer inkubasi dan diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang diatas *shaker*, kemudian membran nitroselulosa dicuci lagi dengan *washing buffer* sebanyak lima kali masing 10 menit. Setelah dicuci dilakukan penambahan konjugat *anti-Chicken* yang berlabel fosfatase dalam buffer inkubasi selama satu jam dengan *shaker* pada suhu ruang, kemudian dicuci lagi dengan *washing buffer* sebanyak tiga kali masing-masing 10 menit kemudian ditambahkan substrat BCIP/NBT.

Hasil dan Pembahasan

Protein virus Avian Influenza dapat diekspresikan dengan menggunakan metode SDS-PAGE dengan indikator warna *Comassie Brilliant Blue*. Metode SDS-PAGE memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Isolat virus yang digunakan berasal dari penelitian yang terdahulu, yaitu isolat lokal (yang berasal dari Jombang). Sampel yang telah dilakukan identifikasi berdasarkan berat molekulnya dengan menggunakan SDS-PAGE 12,5% dan divisualisasikan dengan pewarnaan *Comassie Brilliant Blue* menunjukan beberapa protein dengan berat molekul yang berbeda.



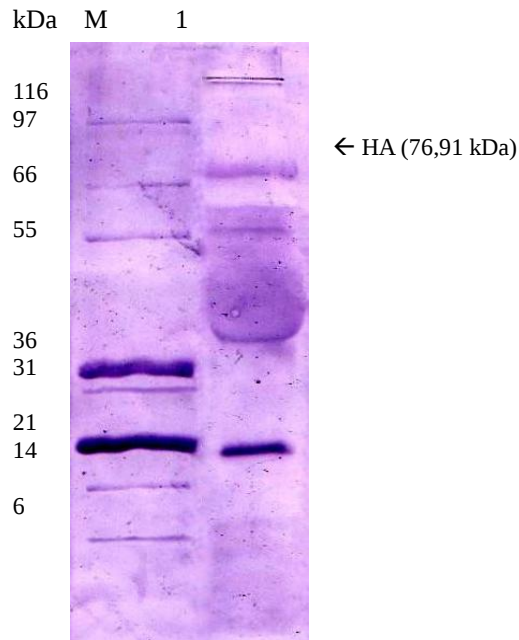
Gambar 1 : Hasil analisis SDS-PAGE protein isolat virus *Avian Influenza* M) Marker protein unstained K+) Kontrol positif 1) isolat lokal.

Protein yang muncul ini adalah protein yang bersifat umum karena bukan protein spesifik AI, sehingga diperlukan analisis reaktivitas dengan menggunakan metode *western blotting*.

Analisis Reaktivitas Virus AI dengan *Western Blotting*

Protein dari SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa kemudian direaksikan

dengan antibodi poliklonal dari serum ayam yang diimunisasi dengan vaksin AI, selanjutnya direaksikan dengan konjugat (fragmen Imunoglobulin G *anti chicken*) yang kemudian divisualisasikan dengan substrat NBT/BCIP menunjukkan bahwa tidak semua protein yang muncul pada SDS-PAGE dapat bereaksi dengan antibodi (tidak menunjukkan adanya reaktivitas).



Gambar 2: Hasil Analisis *Western Blot* protein isolate virus *Avian Influenza* M) Marker protein 1) isolat lokal

Pembahasan

Elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekul. Salah satu metode elektroforesis yang sering dipakai adalah SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphat Poly Acrylamid Gel Electrophoresis*) yang merupakan metode standart pengujian terhadap berat molekul protein (Rantam., 2003).

Hasil SDS-PAGE, protein yang muncul setelah divisualisasi dengan *Commassie Brilliant Blue* menunjukkan bahwa isolate virus AI tidak semuanya sama, hal ini kemungkinan virus tersebut mempunyai sifat berbeda antara satu daerah dengan daerah lain, selain itu juga sampel virus AI tersebut mempunyai sifat patogenitas yang berbeda karena protein ini merupakan protein fungsional yang diekspresi pada saat virus menginfeksi sel. Protein virus untuk sampel isolat lokal yang berasal dari daerah Jombang tidak terlihat jelas pita/*band* yang terbentuk. Pita yang tidak jelas terlihat ini kemungkinan disebabkan karena sampel yang sudah terlalu lama dan virus tidak diperbanyak lagi. Selain itu sampel juga terlalu kotor.

Protein yang terlihat pada hasil SDS-PAGE masih belum spesifik, karena itu diperlukan uji spesifitas sehingga didapatkan protein spesifik. Salah satu uji spesifitas yang biasa digunakan adalah metode *Western Blotting* (Aulani'am, 2005). *Western Blotting* digunakan untuk mendeteksi berat molekul protein campuran antigen dan digunakan untuk membedakan reaksi silang diantara protein. Tujuan dari *Western Blotting* adalah untuk mendapatkan protein antigenic yang lebih spesifik (Rantam, 2003).

Setelah dilakukan analisis *western blotting* dengan cara mereaksikan antibody poliklonal ayam yang telah divaksinasi virus *Avian Influenza (AI)* subtype H5N1 menunjukkan bahwa protein yang muncul pada pemeriksaan SDS-PAGE 12,5% tidak semuanya ditemukan pada analisis dengan metode *western blotting*. Hal ini dikarenakan protein tersebut kemungkinan tidak mempunyai kemampuan untuk menginduksi antibodi sehingga protein tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan vaksin. Hal tersebut diatas menandakan bahwa protein yang mempunyai daya reaktivitas mempunyai peranan penting dalam pathogenesis virus dan oleh karena protein yang mempunyai daya reaktivitas tersebut dapat dikembangkan untuk diagnostik.

Kesimpulan

Analisis dengan *Western blot* yang dilakukan pada sampel isolat lokal menunjukkan menunjukkan protein Hemagglutinin (HA) dengan berat molekul 76,91kDa. Protein HA isolate virus *Avian Influenza* isolat Jombang merupakan protein antigenik karena menunjukkan reaktivitas saat direaksikan dengan antibodi poliklonal AI pada *western blotting*

Daftar Pustaka

- Aulini'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 53-85.
- Fouchier R.A,V. Munster, A. Wallensten , T.M Bestebroer, S.Herfist, D. Smith, G. F. Rimmelzwan, B. Olsen, and A. D. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H5) obtained from black-headed gulls. *J Virol*; 79: 2814-22.
- Harimoto, T. and Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza Viruses. *Clinical Microbiology. Rev.* 14 (1) : 129 – 149.
- Matrosovich, M.N., T.Y., Matrosovich, T. Gray, N.A. Robert, and H.D. Klenk. 2004. Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cell Types in Cultures of Human Airway Ephithelium. *PNAS.* 101 (13) : 4620 – 4624.
- Murphy, B. R., and R.G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses. P. 1397 – 1445. In *Fields Virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds) 3rd. Lippincott – Raven, Philadelphia
- Raharjo, Y. dan C.A. Nidom. 2004. *Avian Influenza; Pencegahan, Pengendalian, dan Pemberantasannya. Hasil Infestigasi Kasus di Lapangan GITA* Pustaka. Jakarta.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Suwarno., Adi Prijo Rahardjo, Fauziah, Eko Agus. 2006. Karakterisasi Virus Avian Influenza dengan Uji Serologik dan *Reserve Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*. *Media Kedokteran* 22 (2) : 74-78.
- Swayne, D.E., and D.L. Suarez. 2003. Biology of Avian Influenza Especially The Change of Low Pathogenicity. *Proc. Latin American Poultry Congress*.

- Tabbu, R.C. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangan Penyakit Bakterial, Mikal dan viral. Kanisius. Yogyakarta. 238 -343.
- Webster RG and D.J. Hulse, 2004. Microbial Adaption and Change : Avian Infleunza Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23 (2) : 453-465
- Wenxin,LUO.,et al. 2009. Peptide mimics of a conserved H5N1 avian influenza virus neutralization site. Biochem. J. 419 : 133-139.
- Widjaja, N.S. 2007. Study of Serologic and Crossed Reaction among Some Commercial Avian Influenza Vaccine against Field AI Virus. Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University.