

Purifikasi Hemagglutinin dan Produksi Antibodi Monospesifik terhadap Hemagglutinin Virus Influenza Subtipe H5N1

SIMSON TARIGAN, R. INDRIANI dan D.A. HEWAJULI

*Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. RE Martadinata 30, Bogor 16114*

(Diterima dewan redaksi 5 Oktober 2010)

ABSTRACT

TARIGAN, S., R. INDRIANI and D.A. HEWAJULI. 2010. Purification and production of monospecific antibody to the hemagglutinin from Subtype H5N1 influenza virus. *JITV* 15(4): 308-314.

The purpose of this study was to purify the hemagglutinin from H5N1 virus and to generate monospecific antibody appropriate for production of sensitive and specific immunoassay for H5N1 avian influenza. For this purpose, a local isolate H5N1 virus (A/Ck/West Java/Hamd/2006) was propagated in chicken embryos. The viral pellet was dissolved in a Triton-X-100 solution, undissolved viral particles were pelleted by ultracentrifuge, and the supernatant containing viral surface glycoproteins (Hemagglutinin and neuraminidase) was collected. The neuraminidase in the supernatant was absorbed by passing the supernatant through an Oxamic-acid-superose column. After dialyzing extensively, the filtrate was further fractionated with an anion exchange chromatography (Q-sepharose) column. Proteins absorbed by the column were eluted stepwisely with 0.10, 0.25, 0.25 and 0.75 M NaCl in 20 mM Tris, ph 8. Hemagglutinin (H5) was found to be eluted from the column with the 0.5 M NaCl elution buffer. The purified H5 was free from other viral proteins based on immunoassays using commercial antibodies to H5N1 nucleoprotein and neuraminidase. When used as ELISA's coating antigen, the purified H5 proved to be sensitive and specific for hemagglutinin H5. Cross reactions with other type-A-influenza virus, H6, H7 dan H9, were negligibly low. For the production of monospecific antiserum, the purified H5 was separated with SDS-PAGE, the band containing the H5 monomer was cut out, homogenised and injected into rabbits. The antiserum was capable of detecting the presence of inactivated H5N1 virus in a very dilute suspension, with a detection limit of 0.04 hemagglutination (HA) unit. The purified hemagglutinin and the serum raised against it should be useful for developing specific, sensitive and affordable immunoassay for H5N1 avian influenza.

Key Words: H5N1, Hemagglutinin, Triton, Oxamic-acid Sepharose, Q sepharose, ELISA

ABSTRAK

TARIGAN, S., R. INDRIANI dan D.A. HEWAJULI. 2010. Purifikasi hemagglutinin dan produksi antibodi monospesifik terhadap hemagglutinin virus influenza subtipe H5N1. *JITV* 15(4): 308-314.

Penelitian ini bertujuan mengisolasi hemagglutinin virus H5N1 dan memproduksi antibodi monospesifik sebagai dasar dalam pembuatan alat diagnosa yang sensitif dan spesifik. Untuk tujuan tersebut, virus H5N1 (A/Ck/West Java/Hamd/2006) dipropagasi dalam telur ayam SPF tertunas. Pelet virus diinkubasikan dengan Triton-x 100, kemudian dipeletkan dengan ultrasentrifus, lalu supernatan yang mengandung neuraminidase (N1) dan hemagglutinin (H5) diambil. Setelah neuraminidase dalam supernatan diabsorpsi dengan kolom Oxamic-acid superose, supernatan didialisis secara intensif. Pemisahan selanjutnya dilakukan dengan kromatografi pertukaran anion menggunakan kolom Q-sepharose. Protein yang diadsorpsi oleh kolom dielusi secara *stepwise* dengan 0.10, 0.25, 0.25 and 0.75 M NaCl dalam 20 mM Tris, ph 8. Hemagglutin ditemukan terelusi dari kolom dengan larutan 0.5 M NaCl. *Purified* H5 tersebut tidak mengandung protein virus yang lain berdasarkan uji imunologis menggunakan antibodi komersial terhadap neuraminidase dan nucleoprotein. Ketika digunakan sebagai *coating* antigen ELISA, *Purified* H5 tersebut memiliki sensitivitas dan spesivitas yang tinggi; reaksi silang dengan suptype virus influenza type A yang lain (H6, H7 dan H9) sangat rendah. Untuk memproduksi anti-H5 antibodi monospesifik, *Purified* H5 tersebut dipisahkan dengan SDS PAGE, pita H5 monomer dipotong, dihomogenisasi lalu disuntikkan kepada kelinci. Dua minggu setelah penyuntikan kedua antibodi spesifik telah mencapai titer yang tinggi. Antiserum dapat mendeteksi virus H5N1 yang telah dinaktifkan pada konsentrasi yang sangat rendah, dengan limit deteksi 0.04 hemagglutinasi (HA) unit. *Purified* H5 and antibodi spesifik H5 yang dihasilkan dari penelitian ini dapat dipakai untuk pembuatan alat diagnosa penyakit AI-H5N1 yang sensitif, spesifik dan dengan biaya yang relatif sangat murah.

Kata Kunci: H5N1, Hemagglutinin, Triton, Oxamic-acid Sepharose, Q sepharose, ELISA

PENDAHULUAN

Penyakit Flu burung yang disebabkan oleh virus avian influenza sub tipe H5N1 merupakan penyakit yang paling banyak mendapat perhatian sejak tahun 1997. Penyakit ini telah tersebar di sekurang kurangnya 57 negara, menimbulkan kerugian yang luar biasa besar bagi industri perunggasan, dan ketakutan karena virus penyebabnya memiliki potensi bermutasi menjadi penyebab pandemi influenza pada manusia yang dapat menimbulkan korban puluhan sampai ratusan juta jiwa (SIMS dan BROWN, 2008). Di Indonesia, penyakit flu burung H5N1 telah menyebar hampir di seluruh wilayah dan merupakan negara dengan kasus pada manusia paling tinggi di dunia, sampai tanggal 18 Oktober 2010 telah terjadi 171 kasus (141 fatal).

Mengendalikan infeksi pada unggas merupakan salah satu upaya terpenting dalam mencegah atau sekurang kurangnya menghambat terjadinya pandemi oleh virus H5N1 (HORIMOTO dan KAWAOKA, 2001). Pengendalian infeksi pada unggas juga akan menyelamatkan industri perunggasan dari kerugian sehingga memberikan keuntungan ekonomi yang sangat besar. Ada berbagai cara dapat dilakukan untuk mengendalikan penyakit seperti *stamping out*, vaksinasi, pengetatan *biosecurity* dan sebagainya. Namun, apapun cara yang dipilih ketersediaan alat deteksi penyakit yang akurat, cepat dan harga yang terjangkau mutlak diperlukan. Untuk penyakit influenza, termasuk Flu burung H5N1, isolasi virus merupakan diagnosa yang menjadi patokan atau *golden standard*. Deteksi nukleotida virus dengan *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) atau *Real time polymerase chain reaction* (RRT-PCR) adalah cara kedua yang paling banyak dipakai karena sensitifitas dan spesivitasnya sangat tinggi.

Penetapan diagnosa dengan isolasi virus memerlukan fasilitas khusus, mahal dan hasilnya dan pengerjaannya membutuhkan waktu yang lama. Diagnosa dengan PCR sekalipun lebih baik, namun biayanya juga mahal dan pengerjaannya harus dilakukan di laboratorium yang relatif lengkap. Oleh karena itu, alat diagnosa tambahan yang praktis, cepat dan harga yang terjangkau sangat diperlukan. Alat diagnosa yang berpotensi memenuhi kriteria seperti itu adalah alat diagnosis imunologis. Kit *immunoassay* untuk Flu burung yang praktis dan cepat telah dipakai secara meluas di Indonesia. Semua kit tersebut merupakan produk impor sehingga harganya mahal disamping itu sensitifitas dan spesifitas dari beberapa kit tersebut juga kurang memuaskan.

Diagnosa cepat tersebut dimaksudkan sebagai komplemen terhadap PCR dan isolasi virus bukan untuk menggantikannya secara total. Sensitifitas *rapid diagnostic kit* tidak akan bisa menandingi PCR. Salah satu laporan menyebutkan sensitifitas PCR dapat

mencapai 10^{-6} TCID₅₀, bahkan real-time PCR dapat mencapai 10^{-7} TICD₅₀; sedangkan Binax NOW[®], sebuah *rapid dignostic kit* hanya mencapai 10^{-4} TICD₅₀ (NG, *et al.*, 2005). Penelitian lain terhadap enam diagnostik kit (Binax Now, Directigen A+B, Directigen EZ A+B, Quidel Quick Vue A+B, Sysmx and Genzyme) melaporkan bahwa sensitivitas ke enam kit tersebut berkisar antara $10^{-2.5}$ sampai 10^{-4} TCID₅₀. Walaupun sensitifitas nya lebih rendah dibandingkan PCR, spesifitasnya hampir menyamai PCR. Sebuah evaluasi terhadap kinerja Directigen Flue A+B[®] pada spesimen *nasopharyngeal aspirate* manusia, mengungkapkan kit tersebut memiliki spesifitas 99,6%, sensitivitas 96%, *positive predictive value* 96% dan *negative predictive value* 99% terhadap PCR sebagai standard (CHAN, *et al.*, 2002). Performan immunoassay kit untuk unggas kelihatannya tidak sebaik pada manusia. WOOLCOCK dan CARDONA, (2005) mengevaluasi lima buah *antigen capture immunoassay kit*, Directigen Flu A (Becton Dickinson), QuickVue Influenza test kit (Quidel), FLU OIA (ThermoBiostar), Zstat Flu (ZymeTx, Inc.) and NOW FLU A Test (Binax) dan menyimpulkan bahwa tidak ada satupun diantara kit tersebut yang cukup sensitif untuk mendeteksi virus dari sampel swab kloaka dan orofarings dari ayam yang terinfeksi virus influenza.

Uji cepat untuk AI pada umumnya untuk mendeteksi antigen atau protein virus menggunakan antibodi spesifik. Protein virus yang banyak digunakan sebagai target adalah nucleoprotein virus influenza tipe A (Binax Now Influenza A&B, Directigen EZ Flu A+B, Denka Seiken Quick Ex-Flu, Fujirebio Espline Influenza A&B-N, and Quidel QuickVue Influenza A+B Test, Rocheby Influenza A Antigen Test, Poctem Influenza A+B) (CHAN, *et al.*, 2007, HURT, *et al.*, 2007). Sejak merebaknya wabah H5N1 AI, hemagglutinin H5 (H5HA) juga telah banyak digunakan sebagai target (CHEN, *et al.*, 2007, CHEN, *et al.*, 2008, TSUDA, *et al.*, 2007).

Membuat perangkat diagnostik cepat AI untuk keperluan dalam negeri sangat layak dilakukan karena permintaan yang sangat besar. Permintaan yang tinggi terhadap diagnosa cepat tersebut bukan saja terjadi di dalam negeri, tetapi juga secara global. Hal ini dapat terlihat dari banyaknya diagnosa cepat yang telah diproduksi oleh perusahaan perusahaan multi nasional (HURT, *et al.*, 2007). Telah banyaknya kit diagnosa yang beredar juga merupakan tambahan indikasi bahwa pembuatannya fisibel secara teknis. Penelitian ini bertujuan mengisolasi hemagglutinin virus H5N1 (H5) dan memproduksi antitibodi monospesifik terhadap protein tersebut. Penelitian ini merupakan langkah pertama yang vital dalam usaha menghasilkan alat diagnostik AI H5N1. Alat diagnosa yang nantinya dapat dikembangkan adalah alat diagnosis yang mampu medeteksi antibodi dan antigen virus Influenza tipe A

sutipe H5, sehingga lebih spesifik dari alat yang hanya mampu mendeteksi virus influenza tipe A saja.

MATERI DAN METODE

Isolat dan propagasi virus

Isolat virus H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah A/Ck/West Java/Hamd/2006. Sebelum dilakukan propagasi, kemurnian virus diperiksa dengan memastikan bahwa tidak ada kontaminasi virus lain, terutama virus ND, dalam inokulum. Propagasi virus dilakukan dalam 1000 telur tertunas ayam SPF umur 11 hari dengan 10^3 lethal egg dose (LED) virus per butir. Setelah inkubasi selama 30 jam pada suhu 37°C, cairan alantoik diambil. Partikel yang ada didalamnya dihilangkan dengan memelotkannya pada 5000 x g dan menyaringnya dengan filter 0.45 µm. Setelah itu, virus dipeletkan pada 35000 x g selama 1 jam, pelet virus disuspensikan dalam PBS, dialiquot, lalu disimpan dalam -80°C sampai digunakan. Sebelum proses purifikasi hemagglutinin, protein virus yang telah dipropagasi ini dianalisis dengan SDS PAGE dan imunoblot. Sebuah gel SDS PAGE diwarnai dengan Coomasie dan sebuah lagi ditransfer ke membran nitroselulosa dan direaksikan dengan antiserum terhadap virus H5N1 standard (A/Ck/Scot/59) (Abcam, UK), nucleoprotein rekombinan (Abcam, UK) dan hemagglutinin-H5 rekombinan (Abcam, UK).

Ekstraksi glikoprotein permukaan

Ekstraksi glikoprotein dilakukan sesuai dengan prosedur sebelumnya (HOCART, *et al.*, 1995, TARIGAN, *et al.*, 2009). Secara ringkas, pelet virus disuspensikan dalam larutan pengeksrak (3% Triton x-100, 1 M KCl, 2 mM PMSF dalam 0.1 M bufer fosfate pH7) dan diagitasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kecuali kalau disebutkan lain, semua bahan kimia diperoleh dari Sigma chemical. Komponen virus yang tidak terlarut dipeletkan dengan ultrasentrifus (35000 x g selama 1 jam), lalu supernatan yang didalamnya terkandung glikoprotein permukaan virus (hemagglutinin dan neuraminidase) diambil. Neuraminidase dalam larutan dipisahkan dari larutan menggunakan *affinity column* (N-(*p*-aminophenyl) oxamic acid agarose)) sesuai dengan prosedur sebelumnya (TARIGAN, *et al.*, 2009).

Purifikasi hemagglutinin

Filtrate atau Protein yang tidak diabsorpsi oleh kolom oxamic-acid sepharose didialisis dalam bufer 20 mM Tris pH 8 mengandung 0.1% detergent octyl glycopyranoside. Suspensi protein yang telah didialisis selanjutnya diseparasi dengan kolom anion exchange (Q

sepharose). Setelah semua sampel diinjeksikan, kolom dicuci dengan bufer A (20 mM Tris, 0.1% octyl glycopyranoside, pH 8) sebanyak 20 volume kolom. Protein yang diabsorpsi kolom dielusi secara stepwise, masing-masing dengan 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M dan 0.75 M NaCl dalam bufer A, masing masing sebanyak 5 volume kolom. Semua fraksi ditampung dan diperiksa kandungan Hemagglutininya menggunakan HA test (FAO, 2004), dan ELISA menggunakan antibodi monospesifik terhadap hemagglutinin H5 (Abcam, UK). Fraksi yang positif H5 dianalisis kemurniannya dengan SDS PAGE. Protein dalam gel diwarnai dengan Coomasie blue, dan sebagian lagi ditransfer ke dalam membran nitroselulosa. Hemagglutinin H5 dalam membran diidentifikasi dengan antibodi monospesifik terhadap hemagglutinin H5 dalam uji immunoblot. Konsentrasi proteinnya diukur dengan metode Bradford, dikonsentrasikan menjadi 2-3 ml, dialiquot dan disimpan pada -20°C (Bradford, 1976).

ELISA

Konsentrasi optimum purified H5 sebagai *coating* ELISA ditentukan dengan *checkerboard titration*, menggunakan serum referensi anti virus H5N1 (A/Ck/Scot/59) (Veterinary Laboratory Agency, UK. Reaksi silang purified H5 dengan antiserum terhadap virus influenza type A subtype H5N2, H6, H7 dan H9 ditentukan untuk memprediksi spesifitas dari hemagglutinin H5 tersebut. Serum referens tersebut diperoleh dari AAHL Geelong, Australia.

Produksi anti-H5 antibodi

Untuk memproduksi anti-H5 antibodi monospesifik, purified H5 tersebut diseparasi dengan SDS PAGE menggunakan sumuran tunggal sepanjang, gel diwarnai dengan Coomasie blue (diencerkan 1: 10) selama 5 menit lalu *destained* larutan asam asetat. Pita atau *band* yang mengandung H5 dipotong, dihomogeisasi dalam PBS yang mengandung 1 mg/ml adjuvan Quil A (pita dari 2 gel dalam 2.5 ml), lalu disuntikkan secara subcutan pada kelinci. Sample serum untuk pengukuran titer antibodi diambil pada hari sebelum imunisasi dan 2 minggu setelah setiap imunisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Propagasi virus dalam 1000 telur tertunas SPF menghasilkan 26 ml suspensi virus dengan titer 2^{26} HA/25 µl. Pemeriksaan imunoblot virus H5N1 yang dipakai dalam penelitian ini (A/Ck/West Java/Hamd/2006) menunjukkan bahwa protein virus tersebut dikenali oleh serum referens terhadap H5N1 (A/Ck/Scot/59), antiserum monospesifik terhadap

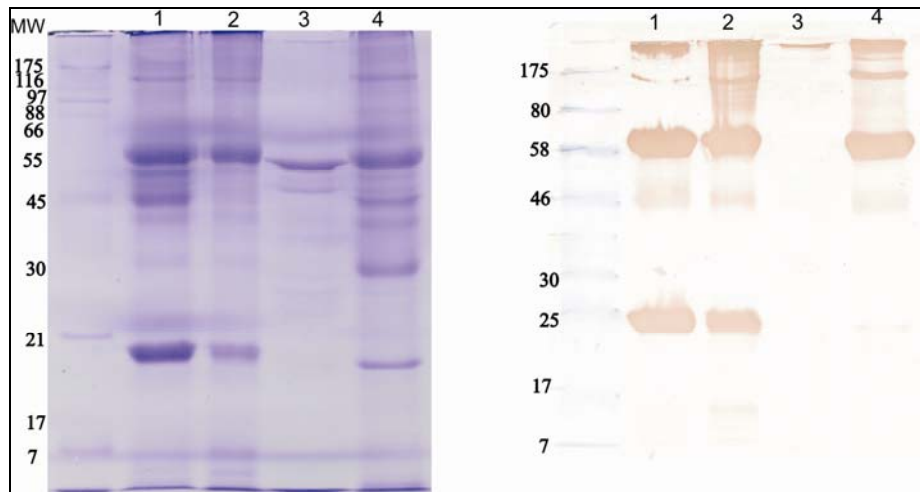
hemagglutinin-H5N1 rekombinan dan nucleoprotein-H5N1 rekombinan. Pengujian ini mengukuhkan identitas imunologis virus H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini.

Hasil purifikasi dengan kromatografi pertukaran anion menggunakan kolom Q sepharose menunjukkan bahwa H5 dielusi dari kolom dengan eluent yang memiliki PH 8 dan konduktivitas setara 0.5 M NaCl (fraksi F50). Tidak ada protein yang terdeteksi pada fraksi F75 (eluent 0.75 M NaCl) yang berarti H5 sudah terelusi semua dengan eluent 0.5 M NaCl. Keberadaan H5 pada fraksi F25 dapat dideteksi dengan antibodi spesifik tetapi aktifitas hemagglutinasinya tidak terdeteksi.

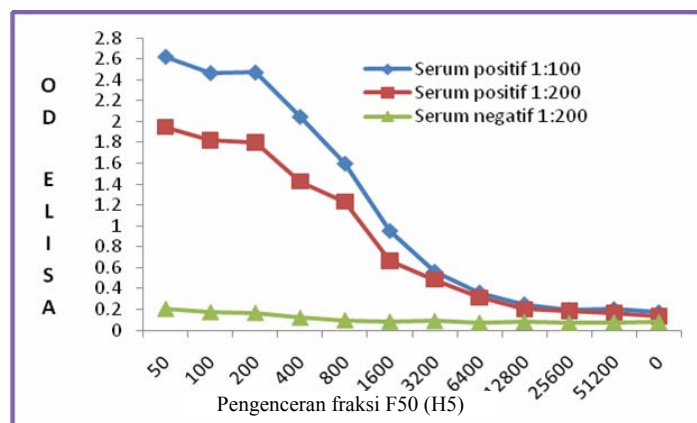
Ketika diseparasi dengan SDS PAGE, fraksi F50 memiliki sekurang-kurangnya 6 pita dengan pita ~60 kDa terlihat paling dominan. Berdasarkan analisis immunoblot diketahui bahwa pita ~60 kDa adalah H5 sedangkan pita

~ 120 kDa merupakan *dimer* dari H5. Pita yang lain tidak bereaksi dengan antiserum H5 ataupun antiserum H5N1, jadi pita tersebut bukan merupakan komponen protein virus H5N1 yang utuh. Kemungkinan pita tersebut merupakan frakmentasi dari protein H5 yang tidak lagi dikenali oleh antiserum H5. Hal ini diperkuat oleh kenyataan bahwa sebagian besar pita tersebut tidak terlihat pada sampel atau lajur H5N1 dan triton ekstrak (Gambar 1).

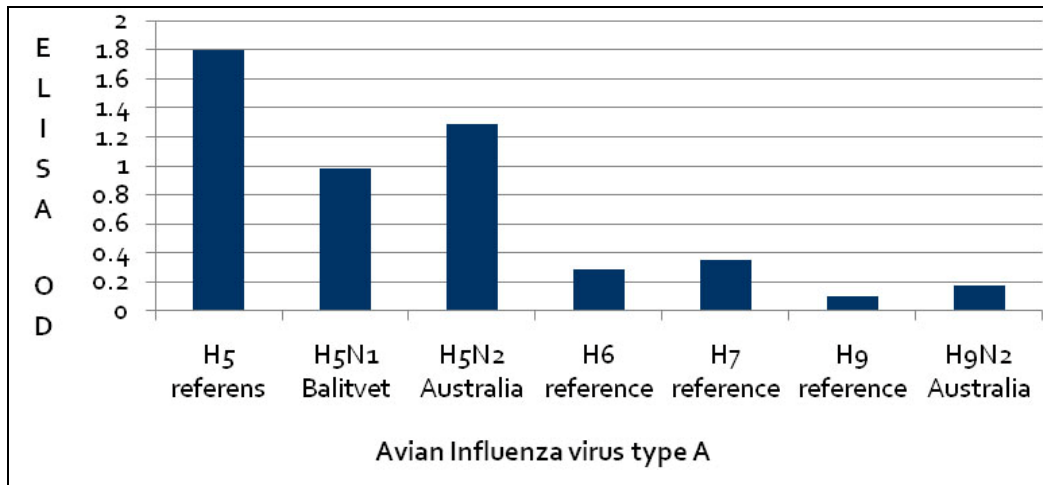
Ketika dipakai sebagai *coating antigen* dalam ELISA antibodi, *purified* H5 tersebut memberikan perbedaan reaksi yang sangat jelas antara serum ayam positif H5N1 dan serum negatif (Gambar 2). Tidak ditemukan reaksi dengan serum negatif pada semua pengenceran *purified* H5 yang diuji sedangkan dengan serum positif, reaksi masih sangat jelas sampai pengenceran yang tinggi (1: 3200 setara dengan 0.5625



Gambar 1. Profil protein pada berbagai tahap purifikasi H5, SDS PAGE (gambar kiri) dan immunoblot dengan antiserum H5N1 (A/Ck/Scot/59) (gambar kanan). Lajur 1= keseluruhan protein virus H5N1 (A/Ck/West Java/Hamd/2006), lajur 2 = ekstrak triton H5N1, lajur 3= fraksi F15 Q-sepharose, dan Lajur 4= fraksi F50 Q-sepharose



Gambar 2. Reaktivitas serum ayam SPF (serum negatif) dan antiserum referen H5N1 (serum positif) terhadap purified H5 berbagai pengenceran.



Gambar 3. Reaksi silang purified H5 dengan serum ayam positif terhadap berbagai subtype virus influenza type A.

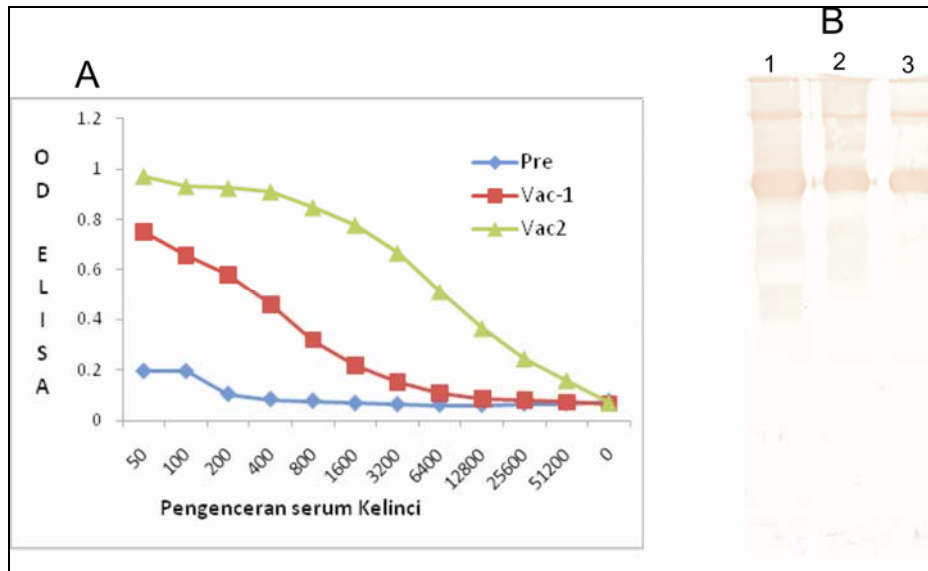
µg protein H5). Protein tersebut bereaksi kuat bukan saja dengan antiserum H5N1 tetapi juga dengan antiserum H5N2. Purified H5 tersebut bukan hanya sangat sensitif bila dipakai dalam coating ELISA, tetapi juga sangat spesifik, karena reaksi silangnya dengan antiserum virus influenza type A subtype yang lain seperti H6, H7 dan H9 sangat rendah (Gambar 3). Karena sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi tersebut, purified H5 yang diperoleh dengan cara seperti yang diuraikan dalam penelitian ini sangat layak untuk dipakai sebagai alat diagnosis. Biaya untuk memproduksi purified H5 tersebut juga relatif sangat murah bila dibandingkan dengan harga ELISA kit komersial. Sebagai gambaran, untuk menghasilkan purified H5 yang cukup untuk satu microwell plate ELISA dibutuhkan kurang dari 1 butir telur tertunas.

Purified H5 tersebut memiliki antigenisitas yang tinggi. Kelinci yang diimunisasi dengan pita SDS PAGE H5 memberikan respons yang sangat cepat. Respons antibodi yang diukur dengan ELISA sudah terdeteksi dengan jelas dua minggu setelah imunisasi pertama (Gambar 4, A). Hasil analisis dengan immunoblot memperlihatkan bahwa serum kelinci tersebut mengenali hemagglutinin H5 dan tidak mengenali protein virus H5N1 lainnya (Gambar 4, B). Spesifitas yang tinggi terhadap hemagglutinin H5 tersebut memang wajar mengingat kelinci tersebut diimunisasi dengan H5 murni tanpa kontaminasi protein lain. Setelah vaksinasi kedua titer antibodi meningkat tajam, kira-kira delapan kali lipat lebih tinggi dibandingkan setelah vaksinasi pertama (Gambar 4, A).

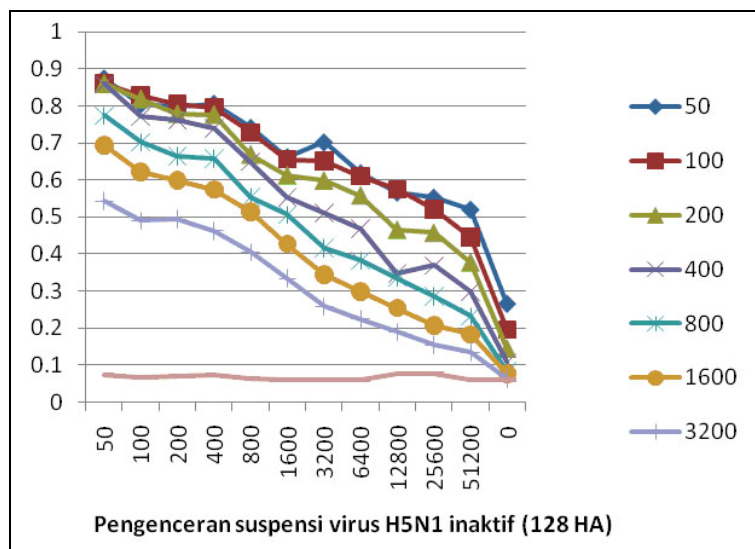
Antiserum H5 kelinci tersebut direncanakan untuk pengembangan alat imunodiagnosis untuk virus H5N1 yang didasarkan pada deteksi H5. Ketika dipakai untuk mendeteksi virus H5N1 inaktif yang mengandung 128 hemagglutinin unit/25 µl, yang diencerkan secara serial dari pengenceran 1:50 (2.6 HA/25 µl) sampai 1:51200

(0.0025 HA/25 µl), antiserum tersebut mampu mendeteksi keberadaan virus sampai pengenceran terakhir sekalipun serum kelinci tersebut telah diencerkan 1:3200 (0.04 HA unit/25 µl) (Gambar 5). Jumlah virus yang terkandung dalam suspensi virus influenza 0.04 HA unit/25 µl ditaksir sekitar 400 000 partikel, atau 40 000 infective dose (ID50) (DONALD dan ISAACS, 1954). Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, antiserum H5 yang diproduksi dalam penelitian ini jauh lebih sensitif. Hasil evaluasi terhadap sebuah kit H5 dot ELISA, (CHEN, et al., 2008) melaporkan limit deteksi sebesar 0.1 HA unit.

Tingginya sensitivitas antibodi yang diproduksi dalam penelitian kemungkinan besar disebabkan oleh dua hal. Pertama, hemagglutinin yang dipakai untuk mengimmunisasi kelinci adalah native protein bukan dalam bentuk rekombinan. Protein rekombinan terutama yang diekspresikan pada bakteri sering mengalami perubahan struktur terutama struktur tersier atau konformasi dari yang native atau aslinya nya. Disamping itu hemagglutinin adalah glikoprotein, jadi tidak dapat disintesa dengan utuh dalam sel bakteri karena sel bakteri tidak dapat melakukan glikosilasi. Pada umumnya, kit immunoassay untuk Flu burung bersandar pada hemagglutinin rekombinan. Memang harus diakui bahwa rekombinan protein memiliki banyak keunggulan yang lain seperti konsistensi produksi antar batch dan kemudahan produksi atau purifikasi setelah proses kloning dan ekspresi berhasil. Kedua, antibodi yang dipakai adalah poliklonal bukan monoklonal. Poliklonal mengenali banyak epitop sedangkan monoklonal hanya mengenali satu epitop pada antigen akibatnya poliklonal lebih sensitif tetapi sering kurang spesifik, sebaliknya monoklonal antibodi sangat spesifik tetapi sering kurang atau tidak sensitif bila terjadi perubahan pada epitop tersebut (LIPMAN, et al., 2005).



Gambar 4. Respons antibodi kelinci setelah vaksinasi pertama dan kedua dengan purified H5. B. Immunoblot serum kelinci setelah vaksinasi pertama. Lajur 1= virus H5N1, lajur 2= triton ekstrak virus H5N1, lajur 3= *purified H5*



Gambar 5. Sensitivitas anti-H5 serum kelinci untuk mendeteksi virus H5N1. Suspensi virus H5N1 inaktif (128 HA) diencerkan secara serial dari 1: 50 (2.5 HA) sampai 1: 51200 (0.0025 HA), dicoat pada *microplate*. Virus tersebut dideteksi dengan serum kelinci yang diambil 2 minggu setelah vaksinasi kedua lalu diencerkan secara serial mulai dari pengenceran 1: 50 sampai 1: 3200.

KESIMPULAN

Hemagglutinin H5 yang dipurifikasi dalam penelitian ini dapat dipakai untuk diagnosa AI H5N1 karena memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi ketika digunakan sebagai *coating* ELISA untuk mendeteksi antibodi. Tidak terlihat reaksi silang yang berarti dengan influenza tipe A sub tipe yang lain seperti

H6, H7 dan H9. Disamping itu biaya yang akan diperlukan untuk memproduksi purified H5 tersebut juga relatif sangat murah bila dibandingkan dengan kit ELISA H5 komersial. Purified H5 tersebut juga sangat imunogenik, titer anti H5 antibodi yang tinggi telah diperoleh setelah dua kali imunisasi pada kelinci. Antibodi tersebut memiliki sensitivitas yang sangat tinggi untuk mendeteksi hirus H5N1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Insentif Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa (PIPP) tahun 2009. Penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Ibu Gita Sekarmila, Bapak Achpas, Bapak Heri Hoerudin Nasution atas bantuan teknis mereka.

DAFTAR PUSTAKA

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CHAN, K.H., S.Y. LAM, P. PUTHAVATHANA, T.D. NGUYEN, H.T. LONG, C.M. PANG, K.M. CHAN, C.Y. CHEUNG, W.H. SETO and J.S.M. PEIRIS. 2007. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kit for detection of influenza A subtypes H1N1, F3N2 and H5N1. *J Clin Virol* 38:169-171.
- CHAN, K.H., N. MALDEIS, W. POPE, A. YUP, A. OZINSKAS, J. GILL, W.H. SETO, K.F. SHORTRIDGE and J.S.M. PEIRIS. 2002. Evaluation of the Directigen FluA B Test for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Type A and B Infections. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1675-1680.
- CHEN, J., M. JIN, Z. YU, H. DAN, A. ZHANG, Y. SONG and H. CHEN. 2007. A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 155-160.
- CHEN, Y., F. XU, X. FAN, H. LUO, S. GE, Q. ZHENG, N. XIA, H. CHEN, Y. GUAN and J. ZHANG. 2008. Evaluation of a rapid test for detection of H5N1 avian influenza virus. *J. Virol. Methods* 154: 213-215.
- DONALD, H.B. and A. ISAACS. 1954. Counts of Influenza virus particles. *J. Gen. Microbiol.* 10: 457-464.
- FAO. 2004. FAO expert meeting on surveillance and diagnosis of avian influenza in Asia. Bangkok, 21-23 July 2004. pp. 1-16.
- HOCART, M., B. GRAJOWER, A. DONABEDIAN, B. POKORNY, C. WHITAKER and E.D. KILBOURNE. 1995. Preparation and characterization of a purified influenza virus neuraminidase vaccine. *Vaccine* 13: 1793-1798.
- HORIMOTO, T. and Y. KAWAOKA. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- HURT, A.C., R. ALEXANDER, J. HIBBERT, N. DEED and I.G. BARR. 2007. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J. Clin. Virol.* 39: 132-135.
- LIPMAN, N.S., L.R. JACKSON, L.J. TRUDEL and F. WEIS-GARCIA. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 46: 258-268.
- NG, E.K.O., P.K.C. CHEN, A.Y.Y. NG, L.T. HOANG and W.W.L. LIM. 2005. Influenza A H5N1 Detection. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1303-1305.
- SIMS, L.D. and I. H. BROWN. 2008. Multicontinental Epidemic of H5N1 HPAI virus (1996-2007). In SWAYNE, D.E. (Ed.). Avian Influenza, ed, vol. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. p. 251-286.
- TARIGAN, S., R. INDRYANI and J. IGUNJATOVIC. 2009. Purification of neuraminidase from subtype H5N1 influenza virus. *JITV* 14: 75-82.
- TSUDA, Y., Y. SAKODA, S. SAKABE, T. MOCHIZUKI, Y. NAMBA and H. KIDA. 2007. Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of h5 avian influenza virus infection. *Microbiol. Immunol.* 51: 903-907.
- WOOLCOCK, P.R. and C.J. CARDONA. 2005. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.* 49: 477-481.