

**Cell Line Monolayer Tissue Culture FKDL Dan Cell Line OL Sebagai
Media Penumbuh Virus pada Pengembangan Bioteknologi
Biomolekuler (Penelitian Eksperimental Laboratoris)**

**Hasdianah
STIKes Surya Mitra Husada Kediri**

Abstrak

Cell line sangatlah penting dalam dunia medis, khususnya dibidang diagnosis, produksi vaksin maupun dibidang bioteknologi serta biomolekuler. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk tehnik pembuatan *Cell Line Monolayer Tissue Culture*. Namun selama ini kita dapat membeli cell line di ITCC Canada; dengan harga yang cukup tinggi dan memerlukan waktu yang cukup lama untuk tibanya *seed cell line* ini ke Indonesia. Bertitik tolak dari permasalahan diatas, pada ini penelitian dikembangkan biakan jaringan dari *FKDL (Foetal Kidney Lamb)* dan *OL (Ovine Lung)*. Biakan jaringan dapat digunakan untuk kepentingan pengembangan Bioteknologi, Bio Molekuer, Identifikasi Virus, diagnosis ,maupun Rekayasa Genetik, Stem Cell. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Foetus Domba Muda yang diambil ginjal (*Kidney Lamb*) dan paru-paru domba muda (*Ovine Lung*), eagle medium, versen tripsin, *phosphate buffer saline* yang mengandung Ca^{++} dan Mg^{++} serta yang *Ca* dan *Mg Free*, serta *Foetal Calf Serum* dan Serum sapi (semua bahan dan alat haruslah steril). Pembuatan vaksin sub unit molekuler dengan menggunakan cell line (OL). Cell OL ditanami virus EBL, terbentuk CPE, dititrasi dengan menemukan titer virus EBL yang sesuai standar $10^{5.5}$ TCD₅₀. suspensi virus dikumpulkan kemudian disonikasi untuk mendapatkan envelope virus, selanjutnya dilihat berat molekul antigen melalui SDS page, ditemukan 51 Kda. Kemudian diadakan uji postulat koch, dengan menggunakan cell line (OL), dilanjutkan dengan PCR, setelah itu diadakan uji serum netralisasi untuk melihat titer antibody serta diadakan uji immunoblotting ditemukan satu band envelope protein Egp51, yang berarti protein Egp51 adalah murni dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit molekuler. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan Virus EBL isolat lokal mengandung *sub unit protein envelope gp 51* yang merupakan protein hemagglutinin. Protein hemagglutinin *envelope gp 51* virus EBL isolat lokal bersifat imunogenik dan protektif.

Keywords: Cell line,FKDL.OL,SDS PAGE,Immunobloting,Elusi,Sub Unit Molekuler

Pendahuluan

Cell (sel) adalah unit terkecil kehidupan semua makhluk hidup tersusun atau satu atau lebih sel. Sel-sel paling primitive yang masih hidup saat ini adalah bakteri. Sel dibatasi oleh membrane plasma, serta mengandung semua zat-zat kimiawi dan struktur yang diperlukan bagi keberlangsungan hidup tipe sel tertentu.

Di dalam sel terdapat inti sel, dan di dalam inti sel ditemukan adanya nucleolus. Di dalam nucleolus ditemukan adanya khromosom. Pada organisme-organisme yang lebih kompleks, misalnya tumbuhan

dan hewan. Setiap sel somatik mengandung satu sel kromosom yang diwarisi dari induk (maternal).

Khromosom tersusun dari DNA yang berasosiasi dengan berbagai protein. Tahun 1953 Watson dan Crick mempublikasikan model struktur DNA. Itulah kunci yang membuka ledakan bidang Biologi yang dikenal sebagai revolusi molekuler. (Stamofield,w.,et.al, 2006)

Evaluasi organissi multisel, menyebabkan terjadinya diferensiasi sel, yang berarti bahwa sel yang berlainan mengalami evolusi untuk melakukan fungsi

dan proses tertentu yang memberi kontribusi pada kesejahteraan organism secara keseluruhan. Sel-sel berdiferensiasi untuk membentuk jaringan yang berpadu dengan jaringan lain dan untuk membentuk organ. (Dunstall, M. at.al., 2007)

Kurang lebih 70 tahun yang lalu pertama kali dilakukan percobaan dengan kultur sel dan jaringan sel yang mana pada waktu itu anti biotik sangat berperan untuk menghindari kontaminasi bakteri dan jamur. Sejak itu kultur sel sangat berarti dalam penelitian terutama dalam bidang virology. Awal keberhasilan isolasi virus dengan kultur sel adalah pada tahun 1949, pertama kali polio virus berhasil diisolasi.

Ada dua jenis kultur sel yaitu kultur primer (*primary cell culture*) dan *cell line* (sel skunder). Cell culture adalah seperti pada Gambar 2.1 dikenal dengan primary cells culture. Sel ini hanya mampu membelah 3-4 kali, karena mempunyai inti cell dan khromosom yang bersifat tidak stabil. Bila dipasasi lanjut maka primary cell culture akan membentuk Giant cells (Hasdianah, 2005). Primary cells culture jarang digunakan untuk diagnostik maupun untuk produksi vaksin, tetapi sering digunakan untuk mempelajari virus yang mempunyai sifat *latent*. Pada sel yang aktif, juga mempelajari virus yang belum dikenal atau belum terkarakterisasi dan terklasifikasi. Cell line (sel skunder) bersifat tidak immortal, tidak mengalami deferensiasi, mempunyai inti sel dan khromosom bersifat stabil, sehingga dapat dipasasi berkali-kali, melebihi pasasi 50 (Hasdianah, 2005; Fedik, A.R, 2005).

Diikuti dengan kariotyping cell dengan cara : mempersiapkan 0,1 ml MTX yang ditambahkan pada media *maintenance* kemudian diinkubasikan 7 jam pada CO₂ Inkubator setelah itu disentrifus dan dilakukan aspirasi 15 menit. Ambil supernatant ditambahkan 0,1 ml thymidin buat preparat dengan jalan *fixative* 5x sampai dengan supernatant jernih. Teteskan pada obyek gelas, keringkan dan dilihat di bawah *microscope* fase kontras untuk

melihat kromosom. Terlihat bentukan kromosom dan inti *cell* yang bersifat stabil walaupun telah dipasasi melebihi 50, yang menunjukkan sifat dari *cell line*. *Cell line* dapat disimpan dalam media *stored* pada suhu yang stabil (-80°C) dan *liquid nitrogen* (-196°C) sebagai *Mater Seed*. Penggunaan *cell line* sangat penting dalam bidang diagnosis penyakit, produksi vaksin dan bidang biomolekuler (bioteknologi)

Penggunaan *cell line* FKDL dan OL yang ditanam dengan virus EBL terlihat adanya *cytopathogenic effect* (CPE) sebagai indikasi adanya pertumbuhan virus di dalam *cell line* tersebut. Dapat ditarik kesimpulan bahwa penggunaan *cell line* sangat luas di bidang diagnosis, produksi vaksin dan bidang biomolekuler (bioteknologi).

Selama ini kita dapat membeli cell line di ITCC Canada; dengan harga yang cukup tinggi dan memerlukan waktu yang cukup lama untuk tibanya *seed cell line* ini ke Indonesia. Bertitik tolak dari permasalahan diatas, maka saya membuat penelitian terdahulu tentang perbandingan *cell line FKDL dan primary cells culture* (Hasdianah, 2005) ; dan dilanjutkan dengan disertasi yang berjudul Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Imunogenik Egp51 virus EBL Isolat Lokal Sebagai Kandidat Vaksin Sub Unitmolekuler (Hasdianah, 2006), dengan menggunakan sel OL sebagai penumbuh virus EBL isolat lokal, dan sebelumnya saya telah membuat Studi Banding Pembuatan KIT diagnosis penyakit EBL Produksi Canada; yang hasilnya sama dengan antigen tes Kit diagnosis penyakit EBL isolate lokal.

Dapat ditarik kesimpulan : bahwa memang *cell line* sangatlah penting dalam dunia medis; khususnya dibidang diagnosis, produksi vaksin maupun dibidang bioteknologi serta biomolekuler.

Metoda

Pembuatan vaksin sub unit molekuler dengan menggunakan cell line (OL). Cell OL ditanami virus EBL,

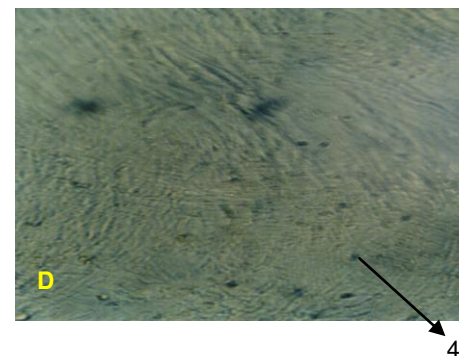
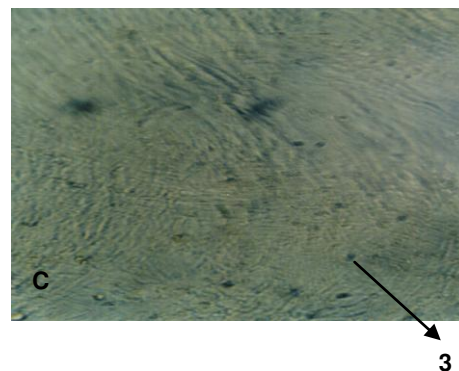
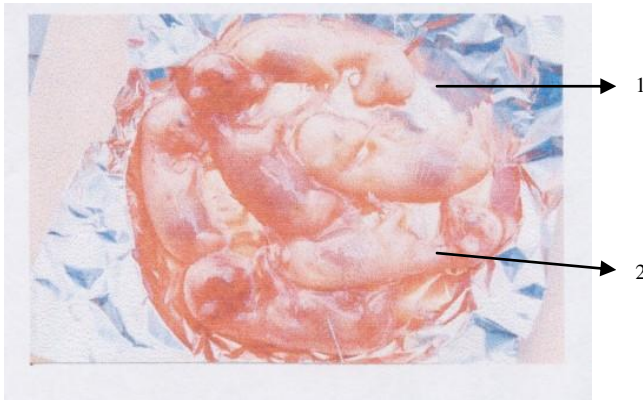
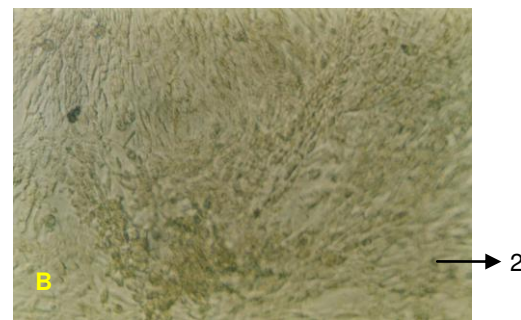
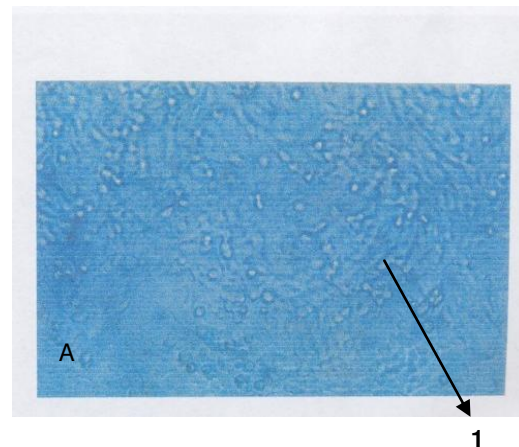
terbentuk CPE, dititrasi dengan menemukan titer virus EBL yang sesuai standar $10^{5.5}$ TCD₅₀. suspensi virus dikumpulkan kemudian disonikasi untuk mendapatkan envelope virus, selanjutnya dilihat berat molekul antigen melalui SDS page, ditemukan 51 Kda. Kemudian diadakan uji postulat koch, dengan menggunakan cell line (OL), dilanjutkan dengan PCR, setelah itu diadakan uji serum netralisasi untuk melihat titer antibody serta diadakan uji immunoblotting ditemukan satu band envelope protein Egp51, yang berarti protein Egp51 adalah murni dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit molekuler.

Hasil Penelitian

Cell line

Cell line yang didapat dengan menggunakan metode Kaplan, *et.al.*, 1973, Johan, *et.al.*, 1975. Hasil tersebut sebagaimana Gambar berikut dan Tabel 1 pada Lampiran 1, dan Gambar

tumbuh dengan baik dan *confluent* sebagaimana Gambar berikut.



Gambar Foetus Domba untuk Persiapan Pembuatan Cell Line OL.

Keterangan: 1 Media eagle dan antibiotik Kanamycin 0,4%
2 Janin domba umur 4-6 minggu

Sifat dari cell line mempunyai inti sel dan kromosom yang bersifat stabil, sehingga dapat dipasase berkali-kali dan tidak bersifat toksik; sehingga sel tetap

Gambar *Cell OL* dalam beberapa tingkat pertumbuhan

Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope*

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

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

Selanjutnya *cell line OL* diinokulasi dengan virus EBL, secara berkali-kali untuk mengetahui keberadaan virus EBL; karena *cell line OL* merupakan media penumbuh dari virus EBL (Kaplan, *et.al.*, 1973 dan Ishino, *et.al.*, 2000; Hasdianah, 1998). Keberhasilan pembuatan *cell line* seperti yang ditampilkan Gambar 2 A

sampai Gambar 2 D, maka penelitian selanjutnya dapat dikerjakan yaitu pembuktian mengenai adanya virus EBL.

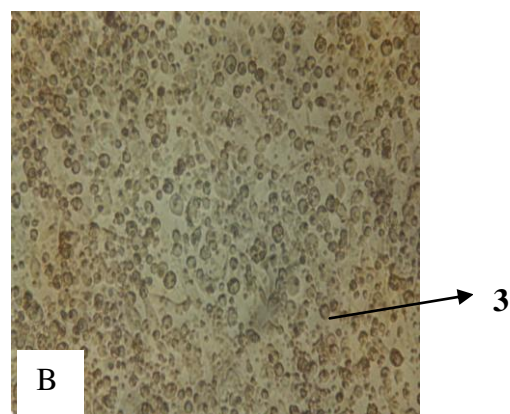
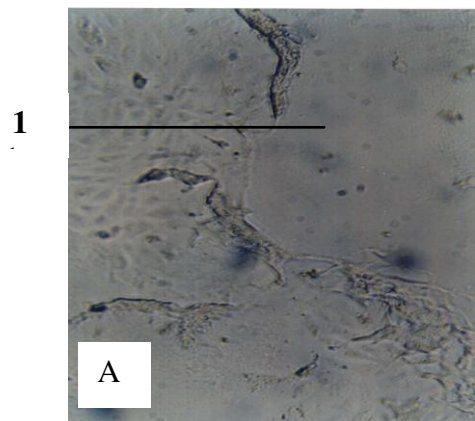
Pembuktian adanya virus EBL

Keberadaan virus EBL dapat dibuktikan dengan beberapa cara yaitu dengan CPE, uji postulat Koch dan uji imunodiffusi dengan ouchterlony.

Cytopathogenic effect (CPE)

Untuk mendeteksi keberadaan virus EBL dilakukan uji CPE dengan melakukan pemeparan virus pada *cell OL* dimana hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.4.

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



Gambar Kerusakan *cell OL* akibat pemaparan Virus EBL

Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope*

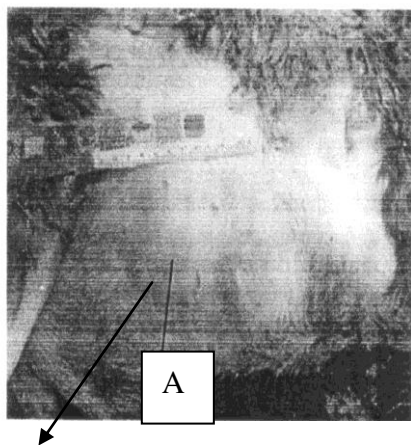
- Keterangan : A. Gambar *cell OL* yang terpapar virus pada hari ke-5
1. *Cell OL* yang mengalami kerusakan yang menunjukkan sifat CPE
 2. *Cell OL* yang belum mengalami kerusakan
- B Gambar *cell OL* (3) yang mengalami kerusakan yang menunjukkan sifa total (100%) pada hari ke 7.

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

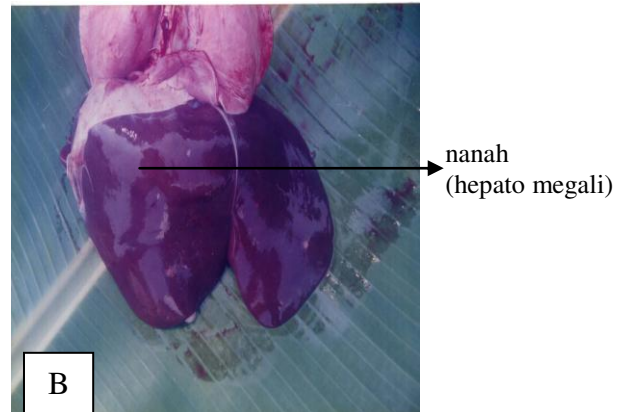
Uji Postulat Koch

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

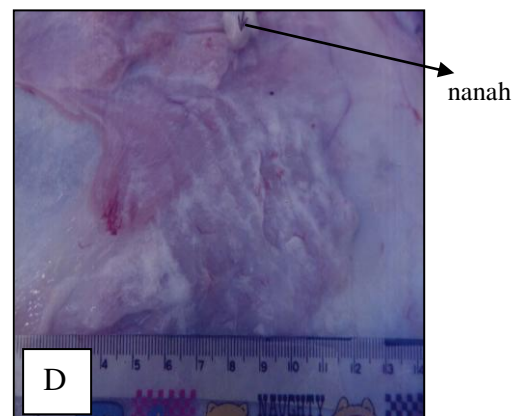
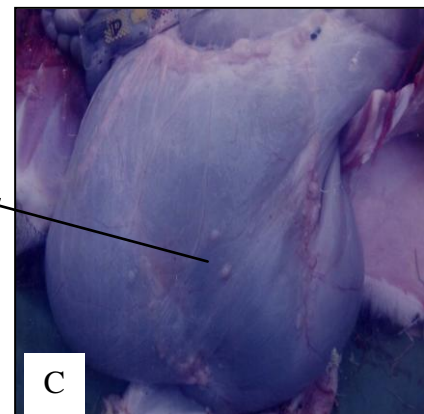
Hasil uji *Postulat Koch* dapat dilihat pada Gambar berikut



benjolan (tumor) cutaneus



nanah pada lambung



Gambar Hasil Uji *Postulat Koch* Klasik

- Keterangan : A. Benjolan (peradangan) pada kulit domba.
 B. Nanah (pus) pada hepar yang mengalami pembesaran.
 C. Nanah (pus) pada lambung.
 D. Nanah (pus) dari bagian tumor kelenjar limpha.

Ditemukan reaksi peradangan akibat pemaparan virus EBL sehingga timbul benjolan pada bagian kulit Gambar A,

pada bagian hepar terjadi hepatomegali Gambar B, pembesaran lambung Gambar C dan Gambar D terlihat adanya nanah yang berwarna putih kekuningan, mengeras, yang merupakan massa dari EBL dan mengeluarkan bau yang tidak sedap. Hasil ini merupakan uji *Postulat Koch* klasik.

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

Uji imunodifusi dengan *ouchterlony*

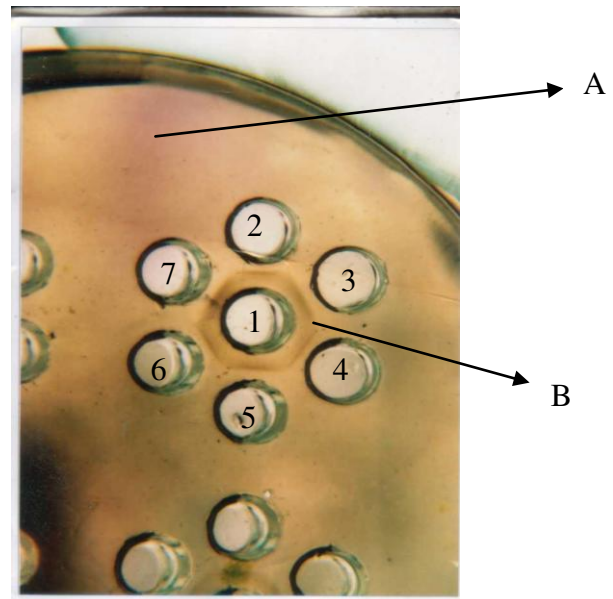
Pembuktian lanjut untuk mengetahui keberadaan virus EBL adalah melalui uji *ouchterlony* dengan Agar Gel Imunodifusi (AGID), ditemukan adanya ikatan antigen dan antibodi yang ditandai dengan timbulnya garis *presipitasi* berwarna putih diantara sumuran-sumuran AGID.



Gambar Kontrol negatif Hasil Uji Agar

Keterangan :
Sumuran 1 : antigen *EBL* isolat lokal
Sumuran 2,3,4,5,6,7 : serum antibodi kelinci tanpa perlakuan (kontrol negatif)

Data presipitasi sebagaimana Gambar berikut



Gambar 5 Hasil Uji Agar gel presipitasi
Foto : Pembesaran 400X dengan *inverted microscope*

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

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

Pada Gambar 5. terlihat jelas adanya ikatan antigen dan antibodi spesifik EBL, terlihat adanya garis presipitasi pada plate yang berdiameter 15 cm dan jarak sumuran satu dengan yang lain adalah 3 mm. Di situ terlihat seperti pada Bagian A adalah merupakan bagian agar *ouchterlony*. Sedangkan pada Gambar B adalah garis presipitasi yang merupakan hasil ikatan antigen antibodi spesifik EBL isolat lokal, di antara lubang yang berisi antigen dan antibodi.

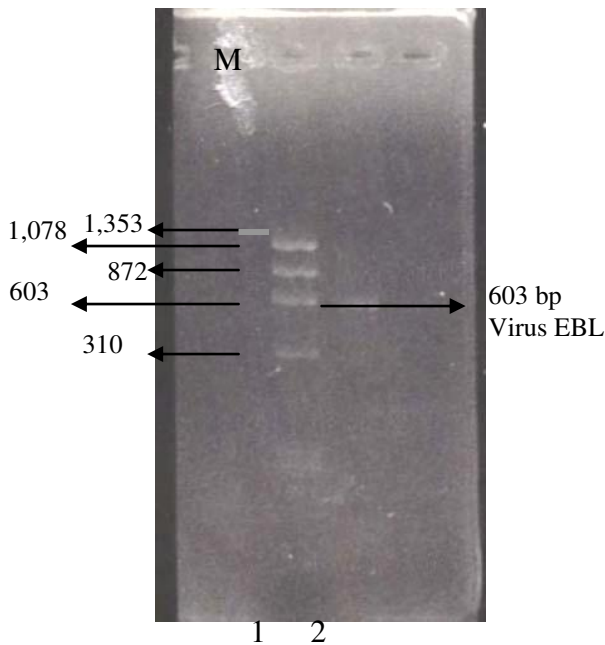
Polymerase Chain Reaction (PCR)

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

5'GTL-GCC-CGA-TAC-TGA-CTT-CGA-AGA 3'

3GGG-CCG-CGA-GAG-CTC-AAC-GTC
(Splitter GA, 1996).

Hasil sebagaimana Gambar 6.



Gambar 6 Hasil PCR dari virus EBL
M adalah *Marker RF DNA/Hae III*

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

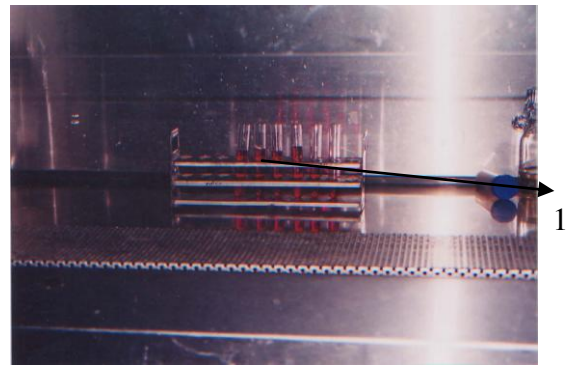
Pada lajur 2 ditemukan pita (band) dengan ukuran 603 bp yang merupakan bagian dari gen yang menyandi protein *envelope* dari virus EBL (Safitri, IM, 1993; Blease *et.al.*, 1997; Yoko, 1998)

Penelitian Tahap II
Hasil pemurnian virus EBL

Pemurnian virus dengan cara mengambil supernatan dari biakan *cell* yang telah diinokulasi dengan virus EBL, kemudian dikoleksi dengan menggunakan tabung 50 ml. Hasil yang didapat dari pemurnian virus sebanyak 1,22 g/cm³/4 ml suspensi virus EBL pasase 29 dengan titer 10^{7.8} *TCID*₅₀ sebagaimana Gambar berikut.



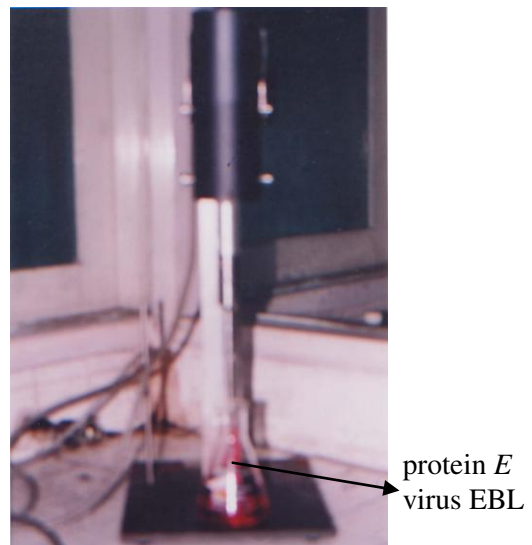
Gambar 9 Suspensi virus EBL yang akan dimurnikan di dalam ultracentrifus



Gambar 9 Hasil Suspensi virus EBL yang telah dimurnikan
603 bp
Virus EBL
Keterangan : 1. Suspensi virus yang telah dimurnikan

Hasil pemurnian protein *envelope* virus EBL

Hasil pemurnian *protein Egp 51* virus EBL digunakan untuk penelitian selanjutnya sebagaimana Gambar 10 (B).

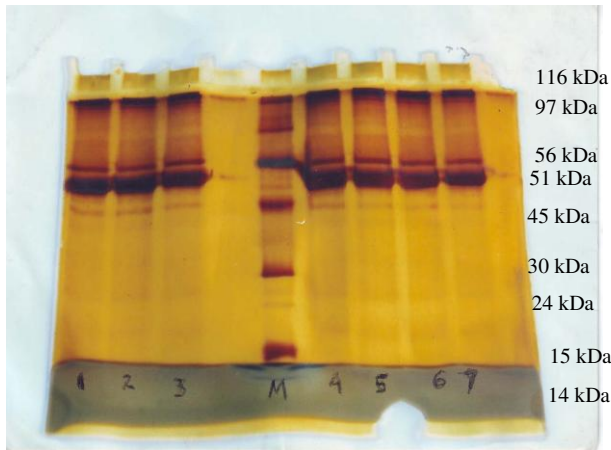


Gambar10 Hasil pemecahan protein E virus EBL dengan menggunakan alat sonikator
Pengukuran Berat Molekul Protein Egp 51 virus EBL dengan SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Dengan alat ini dapat diketahui berat molekul protein E virus EBL isolat lokal.

Virus EBL terdiri dari beberapa macam protein. Hasil sebagaimana Gambar 10. Didapat hasil protein *capside*,

nucleo capsid, matrix, dan envelope virus EBL.



Gambar 11 Hasil berat molekul protein virus EBL dengan SDS-PAGE

Keterangan : Analisis protein dengan SDS-PAGE kadar gel 12%. Lajur 1-7 berisi protein virus EBL; yang terdiri dari protein 15 kDa, 24 kDa, dan protein *envelope* 51 kDa; M adalah Marker.

Hasil SDS-PAGE pada gambar 11 menunjukkan protein virus EBL terdiri dari protein dengan berat molekul antara 14 kDa – 116 kDa. Pada hasil SDS-PAGE tersebut dihasilkan protein virus EBL dalam berat 51 kDa yang merupakan protein virus EBL yang paling menonjol. Protein virus EBL dengan berat 51 kDa adalah merupakan protein di bagian E. Untuk mengetahui protein E virus EBL merupakan protein *hemagglutinin*, maka diperlukan pemurnian dengan elektro elusi. Tujuan dari elektro elusi untuk menghasilkan bagian protein yang murni.

Isolasi protein virus EBL dengan elektro elusi

Pada gambar 5.11 ada beberapa protein virus EBL dengan berat molekul 15 kDa, 24 kDa dan 51 kDa. Untuk mengetahui bagian dari protein yang mana yang mempunyai sifat hemagglutinin dilakukan uji HA seperti pada gambar 5.12

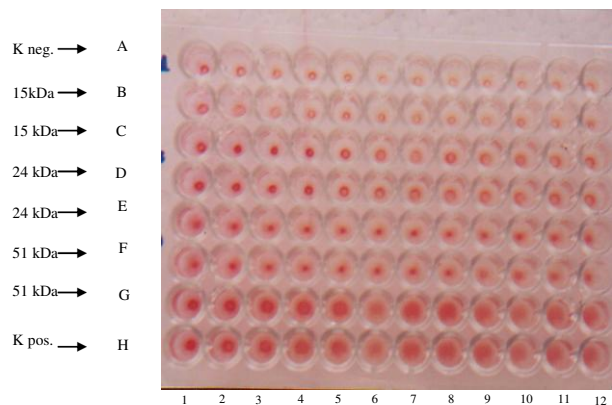
Elektro elusi dilakukan pula pada protein dengan berat molekul 51 kDa, 24

kDa, dan 15 kDa, yang diambil dari hasil SDS-PAGE. Hasil elektro elusi dilanjutkan untuk membuktikan bagian protein murni. Kemudian hasil elektro elusi dilanjutkan dengan uji hemagglutinas, untuk mengetahui bagian mana yang mempunyai sifat *hemagglutinin* dan bersifat sebagai molekul adhesin. Untuk mengetahui bagian dari protein mana yang mempunyai sifat hemagglutinin maka dilakukan uji HA dari hasil elektro elusi tersebut seperti pada gambar 5.12.

Hasil uji hemagglutinas dari protein E virus EBL hasil elektro elusi

Hasil uji hemagglutinas dari protein di bagian E virus EBL. ditemukan protein dengan berat molekul 51 kDa adalah protein *hemagglutinin*. Protein dengan berat molekul 51 kDa adalah protein *hemagglutinin* yang merupakan molekul adhesin. Hasil sebagaimana Gambar berikut

Pada protein *Egp 51*, titer yang didapat adalah 64 HA Unit. Pada kontrol + terlihat HA Sempurna (100%). Hasil terlihat pada Gambar berikut dan Tabel dibawah



Gambar 12 Hasil Uji HA protein E virus EBL

Keterangan :
 L = lajur
 PBS = Posphat Buffer Saline
 RBC = Red Blood Cell
 Gambar lajur A kontrol tidak terjadinya aglutinasi (kontrol negatip yang berisi PBS dan RBC)
 Gambar lajur B dan C adalah protein 15 kDa tidak terjadi aglutinasi
 Gambar lajur D dan E adalah protein 24 kDa tidak terjadi aglutinasi
 Gambar lajur H berisi kontrol aglutinasi (kontrol positif yang berisi protein E gp 51 dan RBC tanpa pengenceran)
 Pada lajur A kontrol negatife (tidak dilakukan pengenceran)
 Pada lajur H kontrol positif (dilakukan pengenceran)
 Pada lajur B – G dilakukan pengenceran secara duplo di mulai 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, dan 1/256

Hasil uji hemaglutinasi protein dengan berat molekul 15 kDa dan 24 kDa adalah menghasilkan aglutinasi negatif. Hasil uji aglutinasi pada protein dengan berat molekul 51 kDa menghasilkan aglutinasi yang positif dimana terjadi aglutinasi. Hasil titer aglutinasi pada protein dengan berat molekul 51 kDa adalah sebesar 4 HA unit seperti gambar 5.12.

Hasil aglutinasi dapat ditabulasi seperti pada tabel berikut

Tabel 1 Hasil Uji HA

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

Keterangan :

L = lajur

PBS = Posphat Buffer Saline

RBC = Red Blood Cell

Gambar lajur A kontrol tidak terjadinya aglutinasi (kontrol negatif yang berisi PBS dan RBC)

Gambar lajur B dan C adalah protein 15 kDa

Gambar lajur D dan E adalah protein 24 kDa

Gambar lajur F sampai sumuran 4 adalah aglutinasi

Gambar lajur G sumuran 1 sampai sumuran 12 adalah protein E gp 51 kDa pada pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 masing – masing pengenceran dimasukkan pada 2 sumuran

Gambar lajur H berisi kontrol aglutinasi (kontrol positif yang berisi protein E gp 51 dan RBC tanpa pengenceran)

Penelitian Tahap III

Hasil Uji In Vitro

Hasil Uji In Vitro terdiri dari :

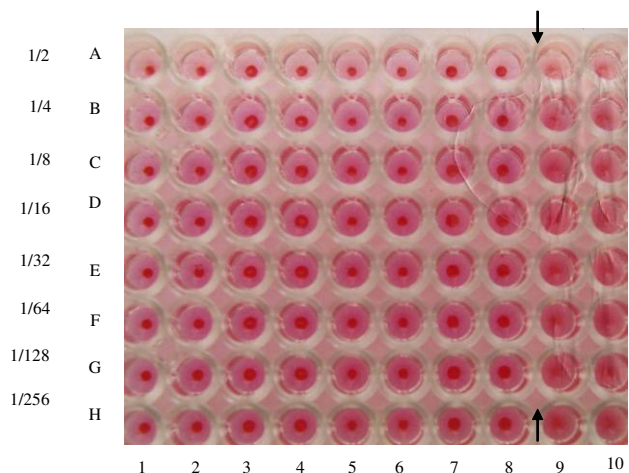
Hasil pembuatan antibodi poliklonal protein Egp 51 molekul hemaglutinin

Serum dari hasil pembuatan antibodi poliklonal protein Egp 51 virus EBL digunakan untuk HI Test, Uji Imunositokimia, Uji Immunoblotting, dan Uji Serum Netralisasi, sebagaimana gambar 13

Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI Test)

Uji hambatan hemaglutinasi untuk mengukur derajat kekebalan terhadap penyakit EBL (daya proteksi protein sub unit gp51 sebagai kandidat vaksin). Uji hambatan aglutinasi dikerjakan dan disesuaikan dengan petunjuk OIE (2003) dan Wringati (2005).

Pada Uji HI digunakan serum (antibodi dari protein Egp 51 Isolat Lokal Virus EBL) dengan antigen 4 HA Unit dari hasil Uji HA. Hasil sebagaimana Gambar 13 dan Tabel .2.



Gambar Hasil Uji HI protein Egp 51 hemaglutinin virus EBL

Keterangan :

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

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

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

Pada Uji *HI* yang digunakan hanya protein *Egp 51* kDa yang merupakan protein hemaglutinin; karena hanya protein *Egp 51* kDa yang menimbulkan aglutinasi; sedangkan pada protein 15 kDa dan 24 kDa tidak menimbulkan reaksi aglutinasi. Pada pengenceran tertinggi (1/256) masih menimbulkan pengendapan, karena ikatan antigen dan antibodi spesifik (imunogenik).

Tabel 2. Hasil Uji *HI*

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

Keterangan :

Lajur A sampai dengan D kolom 1 sampai dengan kolom 8 adalah kontrol positif terlihat endapan sel darah merah yang tidak terikat oleh antigen yang menandakan adanya antibodi
Lajur A sampai dengan D kolom 9 dan 10 adalah kontrol negatif terjadi aglutinasi berarti terjadi pengikatan antigen terhadap sel darah merah.

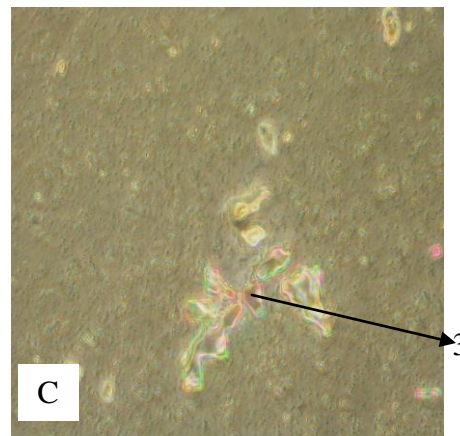
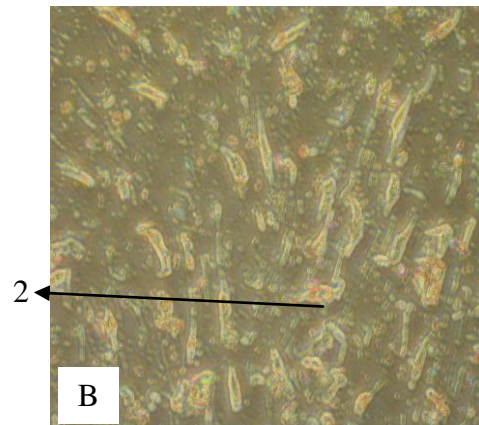
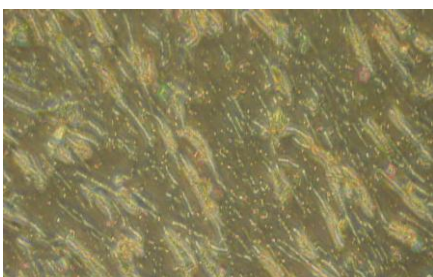
Kolom 1 sampai dengan kolom 8 adalah lajur pengenceran yang terdiri dari 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256.

5.1.2.8 Hasil Uji Imunositokimia

Uji Imunositokimia untuk mengetahui kemampuan daripada antibodi yang berlabel mengenal antigen, adanya ikatan antigen antibodi yang spesifik.

Hasil akan terlihat adanya sel yang masih *intack*, bagian yang berwarna coklat yang merupakan bagian yang mengenal antibodi.

Terjadinya ikatan antigen antibodi menunjukkan protein *Egp 51* bersifat imunogenik. Hasil imunositokimia sebagaimana Gambar berikut.



Gambar Hasil Uji imunositokimia

Keterangan :

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

Gambar B sel yang dipapar virus EBL kemudian diberi protein *Egp 51* terlihat bagian yang berwarna coklat merupakan bagian yang mengenal antibodi; terjadi ikatan antigen antibodi (2 = imunogenik)

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

Hasil Uji *Immunoblotting*

Hasil Uji *Immunoblotting* dengan menggunakan *Westernblot* sebagai pertanda untuk menentukan bobot molekul protein imunogenik *Egp 51* sudah murni yang akan digunakan pada uji serum netralisasi, sebagaimana Gambar.



Gambar Hasil Western blot pada Immunoblotting

Keterangan : Pada lajur 2 dan 3 berisi protein 15 kDa dan 24 kDa tidak terlihat *band* (pita protein) yang berarti tidak terjadi respon imun.

Pada lajur 4, 5, dan 6 berisi protein *Egp 51* kDa terjadi respon imun ditandai dengan terlihatnya *band* (pita protein).

Pada lajur 8 berisi Marker

Hasil Uji Serum Netralisasi

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

Pada titer *SN test* yang rendah setelah dihitung dengan metode Karber menunjukkan jumlah antibodi meningkat *equal* dengan titer SN yang rendah, yang menandakan adanya sifat protektif; sejalan dengan peningkatan jumlah antibodi berarti protein *Egp 51* kDa bersifat imunogenik. Positif *cytopathogenic effect* menandakan tidak terbentuknya antibodi (-); negatif *cytopathogenic effect* menandakan terbentuknya antibodi (+). Hasil sebagaimana Lampiran 3

Hasil Penelitian Tahap III

Hasilnya berupa larutan kandidat vaksin berwarna putih yang diperoleh dari suspensi protein hemaglutinin *Egp 51* virus EBL isolat lokal yang disuntikkan pada hewan coba kelinci yang sehat. Hewan coba

kelinci yang digunakan adalah yang bebas dari penyakit EBL setelah diuji dengan agar gel imunodifusi. Hasil sebagaimana Lampiran 4.

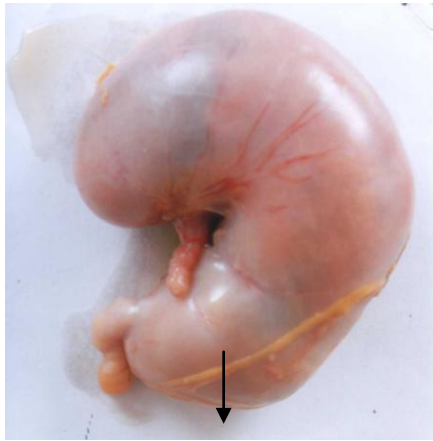
Kemudian dari semua sample negatif dibagi atas kelompok I tidak diberi suntikan protein *Egp 51* (sebagai kelompok kontrol = K) hanya disuntik Pbs dan *dichallenge* virus EBL dengan titer $10^{7,8}$ TCID₅₀, kelompok Iia disuntik protein sub unit dan *booster* sebanyak satu kali (P2), kelompok Iib disuntik protein sub unit dan dilakukan *booster* sebanyak dua kali (P3), sedangkan kelompok Iic disuntik protein sub unit *E gp51* satu kali tanpa *booster* dan pada minggu ketiga dilakukan *challenge* dengan memberikan suspensi virus EBL isolat lokal yang ganas sebagai kelompok ujiantang (*challenge test* = Ch) dengan titer $10^{7,8}$ TCID₅₀. Hasil sebagaimana Lampiran 5.

Pemeriksaan limfosit diikuti pula dengan uji protektif pada hewan kelinci. Hewan kelinci disuntik dengan protein *Egp 51* dan *dichallenge* dengan virus ganas titer $10^{7,8}$ TCID₅₀ setelah diseksi terlihat hati dan lambung yang terproteksi tanpa adanya nanah dan tidak terjadinya pembengkakan pada hati dan lambung, semuanya terlihat normal, dengan adanya pemberian protein *Egp 51*. Hasil sebagaimana Gambar 5.16

Demikian isolasi dan karakterisasi sub unit protein *gp 51* virus EBL isolat lokal sebagai protein spesifik dan dipakai sebagai kandidat vaksin sub unit.



A



B

Gambar Hasil uji protektifitas pada hewan kelinci dengan pemberian protein *Egp 51* dan dichallenge dengan virus ganas titer $10^{7,8}$ TCID₅₀

Keterangan:

A. Hati yang terproteksi dengan pemberian protein *Egp 51*

B. Lambung yang terproteksi dengan pemberian protein *Egp 51*

Pada Uji protektifitas yang dilakukan pada hewan coba kelinci dengan pemberian protein *Egp 51 kDa* dan dichallenge dengan virus ganas titer $10^{7,8}$ TCID₅₀, terlihat hati dan lambung tidak menunjukkan adanya pus (nanah) walaupun telah dichallenge dengan virus ganas titer $10^{7,8}$ TCID₅₀; yang menunjukkan bahwa protein *Egp 51 kDa* bersifat protektif seperti pada Gambar 5.16. A dan B.

Hasil analisis data penelitian

Penelitian isolasi dan karakterisasi sub unit protein *gp 51* virus EBL isolat lokal sebagai protein spesifik dan dipakai sebagai kandidat vaksin sub unit telah dilakukan, dan selanjutnya diadakan analisis data penelitian. Hasil sebagaimana Tabel 5.3.

Pada sel limfosit yang mengalami kenaikan secara persisten akibat proliferasi dan diferensiasi sel – sel limfosit yang abnormal, maka akan terjadi pengecilan bagian sitoplasma dari sel limfosit dan sampai dengan bagian sitoplasma tersebut

tertutup secara keseluruhan oleh inti sel limfosit, yang merupakan sebagai pertanda adanya leukemia (Djalil, 1994) sebagaimana pada lampiran 6. Pemberian protein *Egp 51 kDa hemagglutinin* dapat menghambat terjadinya limfositosis persisten sebagai akibat adanya kenaikan jumlah sel limfosit karena adanya proliferasi dan diferensiasi abnormal dari sel limfosit sebagai akibat adanya infeksi virus EBL. Menurut Spitter, 1996, adanya limfositosis persisten sebagai pertanda adanya penyakit *bovine leukemia virus (BLV)*. Hasil sebagaimana Tabel 5.3.

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

Tabel Hasil jumlah limfosit pada Uji *In Vivo*

| Pemeriksaan Hari Ke | Perlakuan | | | |
|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Virus | Virus + Protein <i>Egp 51</i> | | |
| | | Boster 1 Kali | Boster 2 Kali | Tanpa Boster |
| 5 | 8843,40 ± 375,21 ^a | 105,80 ± 5,31 ^b | 95 ± 5,45 ^b | 100,60 ± 4,51 ^b |
| 10 | 8751,00 ± 512,96 ^a | 113,40 ± 5,58 ^b | 100,00 ± 1,00 ^b | 103,00 ± 4,12 ^b |
| 15 | 8878,40 ± 515,54 ^a | 111,60 ± 3,58 ^b | 100,60 ± 0,89 ^b | 101,80 ± 2,39 ^b |
| 20 | 9018,00 ± 475,03 ^a | 112,00 ± 3,08 ^b | 99,60 ± 0,55 ^b | 106,20 ± 5,26 ^b |
| 25 | 9149,20 ± 472,40 ^a | 111,60 ± 4,39 ^b | 97,80 ± 2,86 ^b | 102,80 ± 4,86 ^b |
| 30 | 9269,80 ± 496,60 ^a | 111,60 ± 4,39 ^b | 97,80 ± 2,86 ^b | 102,80 ± 4,82 ^b |
| 35 | 9388,20 ± 475,25 ^a | 93,80 ± 41,96 ^b | 99,80 ± 0,84 ^b | 101,80 ± 5,75 ^b |
| 40 | 9690,90 ± 430,48 ^a | 108,00 ± 4,53 ^b | 100,00 ± 0,71 ^b | 97,40 ± 8,79 ^b |
| 45 | 10564,00 ± 871,19 ^a | 112,00 ± 3,78 ^b | 89,40 ± 22,60 ^b | 104,20 ± 8,84 ^b |

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

Pada Tabel 3 terlihat adanya perbedaan yang signifikan dari hewan coba yang diberi protein *Egp 51 kDa* dengan yang tidak diberi protein *Egp 51 kDa* (kelompok kontrol); tetapi dichallenge

dengan virus EBL yang ganas titer tinggi $10^{7,8}$ $TCID_{50}$. Pada kelompok kontrol hewan coba akhirnya mati setelah hari ke 45, sebagai pertanda bahwa virus yang digunakan sebagai *challenge* adalah memang virus EBL dengan titer tinggi yang ganas. Pada kelompok II a dan II b (P2 dan P3) terlihat adanya daya protektif pada masing – masing kelompok, letak perbedaannya adalah pada jumlah pemberian *booster*; tetapi daya protektif yang ditimbulkan kurang lebih sama. Sedangkan pada kelompok II c adalah kelompok yang tidak *dibooster*, tetapi tetap mempunyai daya protektif; karena dengan adanya pemberian protein *Egp 51 kDa*, maka akan timbul daya protektif.

Penelitian Tahap I

EBL adalah penyakit ganas yang menyebabkan angka kematian 80 – 90 % dan menimbulkan kerugian ekonomi cukup tinggi, sampai saat ini pengobatan maupun vaksinnya belum ditemukan (Resang *et al.*, 1996; OIE, 2000).

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

Pembuatan *cell OL*

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

mengalami adaptasi, sehingga perlu diadakan penggantian *media maintenance* untuk mendapatkan *cell* yang *confluent*. Masa inkubasi yang dibutuhkan pada pengembangan *cell* awalnya masih memerlukan waktu berkisar 5-7 hari, dengan perkembangan *cell* yang masih belum maksimal; ini terjadi pada pasase satu sampai pasase dua belas. Pasase selanjutnya sudah terlihat perkembangan *cell line* yang mulai mengalami adaptasi dan berkembang cepat, dimana inti *cell* dan kromosom bersifat stabil, yang dapat dipasasi secara terus menerus dengan masa inkubasi yang semakin pendek. Sifat *cell line* adalah dapat berkembang dan dipasasi secara terus menerus sampai pasase 50, sebagaimana Tabel 1. dan Gambar 2 (A, B, C).

Menurut Johan, 1975 dan Kaplan *et al.*, 1973, bahwa *cell* dikatakan dapat bersifat *cell line*, bila dapat dipasase sampai pasase 50. Pada penelitian ini ternyata *cell OL* bersifat *cell line* dan dapat dipasase melebihi pasase 50 yaitu sampai pasase 58, sebagaimana pada Tabel 5.1.1. dan Gambar 5.2 (D) Menurut Johan, 1975 dan Kaplan *et al.*, 1973, media *maintenance cell* yang digunakan adalah terdiri dari *media eagle overlay* sembilan puluh lima persen ditambah dengan *foetal calf serum* lima persen; tetapi pada penelitian ini media *maintenance cell* yang digunakan sama seperti peneliti terdahulu kemudian ditambahkan pula TPB sebanyak sepuluh persen karena menurut Burke *et al.*, 1973 TPB dapat merangsang peningkatan pertumbuhan dan perkembangan *cell*, ternyata dengan menggunakan TPB sepuluh persen memang dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan *cell* (Hasdianah, 1998).

Inokulasi dan titrasi virus EBL pada *cell OL*

Virus EBL diisolasi dari sapi di Lembang oleh BPMSOH tahun 1998 diinokulasikan menggunakan *cell OL* sampai dengan pasasi 15; kemudian dalam

penelitian ini diadaptasikan pada *cell OL* sampai dengan pasasi 29.

Virus EBL adalah virus RNA yang mempunyai sifat stabil. Oleh karena itu virus ini dalam memproduksi antigen untuk karakterisasi proteinnya telah dipasasekan sampai 29 kali, sehingga didapatkan virus yang mempunyai titer cukup tinggi (sesuai dengan OIE, 2000). Sifat pertumbuhan virus EBL pada *Cell OL* pasase 15 membentuk *CPE* 50% memerlukan waktu 7 hari dengan $TCID_{50}$ $10^{4.4}$. Selanjutnya semakin meningkat jumlah pasasenyanya semakin cepat daya multiplikasinya hingga pada pasase 25 daya multiplikasinya sangat meningkat tajam, *CPE* terbentuk 90% memerlukan waktu hanya 3 hari dengan nilai $TCID_{50}$ $10^{7.4}$. Walaupun demikian untuk mencari sifat yang stabil, maka diperlukan pasase ulang sampai pada pasase 27 virus mampu membentuk *CPE* 90% dalam waktu 2 hari dengan $TCID_{50}$ $10^{7.8}$ sebagaimana Gambar 5.4 (A, B). Hal ini menunjukkan bahwa virus EBL sifat pertumbuhannya stabil dengan harapan tidak mengalami mutasi. Hasil titrasi virus selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.2. (Kaplan, 1973; Sarjono, 1993; Ishino, *et al.*, 2000).

Uji *Postulat Koch* pada perubahan patologi anatomis

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

Pembuktian yang pertama bahwa bakteri dapat menimbulkan penyakit dilakukan oleh Robert Koch pada 1876

seorang sarjana fisika yang berasal dari Jerman. Beliau dapat membuktikan bahwa penyakit Anthrax yang menyerang pada domba yang menimbulkan kematian ternyata disebabkan oleh bakteri yang kemudian diberi nama *Bacillus anthracis*. Robert Koch melakukan kultur darah domba yang mati tersebut pada media perbenihan yang ternyata ditemukan pertumbuhan bakteri, selanjutnya media perbenihan yang mengandung bakteri tersebut yang disuntikan pada domba sehat, ternyata menimbulkan gejala yang sama dan akan menimbulkan kematian (Tortora *et al.*, 2001).

Hasil penelitian Koch tersebut merupakan dasar dari penelitian penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme yang menimbulkan infeksi. Sampai saat ini maka untuk menentukan apakah suatu mikroorganisme dapat menyebabkan terjadinya penyakit harus merujuk pada hasil penelitian dari Robert Koch. Rujukan tersebut kemudian diformulasikan menjadi *Postulat Koch* yang terdapat empat syarat. Syarat pertama: Mikroorganisme patogen tersebut dapat ditemukan pada setiap kasus penyakitnya. Syarat kedua: Mikroorganisme patogen tersebut dapat diisolasi dari kasus penyakitnya dan dapat ditumbuhkan pada medium perbenihan secara murni. Syarat ke tiga: Mikroorganisme patogen yang murni yang tumbuh pada perbenihan tersebut apabila disuntikkan pada hewan yang peka akan menimbulkan gejala yang sama. Syarat ke empat: Mikroorganisme patogen yang sama harus bisa diolasi dari binatang yang peka tersebut.

Pada kenyataannya ternyata beberapa penyakit yang telah diketahui tidak dapat memenuhi *Postulat Koch* tersebut secara lengkap. Penyebab penyakit Lues yaitu *Treponema pallidum* dan Morbus Hansen yaitu *Mycobacterium leprae* tidak dapat ditumbuhkan pada media perbenihan. Apalagi penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus sukar untuk

ditumbuhkan pada media perbenihan misalnya virus penyebab AIDS dan SARS.

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

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

Kelaianan patologi anatomis terlihat jelas bahwa adanya virus EBL ditunjukkan dengan pembesaran hati yang menyebabkan hepatomegali, pembesaran lambung yang berisi nanah serta adanya benjolan – benjolan pada hampir seluruh permukaan tubuh ternak sapi yang terserang virus EBL, yang mana bila bagian tersebut diiris maka akan mengeluarkan nanah yang berwarna putih kekuning – kuning, padat, dan mengeras, juga menimbulkan bau yang sangat tidak sedap. Benjolan-benjolan yang terbentuk adalah merupakan hasil dari proliferasi dan differensiasi abnormal dari *cell* limfosit yang menyebabkan limfositosis persisten. Kenaikan jumlah

limfosit secara abnormal dan sangat menyolok sebagai akibat dari infeksi virus EBL; sebagaimana Tabel 3. Dengan pemberian antibodi terhadap protein *Egp 51* mekanisme terjadinya kenaikan limfosit secara persisten ini dapat dihambat dan dicegah sebagaimana gambar limfositosis. Dari hasil seperti pada Gambar 5.4 terlihat adanya perbedaan yang nyata pada percobaan *in vivo* dengan pemberian protein *Egp 51* di mana terlihat tidak terbentuknya nanah pada bagian hepar hewan percobaan, yang menunjukkan mekanisme limfositosis persisten dapat dicegah. Hal ini seperti yang dinyatakan oleh *Robert Koch* tahun 1876 untuk mengetahui keberadaan suatu virus maka diadakan Uji *Postulat Koch* klasik. Hasil tersebut sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4. (OIE, 2000)

Uji agar gel imunodifusi

Pembuktian lain untuk mengetahui keberadaan virus EBL dilakukan pula uji serum melalui uji agar gel imunodifusi.

Hasil peneltian mengenai reaksi antigen antibodi yang dikerjakan menggunakan agar gel imunodifusi metode Nakajima, *et.al.*, 2000 dapat dilihat adanya garis presipitasi yang merupakan hasil ikatan antigen dan antibodi di antara sumuran – sumuran agar gel imunodifusi yang membuktikan bahwa virus EBL dapat berikatan dengan antibodi spesifik. Sebagaimana pada Gambar 6. Seperti pada penelitian terdahulu bahwa untuk mendeteksi keberadaan virus EBL digunakan uji serologi yaitu uji agar gel imunodifusi; hal ini sesuai dengan kesepakatan ahli EBL berdasarkan hasil pertemuan di Copenhagen tahun 1989. Keberhasilan pembuatan antigen *test KIT* penyakit EBL yang berisi antigen *test*, serum *refferen*, serum negatif, serum kontrol positif, serum kontrol positif lemah (*weak positive*); yang telah digunakan untuk pengujian serum lapangan penyakit EBL, dan sebagai kontrol digunakan antigen *test KIT* penyakit EBL produksi Kanada, di mana hasilnya adalah kurang lebih sama;

yang membuktikan pula bahwa virus EBL isolat lokal yang digunakan dalam penelitian ini benar adalah virus EBL isolat lokal; sebagaimana Tabel 1.

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

Hasil pemeriksaan keberadaan materi genetik virus EBL seperti pada Gambar 5.8 ternyata memperkuat hasil uji *Postulat Koch* yaitu versi molekuler. Produk hasil PCR menghasilkan 803 bp nukleotida yang merupakan bagian dari gen penyandi protein *E* berat molekul gp 51 kDa. Penelitian tahap akhir menyimpulkan bahwa protein hemagglutinin E gp 51 kDa virus EBL merupakan protein yang bersifat imunogenik dan protektif. Hal ini menunjukkan bahwa protein hemagglutinin E gp 51 kDa virus EBL merupakan faktor virulensi.

Berdasarkan hasil penelitian tahap I maka dapat disimpulkan mengenai uji *Postulat Koch* baik secara klasik maupun molekuler dapat terpenuhi untuk virus yang akan digunakan pada penelitian tahap berikutnya adalah benar virus EBL yang virulen. Penelitian selanjutnya meliputi penelitian tahap II yaitu eksploratif dan tahap III penelitian eksperimental yang terdiri dari penelitian *in vitro* dan *in vivo*.

Penelitian Tahap II

Penelitian Tahap II bertujuan untuk menentukan protein *Egp 51* adalah protein hemagglutinin. Penelitian ini meliputi : pemurnian virus EBL, pemurnian protein *envelope* virus EBL, pengukuran berat molekul protein *Egp 51* virus EBL dengan SDS-PAGE pada Gambar 5.7, terlihat ada beberapa jenis protein virus EBL yang terdiri dari protein struktural yang mempunyai berat molekul yang berbeda, yaitu 15 kDa, 24 kDa, serta protein *envelope* yang merupakan glikoprotein dengan berat molekul 51 kDa. Dari ketiga

macam protein yang memungkinkan dapat digunakan sebagai vaksin, perlu diuji mengenai karakter hemagglutinin, uji imunogenisitas yang terdiri dari uji hemagglutinasasi (Uji *HA*), uji hambatan hemagglutinasasi (Uji *HI*), uji imunositokimia dan uji *immunoblotting*. Hasil pengujian yang telah dilakukan ternyata hanya protein *Egp 51* yang bersifat protein hemagglutinin. Protein hemagglutinin pada umumnya merupakan protein adhesin, yaitu protein yang berperan pada perekatan suatu mikroba baik virus maupun bakteri pada sel hospes (Karzenstein *et al.*, 1999; Sumarno, 2000; Fitri L.E., 2005). Pada beberapa bakteri telah ditemukan protein hemagglutinin yang bertindak sebagai molekul adhesin seperti halnya pada bakteri *Vibrio Cholera* 38 kDa; dan pada *Salmonella thypi* 36 kDa (Sumarno, 2000; Sunarto S., 2002). Pada virus yang digunakan pada penelitian ini telah ditemukan pula protein hemagglutinin berat molekul 51 kDa, sedangkan pada virus *HIV* ditemukan protein yang berasal dari *envelope glycoprotein* dengan berat molekul 140 kDa yang berperan pada pelekatan virus *HIV* pada cell CD⁸⁺ (Weiner *et al.*, 1999; Karzenstein *et al.*, 1999). Pada parasit telah ditemukan protein hemagglutinin pada penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* yang mempunyai berat molekul 270 kDa, protein hemagglutinin ini berfungsi sebagai protein adhesin (Fitri L.E., 2005). Protein *Egp 51* adalah protein hemagglutinin serta merupakan molekul adhesin yang bersifat protektif dan imunogenik yang terdapat pada bagian *envelope* virus EBL; hal ini menunjukkan protein *Egp 51* dapat digunakan sebagai kandidat vaksin, seperti pada Gambar 10 dan Tabel .3.

Beberapa penelitian mengenai hemagglutinin dapat digunakan sebagai bahan dasar vaksin, sebagai contoh dalam menanggulangi penyakit pertusis yang disebabkan oleh *Bordella pertusis*, dan vaksin lain yang berbasis protein hemagglutinin yang berisi molekul adhesin yaitu vaksin pertactin. Bakteri lain yang

akan digunakan sebagai bahan vaksin yang mengandung protein hemagglutinin dan masih dalam penelitian adalah pada bakteri yang menyebabkan infeksi saluran kencing, yaitu bakteri yang mengandung protein hemagglutinin strain UPEC (*Uro Pathogenic Eicesheria colli*) (Sumarno, 2000). Dari hasil pembahasan yang didukung dengan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa protein hemagglutinin yang berada di daerah *envelope* virus EBL, adalah protein *Egp 51* yang bersifat imunogenik.

Penelitian Tahap III

Uji *In Vitro*

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

Sifat imunogenesitas dari protein hemagglutinin 51 kDa virus EBL dapat dilihat dari hasil penelitian yang ditampilkan pada Gambar 5.11. dan Tabel 5.1. Hasil *HA* menunjukkan pada protein *Egp 51* dapat menghasilkan titer 4 *HA* unit, berarti pada titer 4 *HA* unit ini dapat dilanjutkan dengan uji respon imun, yang menunjukkan bahwa virus EBL bersifat imunogenik.

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

Eksperimen reaksi hambatan hemagglutinasi dapat dilihat pada baris yang berisi *protein Egp 51* dimana menunjukkan *protein sub unit Egp 51* virus EBL tersebut menghambat aglutinasi virus EBL. Terlihat adanya endapan dari *cell* darah merah sapi yang menandakan *protein Egp 51* berikatan dengan antigen virus EBL sebagai petunjuk bahwa *protein Egp 51* tersebut bersifat imunogenik (OIE, 2003; Sumarno, 2000). Pada Uji Imunositokimia terlihat sebagaimana Gambar 5.10, bagian *cell* yang terlihat masih *intact* walaupun telah diberi virus ganas titer $10^{7.8}$ TCID₅₀ menunjukkan bahwa antibodi anti *protein E gp51* yang diberikan bersifat imunogenik protektif, adanya warna coklat menunjukkan adanya bagian virus dan warna hijau menunjukkan bagian yang terproteksi.

Sedangkan untuk membuktikan bahwa anti bodi protein hemagglutinin 51 kDa adalah bersifat protektif dapat dilihat dari hasil penelitian Uji *HI* seperti pada Gambar 5.13. dan Tabel 5.2. Pada Uji ini ditemukan sifat protektif dari antibodi protein hemagglutinin *E gp 51*, dengan titer 64 *HI* unit yang menandakan antibodi protein hemagglutinin *E gp 51*, bersifat protektif. Pada uji serum netralisasi test terlihat bahwa antibodi *gp 51* mempunyai daya protektifitas lebih tinggi dibandingkan dengan protein lainnya. Hal ini berarti *protein gp 51* mempunyai sifat imunogenik. Sedang jenis protein yang mempunyai berat molekul 24 kDa dan protein 15 kDa lebih cocok untuk digunakan sebagai bahan diagnostik, karena kemungkinan protein ini diekspresi pada awal infeksi dan yang menginduksi respon imun pertama kali di dalam induk semang. Hasil Tabel 5.3, Tabel 5.4, Tabel 5.5, Tabel 5.6, Tabel 5.7 dan Tabel 5.8, terlihat pada Kelompok I titer rendah tidak ada daya imunogenisitas dan protektifitas karena pada kelompok ini tidak diberi suntikan protein hemagglutinin *E gp 51* tetapi langsung di-*challenge* dengan Virus EBL Titer $10^{7.8}$ TCID₅₀. Pada kelompok II sudah mulai terlihat adanya daya imunogenisitas dan protektifitas yang positif; karena pada kelompok II (IIa, IIb,

IIc) merupakan kelompok yang diberi suntikan protein hemagglutinin *E gp 51*, dari hasil kelompok II dapat ditarik kesimpulan bahwa melalui uji serum netralisasi terdapat titer antibodi yang tinggi dengan pemberian protein hemagglutinin *E gp 51* pada yang diboster 1 kali maupun yang diboster 2 kali. Hasil tersebut di atas membuktikan bahwa protein hemagglutinin *E gp 51* bersifat imunogenik dan protektif.

Uji *In Vivo*

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* yang kemudian di-*challenge* virus EBL ganas dengan titier $10^{7.8}$ TCID₅₀ pada hari ke lima menunjukkan jumlah lebih banyak secara sangat signifikan daripada jumlah limfosit yang di-*challenge* virus yang sama tetapi sebelumnya mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁*, baik yang mengalami suntikan ulangan satu kali, dua kali, bahkan yang tidak disuntik ulang ($P < 0,01$).

Subyek yang diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁*, menunjukkan bahwa suntikan ulangan tidak menunjukkan pengaruh terhadap jumlah limfosit yang signifikan. Hal itu dapat dilihat diantara subyek yang disuntik ulang satu kali, disuntik ulang dua kali atau terhadap subyek yang tanpa disuntik ulang tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ($p > 0,05$).

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* yang kemudian di-*challenge* virus EBL ganas dengan titier $10^{7.8}$ TCID₅₀ pada hari ke sepuluh menunjukkan jumlah lebih banyak secara sangat signifikan daripada jumlah limfosit yang di-*challenge* virus yang sama tetapi sebelumnya mendapat perlakuan pemberian protei *Egp 51*, baik yang mengalami *booster* ulang satu kali, dua kali bahkan yang tidak di-*booster* ($p < 0,01$). Seperti pada hari ke lima pemeriksaan jumlah limfosit di antara subyek yang diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁*, menunjukkan bahwa pembosteran tidak menunjukkan pengaruh

terhadap jumlah limfosit yang signifikan. Hal itu dapat dilihat dari antara subyek yang diboster satu kali terhadap subyek yang diboster dua kali atau terhadap subyek yang tanpa diboster dan subyek yang diboster dua kali terhadap subyek yang tidak mengalami pembosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek yang di-*challenge* virus EBL. Jumlah limfosit subyek yang di-*challenge* virus EBL tetapi mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* baik yang mengalami pembosteran satu kali, dua kali dan tanap pembosteran berturut – turut adalah $18751,00 \pm 512,96$; $413,40 \pm 5,58$; $400,00 \pm 1,00$; $403,00 \pm 4,12$.

Jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* yang kemudian di-*challenge* virus EBL ganas dengan titier $10^{7.8}$ TCID₅₀ pada hari ke lma belas sebesar $18878,40 \pm 515,54$. Jumlah ini lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan dengan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama dan diperiksa pada hari yang sama tetapi ditambahkan protein *Egp₅₁*, baik terhadap subyek yang mengalami pembosteran satu kali yaitu sebesar $411,60 \pm 3,58$, subyek yang mengalami pembosteran dua kali, sebesar $400,60 \pm 0,89$ atau tanpa pembosteran $401,80 \pm 2,39$ ($p > 0,05$).

Hasil pemeriksan yang dilakukan pada hari ke dua puluh menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* adalah $19018,00 \pm 475,03$ sedangkan tiga perlakuan lainnya , terdiri atas pemberian protein *Egp₅₁* dan diboster satu kali, pemberian protein *Egp₅₁* dan diboster dua kali dan pemberian protein *Egp₅₁* tanpa pembosteran berturut – turut adalah $412,00 \pm 3,08$; $399,60 \pm 0,55$ dan $406,20 \pm 5,26$. Hasil analisis data menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* lebih banyak secara sangat signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat

perlakuan protein *Egp₅₁* baik yang diboster maupun tanpa pembosteran ($p < 0,01$). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp₅₁* dan mengalami pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami pembosteran dua kali ($p > 0,05$). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp₅₁* dan mengalami pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa pembosteran ($p > 0,05$). Antara subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp₅₁* dan mengalami pembosteran dua kali terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp₅₁* tetapi tanpa mengalami pembosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ($p > 0,05$).

Pada hari ke 25 hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* sebesar $19149,20 \pm 472,40$. jumlah limfosit pada subyek ini lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp₅₁* ($p < 0,01$). Di antara subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* diperoleh hasil jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali tidak berbeda nyata dengan jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek yang tidak diboster tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap subyek yang mengalami pembosteran dsatu kali atau dua kali ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* baik yang mengalami pembosteran satu kali, dua kali atau tanpa pembosteran masing – masing sebesar $411,60 \pm 4,39$; $397,80 \pm 2,86$ dan $402,80 \pm 4,86$.

Hasil pemeriksaan jumlah limfosit pada keempat perlakuan yang dilakukan pada hari ke tiga puluh masing sebesar

$19269,80 \pm 496,60$ untuk subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, $411,60 \pm 4,39$ untuk subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dan diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* dengan pembosteran satu kali, $397,80 \pm 2,86$ subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dengan pembosteran dua kali dan $402,80 \pm 4,82$ untuk subyek yang *dichallenge* virus EBL ganas, dan diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* dengan tanpa pembosteran. Dari hasil analisis data yang diperoleh pada pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke tiga puluh memperlihatkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp₅₁* ($p < 0,01$). Di antara perlakuan yang menerima perlakuan protein *Egp₅₁* memperlihatkan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan dan mengalami pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami pembosteran dua kali atau tidak mengalami pembosteran ($p > 0,05$). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan protein *Egp₅₁* dan mengalami pembosteran dua kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa pembosteran ($p > 0,05$).

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

Analisis data jumlah limfosit yang diperoleh dari pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke 35 menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* lebih banyak secara sangat signifikan disbanding jumlah limfosit subyek yang diberi perlakuan pemberian protein *Egp₅₁* dengan mengalami pembosteran satu kali, dua kali atau tanpa pembosteran ($p < 0,01$). Jumlah limfosit

subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi mengalami pembosteran dua kali ($p > 0,05$). Demikian pula jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan sama dan tidak mengalami pembosteran ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran dua kali terhadap subyek yang mendapat perlakuan sama tetapi tanpa mengalami pembosteran tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan ($p > 0,05$). Jumlah limfosit yang diperoleh pada pemeriksaan hari ke 35 dari subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51*, jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran satu kali, jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran dua kali dan jumlah limfosit subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan tanpa pembosteran berturut – turut adalah $19388,20 \pm 475,25$; $393,80 \pm 41,96$; $399,80 \pm 0,84$ dan $401,80 \pm 5,75$.

Jumlah limfosit yang diperoleh dari hasil pemeriksaan yang dilakukan pada hari ke empat puluh pada subyek yang tidak mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51*, pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran satu kali, pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran dua kali dan pemberian protein *Egp51* tanpa pembosteran berturut – turut adalah $19690,90 \pm 430,48$; $408,00 \pm 4,53$; $400,00 \pm 0,71$ dan $397,40 \pm 8,79$. Hasil selengkapnya pemeriksaan jumlah limfosit pada hari ke empat puluh lebih jelas disajikan dalam Tabel 5.11

Seperti yang terlihat dalam Tabel 5.11, jumlah limfosit subyek yang tidak

mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* lebih banyak secara sangat signifikan bila dibandingkan tiga perlakuan lainnya yaitu pemberian protein *Egp51* ($p < 0,01$). Di antara subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* diperoleh hasil jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali tidak berbeda nyata dengan jumlah limfosit subyek yang diboster dua kali ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek yang tidak diboster tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap subyek yang mengalami pembosteran dsatu kali atau dua kali ($p > 0,05$).

Seperti hasil pemeriksaan yang diperoleh pada hari sebelumnya, analisis data jumlah limfosit pada hari ke 45 menunjukkan jumlah limfosit subyek yang tidak mendapat ini lebih banyak secara signifikan bila dibandingkan subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* baik yang mengalami pembosteran satu kali, dua kali atau tanpa pembosteran ($p < 0,01$). Subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran satu kali tidak menunjukkan perbedaan jumlah limfosit yang signifikan baik terhadap subyek yang subyek yang mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran dua kali atau mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan tanpa ($p > 0,05$). Jumlah limfosit subyek mendapat perlakuan pemberian protein *Egp51* dengan pembosteran dua kali tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap subyek yang mengalami pembosteran satu kali atau dua kali ($p > 0,05$). Data hasil pemeriksaan jumlah limfosit pada keempat perlakuan yang dilakukan pada hari ke 45 selengkapnya disajikan dalam Tabel 5.10.

Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa protein *Egp51* bersifat protektif. Hasil lain terlihat pada Gambar 5.16. menunjukkan protein *Egp51* bersifat protektif, sebagaimana pada Gambar 5.16 tersebut bagian hati dan lambung tidak menunjukkan benjolan – benjolan tumor yang berisi pus (nanah) masa tumor EBL,

dengan pemberian protein *Egp₅₁* dan *dichallenge* dengan virus EBL yang ganas mempunyai titer 10^{7,8} TCID₅₀. Dari hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan pernyataan ilmiah sebagai berikut bahwa :

Protein hemagglutinin E gp 51 kDa virus EBL merupakan protein yang bersifat imunogenik dan protektif.

Kesimpulan

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

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

Saran

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

DAFTAR PUSTAKA

Altaner, C, ban J, Altanerocha. V, and Janik. V., 1991. **Protective Vaccination Against Bovine Leukaemia Virus Infection by Means of cell Drived Vaccine** Ver.Sci. Vol (9). pp 889-894.

Direktorat Jenderal Peternakan, 1996. **Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular**. Jilid IV. Direktur

Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta. hlm 1-4

Emanuelson, U., Scherling, K. and Petterson, H., 1992. **Relationship between Herd Bovine Leukemia Virus Infection Status and Reproduction, Disease Incidence, and Productivity in Swedish Dairy Herds**. Prev. Vet. Med. 12:121-131

Fedik A. Rantam. 2005. **Virologi**. Airlangga University Press. Hlm 60-70.

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

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

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

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

Hasdianah, R. H., 2006. **Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Egp 51 Virus EBL Isolat Lokal Sebagai Kandidat Vaksin Sub Unit Molekuler**. Disertasi. Perpustakaan Unversitas Airlangga Program Pasca Sarjana, Surabaya 2006, hlm 87-103.

Hudson, L ; hay, F.C., 2001. **Practical Immunology** 3rd ed., Oxford

- Blackwell Scientific Publications
London Edinburgh Boston Melbourne
Paris-Berlin Vienna, pp 251-254.
- Ishino, S, Nhara, S. Konoy, Sentsui H.,
2000. **Experiment infection of
bovine Leukosis Virus in Small
laboratory Animal**, National Institute
on Animal health 1-3 Kannodai
Tsukuba, Ibaraki 305 **Japan. J.
Vet. Res.** 50(6), pp 124-1251.
- Johan, P., 1975. **Cell and tissue Culture**
(Ed 5) Churchill Livingstone Edinburg
London and New York, pp 261-290.
- Johnson, R. Kanee JB, Anderson, M., 1987.
**Bovine leukemia Virus : Duration
of BLV Colostral Antibodies in
Calves from Commercial Dairy
Herds Prev. Vet,med, 4 : pp 371-
376.**
- Miller, J.M and Van der Maaten MJ, 1999.
**Use of Glycoprotein Antigen in the
Immunodiffusion Test for Bovine
Leukemia Virus Antibodies. Eur J.
Cancer, 13, 1369-1375.**
- Office International des Epizooties (OIE)
Journal Oktober Copy right @ 2000.
**Enzootic Bovine Leucosis manual
of Standard for Diagnostic Test
and Vaccine. American Type
Culture Collection, 10801.
university Bourklevard, Manassas-
Virginia. 2210-2209, United States of
America, pp 328-345.**
- Ressang, AA, 1989. **Penyakit Viral pada
Hewan Mamalia yang Penting di
Indonesia. Penerbit Universitas
Indonesia-UI Press, Jakarta. hlm
110-119**
- Spitter, G.A, Orlik, O., 1996. **Progression
to Persistent Lymphocytosis and
Tumor Development in Bovine
leukemia Virus (BLV) Infected
Cattle Correlates with Impaired**
- Proliferation of CD⁴⁺ + Cell in
Response to gag and env-Encoded
BLV Proteins. Journals of Virology,
NDV, 1996, pp 7584-7593.**
- Trainin, Z, Berstein, S, Rosental and Berner
J., 1990. **The Fat of Milk From
Dairy Cattle Infected with bovine
leukosis Virus, J. Vet. Research
Communications (14) ; pp 436-448.**
- Yoko, A ; Ikawa, Y., Tajima, S., 1998.
**Complete Bovine Leukemia Virus
(BLV) Provirus is Conserved in
BLV-Infected Cattle through out
the Course of B-Cell
Lymphosarcoma Development.**

