

# Karakterisasi Aktivitas Enzimatis Neuraminidase Virus Influenza H5N1

SIMSON TARIGAN, RISA INDRIANI dan DARMINTO

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

E-mail: [tarigan@indo.net.id](mailto:tarigan@indo.net.id)

(Diterima dewan redaksi 16 Mei 2007)

## ABSTRACT

TARIGAN, S., R. INDRIANI and DARMINTO. 2007. Characterisation of enzymatic activities of H5N1 influenza virus. *JITV* 12(2): 153-159.

One of the two glycoproteins projected from the surface of the influenza virus is identified as neuraminidase. This enzyme enables the virus to spread in the host, and therefore it plays vital roles in the viral pathogenicity. From the viewpoint of disease control, neuraminidase is used as the target for the development of anti-flu drugs, and for the development of diagnostic test to differentiate infected from vaccinated animals (DIVA). Since the roles of the enzyme are very important, information regarding the characteristics and the procedure to measure its activity, which is the purpose of this study, is essential. The optimum incubation time of the neuraminidase-substrate (fetuin) reaction and the optimum pH of the buffer were determined. The stability of the enzyme against heating, supplementation or chelating of calcium ion, and  $\beta$ -propiolactone treatment were analysed. This study showed that neuraminidase from H5N1-influenza virus was, in regards to the characteristics investigated in this study, was comparable to that from *Clostridium perfringens*. The optimum incubation time for the viral and Clostridial neuraminidases were 60 and 30 minutes, respectively; whereas, the optimum pH for both neuraminidase was 6-7. At pH 8, both neuraminidase were inactive. Supplementation of calcium ion tended to increase activity but chelating of the cation did not have any observable effects. Treatment with 0.2%  $\beta$ -propiolactone for 6 hours reduced the activity, whereas heating at 60°C for 60 minutes abolished all activity. Since inactivation by  $\beta$ -propiolactone is partially only, neuraminidase assay could be performed safely in ordinary laboratories using  $\beta$ -propiolactone-treated-influenza virus, rather than the live virus. The thermolabile nature of the enzyme will complicate any attempt to purify the enzyme.

**Key Words:** H5N1, Neuraminidase, Stability, Thiobarbituric Assay

## ABSTRAK

TARIGAN, S., R. INDRIANI dan DARMINTO. 2007. Karakterisasi aktivitas enzimatis neuraminidase virus influenza H5N1. *JITV* 12(2): 153-159.

Salah satu dari 2 glycoprotein pada permukaan partikel virus influenza diidentifikasi sebagai neuraminidase. Enzim ini berfungsi dalam penyebaran virus di dalam induk semang karena itu perannya vital dalam patogenitas virus. Dari aspek pengendalian penyakit, neuraminidase digunakan sebagai target pengembangan obat anti flu dan pengembangan teknik diagnosis untuk pembedaan ayam yang sero positif akibat vaksinasi atau akibat infeksi alam. Mengingat pentingnya peranan enzim tersebut, pengetahuan tentang karakteristik dan kemampuan pengukuran aktivitasnya, yang merupakan tujuan dari penelitian ini, sangat diperlukan. Waktu inkubasi reaksi neuraminidase dengan substrat (fetuin) dan pH larutan penyangga ditentukan. Stabilitas enzim terhadap panas, penambahan dan *chelating* ion kalsium, dan  $\beta$ -propiolactone dianalisis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa neuraminidase virus influenza H5N1 hampir sama dengan neuraminidase *Cl. perfringens*. Waktu inkubasi yang optimum adalah 60 menit untuk neuraminidase virus influenza dan 30 menit untuk neuraminidase Clostridium, sedangkan pH optimum larutan penyangga untuk kedua neuraminidase adalah 6-7, pada pH 8 enzim tidak aktif. Penambahan ion kalsium cenderung menaikkan aktivitas enzim tetapi *chaleting* kation tersebut tidak mempunyai pengaruh. Perlakuan dengan 0,2%  $\beta$ -propiolactone selama 6 jam menyebabkan penurunan aktivitas enzim, sedangkan dengan pemanasan 60°C selama 60 menit menghilangkan aktivitas secara total. Karena kehilangan aktivitas enzim akibat penambahan  $\beta$ -propiolacton hanya sebahagian saja, uji aktivitas neuraminidase dapat dilakukan secara aman dengan menggunakan virus H5N1 yang telah diinaktifkan dengan  $\beta$ -propiolacton. Sifat neuraminidase yang *thermolabile*, sangat menyulitkan purifikasi dan penyimpanan enzim dalam keadaan aktif.

**Kata Kunci:** H5N1, Neuraminidase, Stabilitas, Uji Thiobarbiturat

## PENDAHULUAN

Virus influenza adalah virus yang paling ditakuti karena dapat menyebabkan pandemi dengan kematian puluhan juta manusia atau menyebabkan wabah pada peternakan ayam dengan kerugian yang luar biasa

tinggi. Virus influenza mengandung materi genetik berupa RNA rantai tunggal, bersegmen dan dilindungi oleh protein inti (*nucleoproteins*) dan protein matriks. Berdasarkan antigenisitas protein pelindung tersebut, virus influenza dikelompokkan menjadi 3 tipe; yakni tipe A, B dan C. Virus influenza tipe A adalah tipe yang

terdapat pada unggas, paling ganas, dan penyebab pandemi pada manusia (KAMPS dan REYES-TERAN, 2006). Materi genetik dan protein pelindung terbungkus oleh selubung lipid (*lipid envelope*) yang dari permukaannya muncul dua jenis tonjolan glikoprotein; haemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Kedua glikoprotein ini yang bertanggung jawab terhadap virulensi, keganasan dan imun proteksi terhadap virus. Berdasarkan antigenisitasnya, HA virus influenza type A dikenal 16 macam (H1-H16) sedangkan NA dikenal 9 macam (N1-N9) (OIE, 2004). Pengklasifikasian lebih lanjut virus influenza type A menjadi subtype didasarkan pada kedua glikoprotein tersebut menjadi: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H5N2, H7N1, H7N7, H7N3 dan sebagainya (KAMPS dan REYES-TERAN, 2006).

Haemagglutinin berfungsi mengenali dan mengikat reseptor (*N-acetyl neuraminic acid*) pada sel host sedangkan neuraminidase berfungsi melepaskan progeni virus atau virus yang baru terbentuk dari permukaan sel yang mensintesisnya sehingga memungkinkan menginfeksi sel-sel yang baru. Neuraminidase memutus ikatan  $\alpha$ -ketosidik antara asam neuraminik dan residu glycosyl pada glikoprotein, glikolipid atau asam kolominik. Tanpa aktivitas enzimatis neuraminidase ini, virus yang baru menginvasi akan terjatuh dalam permukaan mukosa saluran pernafasan atau partikel virus yang baru terbentuk akan menumpuk pada permukaan sel yang mensintesisnya (WERNER dan HARDER, 2006). Karena vitalnya peranan neuraminidase bagi siklus hidup virus, hewan atau manusia yang terinfeksi dapat diobati dengan neuraminidase inhibitor seperti Oseltamivir (Tamiflu®) (KAMPS dan HOFFMANN, 2006). Disamping terapi, neuraminidase juga memainkan peranan istimewa dalam surveilans penyakit, yakni pembedaan hewan yang terinfeksi secara alami dengan hewan yang divaksin (DIVA, *differentiating infected from vaccinated animals*) (CAPUA et al., 2003; CAPUA et al., 2004; CATTOLI et al., 2006).

Mengingat pentingnya peranan neuraminidase tersebut, beberapa metode telah dikembangkan untuk mendeteksi atau mengkuantifikasi aktivitasnya. Salah satu yang paling sederhana adalah mendeteksi atau mengkuantifikasi asam neuraminik yang terlepas akibat aktivitas neuraminidase pada substratnya. Kuantifikasi asam neuraminik dilakukan dengan uji asam tiobarbiturat (*thiobarbituric assay*) menurut (WARREN, 1959). Mengingat virus influenza gampang berubah secara genetik akibat *antigenic drift* atau *shift* metode deteksi enzim tersebut perlu secara berkala mengalami optimalisasi. Optimalisasi ini merupakan salah satu tujuan dari penelitian ini. Disamping itu, penelitian ini juga bertujuan mengevaluasi peranan ion kalsium, stabilitas enzim terhadap suhu dan  $\beta$ -propiolactone (zat kimia yang banyak dipakai untuk menginaktivkan

virus). Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam usaha purifikasi enzim tersebut dan identifikasi bahan-bahan kimia atau biologis inhibitor neuraminidase untuk penemuan obat influenza.

## MATERI DAN METODE

### Virus

Virus influenza H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari seekor ayam petelur di Gunung Sindur, Bogor saat terjadi wabah penyakit tahun 2003. Hasil analisis asam inti virus menunjukkan kecocokan dengan virus H5N1. Virus dipropagasi dalam telur ayam SPF tertunas umur 11 hari dengan dosis  $10^3$  LED<sub>50</sub>. Cairan alantoik dari telur dipanen setelah kurang lebih 30 jam pasca inokulasi. Cairan diklarifikasi pada 1000 x g selama 30 menit lalu partikel virus disedimentasi pada 100.000 x g selama 60 menit. Virus disuspensikan dalam PBS pH 7.4, dialiokuat dan disimpan pada -20°C sebelum digunakan.

### Uji Hemagglutinas

Aktifitas haemagglutinas virus diukur sesuai prosedur standard (OIE, 2005). Sampel diencerkan secara serial (dua kali) dalam 25  $\mu$ l PBS, pH 7.4. Kedalam sampel yang telah diencerkan ditambahkan lagi 25  $\mu$ l PBS lalu plate diagitasi sampai suspensi menjadi homogen. Sebanyak 25  $\mu$ l suspensi 1% eritrosit ayam ditambahkan kedalam sampel, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Kebalikan (*reciprocal*) dari pengenceran tertinggi sampel yang menimbulkan haemagglutinas dengan jelas dinyatakan sebagai titer haemagglutinas (HA).

### Uji Neuraminidase

Pengukuran aktivitas neuraminidase didasarkan pada pelepasan *N-acetyl neuraminic acid* dari substrat fetuin yang diukur dengan *thiobarbituric assay* (WARREN, 1959). Semua bahan-bahan kimia untuk uji ini diperoleh dari Sigma Chemical. Pelaksanaan pengukuran adalah sebagai berikut. Sampel yang akan diuji diencerkan dalam 125  $\mu$ l larutan penyangga fosfat (50 mM natrium fosfat, 150 mM NaCl, pH 7) kecuali kalau disebut larutan penyangga lain. Kecuali kalau disebut lain, suspensi virus yang digunakan memiliki titer HA 2<sup>8</sup>/ 25  $\mu$ l sedangkan suspensi neuraminidase *Cl. perfringens* mempunyai titer 2 x 10<sup>3</sup> unit/ml. Berdasarkan hasil pre eksperimen, pada konsentrasi virus atau neuraminidase *Clostridium* diatas akan terlihat jelas pertambahan atau pengurangan aktivitas akibat suatu perlakuan. Sebanyak 50  $\mu$ l substrat (Fetuin 1 mg/ml) ditambahkan kedalam sampel, dicampur

sampai merata kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit, kecuali kalau disebut selama waktu yang lain. *N-acetyl neuraminic acid* yang terbebaskan dioksidasi dengan penambahan 50 µl larutan Natrium *m-periodate* (250 mM dalam 9 M asam fosfor). Setelah diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit, 75 µl larutan Arsenit (500 mM Natrium *m*-arsenit, 500 mM Natrium sulfat) ditambahkan, divorteks dan diagitasi selama 3 menit. Inaktivasi periodate yang komplit yang ditandai dengan menghilangnya warna kuning dilakukan dengan penambahan 75 µl larutan arsenit yang kedua. Setelah itu, sebanyak 75 µl larutan asam thiobarbiturat (56 mM asam thiobarbiturat, 500 mM Natrium sulfat, pH 7.7) ditambahkan, divorteks lalu diletakkan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah didinginkan dalam es selama 5 menit, ditambahkan 800 µl Cyclohexanone, divortex lalu disentrifuge pada 1000 x g selama 5 menit. Supernatan dipindahkan kedalam *cuvette* lalu diukur absorpsi ( $A_{549\text{ nm}}$ ) dengan blank berisi komponen yang sama kecuali tanpa neuraminidase). Aktivitas neuraminidase sampel berbanding lurus dengan  $A_{549\text{ nm}}$ .

#### Karakterisasi aktivitas neuraminidase virus H5N1 dan analisis statistik

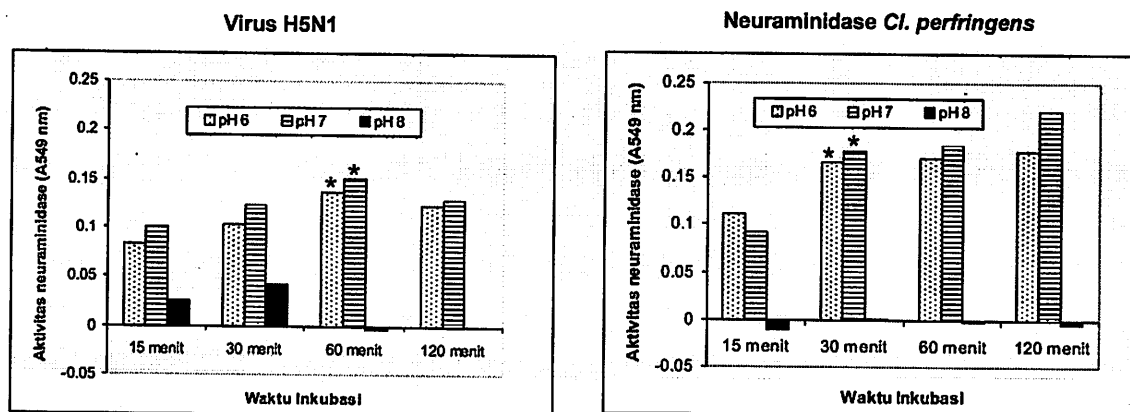
Karakteristik neuraminidase virus H5N1 yang diinvestigasi dalam penelitian ini antara lain: pH dan waktu inkubasi optimum, ketergantungan terhadap ion kalsium, stabilitas terhadap panas dan  $\beta$ -propiolactone. Tiga macam buffer dengan pH yang berbeda yang dicoba dalam penelitian ini; yakni: (1) 50 mM Natrium asetat, 150 mM NaCl, pH 6, (2) 50 mM Natrium fosfat, 150 mM NaCl, pH 7, dan (3) 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8. Waktu inkubasi neuraminidase fetuin yang dibandingkan adalah 15, 30, 60 dan 120 menit. Investigasi pengaruh ion kalsium dilakukan dengan penambahan 10 mM  $\text{CaCl}_2$  atau 5 mM EDTA kedalam suspensi virus atau neuraminidase sebelum penambahan

fetuin. Analisis stabilitas terhadap panas dilakukan dengan pemanasan suspensi virus pada 60°C selama 60 menit, sedangkan stabilitas terhadap  $\beta$ -propiolactone dilakukan dengan penambahan 0.2%  $\beta$ -propiolactone kedalam cairan allantoic. Setelah *distir* selama 6 jam, partikel virus dipeletkan 100.000 x g selama 60 menit, dan disuspensikan dalam PBS. Sebagai kontrol dilakukan perlakuan yang sama kecuali  $\beta$ -propiolactone diganti dengan PBS. Sebagai pembanding neuraminidase virus H5N1, digunakan neuraminidasi bakteri *Clostridium perfringens* (Sigma Chemicals). Setiap percobaan dilakukan dengan tiga ulangan dan signifikansi perbedaan antar perlakuan diuji dengan *Oneway ANOVA* (PETRIE dan WATSON, 2001).

## HASIL PENELITIAN

### Waktu dan pH optimum

Neuraminidase virus H5N1 maupun *Cl. perfringens* tidak aktif pada kondisi basa (pH 8). Hal ini terlihat dari hasil percobaan dimana virus influenza dan neuraminidase *Clostridium* tidak mampu membebaskan *N-neuraminic acid* dari fetuin pada larutan penyangga Tris-HCl (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8). Tidak terlihat perbedaan aktivitas yang nyata bila digesti dilakukan pada kondisi netral (50 mM natrium fosfat, 150 mM NaCl, pH 7) ataupun asam (50 mM Natrium asetat, 150 mM NaCl, pH 6) (Gambar 1). Waktu inkubasi 60 menit adalah waktu paling optimum untuk neuraminidase virus influenza karena kenaikan aktivitasnya tidak signifikan setelah waktu tersebut. Waktu inkubasi 30 menit merupakan waktu yang optimum untuk neuraminidase *Cl. perfringens* karena dengan waktu tersebut aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan 15 menit dan inkubasi yang lebih lama lagi tidak nyata ( $P>0,05$ ) meningkatkan aktivitasnya.



Gambar 1. Pengaruh pH dan waktu inkubasi terhadap aktivitas neuraminidase virus H5N1 dan *Clostridium perfringens*. Tanda \* memperlihatkan waktu inkubasi yang optimum

### Pengaruh ion kalsium

Penambahan ion  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) kedalam suspensi virus H5N1 secara sepintas terlihat meningkatkan aktivitas enzimatis neuraminidasenya, akan tetapi peningkatan tersebut tidak nyata ( $p=0.062$ ) (Gambar 2). 'Chelating' ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam suspensi virus juga sama sekali tidak merubah aktivitas neuraminidasenya. Hal yang sama juga terjadi pada neuraminidase *Cl. perfringens*, penambahan ataupun chelating ion  $\text{Ca}^{2+}$  sama sekali tidak terlihat mempengaruhi aktivitas enzimatisnya.

### Pengaruh Pemanasan dan $\beta$ -propiolactone

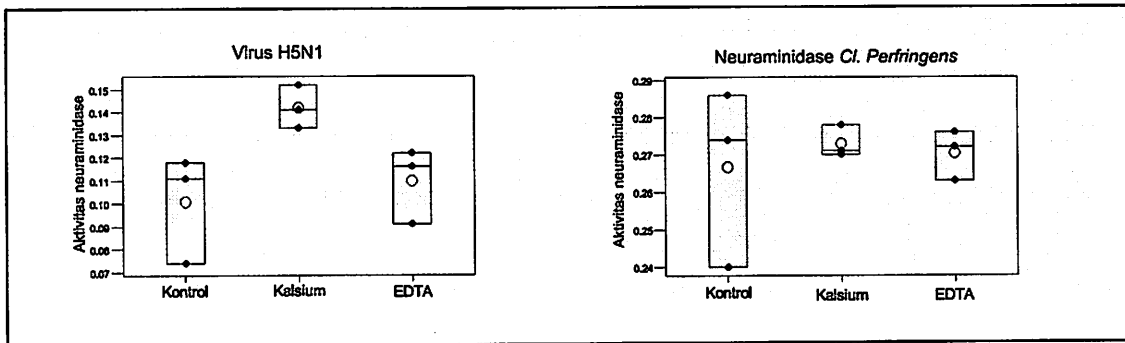
Pemanasan suspensi virus H5N1 pada  $60^\circ\text{C}$  selama 60 menit menyaknkan secara total aktivitas enzimatis neuraminidasenya (Gambar 3). Hal yang sama juga terjadi dengan pemanasan neuraminidase *Cl. perfringens*.

Inaktivasi virus dengan  $\beta$ -propiolactone mengakibatkan penurunan aktivitas neuraminidasenya,

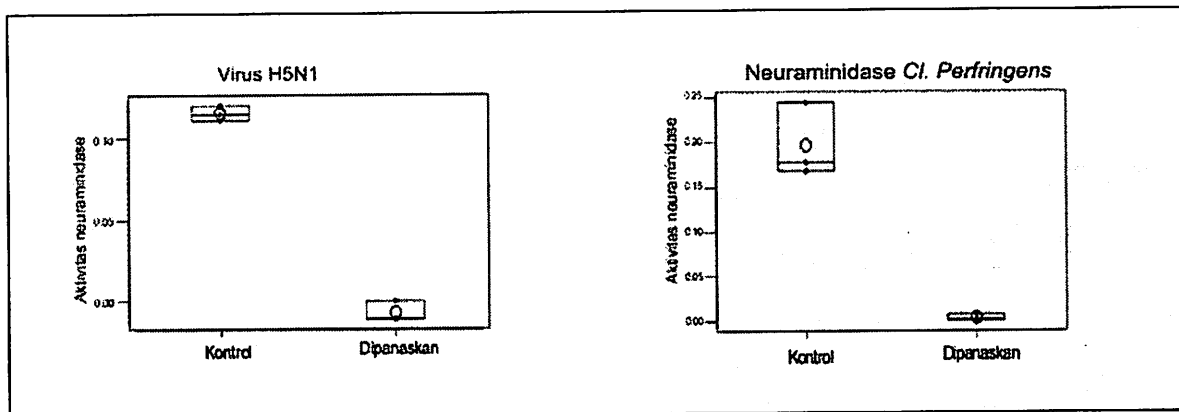
tetapi tingkat penurunan tergantung pada konsentrasi atau pengenceran virus. Makin encer virus makin jelas terlihat penurunan aktivitas neuraminidasenya. Pada pengenceran 1: 10, tidak terlihat penurunan yang nyata ( $p= 0,121$ ) pada pengenceran 1: 20 terlihat penurunan lebih dari 50% ( $p= 0.012$ ) dan pada pengenceran 1: 40 terjadi penurunan lebih 75% ( $p= 0.001$ ) (Gambar 4).

### PEMBAHASAN

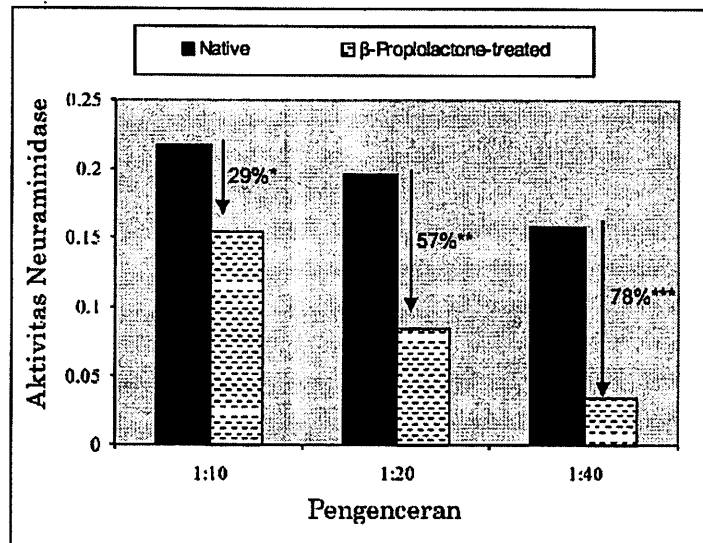
Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzimatis neuraminidase virus influenza H5N1 dapat dideteksi atau dikuantifikasi dengan mengukur asam neuraminik yang dilepaskan oleh enzim tersebut dari substrat fetuin. Metode pengukuran aktivitas neuraminidase influenza yang sederhana dan terpercaya (*reliable*) sangat dibutuhkan untuk pemurnian enzim, pencarian inhibitor neuraminidase sebagai obat influenza, dan pengujian kepekaan atau resistensi isolat virus klinis terhadap suatu obat neuraminidase inhibitor.



Gambar 2. Boxplot pengaruh penambahan dan *chelating* ion kalsium terhadap aktivitas enzimatis neuraminidase virus H5N1 dan *Cl. perfringens*  
Balok= range, bulatan berisi = hasil pengukuran, dan bulatan kosong = rata-rata dari 3 ulangan



Gambar 3. Pengaruh pemanasan pada  $60^\circ\text{C}$  selama 60 menit terhadap aktivitas enzimatis



Gambar 4. Pengaruh  $\beta$ -Propiolactone terhadap aktivitas neuraminidase virus H5N1

Tanda \*, \*\*, dan \*\*\* dibelakang angka persentase penurunan aktivitas menunjukkan berturut turut  $p = 0.121$  (penurunan tidak nyata),  $p = 0.012$  (nyata) dan  $p = 0.001$  (sangat nyata)

Pemurnian neuraminidase terutama berguna dalam pengembangan alat diagnostik serologis untuk pembedaan ayam yang seropositif akibat infeksi alam atau vaksinasi (DIVA). Metode pengukuran aktivitas neuraminidase yang lebih sensitif sebenarnya telah tersedia tetapi menggunakan bahan-bahan yang lebih mahal seperti substrat fluorochrom dan peralatan yang hanya tersedia di beberapa laboratorium-laboratorium tertentu saja seperti fluorometer atau luminometer (POTIER *et al.*, 1979; BUXTON *et al.*, 2000).

Perubahan terus menerus pada molekul haemagglutinin dan neuraminidase akibat *antigenic drift* dan kadang kadang *antigenic shift* merupakan ciri dari virus influenza (WERNER dan HARDER, 2006). Sebagai salah satu konsekuensi dari perubahan tersebut performans suatu uji untuk aktivitas enzimatik neuraminidase kemungkinan juga bisa berubah seiring dengan perubahan virus tersebut. Pada penelitian ini ditemukan bahwa aktivitas neuraminidase virus influenza dapat dideteksi pada pH 6 dan 7 tetapi tidak pada pH 8, suatu temuan yang sesuai dengan hasil penelitian (SUTTAJIT dan WINZLER, 1971) dan (KENDAL *et al.*, 1977) yang menemukan bahwa pH yang optimum berturut-turut adalah 6,8 dan 6. Aktivitas optimum neuraminidase bukan saja optimum pada kondisi sedikit asam tetapi pada pH yang sangat rendahpun (pH3) sebagian (38%) aktivitasnya masih terdeteksi (GLATHE *et al.*, 1982).

Lamanya inkubasi virus dengan enzim yang optimum pada penelitian ini adalah 60 menit untuk neuraminidase virus influenza dan 30 menit untuk neuraminidase *Clostridium*. Hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa waktu inkubasi

optimum tergantung dari tinggi rendahnya aktivitas enzimatik, makin rendah aktivitasnya makin panjang waktu yang dibutuhkan (KENDAL *et al.*, 1977). Jadi waktu inkubasi optimum mungkin berbeda-beda untuk setiap isolat dan konsentrasi virus.

Peranan ion kalsium pada enzim neuraminidase tergantung pada jenis atau asal neuraminidase itu sendiri. Ion kalsium tidak mempunyai peranan pada aktivitas neuraminidase bakteri *Cl. perfringens* atau *Pseudomonas aeruginosa* (FRASER, 1978; LEPRAT dan MICHEL-BRIAND, 1980). Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dengan *Cl. perfringen*. Neuraminidase virus Sendai juga tidak membutuhkan kalsium, bahkan aktivitasnya meningkat dengan penambahan EDTA (*calcium chelating agent*). Sebaliknya dengan neuraminidase virus influenza, penelitian sebelumnya menemukan ketergantungan enzim virus tersebut terhadap ion kalsium. Hasil analisis struktur kristal molekul neuraminidase virus influenza memperlihatkan bawa kalsium terikat pada lokasi sekitar tempat ikatan neuraminidase dengan substrat (*substrate-binding sites*) (BURMEISTER *et al.*, 1993; BURMEISTER *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 2006). Fungsi dari ion kalsium tersebut adalah untuk menstabilkan struktur dan fungsi (aktivitas) molekul. Molekul yang kehilangan kalsium menjadi jauh lebih labil terhadap panas (*thermolabile*) (BAKER dan GANDHI, 1976). Beberapa hasil penelitian terdahulu bahkan memperlihatkan ketergantungan mutlak aktivitas enzimatik neuraminidase virus influenza terhadap ion kalsium (KIYOTANI *et al.*, 1987). Ketergantungan akan ion kalsium tidak terlihat jelas pada penelitian ini. Penambahan ion kalsium (10 mM

CaCl<sub>2</sub>) kedalam suspensi virus dan substrat fetuin memang cenderung meningkatkan aktivitas enzimatisnya namun kenaikannya tidak signifikan ( $p=0.062$ ), dan *chelating* ion kalsium dari suspensi virus dan fetuin dengan EDTA tidak mempengaruhi aktivitas enzimatis. Tidak terlihatnya ketergantungan akan kalsium pada penelitian ini kemungkinan karena tidak adanya *heat stress* karena virus dan fetuin disimpan pada -20°C dan baru dicairkan sesaat sebelum digunakan. Dugaan ini sesuai dengan fungsi ion kalsium pada molekul neuraminidase virus influenza sebagai *thermostabilisator*.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini bahwa neuraminidase virus influenza dan *Cl. perfringens* hilang semua aktivitasnya setelah dipanaskan pada 60°C selama 60 menit sesuai dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya (BAKER dan GANDHI, 1976; SHIBATA *et al.*, 1993). Demikian labilnya neuraminidase virus influenza sehingga bukan hanya dengan pemanasan, penyimpanan pada suhu 4°C sekalipun menyebabkan kehilangan aktivitasnya setelah beberapa bulan (KENDAL *et al.*, 1980). Sifat neuraminidase yang sangat labil ini menimbulkan kesulitan dalam usaha purifikasi enzim dalam keadaan aktif, dan produksi vaksin yang mempunyai aktivitas neuraminidase yang stabil.

Virus influenza suptipe H5N1 yang dipakai dalam penelitian ini adalah subtype yang menimbulkan ketakutan yang amat sangat diseluruh dunia karena bukan saja telah menimbulkan kerugian ekonomis yang luar biasa besar pada industri perunggasan dalam waktu yang relatif singkat tetapi juga telah menunjukkan potensi besar sebagai penyebab pandemi pada manusia (REYES-TERAN dan GOTTSCHALK, 2006). Karena keganasan tersebut, penggunaan virus H5N1 hidup dalam suatu uji, seperti yang dilakukan dalam penelitian, memerlukan laboratorium dengan perlengkapan biosafety yang memenuhi syarat. Tanpa itu resiko si pelaksana uji terinfeksi atau virus menyebar kemana-mana sangat besar. Resiko diatas dapat dieliminasi apabila virus yang digunakan telah diinaktifkan. Dalam penelitian ini virus diinaktifkan dengan  $\beta$ -propiolactone, suatu bahan kimia yang telah terbukti efektif dan banyak dipakai dalam menginaktivasi virus influenza (GOLDSTEIN dan TAURASO, 1970; KAVERIN *et al.*, 2000). Penurunan aktivitas enzimatis neuraminidase akibat inaktivasi virus influenza dengan  $\beta$ -propiolactone, seperti yang hasil penelitian ini, sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa bahan kimia yang sama menyebabkan penurunan antigenisitas haemagglutinin (POLLY dan GUERIN, 1957; GOLDSTEIN dan TAURASO, 1970). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini juga menunjukkan bahwa sekalipun penurunan aktivitas neuraminidase sangat jelas, pemakaian virus yang telah diinaktifkan dengan  $\beta$ -propiolactone masih bisa

digunakan dalam uji neuraminidase thioarbiturat tetapi dengan partikel virus yang lebih banyak dibandingkan dengan kalau menggunakan virus hidup. Hal ini sangat penting terutama bagi laboratorium yang tidak memiliki fasilitas biosafety yang memadai.

## KESIMPULAN

Neuraminidase virus influenza suptipe H5N1 dapat dideteksi menggunakan uji tiobarbiturat dan fetuin sebagai substrat. Reaksi neuraminidase dan substrat yang optimum membutuhkan larutan penyangga pH 6-7 dan waktu inkubasi 60 menit. Aktivitas enzimatis tidak terlihat dipengaruhi oleh ion kalsium, berkurang akibat perlakuan  $\beta$ -propiolactone, dan hilang total akibat pemanasan. Sifat *thermolabil* enzim akan mempersulit usaha purifikasinya. Uji tiobarbiturat dapat dilakukan dengan aman menggunakan virus influenza yang sudah diinaktivasi dengan  $\beta$ -propiolactone.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN Balitvet tahun anggaran 2006. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Gita Sekarmila dan Bapak Achpas yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- BAKER, N.J. and S.S. GANDHI. 1976. Effect of Ca<sup>++</sup> on the stability of influenza virus neuraminidase. *Arch. Virol.* 52: 7-18.
- BURMEISTER, W.P., S. CUSACK and R.W. RUIGROK. 1994. Calcium is needed for the thermostability of influenza B virus neuraminidase. *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 2): 381-388.
- BURMEISTER, W.P., B. HENRISSAT, C. BOSSO, S. CUSACK and R.W. RUIGROK. 1993. Influenza B virus neuraminidase can synthesize its own inhibitor. *Structure* 1: 19-26.
- BUXTON, R.C., B. EDWARDS, R.R. JUO, J.C. VOYTA, M. TISDALE and R.C. BETHELL. 2000. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal. Biochem.* 280: 291-300.
- CAPUA, I., G. CATTOLI and S. MARANGON. 2004. DIVA—a vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)* 119: 229-233.
- CAPUA, I., C. TERREGINO, G. CATTOLI, F. MUTINELLI and J.F. RODRIGUEZ. 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian. Pathol.* 32: 47-55.

- CATTOLI, G., A. MILANI, F. BETTINI, M. SERENA BEATO, M. MANCIN, C. TERREGINO and I. CAPUA. 2006. Development and validation of an anti-N3 indirect immunofluorescent antibody test to be used as a companion diagnostic test in the framework of a "DIVA" vaccination strategy for avian influenza infections in poultry. *Avian. Pathol.* 35: 154-159.
- FRASER. 1978. Neuraminidase production by clostridia. *J. Med. Microbiol.* 11: 269-280.
- GLATHE, H., H.U. STRITTMATTER, M. KUNZE and H. SINNECKER. 1982. Effect of low pH values on the infectivity and neuraminidase activity of human and animal strains of influenza virus type A. *Acta. Biol. Med. Ger.* 41: 1075-1078.
- GOLDSTEIN, M.A. and M.T. TAURASO. 1970. Effect of formalin, beta propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon Influenza virus infectivity, chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity. *Appl. Microbiol.* 19: 290-294.
- KAMPS, B.S. and C. HOFFMANN 2006. Drug Profiles. *Influenza Report 2006*. [www. InfluenzaReport.com](http://www.InfluenzaReport.com). B.S. Kamps, C. Hoffmann and W. Preiser. Paris, Flying Publisher. pp.188-225.
- KAMPS, B.S. and G. REYES-TERAN 2006. Influenza 2006. *Influenza Report 2006*. [www. InfluenzaReport.com](http://www.InfluenzaReport.com). B. S. Kamps, C. Hoffmann and W. Preiser. Paris, Flying Publisher. pp. 17-38.
- KAVERIN, N.V., Y.A. SMIRNOV, E.A. GOVORKOVA, I.A. RUDNEVA, A.K. GITELMAN, A.S. LIPATOV, N.L. VARICH, S.S. YAMNIKOVA, N.V. MAKAROVA, R.G. WEBSTER and D.K. LVOV. 2000. Cross-protection and reassortment studies with avian H2 influenza viruses. *Arch. Virol.* 145: 1059-1066.
- KENDAL, A.P., F.M. BOZEMAN and F.A. ENNIS. 1980. Further studies of the neuraminidase content of inactivated influenza vaccines and the neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *Infect. Immun.* 29: 966-971.
- KENDAL, A.P., G.R. NOBLE and W.R. DOWDLE. 1977. Neuraminidase content of influenza vaccines and neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations. *J. Infect. Dis.* 136 Suppl.1: S415-424.
- KIYOTANI, K., N. TAKEI, M. SENOO, S. TAKAO, K. OTSUKI, M. TSUBOKURA and T. YOSHIDA. 1987. Enzymological characteristics of avian influenza A virus neuraminidase. *Microbiol. Immunol.* 31: 1131-1135.
- LEPRAT, R. and Y. MICHEL-BRIAND. 1980. Extracellular neuraminidase production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis. *Ann. Microbiol. (Paris)* 131B: 209-222.
- OIE. 2004. Manual of Diagnostic Test and Vaccine for Terrestrial Animals. p 258-269.
- PETRIE, A. and P. WATSON. 2001. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. London, Blackwell Science Ltd.
- POLLY, J.R. and M.M. GUERIN. 1957. The use of beta-propiolactone for the preparation of virus vaccine. *Can. J. Microbiol.* 3: 871-877.
- POTIER, M., L. MAMELI, M. BELISLE, L. DALLAIRE and S.B. MELANCON. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal. Biochem.* 94: 287-296.
- REYES-TERAN, G. and R. GOTTSCHALK. 2006. Pandemic Preparedness. *Influenza Report 2006*. B. S. Kamps, C. Hoffmann and W. Preiser. Paris, Flying Publisher: 110-123.
- SHIBATA, S., F. YAMAMOTO-GOSHIMA, K. MAENO, T. HANAICHI, Y. FUJITA, K. NAKAJIMA, M. IMAI, T. KOMATSU and S. SUGIURA. 1993. Characterization of a temperature-sensitive influenza B virus mutant defective in neuraminidase. *J. Virol.* 67: 3264-3273.
- SMITH, B.J., T. HUYTON, R.P. JOOSTEN, J.L. MCKIMM-BRESCHKIN, J.G. ZHANG, C.S. LUO, M.Z. LOU, N.E. LABROU and T.P. GARRETT. 2006. Structure of a calcium-deficient form of influenza virus neuraminidase: implications for substrate binding. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62: 947-952.
- SUTTAJIT, M. and R.J. WINZLER. 1971. Effect of modification of N-acetylneuraminic acid on the binding of glycoprotein to Influenza virus and on susceptibility to cleavage by neuraminidase. *J. Biol. Chem.* 246: 3398-3404.
- WARREN, L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 197: 1971-1975.
- WERNER, O. and T.C. HARDER 2006. Avian Influenza. *Influenza Report 2006*. [www. InfluenzaReport.com](http://www.InfluenzaReport.com). B. S. Kamps, C. Hoffmann and W. Preiser. Paris, Flying Publisher. pp. 50:73.