

## Preparasi Immunoglobulin G Kelinci sebagai Antigen Penginduksi Antibodi Spesifik Terhadap Virus *Avian Influenza* H5N1 Strain Legok

(THE PREPARATION OF RABBIT IMMUNOGLOBULIN G AS AN ANTIGEN  
IN THE INDUCTION OF A SPECIFIC ANTIBODY AGAINST LEGOK STRAIN OF AVIAN  
INFLUENZA VIRUS H5N1)

**Ketut Karuni Nyanakumari Natih<sup>1,2</sup>, Retno Damayanti Soejoedono<sup>3</sup>,  
I Wayan Teguh Wibawan<sup>3</sup>, Fachriyan Hasmi Pasaribu<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan  
Jl. Raya Pembangunan, Gunungsindur, Bogor 16340  
Telpon/Fax: 021 7560489/021 7560466  
E-mail: [bbpmsoh@plasa.com](mailto:bbpmsoh@plasa.com), [ketutkaruni@yahoo.com](mailto:ketutkaruni@yahoo.com)

<sup>2</sup>Mahasiswa Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas  
Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Agatis, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680

### ABSTRACT

The aim of this research was to prepare rabbit Immunoglobulin G as anti-idiotypic antibody ( $Ab_2$ ) of Avian Influenza Virus (AIV) H5N1. A polyclonal antibody was collected from guinea pigs immunized with inactivated AI vaccine H5N1 of Legok strain. Antibody of H5N1 AI in serum was detected by Agar gel precipitation test (AGPT) and an Inhibition Hemmagglutination test (IHT). The highest titre of antibody was obtained one week after the third immunization. Serum of guinea pigs containing IgG was purified using the Montage Antibody purification kit & spin column with Prosep A media (Millipore). The AI H5N1 IgG concentration was 8 mg/ml. AI H5N1 IgG, was then digested with pepsin to obtain  $F(ab)_2$  fraction and was called  $Ab_1$ . The concentration of IgG and  $F(ab)_2$  and purity of IgG were determined by UV spectrophotometer which showed  $Ab_1$  concentration 1 mg/ml. Molecular weight was estimated by sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).  $Ab_2$  was produced by immunization of rabbit with  $Ab_1$ . The first immunization was carried out by subcutaneous injection with 500  $\mu$ g of  $Ab_1$  emulsified in Complete Freund Adjuvant. The immunization was repeated with the same dose of  $Ab_1$  emulsified in Incomplete Freund Adjuvan at 1 week intervals. One week after the second immunization, rabbit's serum was harvested and IgG was purified using the Montage Antibody purification kit & spin column with Prosep A media (Millipore). The rabbit IgG, called  $Ab_2$ , was an anti-idiotypic antibody against AIV-H5N1. In AGPT, a precipitation line appeared between  $Ab_1$  and  $Ab_2$ . A partial reaction appeared between  $Ab_2$  and the AI H5N1 antigen was also detected. The results indicated that  $Ab_2$  is a possible candidate of immunogen for protection against an AI virus H5N1 infection.

Key word : Avian Influenza, Immunoglobulin G (IgG), anti-idiotypic antibody

### PENDAHULUAN

Wabah *Avian Influenza* (AI) H5N1 mulai terjadi pada tahun 1990-an di Hongkong. AI merupakan penyakit yang disebabkan virus influenza tipe A yang termasuk ke dalam famili *Orthomyxoviridae* (ICTV 2006). Virus ini bersifat sangat patogen dan bersifat zoonosis karena dapat menginfeksi unggas dan manusia (Swayne 2004). Virus influenza berbentuk

pleiomorfik yaitu filamen atau sferoid (bola) dengan diameter 80-120 nm (Harris *et al.* 2006).

Kasus AI di Indonesia terjadi pada bulan Agustus 2003. Menurut Songserm *et al.*, 2006, virus AI H5N1 sudah terjadi secara endemik pada perunggasan Indonesia. AI masih menjadi penyakit zoonosis yang penting karena wabah AI di Indonesia sudah menelan 115 korban jiwa manusia sampai dengan awal tahun 2009. Keadaan ini mengkhawatirkan akan terjadinya

pandemi AI. Pemerintah Indonesia melakukan upaya penanganan AI berupa 9 (sembilan) langkah strategis, salah satunya adalah vaksinasi (Ditjennak 2006). Vaksinasi diyakini sebagai salah satu cara untuk mengurangi kasus klinik penyakit AI dan secara langsung mengurangi kontaminasi lingkungan oleh virus AI. Sejak tahun 2004 Indonesia sudah menggunakan 400 juta dosis vaksin AI (Bouma *et al.*, 2009).

Vaksin AI yang digunakan adalah vaksin AI yang telah diinaktifkan (OIE 2004). Pembuatan vaksin inaktif AI umumnya dilakukan dengan menyuntikkan virus pada telur embrio tertunas (TET) atau dibiakkan pada kultur jaringan *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK). Virus AI ditumbuhkan pada embrio telur ayam yang tidak mengandung virus atau patogen apapun yang dikenal dengan *Specific Pathogen Free* (SPF). Virus AI yang telah ditumbuhkan selanjutnya dimatikan untuk dijadikan vaksin. Kendalanya adalah apabila vaksin dibuat dari virus yang virulen, maka ada kemungkinan terdapat vaksin yang dapat menimbulkan kasus penyakit dan juga membahayakan pekerja laboratorium yang memproduksinya.

Saat ini sedang dikembangkan suatu vaksin jenis baru yang dikenal dengan vaksin anti-idiotipe, yaitu vaksin yang dibuat atas dasar adanya daerah pengenalan antigen oleh antibodi. Pengenalan antigen dengan antibodi dapat menghasilkan imunitas spesifik untuk mencapai tujuan imunisasi. Jika hewan disuntik dengan suatu antigen, maka respon imun akan terjadi pada tubuh hewan tersebut. Respon humoral yang terjadi menghasilkan antibodi (Ab) yang mengekspresikan beberapa kumpulan idiotipe di daerah *variable* yang akan dikenali oleh epitop dari antigen yang disuntikkan. Apabila Ab<sub>1</sub> disuntikkan kepada hewan lain, maka populasi antibodi yang mengenalinya disebut antibodi anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>) (Vizcaino 2004).

Penggunaan vaksin Ab<sub>2</sub> selain sebagai vaksin alternatif untuk penyakit-penyakit yang disebabkan oleh agen infeksius yang ganas, berbahaya dan sulit dibiakkan juga tidak mengandung risiko adanya agen infeksius yang dapat menimbulkan penyakit pada hewan yang divaksinasi. Antibodi Ab<sub>2</sub> dapat diproduksi dalam jumlah banyak dengan biaya produksi yang lebih murah. Selain itu Ab<sub>2</sub> yang hanya bereaksi terhadap epitop tunggal agen infeksius

mampu memberikan perlindungan protektif terhadap antigen yang memiliki banyak epitop, antibodi anti-idiotipe juga mampu meniru sifat antigenik sehingga dapat digunakan sebagai imunogen yang dapat menimbulkan respon spesifik terhadap agen infeksius (Lin dan Zhou, 1995).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyiapkan imunoglobulin G kelinci sebagai Ab<sub>2</sub> *Avian Influenza* H5N1. Abu-Shakra *et al.*, 1997 mengatakan bahwa molekul imunoglobulin yang merupakan protein bersifat antigenik sehingga hewan yang diimunisasi dengan imunoglobulin akan menghasilkan antibodi anti imunoglobulin yang dapat mencegah terjadinya penyakit.

## METODE PENELITIAN

### Reidentifikasi Vaksin AI H5N1 Inaktif Strain Legok

Vaksin AI H5N1 inaktif strain Legok diekstraksi RNA-nya dan diidentifikasi sub tipe virus AI-nya berdasarkan gen hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan metode TRIZOL<sup>R</sup> LS Reagent (Invitrogen) sebagai berikut : sebanyak 250 ml virus AI dan 750 ml Trizol dimasukkan ke dalam tabung *microtube* 1.8 ml, kemudian dihomogenkan memakai *vortex mixer*. Setelah diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar 25–30°C, ditambahkan 500 ml chloroform. Tabung *microtube* tersebut dikocok dengan tangan selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 g pada 2–8° C selama 15 menit. Sebanyak 500 ml fase cair pada supernatan (putih bening) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru. Setelah itu ditambahkan 500 ml isoprophil alkohol dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Larutan selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 12.000 g pada 2–8°C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Hasilnya adalah endapan RNA. Ke dalam endapan tersebut ditambahkan 1000 ml ethanol 75% dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 g selama 5 menit. Endapan RNA dikeringkan selama 10-15 menit pada suhu ruang dan selanjutnya dilarutkan dengan 10 ml air suling bebas Rnase atau DEPC. Tahap akhir adalah larutan RNA diinkubasikan dalam penangas air 60°C selama 10 menit. Larutan RNA disimpan

pada  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dilakukan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

*Reverse transcription* (RT) adalah pembuatan cDNA yang bersifat komplementer dengan RNA virus, menggunakan enzim *reverse transcriptase*. *RT-PCR* dilakukan dengan metode Super Script™ III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen H5 dan N1 menurut Lee *et al.*, 2001. Reaksi PCR (PCR mix) dibuat sebanyak 50  $\mu\text{l}$  dengan komposisi 25  $\mu\text{l}$  2x reaction PCR mix, 2  $\mu\text{l}$  Platinum Taq, 5  $\mu\text{l}$  RNA template, 1  $\mu\text{l}$  Primer forward (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Primer reverse (10  $\mu\text{M}$ ) dan 16  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (ultrapure H<sub>2</sub>O). Campuran tersebut divortex Mixer, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah diprogram. Program RT-PCR adalah cDNA synthesis  $60^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, predenaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  40 detik, penempelan  $55^{\circ}\text{C}$  selama 40 detik, ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit dan post ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit. Pita DNA spesifik hasil PCR diidentifikasi dengan elektroforesis pada gel agarose 2% (Invitrogen) dengan 3  $\mu\text{l}$  *ethidium bromide*.

#### **Produksi Antibodi Poliklonal AI H5N1**

Produksi antibodi AI dilakukan dengan menyuntik satu dosis vaksin AI H5N1 inaktif strain Legok (0,5 ml) secara subkutan pada 10 ekor quinea pigs. Penyuntikan diulang sebanyak dua kali dengan interval 3 minggu. Keberadaan antibodi dideteksi dengan uji hambatan hemaglutinasi (*Hemagglutination Inhibition Test/HIT*) (WHO 2002, OIE 2005) dan uji agar gel presipitasi (*Agar Gel Precipitation Test /AGPT*). Jika titer antibodi tinggi dalam darah, maka serum dikoleksi dan disimpan hingga penelitian selanjutnya

#### **Reidentifikasi Serum Anti AI H5N1 (Ab<sub>1</sub>)**

Reidentifikasi serum marmut dilakukan dengan HIT dan AGPT. Sebelum dilakukan HIT, serum marmut diinaktivasi terlebih dahulu dalam penangas air  $56^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dan diabsorpsi dengan sel darah merah ayam pada temperatur ruang selama 30 menit, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1000 g selama 5 menit dan diambil supernatannya. Selanjutnya dilakukan HIT dengan prosedur berikut: semua lubang mikroplate dimasukkan

pengencer PBS dan pada lubang pertama dimasukkan 25  $\mu\text{l}$  serum. Pengenceran secara seri kelipatan dua sampai lubang 11. Kemudian ditambahkan sebanyak 25  $\mu\text{l}$  antigen AI H5N1 4HAU. Campuran tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian ditambahkan sel darah merah ayam 1% sebanyak 25  $\mu\text{l}$  pada semua lubang dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar selama 30 menit. Terbentuknya aglutinasi menunjukkan bahwa serum tersebut tidak mengandung antibodi terhadap virus AI, sedangkan apabila tidak terjadi aglutinasi tetapi yang terjadi adalah pengendapan sel darah merah ayam, maka serum tersebut mengandung antibodi terhadap virus AI. Banyaknya antibodi dalam serum dinyatakan dalam titer yang dihitung sampai pengenceran keberapa terjadi pengendapan sel darah merah ayam? Satuannya adalah HI unit.

AGPT agar presipitasi adalah sebagai berikut: agar gel dibuat dengan melarutkan 0.4 g agarose dan 1.2 g *Poly Ethylene Glycol* (PEG) 6000, 0.1% Na azide dalam 25 ml PBS pH 7,4 dan 25 ml akuades pH 7,4. Larutan ini dipanaskan dalam *mikrowave* sampai larut dan warna larutan menjadi bening. Larutan sebanyak 3,75 ml dituangkan pada gelas objek dan ditunggu sampai mengeras, kemudian dibuat sumur-sumur dengan *puncher*. Antigen sebanyak 20  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam sumur tengah dan antibodi sebanyak 20  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam sumur di sekelilingnya. Pembacaan AGPT dilakukan setelah 24-48 jam, hasil positif ditunjukkan dengan adanya garis putih yang terbentuk di antara lubang yang berisi antigen dan antibodi.

#### **Pemurnian Imunoglobulin G Anti AI H5N1 (Ab<sub>1</sub>) dan Antibodi Anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>)**

Pemurnian imunoglobulin G (IgG) AI H5N1 dari serum quinea pigs (Ab<sub>1</sub>) dan produksi antibodi anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>) dilakukan dengan menggunakan *montage antibody purification kit & spin column with Prosep A media* (Millipore). Prosep A dilepaskan dari tutup atas dan bawahnya kemudian dimasukkan ke dalam spin kolom. Spin kolom dicuci dengan 10 ml *binding buffer* disentrifus dengan kecepatan 500 g selama 15 menit. Serum difilter dengan menggunakan *steriflip GP filter* 0,22  $\mu\text{m}$ . Sampel serum dilarutkan dengan *binding buffer* menggunakan perbandingan 1:1 v/v, lalu dimasukkan ke dalam kolom spin dan

disentrifus pada kecepatan 150 g selama 20 menit. Kolom spin dicuci kembali dengan 10 ml *binding buffer* dan disentrifus dengan kecepatan 500 g selama 5 menit, pencucian dilakukan dua kali. Imunoglobulin G *dilusi* dengan 10 ml buffer *elusi* langsung ke dalam tabung sentrifus berisi 1,3 ml buffer netral dengan kecepatan 500 g selama 5 menit. Larutan yang berada di bawah yang ditampung, merupakan IgG. Imunoglobulin G di *desalting* dengan menggunakan *Amican Ultra 15* dan disentrifus dengan kecepatan 4500 g selama 30 menit. Larutan yang ada di atas ditampung dan merupakan IgG.

Reidentifikasi IgG AI H5N1 dilakukan dengan uji AGPT dan untuk mengetahui berat molekul IgG dilakukan SDS-PAGE dengan menggunakan sistem diskontinu, terdiri atas gel pemisah konsentrasi 12 % dan gel pengumpul 14 %. Gel diwarnai dengan *commassie blue* dan estimasi berat molekul protein berdasarkan perbandingan dengan marker umum berat molekul. Konsentrasi IgG dihitung dengan menggunakan spektrofotometer UV.

**Pemotongan Imunoglobulin G AI H5N1 dan Purifikasi Fragmen F(ab)<sub>2</sub>**

Pemotongan imunoglobulin G (Ig G) dari serum marmut ditujukan untuk memperoleh fragmen F(ab)<sub>2</sub> dari imunoglobulin. Fragmen F(ab)<sub>2</sub>, selanjutnya disebut Ab<sub>1</sub>, akan digunakan untuk merangsang terbentuknya antibodi spesifik terhadap epitop Ab<sub>1</sub> pada kelinci. Antibodi yang akan terbentuk oleh Ab<sub>1</sub> ini merupakan antibodi anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>). Pemotongan dilakukan dengan menggunakan enzim pepsin, sehingga akan diperoleh 1 fragmen F(ab)<sub>2</sub> divalen yang mengandung 2 Fab dan 1 fragmen Fc.

Imunoglobulin G dibuat menjadi 5 mg/ml dalam Na sitrat 100 mM pH 3,5. Pemotongan IgG dilakukan dengan menggunakan 5 µg pepsin untuk 1 mg IgG, kemudian diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam reaksi dihentikan dengan Tris buffer 3 M pH 8,8 sebanyak 10%, lalu di sentrifus dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit. Larutan ini kemudian *didesalting* dengan *HiTrap Desalting*. Larutan hasil *desalting* merupakan F(ab)<sub>2</sub>. Reidentifikasi dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Fragmen F(ab)<sub>2</sub> memiliki berat molekul 110 Kda dan fragmen F(ab) 50 Kda. Konsentrasi dihitung dengan menggunakan spektrofotometer Ultra Violet.

**Produksi Imunoglobulin G Kelinci Anti-Idiotipe (Ab<sub>2</sub>)**

Imunoglobulin G Ab<sub>2</sub> disiapkan dengan cara menyuntik kelinci dengan Ab<sub>1</sub> (F(ab)<sub>2</sub>). Kelinci diimunisasi dengan 500 µg Ab<sub>1</sub> H5N1 dalam CFA secara intramuskular. Imunisasi ulangan dilakukan satu minggu berikutnya dengan menyuntikkan 500 µg Ab<sub>1</sub> dalam IFA secara intramuskular. Satu minggu kemudian serum dikoleksi. Identifikasi keberadaan Ab<sub>2</sub> H5N1 strain Legok dengan AGPT. Berat molekul ditentukan dengan metode SDS-PAGE dan konsentrasinya dihitung dengan spektrofotometer ultra violet.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Vaksin yang digunakan dalam pembuatan antibodi poliklonal adalah vaksin AI inaktif. Menurut Rantam (2005) vaksin inaktif yaitu vaksin yang dihasilkan melalui pengrusakan virulensinya tapi imunogenitasnya masih ada. Vaksin ini sangat aman karena tidak infeksius, tapi diperlukan dalam jumlah banyak untuk dapat merangsang respon imun. Reidentifikasi vaksin AI H5N1 inaktif strain Legok dengan uji RT-PCR menunjukkan hasil positif terhadap virus AI subtipe H5N1.

Keberadaan antibodi poliklonal AI H5N1 dideteksi dengan uji hambatan hemaglutinasi. Hasil titer antibodi dapat dilihat pada Tabel 1. Titer antibodi seminggu setelah imunisasi ke tiga tinggi (2<sup>10.4</sup>). Li *et al.*, 2005 melaporkan bahwa hasil titer antibodi terhadap virus AI

Tabel 1. Hasil Uji Hambatan Hemaglutinasi

| Marmut | Titer Antibodi pada Uji HI (log 2) |     |                   |
|--------|------------------------------------|-----|-------------------|
|        | I                                  | II  | III               |
| 1      | 6                                  | 7   | E <sup>7</sup> 11 |
| 2      | 7                                  | 7   | 9                 |
| 3      | 6                                  | 6   | 10                |
| 4      | 5                                  | 6   | E <sup>7</sup> 11 |
| 5      | 8                                  | 8   | 10                |
| 6      | 7                                  | 8   | 9                 |
| 7      | 6                                  | 7   | E <sup>7</sup> 11 |
| 8      | 7                                  | 7   | E <sup>7</sup> 11 |
| 9      | 7                                  | 8   | E <sup>7</sup> 11 |
| 10     | 7                                  | 8   | E <sup>7</sup> 11 |
| Rataan | 6.6                                | 7.2 | 10.4              |

sebanyak  $2^{10}$  adalah tinggi dan dapat dilakukan panen serum.

Reidentifikasi serum anti AI H5N1 ( $Ab_1$ ) dengan uji imunodifusi AGPT menunjukkan reaksi positif dengan antigen AI H5N1 dengan terbentuknya garis presipitasi (Gambar 1). Hal ini berarti telah terbentuk antibodi yang homolog terhadap virus AI H5N1 yang diimunisasikan.

Menurut Decker (2006), antibodi serum adalah antibodi poliklonal karena antibodi ini dihasilkan oleh turunan dari beberapa sel B yang mengenali epitop berbeda pada antigen yang sama. Antibodi poliklonal dihasilkan dengan cara menyuntikkan antigen ke dalam tubuh hewan lalu memurnikan antibodi dari serum darah. Antibodi ini umumnya bereaksi dengan banyak epitop.

Pengulangan vaksinasi terhadap marmut pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali, hal ini dilakukan untuk membentuk kondisi hiperimun pada marmut sehingga dihasilkan antibodi dengan titer tinggi. Secara normal vaksin inaktif diperlukan dua atau tiga kali vaksinasi. Vaksinasi pertama adalah untuk memperkenalkan dan kedua sebagai *booster* atau ulangan sangat diperlukan, supaya imunitasnya cukup (Rantam 2005). Titer antibodi yang tertinggi dicapai satu minggu setelah vaksinasi ke tiga. Pembentukan antibodi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu: imunogenesitas, kualitas, bentuk kelarutan stimulan, spesies hewan, rute imunisasi, dan sensitivitas *assay* (Bellanti 1993).

Hemaglutinasi adalah fenomena aglutinasi sel darah merah oleh virus tertentu antara lain oleh Influenza, sebagian besar virus Myxo beberapa virus Pox (Variola, Vaccinia dan Ectromelia), semua virus Reo, sebagian besar virus Toga, beberapa virus Entero dan lainnya. Bagian virus yang mengaglutinasi sel darah merah disebut hemaglutinin. Virus akan menempel pada permukaan sel darah merah melalui hemaglutinin tanpa menembus masuk ke dalam sel tersebut. Tempat virus menempel pada permukaan sel darah merah merupakan reseptor yang terdiri dari karbohidrat (mukopolisakarida) bersifat seperti lem dan sifat kimiawinya mirip musin pada saluran pernafasan. Hemaglutinasi terjadi karena banyak virus melekat pada sel darah merah dan bila dua sel darah merah yang mengandung partikel virus pada permukaannya bersentuhan mereka saling menempel melalui jembatan protoplasma yang terbentuk antara kedua sel

tersebut. Lama kelamaan terbentuk massa yang cukup besar terdiri dari sel darah merah yang saling berdekatan (aglutinasi) dan karena massa tersebut cukup berat secara perlahan-lahan akan mengendap ke dasar tabung atau *microplate*.

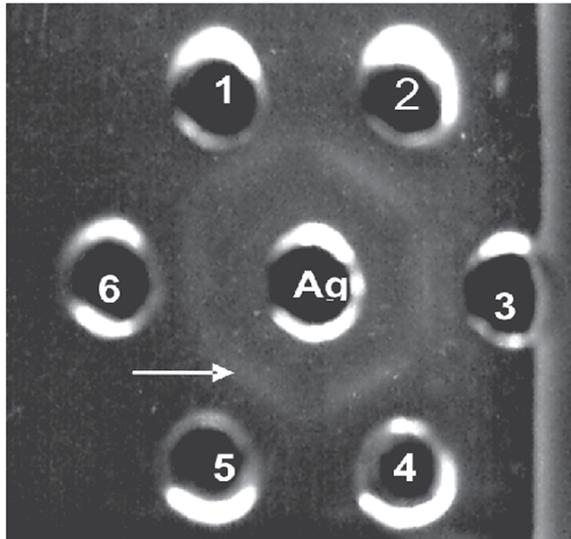
Hemaglutinasi oleh virus dapat dihambat oleh antibodi yang spesifik terhadap virus tersebut, sehingga uji hambatan hemaglutinasi digunakan untuk mengetahui dan mengukur adanya antibodi dalam serum. Batas akhir aktivitas penghambatan adalah pengenceran tertinggi dari serum yang masih dapat menghambat secara sempurna penggumpalan sel darah merah.

AGPT dilakukan untuk melihat reaksi pengendapan antigen oleh antibodi spesifik. Pengendapan antigen oleh antibodi ini diperlihatkan oleh adanya garis presipitasi di media agar gel. Jika sediaan antibodi tidak homolog dengan antigen maka tidak akan terbentuk garis presipitasi.

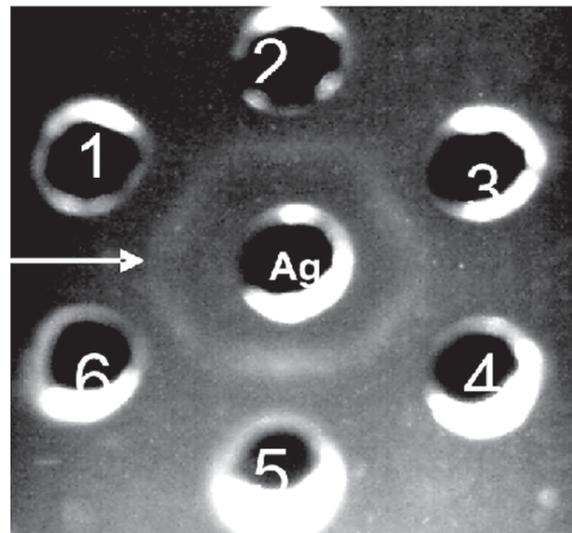
Purifikasi imunoglobulin gG (Ig) dilakukan dengan menggunakan *montage antibody purification kit with Prosep A media*. Purifikasi dilakukan untuk mendapatkan IgG murni sehingga memudahkan proses pemotongan  $F(ab)_2$  dari Fc. Reidentifikasi IgG H5N1 dengan uji imunodifusi AGPT menunjukkan reaksi positif dengan antigen H5N1, ditunjukkan dengan terbentuknya garis presipitasi (Gambar 2). Hal ini berarti bahwa terjadi reaksi serologi yang homolog antara IgG H5N1 dengan antigen H5N1 karena IgG H5N1 merupakan antibodi spesifik terhadap virus AI H5N1. Konsentrasi IgG H5N1 yang diperoleh sebesar 8 mg/ml.

Pemotongan imunoglobulin G dengan enzim pepsin menghasilkan fragmen Fc dan  $F(ab)_2$ . Fragmen  $F(ab)_2$  adalah antibodi 1 ( $Ab_1$ ), dan digunakan mengimunisasi kelinci untuk produksi antibodi anti-idiotipe ( $Ab_2$ ). Fragmen  $F(ab)_2$  dan Fc dipisahkan dengan proses *desalting* menggunakan *HiTrap Desalting*. Hasil pemurnian ini kemudian dianalisis profil pita proteinnya menggunakan SDS-PAGE (Gambar 4).

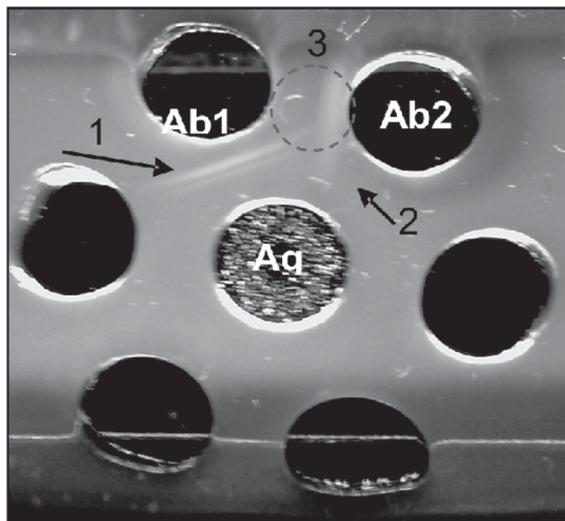
Menurut Rantam (2003), SDS-PAGE adalah protein dielektrophoresis dalam detergen ionik yaitu SDS. Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida secara komplis, dengan demikian protein SDS-komplek bermigrasi melalui poliakrilamid, tergantung berat molekulnya. Ada dua sistem pada SDS yaitu kontinyu dan diskontinyu. Pada sistem kontinyu campuran protein dilapiskan pada



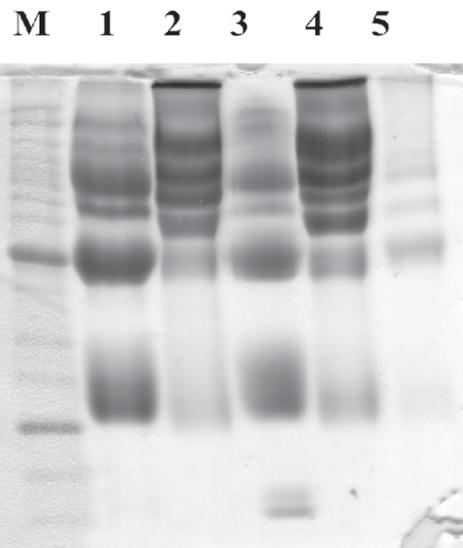
Gambar 1. Reaksi Presipitasi Serum Marmut Spesifik Terhadap Antigen Virus *Avian Influenza* H5N1 Pada Uji Agar Gel Presipitasi  
 Ag = Antigen AI H5N1; 1 = Serum marmut 1; 2 = Serum marmut 2; 3 = Serum marmut 3; 4 = Serum marmut 4; 5= Serum marmut 5; 6 = Serum marmut 6; (→) = Garis presipitasi



Gambar 2. Reaksi Presipitasi Immunoglobulin G Marmut Spesifik Terhadap Antigen Virus *Avian Influenza* H5N1 Pada Uji Agar Gel Presipitasi Hasil Uji AGPT IgG AI H5N1  
 Ag = Antigen AI H5N1; 1,2,3,4,5 = IgG AI H5N1; (→) = Garis presipitasi



Gambar 3. Reaksi Identitas Parsial Immunoglobulin G Kelinci Spesifik Terhadap Ab1 dan Antigen Virus *Avian Influenza* H5N1  
 Ag = Antigen H5N1; Ab1 = antibodi AI H5N1; Ab2 = Antibodi anti-idiotipe; (→) = garis presipitasi



Gambar 4. Profil pita protein Immunoglobulin G yang telah dipurifikasi,  
 M = Marker umum (Invitrogen), 1= IgG Ab1, 2= IgG kelinci kontrol, 3= F(ab)<sub>2</sub>, 4= IgG Ab2, 5= IgG rabbit standar (Promega),

bagian atas (*bands* pada bagian atas dari *separating gel* ), sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Pada penelitian ini menggunakan sistem diskontinyu, protein bermigrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan

*separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau *band* yang tipis. Lebih lanjut Rantam (2003) menyatakan bahwa *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) adalah merupakan metode standar pengujian terhadap berat molekul protein,

struktur subunit dan kemurnian protein. Poliakrilamid adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul antara 500-250.000 Dalton. Pori-pori pada matrik dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrylamid* dengan *bis acrylamide*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total presentasi *acrylamide* atau peningkatan derajat presentasi konsentrasi campuran dengan *bisacrylamide*. Dengan pembuatan atau pemilihan total konsentrasi yang tepat akan menentukan pula ukuran yang tepat terhadap ukuran protein yang diinginkan. Jadi semakin tinggi total presentasi akan menghalangi pergerakan protein ke dalam gel, begitu juga bila terlalu rendah total presentasi akan mengakibatkan pergerakan protein menjadi terlalu cepat melalui gel yang mengakibatkan didapatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang diinginkan. Awal terjadinya polimerasi biasanya disempurnakan oleh ammonium persulfat dan dikatalisis oleh N,N,N,N-Tetramethylethyle- nediamine (TEMED).

Pemeriksaan konsentrasi fragmen F(Ab)<sub>2</sub> menggunakan spektrofotometer UV dan diperoleh hasil sebesar 1 mg/ml. Jumlah ini cukup untuk digunakan sebagai antigen, guna menginduksi terbentuknya anti-idiotipe pada kelinci. Dosis antigen berkisar antara 10-100 µg (Leenars *et al.* 1997, Paryati 2006, Poetri dkk 2008).

Penggunaan adjuvan di dalam penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan respon imun tubuh sehingga antibodi yang terbentuk cukup banyak. Adjuvan membantu imunogen yang kurang imunogenik dalam menggertak sistem imun tubuh. Kuby (1997) menyatakan bahwa adjuvan adalah substansi yang jika dicampurkan dengan antigen kemudian diinjeksikan bersama-sama akan bekerja memperbesar imunogenesitas antigen. Adjuvan digunakan untuk meningkatkan respon imun apabila antigen memiliki imunogenesitas rendah atau apabila jumlah antigen sedikit. Adjuvan juga dapat berfungsi sebagai depot antigen karena adjuvan sebagai pembawa antigen menuju lokasi sistem imun dan melepaskannya sedikit demi sedikit, sehingga masa pembentukan antibodi berlangsung lebih lama (Leenaars *et al.* 1994).

Menurut Bellanti (1993) dan Rantam (2005) penggunaan adjuvan untuk memacu respons imun dengan afinitas yang tinggi dengan cara memperluas permukaan antigen dan memperlambat pelepasan antigen dalam tubuh, sehingga pembentukan antibodi lebih optimal. Adjuvan memperluas permukaan antigen dan memperlama penyimpanan antigen di dalam tubuh sehingga memberi kesempatan pada sistem limfoid untuk menuju antigen.

Satu minggu setelah dua kali vaksinasi dengan Ab<sub>1</sub> dalam adjuvan, serum kelinci diperiksa keberadaan antibodi terhadap Ab<sub>1</sub> dengan AGPT. Hasil AGPT IgG kelinci menunjukkan reaksi positif yang ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi antara Ab<sub>1</sub> dan Ab<sub>2</sub>, artinya telah terbentuk antibodi terhadap Ab<sub>1</sub>. Antibodi ini disebut sebagai antibodi anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>) Avian Influenza H5N1. Antibodi Ab<sub>2</sub> ini dapat digunakan sebagai antigen pengganti karena memiliki karakteristik yang sama dengan antigen aslinya terlihat dengan terbentuknya reaksi identitas parsial antara antibodi anti-idiotipe AI H5N1 dengan antigen H5N1. Reaksi ini menunjukkan virus AI H5N1 mempunyai determinan antigen yang sama dengan antibodi anti-idiotipe AI H5N1. Menurut Jerne 1985, daerah hipervariabel dari imunoglobulin dapat bersifat sebagai antigen dan antibodi yang terbentuk dari antigen tersebut merupakan antibodi anti-idiotipe yang dapat berikatan secara langsung dengan paratope atau daerah pengikatan antigen dari Ab<sub>1</sub>. Dari hasil AGPT ini membuktikan bahwa Ab<sub>2</sub> mempunyai kemampuan untuk meniru struktur antigen aslinya sehingga Ab<sub>2</sub> dapat digunakan sebagai imunogen dalam pencegahan infeksi virus AI H5N1.

## SIMPULAN

Fragmen F(Ab)<sub>2</sub> IgG H5N1 bersifat imunogenik karena dapat menginduksi terbentuknya antibodi anti-idiotipe (Ab<sub>2</sub>) yang mampu berikatan secara homolog dengan antibodi virus AI H5N1. Imunoglobulin G kelinci dapat digunakan sebagai antigen penginduksi antibodi spesifik terhadap virus *Avian Influenza* H5N1 strain Legok sehingga dapat dijadikan sebagai antigen pengganti virus *Avian Influenza* H5N1.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada seluruh staf Laboratorium Imunologi dan Laboratorium Terpadu Departemen IPHK FKH IPB serta Kepala Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan dan staf atas bantuan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y. 1997. Introduction – Idiotypes and Anti-idiotypes. Elsevier Science B.V.
- Bellanti JA. 1993. Imunologi III. Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bouma A, Claassen I, Natih K, Klinkenberg D, Donnelly CA, Koch G, Boven M. 2009. Estimation of Transmission Parameters of H5N1 Avian Influenza Virus in Chickens. *Plos Pathogens*. 5 (1) : e1000281.
- Decker JM. 2006. Antibody. <http://microvet.arizona.edu>.
- Ditjenak. Direktorat Jendral Peternakan. 2006. Prosedur Operasional Standar Pengendalian Penyakit Avian Influenza di Indonesia. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI. Jakarta.
- Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, Steven A. 2006. Influenza Virus Pleiomorphy Characterized by Cryoelectron Tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 : 19123-19127.
- [OIE]. Office International des Epizooties. 2004. OIE Manual of Standar for Diagnostic Test and Vaccines 4<sup>th</sup> Edition. Paris, France.
- [OIE]. Office International des Epizooties. 2005. Avian Influenza. Chapter 2.7.12. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris
- Jerne NK. 1985. The Generative Grammar of The Immune System. *Science*. 229: 1057 - 1059.
- Kuby J. 1997. *Imunology* 3. <sup>rd</sup>. New York. Freeman and Company.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. 2001. Identification and Subtyping of Avian Influenza Viruses by Reverse Transcription-PCR. *J. Virol. Method*. 97 : 13-27.
- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Angulo AF, Koedam MA, Claassen E. 1994. Evaluation of Several Adjuvant as Alternatives to The Use of Freund's Adjuvant in Rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 40:225-241.
- Leenaars PPAM, Claassen E, Boersma WJA. 1997. Antigen and Antigen Presentation. In: Immunology Methods Manual, I. Lefkovits (Ed). Academic Press Ltd., London, pp. 989-1013.
- Li B, Peng J, Niu Z, Yin X, Liu F. 2005. Preparation of Anti-idiotypic Antibody Against Avian Influenza Virus Subtype H9. *Cellular & Molecular Immunology*. 2 (2) : 155-157.
- Lin M, Zhou EM. 1995. Internal Image Rabbit Anti-Idiotypic Antibody Detects Sheep Antibodies to the Bluetongue Virus Core Protein VP7. *Immunotechnol*. 1:151-155.
- Paryati SPY, Wibawan IWT, Soejoedono RD, Pasaribu FH. 2006. Immunoglobulin ayam Sebagai Antibodi Anti-idiotipe terhadap Rabies. *J. Vet*. 7 (3): 92-103.
- Poetri ON, Soejoedono RD, Paryati SPY. 2008. Produksi Antibodi Anti-Idiotipe Sebagai Alternatif Pengganti Virus Avian Influenza. *Media Kedokteran Hewan*. 24 : 74-79.
- Rantam FA. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Swayne DE. 2004. Avian Influenza, Vaccine & Control. *Poultry Sci*. 83 : 79-81.
- Vizcaino SMJ. 2004. How Many Types are Known? Course of Introduction to the Swine Immunologi. <http://www.sanidadanimal.info/inmum/elautor.htm>
- [WHO] World Health Organization. 2002. WHO Manual on Animal Influenza. Diagnosis and Surveillance.