

PEMBUATAN ANTIBODI ANTI-IDIOTIPE SEBAGAI DASAR UNTUK PEMBUATAN VAKSIN TERHADAP STREPTOKOKOSIS¹

THE PREPARATION OF ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY AS VACCINE FOR STREPTOCOCCOSIS PREVENTION

I Nyoman Suartha¹, Bambang Ponco Priosoeryanto², Iwan Harjo Utama¹, I Wayan Teguh Wibawan²

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Denpasar, Jl. PB Sudirman Denpasar, INDONESIA

² Laboratorium Patologi Veteriner, Bagian Parasitologi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor, INDONESIA

ABSTRAK

Media Veteriner. 2000. 7(3):1-4.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antibodi anti-idiotipe, yang akan digunakan sebagai antigen buatan untuk merangsang pembentukan antibodi, dengan menggunakan isolat bakteri berkode SGC 560 sebagai imunogen awal. Isolat bakteri SGC 560 diidentifikasi sebagai isolat *S. equi* subsp. *zoepidemicus* berkapsul. Inokulasi antibodi idiotipe (Ab1) mampu menggerakkan pembentukan antibodi anti-idiotipe (Ab2) terhadap SGC pada kelinci. Keberadaan dari Ab2 dapat dideteksi dengan baik menggunakan uji koaglutinasi dan uji dot-blot. Antibodi 2 memiliki sifat identik dan mempunyai kemampuan untuk meniru struktur antigen utuh (*internal image*) bakteri SGC 560. Karakterisasi antigen SGC 560 dan Ab2 dengan SDS-PAGE menunjukkan pola pita protein yang sama.

Kata-kata kunci: antibodi anti-idiotipe, SGC, vaksin

ABSTRACT

Media Veteriner. 2000. 7(3):1-4.

This research was conducted to study the possibility of using the anti-idiotype antibody as an artificial antigen with *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* (SGC 560) bacteria as initiating immunogen. The SGC 560 bacteria isolate was identified to be an encapsulated *S. equi* subsp. *zoepidemicus*. Idiotype antibody (Ab1) reacted specifically with antigen preparation of SGC 560 detected with coagglutination test and dot-blot examination. Idiotype antibody was injected to rabbit to produce antibody against idiotype antibody (Ab2). The similarity immunological properties of Ab2 and SGC 560 was examined in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Both preparations showed the same protein band pattern.

Key words : anti-idiotype antibody, SGC, vaccine

PENDAHULUAN

Penentuan kandidat vaksin dapat dilakukan berdasarkan atas faktor virulensi dari bakteri (Wibawan *et al.*, 1998). Kapsul merupakan faktor virulen dari *S. equi* subsp. *zoepidemicus* (Huminto *et al.*, 1997; Wibawan *et al.*, 1999), dengan komponen utamanya adalah asam hyaluronat. Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Utama (1998^a) menunjukkan bahwa imunisasi menggunakan kapsul asam hyaluronat *S. equi* subsp. *zoepidemicus* sebagai imunogen, menimbulkan kekebalan lemah. Hal ini menunjukkan bahwa antigen permukaan SGC (asam hyaluronat) kurang bersifat antigenik. Pendapat ini sesuai dengan Male *et al.* (1987), Timoney dan Mukhtar (1993) yang menyatakan asam hyaluronat kapsul bersifat non antigenik dan kekebalan yang ditimbulkan tidak protektif.

Satu usaha untuk menanggulangi masalah diatas adalah dengan membuat antigen tiruan yang mirip dengan antigen permukaan bakteri SGC. Diharapkan antigen tiruan ini memiliki homologi dan sifat antigenik yang tinggi, maka dalam penelitian ini akan dikembangkan teknik preparasi dan kemungkinan aplikasi antibodi anti-idiotipe. Antigen tiruan (antibodi anti-idiotipe) dapat digunakan sebagai alternatif untuk vaksin terhadap penyakit yang dengan antigen utuh tidak menimbulkan respon antibodi dengan baik (Nisonoff, 1991).

BAHAN DAN METODE

1. Preparasi Vaksin Bakteri Utuh

Bakteri SGC 560 dibiakkan pada media THB 50 ml, suhu 37°C selama 18 - 24 jam, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, pelet diresuspensi dalam fosfat bufer saline (PBS), kemudian disentrifus sebanyak 2 kali. Supernatan dibuang, dan pelet yang didapat disetarakan dengan suspensi BaSO₄ (620 nm, transmisi 10%) yang setara dengan kandungan bakteri 10⁹ sel/ml. Suspensi diinaktifkan dalam penangas bersuhu 50-60°C selama 10

¹ Makalah telah disampaikan pada seminar Nasional PERSADA, 6 Desember 1999 di IPB Bogor
Tulisan ini adalah sebagian dari tesis Magister sains pada Program Pascasarjana IPB.

menit, lalu didinginkan dan siap digunakan sebagai vaksin untuk memproduksi antibodi 1 (Ab1).

2. Produksi Antibodi terhadap SGC 560 (Antibodi 1)

Kelinci divaksinasi dengan vaksin bakteri utuh yang telah disiapkan sebelumnya dengan metode berurutan (*sequential method*) (Zhou *et al.*, 1994). Vaksinasi dilakukan pada minggu I sebanyak 0,5 ml, diulang minggu II berturut-turut tiga kali sebanyak 1 ml, kemudian diulang lagi minggu III berturut-turut tiga kali sebanyak 1 ml. Injeksi dilakukan melalui vena aurikularis. Satu minggu setelah vaksinasi terakhir, darah diambil dari arteri aurikularis. Darah yang didapat diinkubasi pada suhu 27°C (suhu kamar) selama 1 jam kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 18-24 jam. Serum dipisahkan dan dikarakterisasi dengan uji AGPT dan uji koaglutinasi, kemudian dilanjutkan pemurnian Ab1 dengan afinitas kromatografi menggunakan protein A.

3. Isolasi Immunoglobulin (Antibodi 1)

Matriks protein A diresuspensi dalam PBS kemudian ditambahkan serum dengan perbandingan 4 : 1. Diinkubasi pada suhu kamar selama 3 jam dan digoyang-goyang secara perlahan-lahan. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Pelet dicuci dengan PBS 5 ml sebanyak tiga kali. Pelet kemudian disuspensikan dalam glycin HCl 0,2N pH 2,5 sebanyak 2 ml untuk melepas ikatan immunoglobulin dengan protein A, diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit kemudian disentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Supernatan ditampung dan ditambahkan indikator merah fenol sampai berwarna kuning, kemudian ditambahkan NaOH 0,1 N sampai timbul warna merah muda. Supernatan dipekatkan dengan tabung dialisis sampai setengah volume awal. Eluat dianalisis untuk mengetahui kandungan protein total dengan spektrofotometer. Eluat kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 1 jam, setelah itu digunakan sebagai antigen untuk isolasi antibodi 2.

4. Produksi Antibodi terhadap Antibodi 1

Kelinci yang lain diimunisasi dengan metode imunisasi berurutan dengan Ab1 sebanyak 2 mg/ml setiap injeksi. Injeksi dilakukan melalui vena aurikularis. Satu minggu setelah injeksi terakhir, darah diambil melalui arteri aurikularis. Darah yang didapat diinkubasi pada suhu 27°C (suhu kamar) selama 1 jam kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 - 24 jam. Serum dipisahkan, kemudian immunoglobulin (antibodi anti-idiotipe) diisolasi seperti cara isolasi antibodi 1. Karakterisasi dilakukan dengan uji AGPT, uji koaglutinasi, dot-blot dan SDS-PAGE. Antibodi 2 (antibodi anti-idiotipe) akan digunakan sebagai vaksin terhadap hewan percobaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Sifat Antigen SGC 560

Serum (antibodi 1) dari kelinci yang divaksinasi dengan bakteri SGC 560 yang telah dilemahkan dengan uji imunodifusi menunjukkan hasil negatif. Sedangkan dengan uji koaglutinasi menunjukkan hasil positif. Demikian juga pada uji dot-blot memberikan hasil positif. Sedangkan pada ujiantang tidak memberikan perlindungan yang optimal. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk mampu mengenali antigen SGC 560 tetapi sangat lemah (non protektif). Hasil yang sama juga dinyatakan oleh Utama (1998^a)

Komponen kapsul *S. equi* subsp. *zooepidemicus* dan Streptokokus grup C umumnya, terdiri dari asam hyaluronat yang secara biokimiawi merupakan struktur dasar jaringan ikat. Kapsul dengan bahan asam hyaluronat ini bersifat tidak imunogenik (Male, 1988), kecuali jika berikatan dengan protein bakteri yang dapat menggertak sistem kekebalan (Durack, 1989). Penyebab lain kapsul bersifat tidak imunogenik adalah komposisi penyusun asam hyaluronat terdiri atas unit ulangan polisakarida yang sama dan struktur trimer unit oligosakarida yang kompleks hanya menyusun sebagian kecil dan terletak pada bagian-bagian tertentu rantai asam hyaluronat, sehingga kurang menonjol atau kurang terekspos dan dianggap tidak asing oleh tubuh (Jennings, Roy dan Michon, 1985 dalam Utama, 1998^b).

2. Antigen Anti-Idiotipe

Inokulasi antibodi idiotipe (Ab1) mampu menggertak pembentukan antibodi anti-idiotipe (Ab2) terhadap SGC pada kelinci. Secara kuantitatif jumlah immunoglobulin yang terbentuk lebih tinggi (20 mg/ml) dibandingkan dengan penggunaan bakteri utuh SGC 560 (4,9 mg/ml), tetapi dengan uji imunodifusi ganda keberadaannya belum dapat dideteksi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terjadinya prozon, karena adanya antibodi yang tidak menyebabkan terjadinya reaksi (antibodi tidak lengkap) atau kemungkinan determinan antigen yang reaktif terletak jauh di dalam lapisan permukaan partikel (Tizard, 1982).

Keberadaan dari antibodi ini dapat dideteksi dengan baik dengan menggunakan uji koaglutinasi dan memberikan hasil yang positif, setelah direaksikan dengan Ab1, sedangkan dengan antigen SGC 560 dan antibodi normal reaksinya negatif (Tabel 1), karena epitop dari Ag 560 dan Abn tidak identik dengan paratop Ab2.

Tabel 1. Uji Koaglutinasi Antibodi Anti-Idiotipe

	Antibodi 1 ^{*)}	Antibodi 2 ^{*)}
Antigen 560	++	-
Antibodi 1	-	++
Antibodi Normal	-	-

*) Antibodi diikatkan pada *S. aureus* Cowan I yang memiliki protein A

Hasil uji koaglutinasi setelah dikonfirmasi dengan uji dot-blot juga memberikan hasil yang positif. Dari hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa Ab2 memiliki sifat identik dengan antigen bakteri SGC 560 utuh. Kemampuan Ab2 untuk meniru struktur antigen utuh (*internal image*) digunakan sebagai dasar untuk menentukan Ab2 sebagai antigen. Antigen ini digunakan untuk menggertak antibodi yang mempunyai spesifitas sama dengan penggunaan SGC 560 pada spesies hewan yang sama atau berbeda. Fenomena ini telah banyak dikembangkan dalam menanggulangi virus Hepatitis B (Kennedy *et al.*, 1986), virus Bluetongue pada domba (Lin, Zhou dan Heckert, 1996). Karakterisasi antigen SGC 560 dan Ab2 dengan SDS PAGE menunjukkan pola pita protein yang sama.

KESIMPULAN

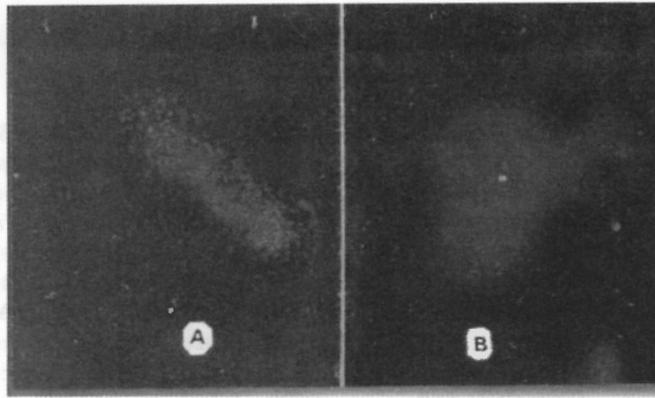
Kekebalan yang ditimbulkan oleh antigen bakteri utuh (SGC 560) bersifat tidak imunogenik. Penggunaan isolat bakteri SGC 560 sebagai imunogen awal mampu menghasilkan antibodi anti-idiotipe (Ab2) dan Ab2 yang terbentuk bersifat identik dengan antigen SGC 560. Berdasarkan uji karakterisasi, antibodi anti-idiotipe dapat dikembangkan sebagai vaksin dalam rangka pemberantasan penyakit streptokokosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

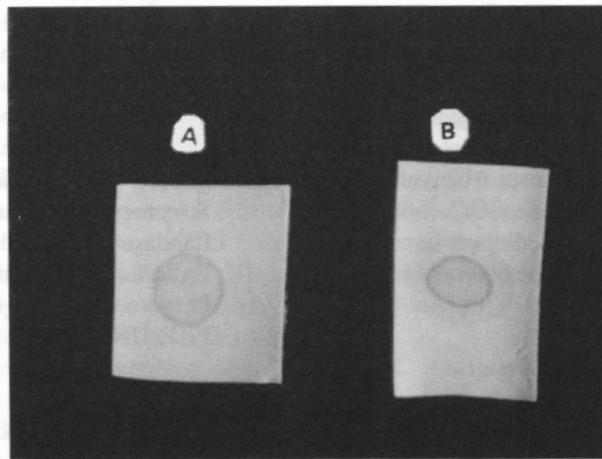
Penelitian ini dibiayai oleh Penelitian Hibah Bersaing VI/1997 – 1999 Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi dengan ketua peneliti Dr. drh. Iwan H. Utama, MS. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Ibu drh. Eva Harlina, Msi., Ibu drh. Sri Estuningsih, Msi., Bapak Agus Somantri dan Bapak M. Soleh atas bantuannya selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

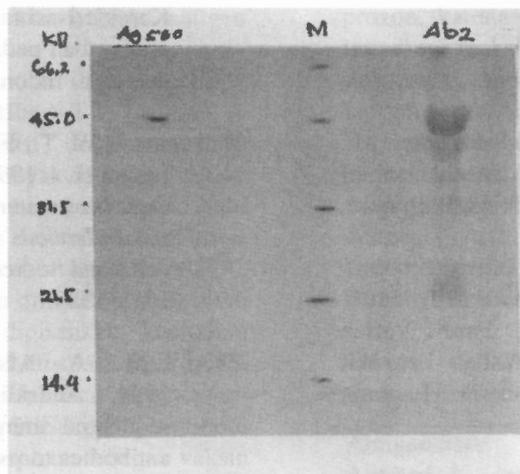
- Durack, D. T. 1989. The Streptococci. In Schaechter, M., G. Medoff and D. Schlessinger (Eds.) Mechanism of Bacterial Disease. William and Wilkins, Baltimore, USA. 205 – 217
- Huminto, H., E. Harlina, F. H. Pasaribu dan I. W. T. Wibawan. 1997. Sub Populasi Fase Varian Streptokokus Grup C Penyebab Wabah Penyakit pada Babi dan Kera di Indonesia. Laporan Penelitian Dasar, FKH-IPB. DIKTI.
- Kennedy, R. C., J. W. Eichberg, R. E. Lanford and G. R. Dreesman. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science*, 232: 220-223.
- Lin, M., E-M. Zhou, and R. A. Heckert. 1996. Induction of antibodies to the bluetongue virus core polypeptide VP7 in sheep by internal image rabbit anti-idiotypic antibodies. *Viral Immunol.*, 9(1): 35 - 43.
- Male, D., B. Champion and A. Cook. 1987. Advanced Immunology. Gower Med. Pub. London.
- Nisonoff, A. 1991. Idiotypes: Concepts and Applications. *J. Immunol.*, 147(8): 2429 - 2438.
- Timoney, J. F., and M. M. Mukhtar. 1993. The protective M proteins of the equine group C Streptococci. *Vet. Microbiol.*, 37: 389 - 395.
- Tizard, I. 1982. An Introduction to Veterinary Immunology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, USA.
- Utama, I. H. 1998^a. Studi Respon Immunologis terhadap *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. sebagai Landasan Pencegahan Wabah Streptokokosis pada Babi. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing VI/1 Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 1997-1998. FKH UNUD.
- Utama, I. H., 1998^b. Ekspresi Fenotip dan Aktivitas Biologi Streptokokus Grup C Isolat Asal Babi dan Kera. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wibawan, I. W. T., E. S. Pribadi, H. Huminto, S. Estuningsih, dan B.P. Priosoeryanto. 1998. Karakterisasi faktor virulen Streptococcus sp. grup C asal wabah pada kera dan babi di Bali dan beberapa daerah di Indonesia. *Med. Vet.*, 5(4): 7-11.
- Wibawan, I. W. T., F. H. Pasaribu, I. H. Utama and C. Lammler. 1999. The role of hyaluronic acid capsular material of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in mediating adherence to HeLa cells and to resist phagocytosis. *Res Vet.Sci.*, 67: 131 - 135
- Zhou, E.M., A. Afshar, R. A. Heckert and K. Nielsen. 1994. Anti-idiotypic antibodies generated by sequential immunization detect the share idiotypic antibodies to pseudorabies virus antigens. *J. Virol. Methods*. 48: 301 - 313.



Gambar 1. Uji koaglutinasi . Reaksi positif ditandai dengan adanya gumpalan seperti pasir (A) dan reaksi negatif ditandai oleh suspensi yang tetap homogen (B).



Gambar 2. Uji Dot-Blot. Reaksi positif ditandai bulatan berwarna hitam, (A) Antigen 560; (B) Antibodi 2 yang direaksikan dengan Antibodi 1.



Gambar 3. Pola pita protein antigen 560 dan antibodi anti-idiotipe pada SDS-PAGE. Ag 560 = Antigen 560; M = Marker; Ab2 = Antibodi anti-idiotipe.