

B/FKH
2001
0113

**PREPARASI SERUM KELINCI SPESIFIK TERHADAP
IMUNOGLOBULIN Y (IgY) AYAM
YANG DIMURNIKAN DENGAN MENGGUNAKAN
*ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY***

NURAINI TRIWIJAYANTI

BO1497128



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

If you can reach out, you can hold on.
If you can imagine, you can achieve.
If you just begin, you can continue.
Search within, and you'll find a reason to believe...

If you can get involved, you can make it happen.
If you can give, you will be rewarded with the taking.
If you can climb, you can climb even higher.
Envision it; your success is in the making...

If you trust the winner within you, you will win.
If you can keep your courage, you will go so far.
If you follow your ambitions, your course will guide you
toward a ladder that you can climb to your stars...

If you don't put limits on yourself, you can always keep striving.
You might amaze yourself with what you discover you can do.
If you want to reach out for happiness, don't ever forget these words:

You can go as far as your dreams can take you.

- Collin McCarty -

It takes a minute to have a crush on someone ☺,
an hour to like someone ☺ and a day to love ♥ someone ☺ ...
but it takes a lifetime to forget someone ☺...

Yesterday is the past,
tomorrow is the future
Today is a gift 📅 that is why we call it the present 📅

Teruntuk:

- 🌹 Papa, Mama, kakak dan adikku
- 🌹 Almamaterku
- 🌹 Kemajuan ilmu pengetahuan

**PREPARASI SERUM KELINCI SPESIFIK TERHADAP
IMUNOGLOBULIN Y (IgY) AYAM
YANG DIMURNIKAN DENGAN MENGGUNAKAN
*ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY***

NURAINI TRIWIJAYANTI

BO1497128

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA KEDOKTERAN HEWAN (SKH) pada

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

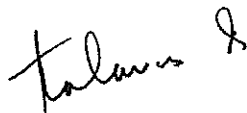
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

Lembar Pengesahan

Judul : Preparasi Serum Kelinci Spesifik terhadap
Imunoglobulin Y (IgY) Ayam yang Dimurnikan dengan
Menggunakan *Ion-Exchange Chromatography*.
Nama : Nuraini Triwijayanti
Nomor Pokok : B01497128

Skripsi ini telah disetujui dan diperiksa oleh :

Pembimbing I



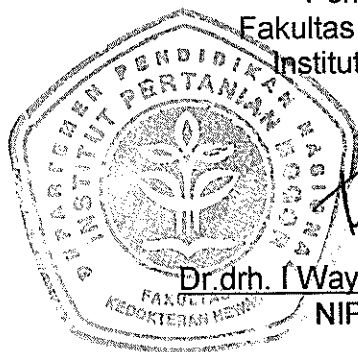
Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS
NIP. 131.129.130

Pembimbing II



drh. Lia Siti Halimah

Mengetahui,
Pembantu Dekan I
Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor



Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS
NIP. 131.129.130

Tanggal lulus : Oktober 2001

ABSTRAK

NURAINI TRIWIJAYANTI. 2001. **Preparasi Serum Kelinci Spesifik Terhadap Immunoglobulin Y (IgY) Ayam Yang Dimurnikan Dengan Menggunakan *Ion Exchange Chromatography***. Penelitian. Dibawah bimbingan DR. drh. I Wayan Teguh Wibawan dan drh. Lia Siti Halimah.

Pengembangan metode yang cepat dan mudah diperlukan dalam upaya penentuan status imunologis ayam. Hal ini dapat dilakukan dengan memanfaatkan aktifitas biologis protein A *Staphylococcus aureus* melalui metode koaglutinasi. Umumnya antibodi mamalia mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan protein A *S. aureus* pada fraksi Fc-IgG. Pada unggas, fraksi utama immunoglobulin unggas IgY sama sekali tidak mampu berikatan dengan protein A *S. aureus*. Pembuatan antibodi kelinci spesifik terhadap IgY ayam berfungsi sebagai penghubung protein A pada permukaan sel bakteri *Staphylococcus* dengan immunoglobulin ayam. Pemurnian IgY ayam dapat dilakukan dengan dua tahap, yaitu pengendapan amonium sulfat yang dilanjutkan dengan *ion-exchange chromatography*. Pemantauan kemurnian terhadap IgY dapat dilakukan dengan *spectrophotometer* pada panjang gelombang 280 nm, yang dilanjutkan dengan pengujian menggunakan SDS-PAGE. Antibodi kelinci spesifik terhadap IgY ayam dihasilkan dari penyuntikan berkala 1 ml IgY. Adanya antibodi spesifik terhadap IgY diketahui oleh adanya reaksi silang yang dinyatakan pembentukan garis presipitat pada uji imunodifusi.

ABSTRACT

NURAINI TRIWIJAYANTI. 2001. *The preparation of spesific rabbit serum against Ion-Exchange Chromatography purified chicken IgY. Research. Under direction of DR. drh. I Wayan Teguh Wibawan and drh. Lia Siti Halimah.*

The development of fast and easy methods was needed as an effort to control the chicken imunological status. These can be done using biological activity of protein A *Staphylococcus aureus* by coaglutination methods. Mostly mamalian Fc IgG fractination will bind to protein A *S. aureus*. The main immunoglobulin fractination of fowls is called IgY does not bind to protein A *S. aureus*. The spesific rabbit serum against chicken IgY being use as joint chain protein A to surface cell bacteri *S. aureus* with chicken immunoglobulin. Chicken IgY can be purified in two steps; protein precipitation by ammonium sulphate combined with ion exchange chromatography. The purity of IgY was monitored by using spectrophotometer which is read at 280 wavelength and SDS-PAGE. Spesific rabbit serum against chicken IgY can be produced by inoculation of 1 ml pure IgY. Spesific rabbit serum against chicken IgY was determined using immunodifusion test.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bogor, Jawa Barat pada tanggal 21 September 1979 dari ayah Dr. H. Supar, MS dan ibu Dra. Hj. Mariyati. Penulis merupakan anak ketiga dari empat bersaudara.

Penulis mengawali masa pendidikan pada tahun 1984 di TK Dirgahayu. Setahun kemudian penulis melanjutkan ke pendidikan dasar di SDN Pengadilan II, Bogor dan lulus pada tahun 1991. Pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan tingkat pertama di SMPN 3 Bogor. Pendidikan lanjutan tingkat atas penulis selesaikan pada tahun 1997 di SMUN 3 Bogor. Pada tahun yang sama, penulis resmi menjadi mahasiswi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor melalui jalur USMI.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas rahmat dan hidayah-Nya lah penulis dapat menyelesaikan karya tulis ini. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Perkenankanlah pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan kepada Direktur Utama PT. Biofarma (*persero*) Bapak Dr. drh Thamrim Poeloengan atas kesempatan melakukan penelitian dan fasilitas yang diberikan. Bapak Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS, selaku pembimbing pertama dan drh. Lia Siti Halimah selaku pembimbing kedua atas saran dan bimbingan selama penelitian dan penulisan skripsi ini. Seluruh Staf PT. Biofarma (*persero*) khususnya bagian Pengawasan Mutu Serum yang telah banyak memberikan bantuan selama penelitian. Papa dan Mama tercinta, Dr. H. Supar, MS dan Dra. Hj. Mariyati yang telah begitu banyak memberikan dukungan moril dan materil kepada penyusun dengan dorongan semangat, kepercayaan, kasih sayang dan doa restu yang tulus dan ikhlas kepada penulis. Saudara-saudariku tercinta, Tyastuti Rahayu, Nurhadi Raharjo, Nugroho Setyowardoyo, atas dukungan yang senantiasa diberikan kepada penyusun. Chimay dan Rik Rik yang telah melaksanakan penelitian bersama, atas kebersamaan dan bantuannya. Sahabat-sahabat penulis, atas bantuan dan dukungannya. Seluruh rekan genetika 21 atas kebersamaanya selama ini semoga memberikan pengalaman yang manis untuk dikenang.

Akhirnya walaupun tulisan ini masih jauh dari sempurna, penulis tetap berharap semoga hasil-hasil yang dituangkan dalam tulisan ini, dapat bermanfaat dan menambah wawasan ilmu bagi kita semua.

Bogor, Oktober 2001

PENULIS

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL DENGAN SPESIFIKASI	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
RIWAYAT HIDUP	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR GRAFIK	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Sistem Kekebalan	3
Lima Kelas Antibodi Utama Mamalia	
Imunoglobulin G	4
Imunoglobulin A	5
Imunoglobulin M	6
Imunoglobulin D	7
Imunoglobulin E	7
Imunoglobulin Y pada Ayam	9
Teknik Pemurnian Imunoglobulin	
Pengendapan Amonium Sulfat	11
Caprilic Acid	13
<i>Ion Exchange Cromatography</i>	13
BAHAN DAN METODE	
Tempat dan Waktu	16
Bahan	16

Metode penelitian	
Serum Ayam	17
Pemurnian Serum dengan Amonium Sulfat	17
Pemurnian serum dengan <i>Ion Exchange Chromatography</i>	18
Pengujian dengan Spektrophotometer	19
Pengujian dengan SDS-PAGE	20
Serum Kelinci	21
Uji Imunodifusi Serum Kelinci Spesifik Terhadap IgY	21
HASIL DAN PEMBAHASAN	22
KESIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

1. Sifat-sifat fisika dari lima kelas utama imunoglobulin	8
2. Sifat-sifat biologi dari lima kelas utama imunoglobulin	9
3. Perbandingan IgG mamalia dengan IgY ayam	11
4. Hasil pemeriksaan imunoglobulin menggunakan spektrofotometer	24

DAFTAR GAMBAR

1. Perbandingan struktur IgG mamalia dengan IgY ayam	10
2. <i>Ion Exchange Chromatography</i>	13
3. Pita polipeptida pada SDS-PAGE	25
4. Pembentukan garis presipitasi antara IgY murni dengan Serum anti IgY pada uji imunodifusi	26

DAFTAR GRAFIK

1. Hasil Pemeriksaan sampel F_1S_7 dengan spektrofotometer	25
2. Hasil Pemeriksaan sampel F_2S_7 dengan spektrofotometer	25
3. Hasil Pemeriksaan sampel FS_7 dengan spektrofotometer	26

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel Komposisi larutan acrylamide	33
Tabel Komposisi larutan buffer pemisah (<i>separating buffer</i>)	33
Tabel Komposisi larutan buffer pengumpul (<i>stacking buffer</i>)	33
Tabel Komposisi larutan amonium persulfat	33
Tabel Komposisi larutan <i>running buffer</i>	33
Tabel Komposisi gel pemisah (<i>separating gel</i>)	33
Tabel Komposisi gel pengumpul (<i>stacking gel</i>)	34
Tabel Komposisi <i>sample solvent</i>	34
Tabel Komposisi larutan <i>staining</i>	34
Tabel Komposisi larutan <i>destaining</i>	34

PENDAHULUAN

Pada spesies hewan tertentu produksi anti-antibodi terhadap hewan lainnya telah banyak dilakukan dalam bentuk antibodi monoklonal maupun poliklonal. Anti-antibodi memiliki peranan yang sangat penting dalam dunia kedokteran khususnya dalam identifikasi, karakterisasi, atau diagnosa terhadap agen tertentu. Pada umumnya, produksi anti-antibodi tersebut telah diberi penanda khusus dengan menggunakan, misalnya zat warna (*florescein isothiocyant*), enzim (*peroksidase, phospatase*) atau radioaktif (*radioimmunoassay*) yang kemudian lebih dikenal dengan istilah *Conjugate*. Metode tersebut selain rumit dan kompleks juga membutuhkan biaya yang cukup tinggi.

Pengembangan metode yang cepat dan mudah diperlukan dalam upaya penentuan status imunologis ayam. Hal ini dapat dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas biologis protein A *Staphylococcus aureus* melalui metode koaglutinasi.

Pada umumnya antibodi mamalia mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan protein A *S. aureus* pada fraksi Fc-Imunoglobulin G. Kemampuan berikatan dengan protein A berbeda-beda pada setiap spesies. Manusia dan kelinci mempunyai kemampuan berikatan yang relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan spesies lainnya yaitu mencit, tikus, kuda, domba. Sedangkan pada unggas, fraksi utama imunoglobulin unggas IgY

sama sekali tidak mampu berikatan dengan protein A *S. aureus*. Hal ini dapat diantisipasi dengan menggunakan antibodi kelinci yang spesifik terhadap Fc-Imunoglobulin Y (IgY) yang berfungsi sebagai penghubung protein A pada permukaan sel bakteri *S. aureus* dengan imunoglobulin ayam.

Keuntungan dari penggunaan IgY ayam adalah tidak bereaksinya IgY dengan anti-mamalia antibodi manusia, seperti faktor rheumatoid dan anti-IgG manusia. Dalam uji imunologis kedua faktor tersebut dapat meningkatkan sensitifitas uji, yang dapat mengakibatkan positif palsu. Sehingga apabila IgY ayam digunakan interfensi oleh antibodi IgG anti-mamalia dapat dihilangkan.

Pemurnian IgY dapat dilakukan dengan menggunakan pengendapan amonium sulfat yang dikombinasikan dengan *ion-exchange chromatography* untuk pembuatan IgG kelinci spesifik terhadap IgY ayam.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antibodi kelinci yang spesifik terhadap IgY ayam yang dapat digunakan sebagai penghubung protein A pada permukaan sel bakteri dalam pengembangan diagnostika.

TINJAUAN PUSTAKA

Sistem Kekebalan

Manusia dan binatang multiseluler mempunyai kemampuan fisiologis untuk mengenal zat kimia dan atau benda asing yang dianggap diri sendiri (*self*) dan membedakannya dari yang asing (*non self*). Kemampuan ini merupakan dasar dari kekebalan karena tubuh akan berusaha untuk mengeluarkan dan memusnahkan benda asing yang masuk dalam jaringan tubuh²². Manusia dan binatang akan berusaha memberikan respon dengan membentuk dan mengeluarkan satu bentuk molekul protein khusus yang dikenal dengan nama imunoglobulin (Ig). Vertebrata tingkat tinggi mempunyai kemampuan untuk mengamati adanya bahan asing yang memberikan reaksi yang cepat dengan mengeluarkan IgG²⁰.

Antigen adalah bahan asing untuk badan yang di dalam manusia atau organisme multiseluler lain yang dapat menimbulkan pembentukan antibodi terhadapnya dan dengan itu antigen dapat bereaksi secara khas²².

Bila antigen masuk ke dalam tubuh maka terdapat dua macam sistem tanggap kebal yang berlainan yaitu tanggap kebal humoral dan tanggap kebal seluler. Kekebalan humoral adalah pembentukan dan sekresi antibodi ke dalam peredaran darah, sedangkan kekebalan seluler ditandai oleh pembentukan sel limfosit yang kemudian menjadi kekebalan kedua²². Keduanya bersama-sama berfungsi untuk menyediakan pertahanan utama

terhadap bahan asing meskipun tergantung pada antigen, dan respon yang diberikan umumnya saling tumpang tindih. Kekebalan humoral memberikan respon pertahanan primer terutama pada infeksi bakteri ekstraseluler dan virus, sedangkan kekebalan sekunder sebagian efektif melawan cendawan, parasit, virus intraseluler sel kanker dan pertumbuhan jaringan berlebihan atau tumor²².

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat dari limfosit B peka antigen dan antigen khusus. Antibodi yang terdapat pada serum kebal dari hewan yang diinfeksi oleh antigen atau zat yang dianggap asing oleh tubuh. Antibodi terdapat dalam berbagai cairan tubuh tetapi terdapat dalam jumlah banyak untuk dianalisa dari serum darah²⁹. Sedangkan menurut Roitt (1993), Antibodi adalah imunoglobulin tanpa menyebut fraksinya. Imunoglobulin adalah molekul protein yang berfungsi sebagai antibodi spesifik dan memberikan respon humoral pada mekanisme tanggap kebal²¹.

Lima kelas Antibodi utama pada Mamalia.

Imunoglobulin G (IgG)

Merupakan komponen glikoprotein utama dalam sistem tanggap kebal humoral dengan jumlah 75% dari jumlah total imunoglobulin dalam plasma pada keadaan normal. Pada reaksi imun sekunder yang diproduksi terbanyak adalah IgG²⁸.

Antibodi dengan bentuk menyerupai huruf "Y" merupakan bentuk protein yang ditemukan dalam serum yang dihasilkan dalam merespon antigen spesifik²¹. Pada rantai berat mempunyai bobot molekul 50.000 Dalton (Da) dan rantai ringannya mempunyai bobot molekul masing-masing 25.000 Da dan sehingga total berat molekul IgG adalah 150.000 Da.

Antibodi merupakan kompleks molekul protein yang terdiri dari 4 rantai polipeptida yang terdiri atas rantai berat dan rantai ringan yang bergabung dalam ikatan disulfida¹⁶. Terdiri atas dua fragmen yaitu fragmen antigen binding (Fab) yang merupakan tempat mengikatnya antigen, dan fragmen konstan atau tetap yang dapat terkristalkan (Fc). Pada Fc mengandung karbohidrat dan banyak sekali fungsi efektor (ikatan dengan komplemen atau ikatan dengan sel reseptor). Pada rantai beratnya mengandung 440 asam amino sedangkan pada rantai ringannya mengandung 220 asam amino. Pada setiap rantai berat terdiri atas 14 rantai, 5 rantai utama pada rantai Fab dan 3 sampai 4 pada Fc²⁰.

Imunoglobulin A (IgA)

Terdapat dalam serum terutama sebagai monomer dan memiliki kecenderungan untuk membentuk polimer dengan perantaraan polipeptida yang disebut rantai J (*joint chain*). Imunoglobulin A mempunyai bobot molekul 160.000 Da²².

IgA tidak hanya terdapat pada serum (IgA serum) tetapi juga dalam berbagai cairan tubuh (IgA sekretori) seperti air ludah, lendir hidung, keringat,

sekresi mukus saluran pencernaan dan pernafasan, keringat, air susu dan kolostrum¹⁹.

IgA berfungsi untuk mencegah melekatnya mikroorganisme pada sel mukosa. Telah ditemukan adanya sinergisme antara IgA dengan lisosim dan komplemen untuk mematikan kuman koliform.

Menurut Atassi *et al.* (1988), isolasi IgA serum maupun IgA sekretori dapat dilakukan namun sangat sulit. Pengendapan dengan menggunakan larutan amonium sulfat sebaiknya dihindari karena bentangan formasi IgA akan mempunyai ikatan yang semakin tinggi. Isolasi dapat dilakukan dengan *hydrophobic Chromatography*.

Imunoglobulin M (IgM)

IgM merupakan komponen ketiga terbanyak dalam serum darah. IgM terdapat dalam bentuk polimer yang terdiri dari 5 sub unit molekul 4-peptida, yang dihubungkan dengan rantai J seperti pada IgA. Semua rantai berat dan rantai ringannya identik satu sama lain¹⁸. Polimer IgM dalam bentuk bebas diperkirakan berbentuk seperti bintang, akan tetapi akan berubah bentuknya apabila berikatan dengan antigen.

Imunoglobulin M pertama kali dibentuk pada fetus dan merupakan komponen pertama yang dibentuk oleh sel B pada stimulasi awal antigen. Mempunyai berat molekul 900.000 Da dengan valensi yang tinggi dan sangat efisien untuk reaksi aglutinasi dan sitolitik, dan karena kemampuannya yang

cepat maka IgM merupakan komponen daya tahan tubuh yang penting terhadap infeksi bakteri¹⁸.

Menurut Atassi *et al.* (1984), isolasi IgM dapat dilakukan dengan teknik fraksinasi makroglobulin yang dikombinasikan dengan *gel filtrasi chromatography*.

Imunoglobulin D (IgD)

Mempunyai bobot molekul 185.000 Da, dengan bentuk monomer. Fungsi secara keseluruhan belum jelas. Tetapi telah ditemukan IgD sebagai antibody terhadap inti sel, dibuktikan dengan adanya IgD ada permukaan sel limfosit dalam tali pusar²⁸.

Menurut Atassi *et al.* (1984), IgD dapat diisolasi dengan metode gel filtrasi menggunakan Ultroge AcA-34 dengan teknik *ion exchange chromatography*.

Imunoglobulin E (Ig E)

Didalam serum ditemukan dalam konsentrasi yang sangat rendah. Imunoglobulin E bila disuntikkan dalam kulit akan mempunyai kemampuan yang tinggi untuk berikatan dengan Fc reseptor pada sel basofil dan sel mast sebelum berinteraksi dengan antigen, sehingga IgE berkaitan erat oleh adanya reaksi alergi¹⁶. Kadar dalam darah akan meningkat bila terjadi infeksi oleh parasit tertentu terutama cacing¹⁸.

Tabel 1. Sifat-sifat fisika dari lima kelas utama imunoglobulin²².

Nama (WHO)	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Angka sedimentasi	7S	7S,9S,11S	19S	7S	8S
Berat molekul (Da)	150.000	160.000	900.000	185.000	200.000
Jumlah unit 4-peptida dasar	1	1,2	5	1	1
Rantai besar (H)	γ	A	M	ϵ	γ
Rantai ringan (L)	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Susunan molekul	$\gamma_2 \kappa_2$ $\gamma_2 \kappa_2$	$(\alpha_2 \kappa_2)_{1-2}$ $(\alpha_2 \lambda_2)_{1-2}$ $(\alpha_2 \kappa_2)_2S$ $(\alpha_2 \lambda_2)_2S$	$(\mu_2 \kappa_2)_5$ $(\mu_2 \lambda_2)_5$	$\epsilon_2 \kappa_2$ $\epsilon_2 \lambda_2(?)$	$\gamma_2 \kappa_2$ $\gamma_2 \lambda_2$
Valensi untuk mengikat antigen	2	2,4	10	2	2
Konsentrasi serum normal	8-1 mg/ml	1,4mg/ml	0,5-2mg/ml	0-0,4mg/ml	17-450mg/ml
% imunoglobulin total	80	13	6	0-1	0,002
% karbohidrat	3	8	12	13	12

Tabel . Sifat-sifat biologi lima kelas utama imunoglobulin manusia²².

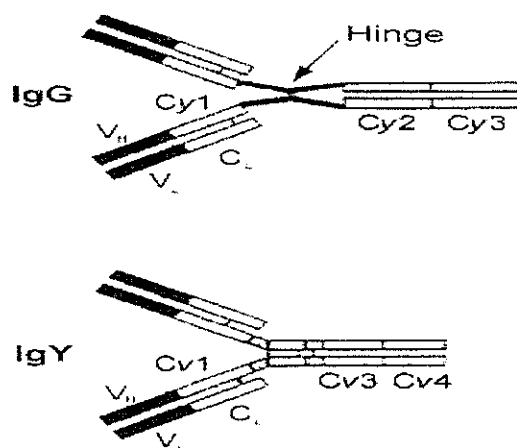
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Sifat utama	Ig terbanyak dalam cairan tubuh	Ig utama dalam sekresi	Aglutinin efektif produksi dini reaksi imun	Terdapat pada permukaan limfosit bayi	Timbul pada infeksi parasit penyebab <i>atopic allergy</i>
Ikatan komplemen	+	-	+	-	-
Tembus plasenta	+	-	-	-	-
Melekat pada <i>Mast cell</i> dan sel basofil	-	-	-	-	+
Daya perlekatan pada makrofag	+	A	-	-	-

Imunoglobulin Y pada Ayam

Menurut Szabo *et al.* (1998), Imunoglobulin G yang dihasilkan oleh bangsa unggas dinamakan Imunoglobulin Y (IgY). Imunoglobulin Y yang

tetapi sangat berbeda nyata dengan IgG pada mamalia. Pada kenyataannya tidak ada antibodi serupa IgG yang mempunyai rantai berat γ seberat 50.000 Da seperti yang dimiliki oleh ayam.

Struktur Ig Y terdiri dari 2 rantai berat yang disebut 'nu' dengan berat molekul 65-70 Kilo Dalton (Kda) dan 2 rantai ringan dengan berat molekul 22-30 Kda. Rantai 'nu' mempunyai 4 rantai konstan (Cv1-Cv4) dan satu variable utama. Pada rantai berat (γ) IgG mengandung empat rantai yaitu tiga rantai konstan (Cy1, Cy2, dan Cy3) dan satu rantai variabel (V_H). Perbandingan antara IgY dan IgG adalah terletak pada daerah Cy2 dan Cy3 dari IgG yang berhubungan erat dengan daerah Cv3 dan Cv4 dan ketika daerah Cv2 tidak ada pada rantai g maka digantikan oleh daerah lengan (*hinge*)².



Gambar 1. Perbandingan struktur Ig G mamalia dengan IgY ayam²⁵.

Fraksi utama imunoglobulin pada unggas disebut IgY, untuk membedakannya dengan IgG mamalia. Ada beberapa hal penting yang membedakan IgG dengan IgY, yaitu IgY lebih resisten terhadap suhu, pH dan kekuatan ion daripada IgG. Imunoglobulin Y tidak mengaktivasi sistem

kekuatan ion daripada IgG. Immunoglobulin Y tidak mengaktivasi sistem komplemen, hal ini dapat mengakibatkan mengurangi ikatan antigen dan menyebabkan hasil negatif palsu. Immunoglobulin ayam tidak bereaksi terhadap anti mamalia antibodi manusia, seperti faktor rheumatoid dan anti IgG manusia⁹.

Tabel. 3 Perbandingan IgG mamalia dengan IgY ayam²⁰.

Struktur Ab	IgG Mamalia	IgY ayam
Ab sampling	Invasive	Non invasive
Jumlah Ab	200 mg IgG /40 ml darah	50-100 mg IgY/telur
Jumlah Ab /bulan	200 mg	1500 mg
Jumlah Ab spesifik	5%	2-10%
Protein A/G binding	Dapat	Tidak dapat
Pengikatan perlakuan dengan IgG	Dapat	Tidak Dapat
Perlakuan dengan faktor rheumatoid	Dapat	Tidak Dapat
Aktivasi dengan komplemen mamalia	Dapat	Tidak Dapat

Teknik Pemurnian Immunoglobulin

Pengendapan Amonium Sulfat

Imunoglobulin adalah protein yang mempunyai sifat larut dalam air karena mempunyai ikatan asam amino hidrofilik pada permukaannya sehingga dapat menarik molekul-molekul air dan berinteraksi dengannya. Kemampuan kelarutan dari protein berubah-ubah dan bervariasi tergantung pada kekuatan ion dan konsentrasi larutan garam⁷.

Menurut Harlow *et al.* (1988), pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat adalah cara yang paling umum digunakan untuk memindahkan protein dari larutannya. Penambahan amonium sulfat akan mengakibatkan molekul-molekul garam berkompetisi dengan molekul protein untuk mengikat air. Hal ini dapat mengakibatkan molekul air berpindah dan menurunkan daya larut, sehingga mengakibatkan terjadinya pengendapan.

Pengendapan terjadi pada konsentrasi yang beragam tergantung pada spesies. Pada antibodi kelinci pengendapan akan terjadi pada konsentrasi 40% kejenuhan, sedangkan pada tikus berkisar antara 45%-50%. Tetapi pada umumnya semua antibodi akan mengendap pada konsentrasi 50% jenuh¹³.

Amonium sulfat merupakan garam yang paling umum digunakan karena mempunyai daya ikat air yang relatif kuat, selain dari biaya yang relatif lebih murah. Tingkat kemurnian yang dihasilkan pun relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan metode pemurnian lainnya, selain kurang atau bahkan tidak mempunyai reaksi terhadap aktivitas enzim¹⁰.

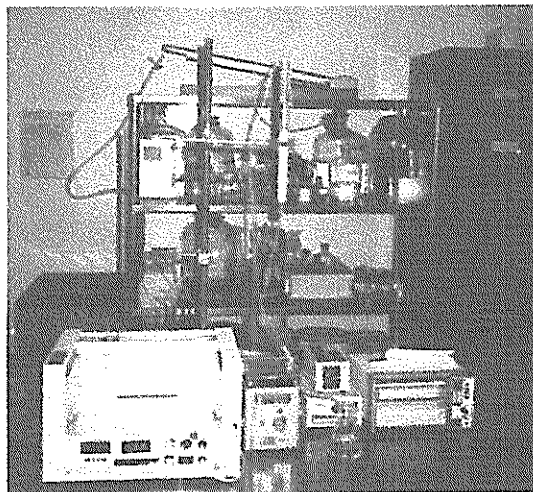
Salah satu kerugian pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat adalah antibodi yang dihasilkan tidak murni karena terkontaminasi oleh protein lain dengan bobot molekul yang besar yang juga ikut terendapkan. Oleh karena itu metode ini sangat baik jika dikombinasikan dengan metode lain yang sesuai dengan preparasi antibodi yang dibutuhkan.

Caprylic acid

Pada prinsipnya pengendapan protein dengan menggunakan amonium sulfat maupun dengan asam caprilic merupakan hal yang sama. Tetapi pengendapan dengan menggunakan asam caprilic akan mengendapkan semua molekul protein kecuali IgG. Sehingga metode ini sangat baik jika digunakan untuk mengendapkan IgA¹³.

Ion-Exchange Chromatography

Ion exchange Chromatography merupakan suatu cara yang dapat digunakan untuk memisahkan hampir semua bentuk molekul dari molekul besar sampai dengan nukleotida kecil dan asam amino¹⁷. Alat ini terdiri dari tiga bagian yaitu bagian utama yang mengatur pola penampungan fraksinasi. Bagian kedua adalah monitor absorban yang berfungsi mendeteksi adanya protein yang dihubungkan pada bagian ketiga yaitu monitor grafik.



Gambar 2. Ion Exchange Chromatography

Terdapat dua tipe *ion exchange chromatography* yaitu, yang pertama adalah *anion exchanger* (bahan mempunyai ion positif) dan akan mengikat protein yang bermuatan negatif, yang mempunyai pH diatas *isoelectric point* (IpH). Bahan yang digunakan biasanya berupa *anion exchanger* dari golongan DEAE (*diethylaminoethyl*). Sedangkan yang kedua adalah *cation exchanger* (bahan mempunyai muatan negatif), sehingga mempunyai kemampuan untuk mengikat protein yang mempunyai pH dibawah IpHnya. Bahan yang digunakan biasanya dari golongan *carboxymethyl*¹⁴. Menurut Harlow *et al.* (1988), umumnya metode yang digunakan menggunakan *anion exchange* karena protein umumnya bermuatan negatif pada nilai pH 6-8.

DEAE-Column Chromatography menggunakan bahan gel dengan butiran-butiran halus yang mengandung karbohidrat seperti selulosa atau dextran. Bahan ini akan larut dalam larutan buffer ber-pH 8 ketika larutan dialirkan pada *column* butiran-butiran halus ini akan mengabsorpsi protein secara bertahap bersamaan dengan aliran sampai ke dasar *column*⁵. Seiring dengan peningkatan konsentrasi garam, antibodi merupakan molekul pertama yang akan terelusi.

Keuntungan dari penggunaan *ion exchange chromatography* adalah kemampuannya untuk menangkap semua molekul IgG relatif lebih tinggi, selain dari tingkat kemurnian yang tinggi. Biaya yang diperlukan pun relatif lebih murah, sehingga dapat digunakan untuk pemurnian IgG dalam skala besar.

Salah satu kerugiannya adalah harus dikombinasikan dengan metode pemurnian lain, dan sangat baik bila telah dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pengawasan Mutu Serum Hewan dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan, PT. Biofarma (persero), Bandung. Pada bulan Februari sampai dengan Mei 2001.

Bahan

Bahan yang diperlukan adalah ayam SPF (*Specific Pathogen Free*) untuk diambil serumnya, kelinci yang diimunisasi oleh IgY ayam, larutan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh, tris 10 mM, PBS pH 8, NaCl fisiologis, NaCl 100, 200, 400 mM dalam tris 10 mM, gel DEAE-Sephadex G-25®, NaOH 1N, HCl 1 N, Ammonium perSulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, *Tetra Methyl Etilen Diamin* (TEMED), *separating gel*, *stacking gel*, *running buffer*, aquades, methiolat, *larutan buffer*, *staining*, *destaining*, agar rose.

Peralatan yang diperlukan adalah tabung erlenmeyer 50 ml, 1000 ml, tabung sentrifus 20 ml, 50 ml, tabung vial 2000 μl , *mini gel electrophoresis*, *mini column Chromatography*, *spectrophotometer*, sentrifus, incubator, timbangan, pemanas, mikro pipet, pipet tips.

Metode Penelitian

Serum Ayam

Untuk pengumpulan serum ayam diperlukan ayam SPF yang dipelihara oleh PT. Biofarma (*persero*). Darah ayam diambil dengan menggunakan spuit 12 ml sebanyak yang diperlukan. Kemudian darah tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian disentrifus 3500 rpm selama 15 menit sehingga terbentuk pemisahan antara supernatan dengan endapannya. Supernatan yang terbentuk berupa serum dikoleksi, dengan membuang endapan dan serum siap untuk dimurnikan. Untuk menghindari adanya kerusakan dapat disimpan pada suhu 4°C.

Pemurnian Serum dengan Amonium Sulfat

Pemurnian dengan amonium sulfat merupakan metode yang paling umum digunakan dan biasanya dikombinasikan dengan metode lainnya. Sebanyak 15 ml serum ayam, ditambahkan setetes demi tetes sebanyak 90 ml Amonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jenuh sehingga konsentrasi menjadi 60% diatas stirrer, dan disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Penambahan Amonium Sulfat ini dimaksudkan untuk meningkatkan konsentrasi garam sehingga kemampuan protein terlarut menjadi rendah sehingga akan terbentuk endapan. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambahkan dengan PBS sampai dengan volume asal. Kemudian dilakukan kembali penambahan sebanyak 75 ml setetes demi tetes amonium

sulfat, sehingga mencapai 50% konsentrasi jenuh diatas stirrer, disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Protein akan terendapkan pada akhir sentrifus. Supernatan dibuang dan endapan ditambahkan dengan PBS sampai dengan volume asal.

Penambahan ammonium sulfat tersebut, mengakibatkan larutan dalam konsentrasi garam yang tinggi. Pada saat melewati jumlah maksimum residu protein, sebagian enzim juga dapat terendapkan. Pemindahan garam dari larutan dilakukan dengan teknik dialisa menggunakan selektif membran permeabel dalam larutan PBS pH 8 selama 2 malam pada suhu 4°C.

Pemurnian dengan *Ion-Exchange Chromatography*

Pemurnian dengan ammonium sulfat biasanya tidak berdiri sendiri karena hasil yang diperoleh tidak murni. Pemurnian dengan ammonium sulfat biasanya dikombinasikan dengan menggunakan *chromatography*.

Sejumlah gel filtrasi, DEAE-cellulose, yang diperlukan dimasukan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan dicuci dengan akuades. Hal ini dilakukan secara berulang kali sampai gel terlihat bersih. Akuades dibuang dan ditambahkan NaOH 1 N, stirrer. Ditambahkan HCl 1 N dengan *stirrer* kemudian kembali dibuang. Selanjutnya larutan ditambahkan dengan *Phospat Buffer* pH 8.

Sejumlah gel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam *Column* yang berukuran 50 cm dengan diameter 22 cm, dengan perbandingan bahwa ada setiap 1 ml sampel memerlukan 2 ml gel¹.

Gel dibilas dengan larutan tris 10 mM hingga pada grafik menunjukkan garis lurus. Sejumlah sampel hasil di dialisa pemurnian dengan amonium sulfat dimasukkan sehingga gel akan berikatan dengan protein (imunoglobulin). Sejumlah larutan tris ditambahkan kembali dengan tujuan memberikan waktu pada agar dan protein untuk berikatan sekaligus untuk mencuci *column* sehingga protein yang tidak diinginkan dapat terelusi terlebih dahulu. Ikatan antara gel dan imunoglobulin akan terurai seiring dengan terjadinya peningkatan konsentrasi garam, dalam hal ini dengan penambahan 100, 300, 500 mM NaCl dalam Tris 10 mM. Imunoglobulin yang terelusi akan terdeteksi oleh monitor absorban yang ditandai oleh pembentukan puncak grafik dan dapat segera dilakukan penampungan dengan menggunakan erlemeyer yang steril.

Untuk selanjutnya kembali dilakukan pencucian dengan menambahkan larutan tris 10 mM. Gel dapat disimpan untuk pemakaian selanjutnya. Hasil yang telah ditampung didialisa dalam larutan PBS selama 2 malam pada temperatur 4°C.

Pengujian dengan menggunakan Spektrofotometer

Larutan sampel imonoglobulin hasil pemurnian dengan *ion exchange chromatography* yang telah didialisa, diuji kemurniannya dengan

menggunakan spektrofotometer. Larutan sampel diambil sebanyak 100 ml didalam *cuvette* ditambahkan 100 ml akuades, kemudian diperiksa dengan menggunakan spektrofotometer adanya imunoglobulin ditunjukkan dengan adanya puncak grafik pada panjang gelombang 280 nm.

Pengujian dengan menggunakan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Pemantauan kemurnian larutan sampel dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dengan memisahkan molekul protein berdasarkan bobot molekulnya. Pertama, dilakukan pemasangan *gel cassett*, kemudian sejumlah agar pemisah / *separating gel* dimasukkan dengan hati-hati dan cepat, sedapat mungkin menghindari adanya gelembung udara sampai dengan 1 cm dari batas sisir bagian bawah. Setelah gel membeku sisir *cassette* dipasang dan sejumlah agar pengumpul / *stacking gel* ditambahkan dengan perlahan dan hati-hati dan sedapat mungkin menghindari adanya gelembung udara sampai dengan batas sisir bagian atas. Setelah waktu cukup dan *stacking gel* membeku, *gel cassette* dipasang pada alat *electrophoresis*. Sejumlah *Running Buffer* dituangkan pada alat, sisir dapat dilepaskan secara hati-hati sehingga batas atas sisir tidak terlepas. Sampel dapat diinokulasikan dengan volume secukupnya.

Electrophoresis disiapkan pada tegangan 200 V dengan arus 40 mA sampai sampel mencapai bagian bawah *cassette*. Pewarnaan dapat dilakukan selama 15 menit, dan dilanjutkan dengan pemucatan selama satu malam.

Serum Kelinci

Hasil pemurnian serum ayam yang telah melewati *column Chromatography* dan telah di dialisa disuntikkan pada kelinci dengan dosis 2 ml setiap 7 hari. Pada hari ke-7 setelah penyuntikan dilakukan pengambilan darah dan melakukan uji imunodifusi. Setelah menunjukkan hasil positif serum kelinci anti terhadap serum ayam dapat dilakukan pemanenan. Jika belum menghasilkan reaksi positif maka penyuntikan terus dilaksanakan. Hal ini dimaksudkan untuk melihat keberadaan antibodi spesifik terhadap serum ayam.

Uji imunodifusi serum kelinci spesifik terhadap IgY

Uji imunodifusi yang dilakukan menggunakan prosedur baku PT. Biofarma (*persero*). Media agar yang telah dilubangi diinokulasikan serum kelinci pada bagian tengah, dan lubang di sekelilingnya diisi oleh IgY ayam murni dengan konsentrasi bertingkat. Pada media agar lainnya diinokulasikan IgY ayam murni di bagian tengah, dan lubang di sekelilingnya diinokulasikan serum kelinci dengan konsentrasi bertingkat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serum merupakan salah satu reagen yang digunakan dalam pengujian imunologis. Serum dapat diperoleh dengan membiarkan darah membeku tanpa koagulan. Dari 40 ml darah ayam dapat diperoleh 25 ml serum ayam. Serum dapat disimpan beku pada temperatur -70°C untuk selang waktu penggunaan yang cukup lama, dan pada suhu lemari es -4°C bila digunakan segera. Sebagai protein antibodi yang terlarut dapat rusak apabila suhu penyimpanan tidak tepat yang dapat mengakibatkan penurunan titer antibodi dalam serum. Demikian pula dengan pembekuan dan pencairan yang dilakukan berulang kali, juga dapat menyebabkan penurunan titer antibodi²².

Pemurnian pertama dilakukan dengan penambahan amonium sulfat jenuh yang akan mengendapkan sebagian molekul protein serum. Dari 22,5 ml serum ayam, endapan yang terbentuk sebanyak 4 ml. Menurut Tizzard (1998), protein yang terendapkan adalah globulin, sedangkan protein yang terlarut adalah albumin.

Penambahan amonium sulfat dilakukan secara bertahap dari konsentrasi tinggi (60%) ke konsentrasi 50% jenuh, dan pemberiannya pun dilakukan secara perlahan. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan daya ikat protein dengan pereaksi, sehingga adanya kepastian bahwa konsentrasi awal pada daerah sekitar penambahan tidak melewati konsentrasi garam yang terbentuk¹⁶.

Pemindahan garam pada akhir sentrifugasi dilakukan dengan menggunakan tabung dialisa yang mempunyai sifat selektif membran permeabel. Dialisa dilakukan dalam larutan buffer pH 8 selama satu malam. Perbedaan konsentrasi diharapkan dapat seimbang secara bertahap yang ditandai oleh tetap jernihnya larutan dialisa setelah pemberian beberapa tetes barium sulfat.

Pada tahap selanjutnya pemurnian IgY dilakukan dengan teknik *ion exchange Chromatography* dengan menggunakan gel DEAE-Celulose yang terlarut dalam buffer pH 8. Perbandingan antara sampel dengan gel adalah 1:2, jadi dari 22,5 ml sampel membutuhkan 45 ml gel. Gel sebagai ion positif akan mengikat imunoglobulin pada pH diatas *isoelectric point* (IpH). *Isoelectric point* imunoglobulin ayam adalah berkisar antara 5,5-6²³.

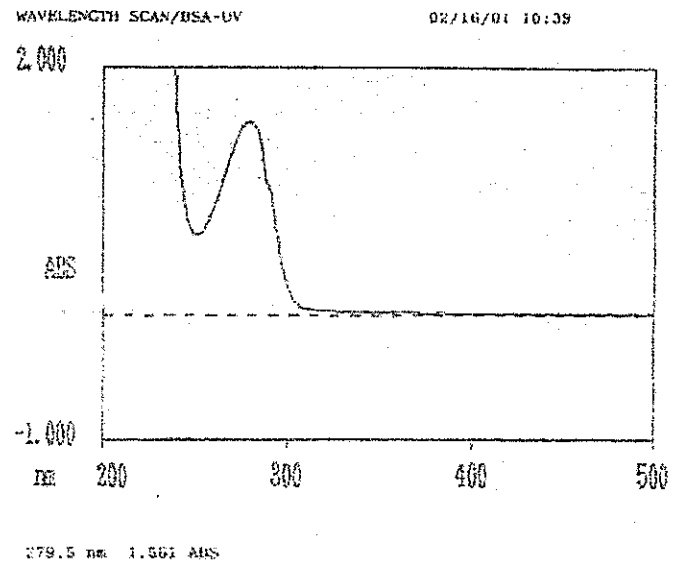
Pengikatan gel dan protein dapat terelusi seiring dengan adanya peningkatan konsentrasi garam. Protein terelusi pertama kali (F₁) pada penambahan 100 mM NaCl dalam 10 mM tris sebanyak 7 ml yang ditandai oleh adanya puncak grafik yang terdeteksi oleh monitor absorban. Sebelum grafik turun dan membentuk garis lurus, grafik kembali naik. Protein yang terelusi ini diberi label yang berbeda (F₂) sebanyak 3 ml. Pada peningkatan konsentrasi garam dilakukan penambahan 300 mM NaCl dalam 10 mM tris, protein yang terelusi semakin banyak yaitu 12,5 ml dan mencapai puncaknya sehingga pada peningkatan konsentrasi garam selanjutnya dengan penambahan 500 mM NaCl dalam 10 mM NaCl tidak ada molekul protein yang terelusi lagi.

Tabel. 4 Hasil pemeriksaan imunoglobulin menggunakan spektrofotometer.

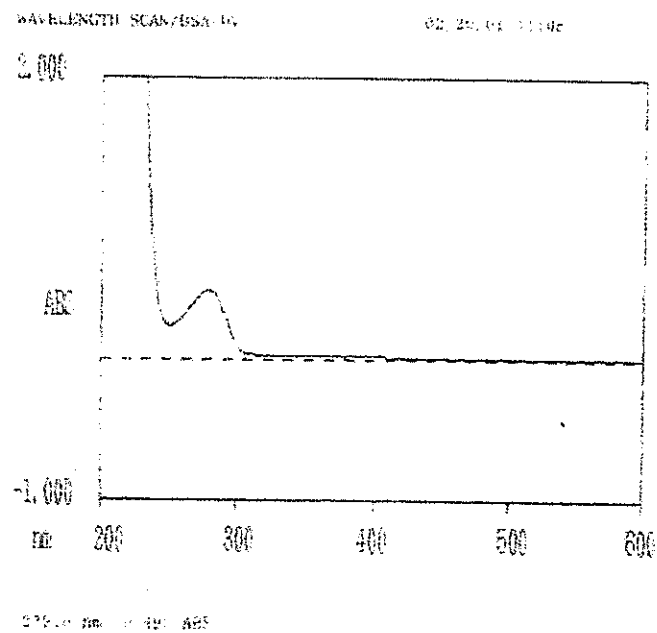
sampel	absorban	konsentrasi	puncak
F1S7 (100mM)	1,561	5,372	279,5 nm
	1,561	5,374	
F2S7 (100mM)	0,496	1,596	279 nm
	0,496	1,596	
FS7 (300mM)	0,861	2,882	278,5 nm
	0,862	2,882	

Dari tabel diatas dapat diketahui bahwa sampel terelusi mempunyai konsentrasi yang berbeda. Sampel F₁ mempunyai konsentrasi yang paling tinggi dan merupakan molekul protein yang pertama kali terelusi, mempunyai bobot molekul yang kecil.

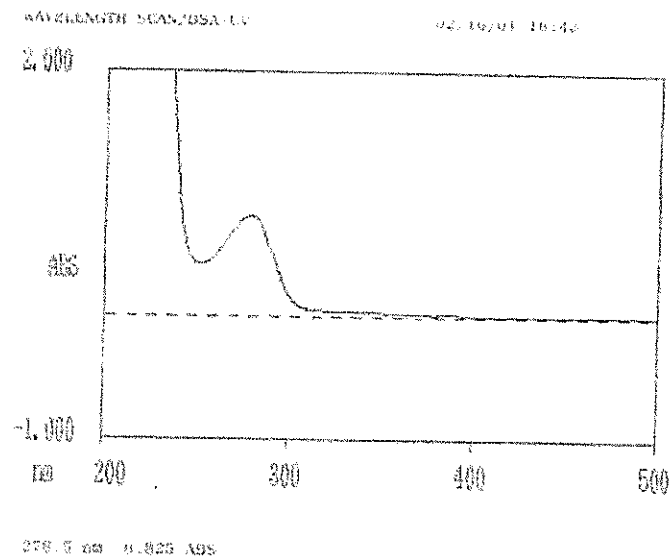
Pada pemeriksaan menggunakan spektrofotometer, juga diketahui bahwa protein yang terelusi tersebut dapat terbaca pada panjang gelombang 280 nm, sehingga dapat disimpulkan bahwa molekul protein tersebut adalah imunoglobulin. Derajat kemurnian yang tinggi pada masing-masing sampel, dapat diketahui gambaran grafik yang terbaca pada panjang gelombang 280 nm.



Grafik 1. Hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer sampel F_1S_7 .

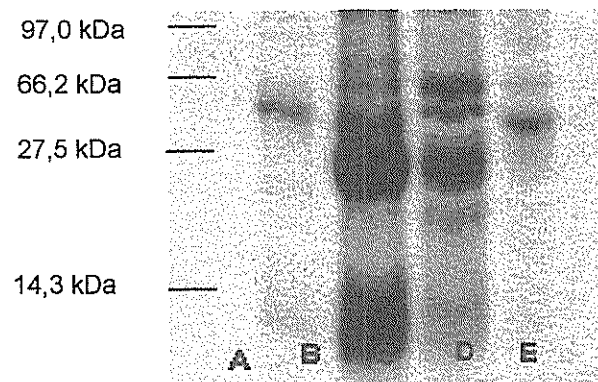


Grafik 2. Hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer sampel F_2S_7 .



Grafik 3. Hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer sampel FS₇.

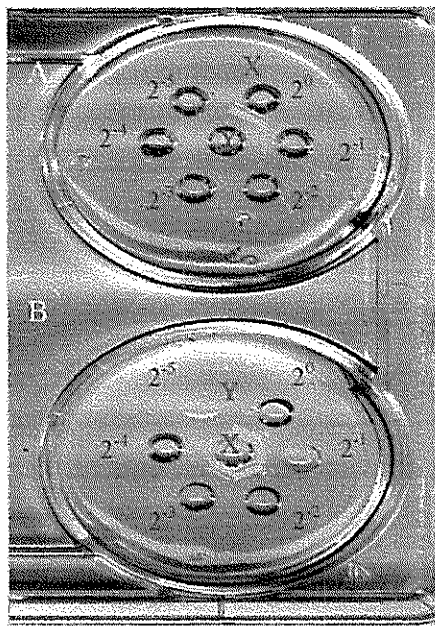
Selain dengan spektrofotometer, pemantauan kemurnian IgY dapat dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yang dapat digunakan untuk memisahkan komponen larutan protein yang terdiri dari unit-unit polipeptida berdasarkan bobot molekulnya dengan pemberian aliran listrik.



Gambar.2 Pita Polipeptida pada SDS-PAGE.

A. standar, B. Imunoglobulin Y ayam, C. serum kelinci
D. Serum ayam, E. Imunoglobulin G kelinci anti-IgY ayam.

Dari gambar diatas, pita polypeptida imunoglobulin Y hasil pemurnian tampak pada sekitar 50 Kda. Imunoglobulin Y merupakan imunoglobulin yang terdapat pada bangsa unggas dengan bobot molekul menyerupai imunoglobulin mamalia yaitu 150 Kda²⁴. Perbedaan bobot molekul imunoglobulin Y ini disebabkan oleh pemberian larutan *β mercaptoethanol* yang mengakibatkan imunoglobulin terpisah menjadi rantai berat dan rantai ringan. Menurut Tizzard (1988), Bila serum diperlakukan dengan memberikan muatan elektron akan selalu dipisahkan oleh empat fraksi, yaitu albumin yang tidak terendapkan oleh amonium sulfat, serta tiga komponen lainnya yaitu globulin yang terbagi menjadi globulin α , β , γ .



Gambar 3. Pembentukan garis presipitasi antara IgY murni dengan serum anti IgY pada uji imunodifusi.
X : serum kelinci anti IgY, Y : IgY murni.

Dari gambar tersebut, dapat diketahui adanya reaksi silang antara IgY ayam dengan serum kelinci anti-IgY yang terlihat dari pembentukan garis presipitat. Kemampuan pengikatan antibodi ayam dengan serum kelinci anti-IgY sampai dengan pengenceran 2^{-1} (A), sedangkan kemampuan pengikatan serum kelinci anti-IgY dengan IgY ayam sampai dengan pengenceran 2^{-5} masih cukup tinggi (B).

Antibodi kelinci yang spesifik terhadap IgY ayam dapat diperoleh dengan menyuntikkan IgY ayam pada kelinci, setelah beberapa waktu maka kelinci telah cukup banyak mengandung antibodi. Antibodi monospesifik adalah antibodi yang tidak bereaksi silang dengan antigen lainnya atau hanya mengenal antigen homolognya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Stevens (1996), antibodi spesifik adalah jika hanya bereaksi dengan antigen yang merangsang produksinya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pembuatan serum kelinci spesifik terhadap IgY ayam dapat dilakukan dengan memurnikan IgY ayam dengan kombinasi teknik pengendapan amonium sulfat dengan *ion exchange chromatography*. Kombinasi teknik pemurnian imunoglobulin tersebut merupakan teknik yang paling sederhana dengan tingkat kemurnian yang relatif tinggi.

Saran

Melihat cukup banyak keistimewaan yang dimiliki IgY ayam maka perlu penelitian lebih lanjut untuk dapat memanfaatkannya dalam pengembangan diagnostika.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Abdallah, M.** 1997. Immuno-electrophoresis (Serum and Urine). American University of Beirut. [http : // www.utmb.edu/lgg/labsurvivalguide/chem/iep,serum,urin.html](http://www.utmb.edu/lgg/labsurvivalguide/chem/iep,serum,urin.html). [5 Mei 2001].
2. **Alpha Diagnostic International.** 1996. Polyclonal Antibodies in Chicken-Beyond Omelets and Sandwiches. [http : // www.4adi.com/service/chicken.html](http://www.4adi.com/service/chicken.html). [15 Mei 2001]
3. **Atassi, M. Z., Van Oss, C. J., Absolom, D. R.,** 1984. Molecular Immunology. Marcel Parker INC. USA.
4. **Atassi, M. Z.** 1986. Preparation of Monoclonal Antibodies to Preselected Protein Regions. Methods in Enzymology. Academic Pr, London. New York.
5. **Biofarma.** 2001. Identifikasi Venom dengan Teknik Ouchterlony. No dok 203T-AGP-AgV; rev: 0; 1 januari 2001. PT Biofarma (*Persero*), Bandung.
6. **Burchiel, S. W.** 1986. Purifications and Analysis of Monoclonal Antibodies by High-Performance Liquid Chromatography. Method in Enzymology. Academic Press INC, London New York.
7. **Booth, A. G.** 2000. Educating the Biotechnology Workforce. Leeds University. UK. [http : // www.booth1.co.uk/archive.html](http://www.booth1.co.uk/archive.html). [10 Juli 2001].
8. **Chang-duk.** 2000. Purification of mAb (IgG). Harvard Medical University. [http : // www.corweb.med.harvard.edu/webpage/protocols/chunduk_mAb.html](http://www.corweb.med.harvard.edu/webpage/protocols/chunduk_mAb.html). [10 Juni 2000].
9. **Clinical Chemistry Research Grup.** 2001. IgY Technology Information. Uppsala University. [http : // www.medsci.uu.se/klinkem/igy/igy_technology.htm](http://www.medsci.uu.se/klinkem/igy/igy_technology.htm). [1 April 2001].
10. **Fralin Biotechnology Center.** 2000. Protein Purification. Virginia University. [http : // www.biotech.vt.edu/classes/bion_4784/g-proteinpurification.html](http://www.biotech.vt.edu/classes/bion_4784/g-proteinpurification.html). [13 Juli 2001].
11. **Gallus Immunotechnology.** 2000. Advantage of IgY. Gallus Immunotech [http : // www.gallusimmunotech.com/advantage.html](http://www.gallusimmunotech.com/advantage.html). [10 Juli 2001].

12. **Haak, M. F.** 1994. Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, An Appealing alternative. Promega. USA. [http : // www.promega.com/pnotes/46/2259e/2259e.html](http://www.promega.com/pnotes/46/2259e/2259e.html). [20 Juni 2001].
13. **Harlow, Ed dan David, L.** 1988. Antibodi : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.USA.
14. **Harris.** 1989. Protein Purification Methods. IRL, Oxford Univ pr.UK.
15. **Indiana University.** 1999. Antibodies. Indiana University - Purdue University Indianapolis. [http : // www.biology.iupui.edu/biocourses/K338/338_05.html](http://www.biology.iupui.edu/biocourses/K338/338_05.html). [15 Mei 2001]
16. **Iowa State University.** 1999. Purifications. Iowa State University. [http : // www.biotech.iastate.edu/facilities/CELLHYB/purewksp.html](http://www.biotech.iastate.edu/facilities/CELLHYB/purewksp.html). [10 Juni 2000].
17. **Lamoyi, E.** 1986. Preparation of F(ab'₂) Fragments from Mouse IgG of Various Subclasses. Methods in Enzymology. Academic Pr. UK.
18. **Mayer, G.** 2001. Immunoglobulins-Structure and Function. Microbiology and Immunology On-Line [serial online]. [http : // www.med.sc.edu:85/mayer/igstruct2000.htm](http://www.med.sc.edu:85/mayer/igstruct2000.htm). [20 Juni 2001].
19. **Melbourne University.** 1999. SDS-PAGE Gels. Melbourne University. [http : // www.pmc.unimelb.edu.au/manual/biochem/b010.html](http://www.pmc.unimelb.edu.au/manual/biochem/b010.html). [10 Juni 2000].
20. **Natural Toxins Research Center.** 1999. Antibodi Structure. Texas A&M University-Kingville. [http : // www.ntritamuk.edu/~imunology/ab-structure.html](http://www.ntritamuk.edu/~imunology/ab-structure.html). [10 Juni 2000].
21. **Natural Toxins Research Center.** 1999. Introduction to Immunology. Texas A & M University-Kingville. [http : // www.ntritamuk.edu/monoclonal/introduction.html](http://www.ntritamuk.edu/monoclonal/introduction.html). [10 Juni 2000].
22. **Roitt, I.** 1978. Essential Immunology. Backwell Scientific Publication. UK
23. **Rybicki, Ed dan Purves, M.** 1996. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE). Molecular Biology Techniques Manual- Cape Town University. [http : // www.uct.ac.za/microbiology/sdspage.html](http://www.uct.ac.za/microbiology/sdspage.html). [10 Juni 2000].

24. **Schade, R dan Hlinak, A.** 1996. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospect. ALTEX. [http : // www.altweb.jhsph.edu/publications/journals/altex/altex1996_suppl/altex1996_suppl1.htm](http://www.altweb.jhsph.edu/publications/journals/altex/altex1996_suppl/altex1996_suppl1.htm). [15 Mei 2001].
25. **Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugi, H., Koch, G., Larsson, A., Pollman, W., Regenmortel, M.V., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H., Straughan, D.** 1996. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies : IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21^{1,2}. Reprinted With Minor Amendments from ATLA 24 : 925-934. [http : // altweb.jhsph.edu/science/pubs/ECVAM/ecvam21.html](http://altweb.jhsph.edu/science/pubs/ECVAM/ecvam21.html). [4 Mei 2001].
26. **Stevens, C. D.** 1996. Clinical Immunology and Serology-A laboratory Perspective. FA Davis Company Philadelphia. USA.
27. **Szabo, C., Bardos, L., Losonezy, S., Karchesz, K.** 1998. Isolation of Antibody from Chicken and Quail Eggs. INABIS. [http: //www.mcmaster.ca /inabis98/immunology/szabo509/two.html](http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo509/two.html) [4 Mei 2001].
28. **Texas University.** 1999. Human Polyclonal In-111 IgG. [http : // www.radiology.uthscsa.edu/rad/williams/NucMed/infect04.html](http://www.radiology.uthscsa.edu/rad/williams/NucMed/infect04.html). [10 Juni 2000].
29. **Tizzard.** 1988. Pengantar Immunologi Veteriner. Airlangga Univ Pr.
30. **Toivanen, A dan Toivanen, P.** 1987. Avian Immunology : Basis and Practise. CRC Press, INC. Boca Raton, Florida.
31. **Virusys Corporation.** 2001. Poultry Science. [http : // www.virusys.com/](http://www.virusys.com/). [15 Mei 2001].

Tabel Komposisi Larutan Acrylamide

Acrylamide	73 gr
Bisacrylamide	2 gr
Aquadest	250 ml

Tabel Komposisi Larutan Buffer Pemisah (*Separating Buffer*)

SDS (Sodium Duodecil Sulfat)	1 gr
TRIS	45.5 gr
Aquadest.....ad	250 ml

Tabel Komposisi Larutan Buffer Pengumpul (*Stacking Buffer*)

SDS	1 gr
TRIS	1 gr
aquadest..... ad	< 250 ml

Tabel Komposisi Larutan Amonium PerSulfat

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	1 gr
aquadest	10 ml

Tabel Komposisi Larutan *Running Buffer*

Glycine	28,8 gr
TRIZ	6,0 gr
SDS	2,0 gr
aquadest.....ad	2 l

Tabel Komposisi Gel Pemisah (*Separating Gel*)

Larutan buffer pemisah	4 ml
Aquadest	3 ml
Larutan buffer pemisah	3 ml
APS	100 ml
TEMED	6 ml

Tabel Komposisi Gel Pengumpul (*Stacking Gel*)

Larutan acrylamide	1,5 ml
Aquadest	3 ml
Larutan buffer pengumpul	2,5 ml
APS	60 ml
TEMED	20 ml

Tabel Komposisi *Sample Solvent*

SDS	0,92 gr
B mercaptoethanol	2 ml
Glycerol	4 gr
TRIZ	0,3 gr
Brom fenol blue	2 ml
Aquadest	20 ml

Tabel Komposisi Larutan *Staining*

Coomasive brilliant blue 250	0,25 gr
Metanol	125 ml
Asam asetat glasial	25 ml
Aquadest	100 ml

Tabel Komposisi Larutan *Destaining*

Metanol	100 ml
Asam asetat glasial	100 ml
Aquadest	800 ml

