ISSN : 1411 - 8327

Imunoglobulin Ayam sebagai Antibodi Anti-idiotipe terhadap Rabies

(CHICKEN IMMUNOGLOBULIN AS THE ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY AGAINST RABIES)

SAYU PUTU YUNI PARYATI[1] I WAYAN TEGUH WIBAWAN[2], RETNO DAMAYANTI SOEJOEDONO[2], DAN FACHRIYAN HASMI PASARIBU[2]

[1] Akademi Medis Veteriner Puragabaya Bandung
Jl. H. Yasin No. 59 Terusan Pasteur, Bandung
E-mail: yunisayu@yahoo.com
[2] Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Imunologi
Bagian Kitwan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor. Telp. & Fax. 0251-625959 dan 629459.
E-mail: fkhipb@cbn.net.id

ABSTRAK

Serum antirabies (SAR) yang diproduksi pada kuda, disebut antibodi 1 (Ab1) digunakan sebagai antgigen untuk mengimunisasi ayam. Imunoglobulin ayam (IgY) yang bereaksi secara khas dengan Ab1 merupakan antibodi anti-idiotipe dan selanjutnya disebut sebagai Ab2. Ab2 dipanen dari darah ayam setiap minggu selama 10 minggu. Titer Ab2 tertinggi diperoleh pada minggu ketiga dan keempat pasca vaksinasi. Pemurnian IgY (Ab2) dilakukan melalui pengendapan dengan amonium sulfat jenuh konsentrasi 60% dan 50%, dilanjutkan dengan dialisis menggunakan PBS pH 8,0 selama 24 jam pada suhu 2 – 8 °C. Pemurnian tahap berikutnya dilakukan dengan kolom kromatografi afinitas spesifik terhadap IgY, menghasilkan protein dengan berat molekul 185.000, 95.000 dan 49.000 dalton. Sebanyak 3 ekor kelinci New Zealand White diimunisasi dengan Ab2 dan 3 ekor kelinci lainnya sebagai kelompok kontrol. Antibodi anti-Ab2 dalam serum kelinci, selanjutnya disebut Ab3, diperiksa dengan teknik *Agar Gel Presipitation Test* (AGPT) dan uji AGPT menunjukkan bahwa Ab3 mengenali secara homolog Ab2 dan virus rabies. Dapat disimpulkan, bahwa antibodi anti-idiotipe (Ab2) dapat menginduksi respon imun Ab3 yang mengenali antigen virus, sehingga terdapat kemungkinan antibodi anti-idiotipe (Ab2) digunakan sebagai antigen pengganti untuk imunisasi anti-rabies.

Kata-kata kunci : Imunoglobulin Ayam, Antibodi Anti-idiotipe, Rabies, AGPT

J Vet 2006 7 (3) : 92-103

ABSTRACT

In this study, horse antiserum containing antibody to rabies virus, referred to as the first antibody (Ab1), was used as an antigen to immunize layer chickens for the production of anti-idotypic antibody (IgY). Chicken sera containing antibody (IgY) to Ab1, referred to as the second antibody (Ab2), were collected weekly for 10 weeks from chicken blood. The highest titer of Ab2 was obtained at the third and forth weeks following the last immunization. The Ab2 was initially purified by precipitation using 60% and 50% ammonium sulfate and dialysis against phosphate buffered saline (PBS) pH. 8.0 for 24 hours at 2-8°C. Then, the Ab2 was further purified by affinity chromatography using bead specific to chicken IgY and this resulted in antibody molecules of 185,000, 95,000 and 49,000 daltons. Six New Zealand White rabbits divided into two group were then used for immunization experiments. In this immunization experiment, three rabbits were immunized with purified Ab2 and three others were not immunized and used as negative controls. Rabbit sera were collected and examined by agar gel precipitation Test for the presence of anti-rabies antibody, which was then referred to as the third antibody (Ab3). The Ab3 obtained from rabbit recognized both Ab2 and rabies virus. It is likely therefore that anti-idiotypic antibody against rabies virus can be used as an antigen to induce antibody against rabies virus.

Key words: chicken immunoglobulins (IgY), anti-idiotype antibodies, rabies, AGPT

J Vet 2006 7 (3) : 92-103

PENDAHULUAN

Banyak agen penyakit bersifat sangat infeksius dan sulit dibiakkan, menyebabkan penggunaannya sebagai vaksin dan reagen serologis menjadi tidak aman karena dapat menjadi virulen apabila digunakan sebagai vaksin. Agen penyakit yang sulit dibiakkan juga merupakan salah satu kendala dalam produksi vaksin. Contohnya, adalah dalam produksi vaksin rabies. Vaksinasi rabies dengan vaksin inaktif mempunyai kemungkinan adanya virus virulen yang justru dapat menimbulkan kasus penyakit. Kelemahan ini dapat diatasi dengan pemakaian vaksin unit struktur atau vaksin subunit, tetapi biasanya vaksin subunit tidak begitu imunogenik.

Virus rabies adalah virus yang sulit dibiakkan dan umumnya dilakukan dengan menyuntikkan virus pada otak domba atau mencit sehingga vaksin yang dihasilkan masih mengandung jaringan otak dari hewan-hewan tersebut. Hal ini dapat menimbulkan reaksi neurologik pasca vaksinasi, seperti *meningoencephalitis, meningoencephalomyelitis, myelitis* dan *paralysis*. Pembuatan vaksin pada sel kultur jauh lebih sulit dan membutuhkan biaya yang sangat mahal (Singh dan Kumar 2004).

Salah satu alternatif pengembangan vaksin yang aman, efektif dan protektif adalah pengembangan vaksin antibodi anti-idiotipe. Vaksin anti-idiotipe merupakan vaksin yang dibuat atas dasar adanya daerah pengenalan antigen oleh antibodi. Menurut teori jaringan idiotipik (Jerne 1985), imunisasi dengan suatu antigen dapat menginduksi bukan hanya antibodi spesifik terhadap antigen (Ab1), tapi juga antibodi yang dapat mengenali Ab1. Respon humoral yang terjadi menghasilkan antibodi (Ab1) yang mengekspresikan beberapa kumpulan idiotop di daerah variabel yang disebut dengan idiotipe. Struktur khas idiotipe pada daerah pengikatan antigen dari Ab1 mampu menginduksi sistem imun untuk membentuk Ab2 yang meniru struktur antigen eksternal, disebut *antibodi anti-idiotipe* (Vizcaino 2004) dan bahkan terjadi terhadap antigen sendiri (*self antigen*) (Roitt *et al.* 1993 ; Vogel *et al.* 2000). Melalui mekanisme yang sama, akan terbentuk Ab3. Ab1 dan Ab3 mempunyai kemampuan berikatan yang sama dan dalam beberapa kasus, mempunyai susunan asam amino yang sama pada daerah pengikatan antigennya.

Sejumlah Ab2 yang terbentuk akibat responnya terhadap Ab1 dapat mengekspresikan determinan idiotipe yang meniru antigen aslinya, disebut $Ab2^2$ yang mengandung *internal image* dari antigen eksternal, sehingga disebut juga antibodi *internal image* (Guancheng *et al.* 2001). Meskipun merupakan struktur tiga dimensi dari asam amino, namun antibodi *internal image* juga dapat meniru epitop protein, karbohidrat atau lemak (Ban *et al.* 1994). Struktur tiga dimensi $Ab2^2$ menunjukkan, bahwa mimikri asam amino terletak pada lekukan *antigen binding site* dari daerah hipervariabel rantai berat (Luo *et al.* 2000) dan meniru struktur antigen melalui proses saling melengkapi (*complementary*) dan *homobodies* (Rico dan Hall 1989; Kennedy dan Attanasio 1990). Baik antigen maupun antibodi anti-idiotipe mempunyai tempat ikatan yang sama dan dapat berikatan secara kompetitif dengan idiotipe (Bentley *et al.* 1990).

Selain hewan mamalia, ayam merupakan penghasil antibodi yang sempurna (Carlender 2002). Imunoglobulin ayam yang memiliki fungsi setara dengan immunoglobulin G pada mamalia disebut imunoglobulin Y (IgY), dapat digunakan sebagai sumber antibodi anti-idiotipe. Dibandingkan dengan IgG, IgY memiliki beberapa keunggulan, di antaranya dapat mengenali lebih banyak epitop antigenik dan mempunyai afinitas lebih tinggi pada antigen mamalia; mengurangi ikatan non-spesifik pada sistem imun serta memiliki reaksi silang yang rendah dengan IgG mamalia. IgY adalah antibodi yang stabil dan antibodi poliklonal dapat diperoleh dari telur ayam sehingga panen antibodi dapat dilakukan tanpa menyakiti hewan serta pemeliharaan ayam lebih mudah dan murah (Anonimus 2004).

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : serum anti rabies (SAR) sebagai Ab1 yang dipanen dari kuda (Produksi PT. Bio Farma, Bandung); virus rabies standar, sebagai antigen untuk uji serologi; ayam strain Isa Brown umur 22 minggu, sebagai sumber antibodi anti-idiotipe (Ab2); dan kelinci New Zealand White dengan bobot badan 2,5 kg, digunakan sebagai hewan percobaan pada uji serologi terhadap virus rabies.

Metode

Produksi Antibodi Anti-Idiotipe

Antibodi anti-idiotipe disiapkan dengan cara menyuntik ayam dengan serum anti rabies (SAR). Pada minggu pertama, ayam disuntik secara intra vena dengan 0,5 ml (100 I.U/ml) SAR, kemudian pada minggu kedua, ketiga dan keempat dilakukan penyuntikan setiap hari selama 3 hari berturut-turut untuk setiap minggunya. Dua minggu kemudian, dilakukan *booster* dengan penyuntikan secara subkutan 0,5 ml SAR yang dilarutkan dengan 0,5 ml *Freund's incomplete adjuvant* (FIA). Panen serum dilakukan satu minggu setelah penyuntikan terakhir, kemudian dilakukan uji imunodifusi *Agar Gel Presipitation Test* (AGPT).

Purifikasi Imunoglobulin Ayam (IgY)

Pemurnian antibodi anti-idiotipe dari serum ayam dilakukan sesuai metode baku Harlow dan Lane (1988). Serum dipresipitasikan dengan *amonium sulfat* jenuh secara bertahap menggunakan konsentrasi 60% dan 50%. *Amonium sulfat* jenuh ditambahkan sebanyak 60% dari volume semula, diberikan setetes demi setetes di atas alat pemutar (*stirrer*) dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan endapan yang terbentuk dilarutkan ke dalam NaCl fisiologis hingga mencapai volume semula. Dengan cara yang sama, kemudian ditambahkan lagi amonium sulfat jenuh sebanyak 50% dari volume semula, supernatan dibuang dan endapan ditambahkan NaCl fisiologis hingga mencapai volume semula. Selanjutnya dilakukan dialisis selama 24 jam dalam larutan PBS pH 8,0. Pengukuran kadar IgY dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 hm.

Pemurnian selanjutnya dilakukan pada kolom kromatografi menggunakan *matriks afinitas* spesifik terhadap IgY. Matriks dalam kolom dibilas dengan buffer K_2SO_4 20 mM dalam larutan NaH_2PO_4 20 mM pH 7,5. Imunoglobulin ayam (IgY) yang sudah diendapkan dengan ammonium sulfat jenuh dan sudah didialisis dimasukkan ke dalam kolom bersamaan dengan buffer K_2SO_4 20 mM. Matriks akan mengikat imunoglobulin ayam (IgY) dan protein-protein selain IgY akan lolos yang dapat dilihat dari kenaikan garis pada grafik. Protein-protein ini dibuang.

adjuvant (FIA). Adjuvan dapat meningkatkan imunogenitas suatu antigen dalam menggertak sistem imun tubuh. Selain itu, adjuvan juga dapat berfungsi sebagai pembawa antigen menuju lokasi sistem imun dan melepaskannya sedikit demi sedikit (sebagai depot antigen), sehingga masa pembentukan antibodi berlangsung lebih lama (Leenaars *et al.* 1997).

Adanya reaksi positif pada hasil uji imunodifusi dengan metode AGPT menunjukkan, bahwa pada tubuh ayam telah terbentuk antibodi terhadap Ab1. Reaksi positif masih terdeteksi sampai dengan 10 minggu setelah vaksinasi. Titrasi antibodi dengan AGPT menunjukkan rata-rata titer tertinggi diperoleh minggu ke 3 dan ke 4 pasca vaksinasi. Hasil uji AGPT dari serum ayam disajikan dalam Tabel 1.

Sebagian antibodi yang terbentuk pada ayam mempunyai karakteristik antigenik yang sama dengan antigen aslinya. Antibodi ini disebut dengan antibodi anti-idiotipe (Wise *et al.* 2005). Hipotesis Jerne menyatakan, bahwa daerah hipervariabel dari suatu imunoglobulin (antibodi) 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 (*antigen binding site*) dari antibodi pertama (Ab1). Dengan demikian, antibodi anti-idiotipe juga dapat menghambat pengikatan antigen aslinya secara kompetitif (Liddell dan Weeks 1995).

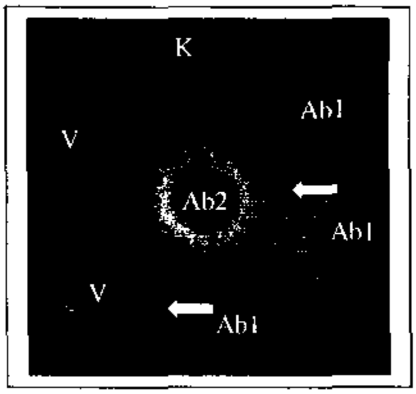
Hasil uji serum ayam yang mengandung antibodi anti-idiotipe (Ab2) dengan Ab1 menunjukkan adanya reaksi homolog, ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi pada AGPT (Gambar 1). Migliorini dan Schwartz (1988) menyatakan, bahwa daerah variabel suatu antibodi atau bagian dari molekul yang mengikat antigen bersifat antigenik dan dapat menggertak terbentuknya antibodi terhadap daerah variabel itu sendiri jika disuntikkan pada hewan yang berbeda spesiesnya atau bahkan pada hewan yang sama spesiesnya.

Uji antara Ab2 dengan vaksin rabies menunjukkan reaksi negatif, karena epitop dari antigen virus rabies tidak homolog dengan paratop Ab2. Untuk menghasilkan kekuatan ikatan antara antigen dan antibodi diperlukan struktur yang cocok antara keduanya (Kennedy 1985).

Tabel 1. Hasil AGPT dari serum ayam.

No. Ayam	Titer serum minggu ke – (pasca vaksinasi terakhir)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2^0	2^3	2^4	2^4	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^2	2^2
2	2^0	2^2	2^3	2^4	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3
3	2^0	2^1	2^2	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^2
4	2^0	2^3	2^4	2^4	2^3	2^3	2^3	2^3	2^3	2^2	2^2
5	2^0	2^2	2^3	2^4	2^6	2^5	2^4	2^3	2^3	2^3	2^3
K	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0
K	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0
K	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0	2^0

Keterangan : K (kontrol negatif).



Gambar 1. Garis presipitasi (tanda panah) pada uji imunodifusi (AGPT) menunjukkan adanya reaksi homolog antara antiserum ayam (Ab2) dengan SAR (Ab1) dan antara vaksin dengan Ab1.

Hal ini menunjukkan bahwa pada ayam telah terjadi respon imun terhadap F(Ab)2 imunoglobulin kuda anti rabies (Ab1). Antibodi yang terbentuk ini merupakan antibodi anti-idiotipe yang diharapkan mempunyai karakteristik serologis yang sama dengan antigen aslinya dan dapat digunakan sebagai antigen pengganti dalam imunisasi. Kemampuan meniru struktur antigen aslinya (*internal image*) merupakan landasan penggunaannya sebagai antigen pengganti. Antibodi anti-idiotipe digunakan untuk menggertak antibodi yang mempunyai spesifisitas sama dengan penggunaan vaksin virus rabies pada spesies hewan yang sama atau berbeda. Sebagaimana halnya antigen, antibodi anti-idiotipe mempunyai kemampuan berikatan secara kompetitif dengan antibodi spesifik terhadap antigen aslinya (Fields *et al.* 1995).

Purifikasi Imunoglobulin Ayam (IgY) dan Karakterisasi

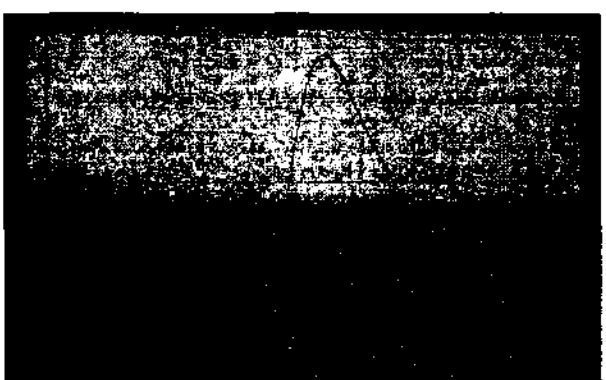
Tahap pertama pemurnian imunoglobulin ayam (IgY) melalui pengendapan protein dengan amonium sulfat jenuh diperoleh endapan protein berwarna putih. Menurut Harlow dan Lane (1988), ketika suatu larutan garam dengan konsentrasi tinggi dan mengandung banyak ion seperti ion amonium ($(NH_4)^+$) dan ion sulfat (SO_4^{2-}) ditambahkan ke dalam larutan yang mengandung protein, maka larutan garam tersebut akan bersaing dengan protein untuk mengikat molekul air. Air akan berpindah dan berikatan dengan garam, sehingga kelarutan protein akan berkurang, menyebabkan pengendapan protein. Protein yang mengendap mempunyai afinitas yang lebih baik terhadap molekul protein lain daripada dengan molekul air.

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pengendapan protein, di antaranya adalah jumlah dan posisi grup polar, berat molekul protein, pH larutan dan temperatur ketika pengendapan terjadi. Kebanyakan antibodi akan mengendap pada kondisi 50% jenuh. Kelemahan pengendapan dengan amonium sulfat adalah protein yang diinginkan, misalnya antibodi, tidak didapatkan dalam keadaan murni, terkontaminasi oleh protein-protein dengan berat molekul tinggi lainnya. Oleh karena itu, pengendapan dengan amonium sulfat tidak dapat digunakan sebagai metode tunggal, tetapi harus dikombinasikan dengan metode yang lain (Beynon *et al.* 1981).

Endapan protein selanjutnya dilarutkan dengan NaCl fisiologis. Untuk menghilangkan garam yang terdapat pada larutan protein dilakukan dialisis menggunakan PBS pH 8,0 selama 24 jam pada suhu 2 – 8 °C. Tabung dialisis direndam dalam larutan buffer, maka molekul-molekul garam akan keluar melalui pori-pori tabung secara bertahap hingga konsentrasi garam di dalam dan di luar tabung dialisis menjadi sama.

Dialisis merupakan proses pertukaran ion (*buffer exchanges*). Meskipun bukan merupakan suatu metode untuk mendapatkan protein murni, tetapi *buffer exchanges* memegang peran penting dalam proses purifikasi dikombinasikan dengan metode lainnya. Proses dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan tabung dialisis. Tabung dialisis mempunyai lubang (pori-pori) yang sangat kecil, dimana hanya molekul-molekul yang sangat kecil (< 5.000 Da) yang dapat lolos, sedangkan molekul protein yang mempunyai ukuran lebih besar tidak dapat melewatinya (Ford 2004).

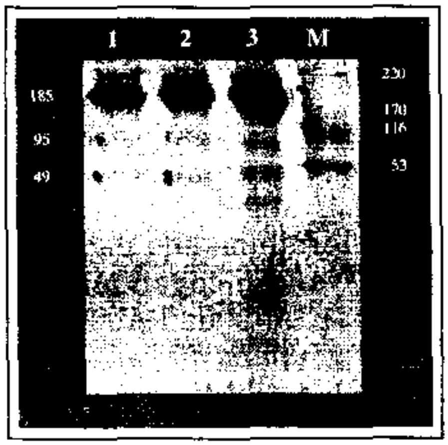
Uji AGPT pada protein yang telah didialisis menunjukkan reaksi serologi yang homolog terhadap SAR (Ab1). Hal ini berarti bahwa protein mengandung antibodi (Ab2) terhadap Ab1. Namun, setelah dilakukan analisis pita protein dengan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* dengan pewarnaan biru komasi (Hames dan Rickwood 1987), menunjukkan masih terdapat banyak pita protein dengan berat molekul yang beragam. Oleh karena itu, maka dilakukan pemurnian tahap berikutnya sehingga dapat diperoleh antibodi dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.



Gambar 2. Pemurnian dengan kromatografi afinitas spesifik IgY terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm.

Pemurnian selanjutnya dilakukan pada kolom kromatografi menggunakan matriks afinitas spesifik terhadap IgY. Prosedur ini didasarkan pada medium yang mempunyai afinitas spesifik terhadap protein yang akan dimurnikan, sehingga matriks hanya akan mengikat protein yang diinginkan (Blaber 1998). Matriks terdiri dari *thiophilic adsorption medium, 2-mercaptopyridine* yang diikatkan dengan *sepharose high perfomance*. Interaksi matriks dengan IgY terjadi karena adanya kombinasi donor elektron dan penerimaan aksi dari matriks atau merupakan gabungan antara interaksi hidrofilik dan hidrofobik. Hasil kromatografi afinitas yang dilihat dengan spektrofotometer disajikan pada grafik Gambar 2. Fraksi protein terbaca optimal pada panjang gelombang 280 nm. Ini membuktikan bahwa hasil pemurnian merupakan protein.

Tingkat kemurnian protein setelah pemurnian dapat dilihat dari analisis pita protein menggunakan metode SDS-PAGE yang disajikan pada Gambar 3. Metode SDS-PAGE biasanya hanya digunakan untuk mendeteksi keberadaan protein dalam suatu proses purifikasi. SDS merupakan detergen anionik yang dapat berinteraksi dengan bagian hidrofobik dari protein, akan menyelimuti protein. Jika dipanaskan maka seluruh polipeptida akan terselimuti sehingga menjadi tidak bermuatan. Atas dasar ini, maka perpindahan protein ditentukan oleh ukurannya, bukan oleh muatan ionnya (Hames dan Rickwood 1987).



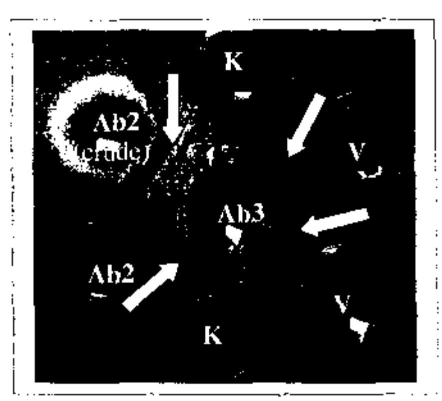
Gambar 3. Profil pita protein yang dimurnikan dengan kromatografi afinitas (1 dan 2) dan hasil pengendapan dengan amonium sulfat (3) dibandingkan dengan marker (M).

Pemurnian dengan kromatografi afinitas spesifik IgY menghasilkan protein dengan berat molekul 185.000 dalton. Protein dengan berat molekul 185.000 dalton diduga merupakan imunoglobulin Y (IgY). Narat (2003) menyatakan, bahwa IgY mempunyai berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan IgG, yaitu sekitar 180.000 dalton atau lebih besar. Selain itu, juga diperoleh protein dengan berat molekul 95.000 dalton dan 49.000 dalton yang diduga merupakan fragmen Fc dan Fab dari IgY yang belum terakit menjadi immunoglobulin utuh. Sun *et al.* (2001) menyatakan, bahwa degradasi IgY akan menghasilkan fragmen Fc dan Fab, dimana berat molekul Fab adalah 45.000 dalton.

Proses pemurnian dengan kolom kromatografi menyebabkan volume larutan IgY bertambah, sehingga perlu dilakukan pemekatan dengan cara menarik air dalam larutan IgY menggunakan *Polyethylen Glycol* (PEG) 6000. Larutan IgY dimasukkan ke dalam tabung dialisis, selanjutnya ditaburkan PEG 6000 di sekeliling tabung hingga volume larutan di dalam tabung dialisis mencapai volume yang diinginkan. Dengan mengubah muatan elektrik konstan dari larutan, PEG kering akan mengabsorpsi air dalam tabung dialisis melalui membran semipermeabelnya sehingga larutan yang terkandung di dalamnya terkonsentrasi. Larutan IgY hasil pemekatan selanjutnya didialisis kembali untuk menghilangkan garam-garam yang kemungkinan masih ada dalam larutan. Pemeriksaan kandungan IgY menggunakan spektrofotometer diperoleh konsentrasi protein rata-rata 0,940 mg/ml larutan.

Imunisasi Kelinci dengan Antibodi Anti-idiotipe

Setelah dilakukan proses pemurnian dan pengukuran konsentrasi IgY yang merupakan antibodi anti-idiotipe (Ab2), selanjutnya Ab2 digunakan untuk menginduksi respon imun pada kelinci. Antibodi yang diperoleh dari serum kelinci merupakan antibodi anti-anti-idiotipe (Ab3). Satu minggu setelah imunisasi terakhir, dilakukan pengujian terhadap Ab3 dengan metode AGPT. Serum kelinci (Ab3) bereaksi spesifik dengan Ab2 (IgY) dan juga dengan antigen virus rabies terlihat dengan adanya garis presipitasi (Gambar 4).



Gambar 4. Serum kelinci (Ab3) bereaksi spesifik dengan antigen virus rabies (V) dan IgY (Ab2), ditunjukkan dengan garis presipitasi (tanda panah) pada uji imunodifusi (AGPT)

Reaksi spesifik antara Ab3 dengan antigen virus menunjukkan bahwa Ab2 merupakan *internal image* yang dapat menginduksi antibodi spesifik terhadap antigen aslinya. Guancheng *et al.* (2001) telah membuktikan, bahwa Ab2 monoklonal mengandung *internal image* dari epitope antigen yang terkait dengan *nasopharyngeal carcinoma* (NPC) dan mampu menginduksi respon imun spesifik baik humoral maupun selular.

Jerne (1985) menyatakan, bahwa Ab2 tertentu mengekspresikan bentuk tiga dimensi yang menyusun struktur antigen eksternal. Terdapat empat tipe Ab2 yang dibedakan berdasarkan topografi dari idiotop target, yaitu Ab2±, $Ab2^2$, $Ab2^3$ dan Ab2μ. Reaksi Ab2± dengan idiotop berlokasi di luar *antigen binding site* dan reaksinya tidak menghambat pengikatan antigen. Antibodi anti-idiotipe yang mengekspresikan determinan idiotipik yang merupakan mimikri dari struktur antigen aslinya dikenal sebagai $Ab2^2$, berikatan dengan idiotipe pada *antigen binding site* dan dapat menghambat antigen berikatan dengan paratop pada idiotope. Antibodi anti-idiotipe $Ab2^3$ berikatan dengan idiotipe di dekat *antigen binding site* dan dapat menghambat ikatan antigen pada idiotop karena pengaruh sterik, tetapi tidak membentuk struktur yang mirip dengan antigen asli. Sedangkan Ab2μ mengenali determinan idiotipik yang meniru struktur antigenik pada daerah konstan dari imunoglobulin.

Ban *et al.* (1994), mengungkapkan respon kebal Ab2 yang terbentuk digolongkan menjadi kelompok yang tidak mampu menghambat antigen (*antigen-noninhibitable group*) (Ab2±) dan kelompok yang mampu menghambat antigen (*antigen-inhibitable group*) ($Ab2^2$). Kelompok ketiga adalah $Ab2^3$, merupakan antibodi anti-idiotipe yang mengenali *combinating site* idiotop di dekat daerah pengikatan antigen.

Imunisasi dengan Ab1 tidak hanya menghasilkan subset $Ab2^2$, tetapi juga menginduksi Ab2± dan $Ab2^3$. Antibodi Ab2 dengan beragan subset, dapat menginduksi terbentuknya anti-anti-idiotipe Ab3 yang sangat kompleks. Hal ini terjadi terutama bila digunakan Ab2 poliklonal yang mengandung beragam subset (Ab2±, $Ab2^2$ dan $Ab2^3$) (Hiernaux 1988). Sebagaimana dinyatakan oleh Luo *et al.* (2000), antibodi anti-idiotipe (Ab2) kemungkinan mempunyai spesifisitas yang berbeda. Beberapa diantaranya mungkin dapat mengenali daerah pengikatan antigen pada antibodi dan mengekspresikan *internal image* antigen asli ($Ab2^2$), sehingga dapat menginduksi respon imun spesifik yang sama dengan respon imun yang diinduksi oleh antigen aslinya. Sejumlah Ab2 lainnya mengenali bagian-bagian lain di sekitar daerah hipervariabel ($Ab2^3$ dan Ab2±). Hal ini dapat menyebabkan kemungkinan terbentuknya Ab3 yang heterogen, yaitu antibodi spesifik dan yang tidak spesifik terhadap antigen aslinya. Secara kuantitatif, jumlah atau konsentrasi Ab2 spesifik yang terbentuk kemungkinan menjadi rendah sehingga kemampuannya menginduksi Ab3 juga rendah karena dosis imunogen berpengaruh terhadap produksi antibodi (Liddell dan Weeks 1995). Rendahnya jumlah dan konsentrasi antibodi (Ab3) menyebabkan garis presipitasi pada teknik AGPT menjadi kurang jelas.

Untuk meningkatkan spesifisitas antibodi yang dihasilkan, dapat digunakan antibodi anti-idiotipe (Ab2) monoklonal. Namun, penggunaan Ab2 monoklonal dalam imunisasi mempunyai kelemahan, diantaranya kemungkinan adanya lebih dari satu faktor virulensi virus rabies. Apabila digunakan Ab2 monoklonal, maka antibodi yang dihasilkan kemungkinan hanya dapat menetralkan satu faktor virulensi saja.

SIMPULAN

Antibodi anti-idiotipe (Ab2) terhadap rabies yang diproduksi pada ayam dapat menginduksi respon imun Ab3 yang mampu mengenali antigen virus rabies, sehingga Ab2 kemungkinan dapat digunakan sebagai antigen pengganti dalam imunisasi rabies. Penggunaan Ab2 sebagai antigen dapat menghindarkan resiko adanya agen penyakit infeksius dan virulen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada drh. Lia Siti Halimah, M.Si, atas bantuannya dalam mendukung proses penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anonimous. 2004. Producing Polyclonal Antibodies : Advantages of Using Chicken Egg-derived IgY Antibodies. Gallus Immunotech Inc.

Ban N, Escobar C, Garcia R, Hasel K, Day J, Greenwood A, McPherson A. 1994. Crystal Structure of Idiotype-Anti-Idiotype Fab Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:1604-1608.

Beynon RJ, Shannon JD, Bond JS. 1981. Protein Purification : Classical Approach. *Biochem.J.*, 199:591-598.

Bentley GA, Boulot S, Riottot MM, Poljak RJ. 1990. Three-dimensional Structure of An Anti-idiotope Complex. *Nature* 348(6298):254-257.

Blaber M. 1998. Protein Purification : Gel Filtration, Affinity and Hydrophobic resins, Preparation of Resin, Plumbing. BCH5425 Molecular Biology and Biotechnology. http://wine1.sb.fsu/C:/My%20Documents/ mailto:blaber@sb.fsu.edu [26 Juli 2004].

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microorganism Quantities of Protein Utilising The Principle of Protein Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Carlender D. 2002. Avian IgY Antibody In Vitro and In Vivo. Comprehensive Summaries of Uppsada Dissertations. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala.

Fields BA, Goldbaum FA, Ysern X, Poljak RJ, Mariuzza RA. 2002. Molecular Basis of Antigen Mimicry by An Anti-idiotope. *Nature* 374(6524):739-742.

Ford RC. 2004. Isolation of Proteins & Nucleic Acids. Course Notes. http://www.bi.umist.ac.uk/teaching/modules/. [26 Juli 2004].

Guancheng L, Jinyue H, Guohua Z, Jiangao Z, Qubing S. 2001. Monoclonal Anti-idiotype Antibody Bearing The Internal Image of Nasopharyngeal Carcinoma Assosiated Antigen. *Chin. Med. J.* 114(9):962-966.

Harlow E, Lane D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. United States of America.

Hames BD, Rickwood D. 1987. Gel Electrophoresis of Protein. IRL Press. Oxford, Washington DC.

Hiernaux J. 1988. Idiotypic Vaccine and Diseases. *Infect. Immun.* 56(6):1407-1413.

Jerne NK. 1985. The Generative Grammar of The Immune System. *Science*. 229:1057-1059.

Kennedy RC. 1985. Idiotype Networks in Hepatitis B Virus Infections. Microbiology and Immunology. Vol. 119. Spinger-Verlag Berlin. Heidelberg.

Kennedy RC, Attanasio R. 1990. Concept of Idiotype-based Vaccines for Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus. *Can. J. Microbiol.* 36(11):811-816.

Leeddell E, Weeks I. 1995. Antibody Technology. JM. Graham dan D. Billington (Ed.). BIOS Scientific Publisher Ltd, Oxford, UK.

Leenaars PPAM, Claassen E, Boersma WJA. 1997. Antigen and Antigen Presentation. In: Immunology Methods Manual, I. Lefkovits (Ed.). Akademic Press Ltd., London, pp. 989 – 1013.

Luo D, Qi W, Ma J, Wang YJ, Wishart D. 2000. Molecular Mimicry of Human Tumor Antigen by Heavy Chain CDR3 Sequence of The Anti-Idiotypic Antibody. *J. Biochem.* 128:345-347.

Migliorini P, Schwartz RS. 1988. Anti-idiotypic Antibodies in Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 6(2):145-150.

Narat M. 2003. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 41(3):259-267.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1993. Immunology. Third Ed. Mosby-Year Book Europe Ltd. London.

Rico MJ, Hall RP. 1989. Anti-idiotypes Antibodies as Vaccine Candidates. The Immune Network. *Arch. Dermatol.* 125(2):271-275.

Segre M, Weigel RM, Schlueter AJ, Segre D. 1992. Behaviour of The Idiotypic Network in Conventional Immune Responses. II. Affinity and Heterogenicity of Idiotypic and Anti-idiotypic Antibodies Following Immunization with T-independent and T-dependent Antigens. *Cell. Immunol.* 144(2):324-31.

Singh S, Kumar TA. 2004. Rabies Vaccines – An Overview. http://www.apcri.org/vol1issue1.htm [22-06-2004].

Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. 2001. Preparation and Mass Spectrometric Study of Edd Yolk Antibody (IgY) Againts Rabies Virus. *Rapid Commun. Mass Spedtrom.* 15:708-712.

Vizcaino SMJ. 2004. How Many Types are Known? Course of Introduction to the Swine Immunology. http://www.sanidadanimal.info/inmun/elautor.htm [29-06-2004].

Vogel M, Miescher S, Kuhn S, Zurcher AW, Stadler MB, Ruf C, Effenberger F, Kricek F, Stadler BM. 2000. Mimicry of Human IgE Epitopes by Anti-Idiotypic Antibodies. *J. Mol. Biol.* 298(5):729-735.

Wise DJ, Carter GR, Flores EF. 2005. Prevention of Viral Diseases, Vaccines and Antiviral Drugs. In: A Concise Review of Veterinary Virology. International Veterinary Information Service, Ithaca New York.