Forum Pascasarjana (1995) 18 (1) : 1-16.

# ISOLASI DAN IDENTIFIKASI IMUNOGLOBULIN GAMA (IgG) SERUM AYAM BURAS DAN AYAM RAS DENGAN METODE KROMATOGRAFI PERTUKARAN ION DAN IMUNOKIMIA[1)]

(Isolation and Identification of Serum Gamma Immunoglobulin (IgG) of Native and Imported Chickens By Ion Exchange Chromatography and Immunochemistry Methods)

**Murniaty Simorangkir*, Aisjah Girindra**, Fachriyan H. Pasaribu** dan Wasmen Manalu****

## ABSTRACT

The study was designed to isolate and identify serum IgG of native and imported chickens, after being immunized with Newcastle Disease Vaccine. The isolation method used was the DEAE-Cellulose ion exchange chromatography using 0.01 M Tris-HCl buffer, at pH 8.0, with linear gradient NaCl from 0.01 M to 0.30 M after salting out with anhydrous $Na_2SO_4$. Identification of IgG characteristics was carried out using the Ouchterlony double immunodiffusion, immuno-electrophoresis and SDS-PAGE 8% methods. Serum fractionation of native and imported chickens using the DEAE-Cellulose chromatography, after salting out with anhydrous $Na_2SO_4$ of 18, 14 and 14%, resulted in four peaks of protein fractions. Fractions 1, 2 and 3 showed positive reactions with specific rabbit anti chicken IgG (SIGMA) on Ouchterlony double immunodiffusion. With the immunoelectrophoresis method, however, fractions 1 and 2 showed positive reactions with specific rabbit anti chicken IgG (SIGMA), native chicken and imported chicken antisera. The results of the experiment suggested that protein fractions 1, 2 and 3 were subclasses of serum IgG of native and imported chickens. Fractions 1 and 2 (suggested to be subclasses of IgG) of native chickens has higher protein concentrations and lower molecular weights than those of imported chickens.

## PENDAHULUAN

Protein merupakan suatu instrumen yang mengekspresikan informasi genetik (Lehninger, 1988). Protein serum terutama fraksi imunoglobulin merupakan suatu fraksi globulin serum yang berhubungan dengan aktivitas pertahanan tubuh. Imunoglobulin G (IgG) yang merupakan kelas imunoglobulin terbanyak dalam serum darah, berperan utama dalam mekanisme kekebalan yang diperantarai oleh antibodi. Berdasarkan perbedaan urutan asam amino rantai berat, variasi ikatan silang sulfida (Weir, 1990) dan perbedaan berat molekul (Kresno, 1991), IgG beberapa spesies hewan terbagi atas subkelas yang memiliki sifat yang berbeda antara lain sifat antigenik, respon terhadap antigen dan reaksi pengikatannya, perbedaan mobilitas elektroforetik, mekanisme selektif transport dan sifat biologis lainnya yang berhubungan dengan sistim

---

[1)] Sebagian dari tesis S2 penulis pertama di Program Pascasarjana IPB Bogor.
** Komisi Pembimbing di Program Pascasarjana IPB Bogor.
* Staf Pengajar Jurusan P. Kimia FPMIPA IKIP Medan.

kekebalan. Tizard (1988) menyatakan bahwa subkelas ini terlibat dalam berbagai aktivitas biologis yang berbeda dan berguna dalam diagnosis imunologis penyakit menular.

Tingginya mortalitas anak ayam masih merupakan suatu masalah yang sering dihadapi oleh peternak ayam. Ronohardjo dan Jan Nari (1977) melaporkan bahwa penyakit ayam yang disebabkan oleh virus Newcastle (NDV) masih menelan banyak korban, walaupun penanggulangan secara vaksinasi telah dilakukan. Sikar (1987) melaporkan bahwa ayam kampung mempunyai respon imun humoral terhadap vaksin NDV lebih baik dibandingkan dengan ayam White Leghorn dan disimpulkan bahwa ada perbedaan resistensi tubuh terhadap penyakit antara kedua jenis ayam tersebut. Sudradjad (1992) juga menyatakan bahwa ayam Kedu Cemani yang termasuk jenis ayam buras, memiliki daya tahan terhadap serangan penyakit tertentu.

Dari adanya perbedaan respon imun humoral dan resistensi ayam buras dan ras terhadap penyakit, diperlukan penelitian dasar terutama mengenai imunoglobulinnya. Dari penelitian dasar ini diharapkan dapat dipertahankan dan ditingkatkan kelebihan resistensi ayam buras terhadap penyakit tertentu.

Sebelum menganalisis struktur, sifat dan fungsi biologis suatu protein, perlu dilakukan lebih dahulu proses isolasi dan pemurnian protein tersebut dari protein lain yang mempunyai aktivitas biologis yang berbeda (Booth dan Hames, 1990). Proses pemurnian ini memerlukan suatu rangkaian prosedur yang masing-masing dapat digunakan untuk membedakan antara protein, dengan dasar karakteristik, struktur dan fungsi yang spesifik.

IgG merupakan protein stabil pada suhu kamar, tahan terhadap pemanasan sampai $56^{o}C$, mempunyai titik isoelektrik lebih basa dari protein serum lain, dapat diendapkan dan dilarutkan kembali dengan merubah kekuatan ionik larutan (Johnstone dan Thorpe, 1987). Dengan mempertimbangkan sifat fisik, kimiawi dan listrik imunoglobulin, tehnik isolasi dan analisis imunoglobulin tersebut dapat ditentukan sehingga konformasi dan aktivitasnya tidak berubah. Johnstone dan Thorpe (1987); Harlow dan Lane (1988); Verheyden *et al.*, (1974) menyatakan bahwa kromatografi pertukaran ion merupakan salah satu metode yang tepat untuk isolasi imunoglobulin IgG. Untuk mengindetifikasi, menguji kemurnian dan analisis sifat imunoglobulin hasil isolasi dapat digunakan metode imunokimia (Johnstone dan Thorpe, 1987) dan elektroforesis SDS- PAGE (Harlow dan Lane, 1988).

Penelitian yang dilakukan ini bertujuan mengisolasi fraksi IgG serum ayam buras dan ras yang telah diberi vaksin NDV untuk mengetahui konsentrasi, berat molekul dan sifat antigenik IgG serum ayam buras dan ras serta mengembangkan metode isolasi IgG serum ayam. Hasil penelitian dasar ini diharapkan bermanfaat untuk penelitian terapan terutama yang berhubungan dengan kekebalan tubuh, kepentingan genetika dan dalam bidang imunokimia.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah 10 ekor ayam buras (Kedu Cemani) dan 10 ekor ayam ras (Broiler strain AA) berumur sehari yang diperoleh dari peternak ayam di Ciawi Bogor serta 4 ekor kelinci dari Balai Penelitian Ternak Ciawi. Ayam percobaan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok buras vaksin (BV), buras kontrol (BK), ras vaksin (RV) dan ras kontrol (RK). Masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Antigen yang diberikan pada kelompok vaksin adalah vaksin NDV, strain La Sota, 100 dosis, produksi Laboratorium Virologi FKH IPB Bogor.

### Metode Penelitian

#### 1. Percobaan Pendahuluan

**1.1 *Pemilihan pH Bufer.***

Percobaan pendahuluan ini bertujuan untuk memilih pH bufer elusi kromatografi ion DEAE-Selulosa dan terdiri dari lima percobaan. Bufer elusi pada percobaan pendahuluan 1 sampai dengan 5 masing- masing adalah bufer 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3 (= PI IgG ayam), 0.01 M Tris-HCl pH 4.6 (<PIgG ayam), 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3 dengan gradien linier 0.01 M - 0.30 M NaCl (pencucian kolom percobaan pendahuluan 1), 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 dengan gradien linier 0.01 M - 0.50 M NaCl (>PI IgG ayam) dan 0.01 M Tris-HCl pH 4.6 dengan gradien linier 0.01 M - 0.30 M NaCl (pencucian kolom percobaan pendahuluan 2).

**1.2 *Produksi Antiserum.***

Satu mililiter serum ayam buras vaksin atau ras vaksin disuntikkan secara subkutan di daerah dekat leher kelinci, secara berulang pada tempat dan dosis yang sama dengan jarak penyuntikan tiga minggu. Darah kelinci diambil secara aseptis setelah 7 hari penyuntikan terakhir, kemudian serum dipreparasi dan dilakukan uji imunodifusiganda untuk mengetahui apakah anti serum telah terbentuk (Godding, 1986).

#### 2. Pembentukan Antibodi Ayam Terhadap Antigen NDV

Masing-masing kelompok ayam buras vaksin (BV), buras kontrol (BK), ras vaksin (RV) dan ras kontrol (RK) diberi 1 tetes vaksin NDV pada mata bagi kelompok perlakuan dan NaCl fisiologis untuk kelompok kontrol. Penyuntikan ulang dilakukan setelah ayam berusia sebulan dan dua bulan melalui suntikan NDV sebanyak 0.2 ml secara intramuskuler di daerah dada untuk kelompok perlakuan maupun penyuntikan

NaCl fisiologis pada kontrol. Pengambilan daerah dilakukan sebelum pemberian vaksin dan setelah dua minggu pemberian vaksin terakhir (Siregar, 1987 yang dimodifikasi). Preparasi serum dilakukan menurut Hudson dan Frank (1988). Selanjutnya penentuan titer antibodi dilakukan dengan metode uji HI menurut prosedur beta untuk mengetahui apakah antibodi telah terbentuk (Siregar, 1987).

### 3. Isolasi IgG Serum Ayam

Isolasi serum ayam dilakukan melalui proses fraksinasi "salting out" yang dilanjutkan dengan kromatografi pertukaran ion DEAE- Selulosa (Dietil aminoetil selulosa).

### 3.1. *Salting Out*

Untuk memisahkan fraksi globulin dari komponen serum lain dilakukan proses salting out dengan $Na_2SO_4$ anhidrat 18, 14, dan 14% menurut Johnstone dan Thorpe (1987) yang dimodifikasi. Fraksi salting out selanjutnya didialisis (Boyer, 1986).

### 3.2 *Kromatografi Pertukaran Ion DEAE-Selulosa*

Kromatografi pertukaran ion dilakukan menurut Verheyden *et al.* (1974); Boyer (1986); Harlow dan Lane (1988) yang dimodifikasi. Tahapan proses kromatografi adalah sebagai berikut:

- Praparasi DEAE-Selulosa yang bertujuan untuk mengembangkan adsorban dilakukan menurut Boyer (1986); Johnstone dan Thorpe (1987).
- Pembuatan kolom pada wadah yang terbuat dari gelas berdiameter 1 cm dan tinggi 18 cm. Kolom diisi dengan bufer awal 0.01 M Tris- HCl, pH 8.0 mengandung 0.01 M NaCl. Adsorban dimasukkan ke kolom sampai tinggi dan volume kolom sekitar 12.0 cm dan 6.5 ml.
- Pengisian sampel dan fraksinasi dilakukan dengan memasukkan 600 µl dialisat ke dalam kolom. Kolom dicuci dengan bufer awal dan dielusi dengan bufer 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 dengan gradien linier NaCl yaitu 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 dan 0.30 M. Volume masing-masing larutan buffer adalah 5 ml. Fraksi-fraksi eluat ditampung sebanyak 0.5 ml dalam 50 buah tabung. Konsentrasi setiap fraksi dihitung dengan metode Bradford (Bradford, 1976) dan dibuat grafiknya. Puncak fraksi tertinggi dikumpulkan untuk dianalisis selanjutnya.

### 4. Identifikasi dan Analisis Kemurnian Tahap Fraksinasi

Identifikasi dan analisis kemurnian yang digunakan adalah metode elektroforesis SDS-PAGE, imunodifusiganda Ouchterlony, imunoelektroforesis dan penentuan konsentrasi protein setiap tahap fraksinasi.

**4.1. *Elektroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodesil Sulfat- Poliakrilamida Gel Elektroforesis)***

Elektroforesis dilakukan menurut Weber dan Osborn (1969); Hames dan Rickwood (1990); Mackenzie (1990). Sistim gel yang digunakan adalah gel elektroforesis SDS-PAGE diskontinu yang terdiri dari resolving gel (8.0%) dan stacking gel (3.0%) dengan alat elektroforesis LKB 2001 Vertical Electrophoresis System. Pewarnaan gel dilakukan dengan menggunakan larutan coomassie Blue R-250 dalam campuran metanol, asetat dan akuades.

**4.2 *Imunodifusiganda Ouchterlony (Ouchterlony, 1953; Clausen, 1981; Catty, 1988)***

Serum awal, fraksi salting out, fraksi 1, 2, 3 dan 4 kromatografi DEAE-Selulosa digunakan sebagai antigen dan anti IgG ayam spesifik (SIGMA) sebagai antibodi.

**4.3 *Imunoelektroforesis (Johnstone dan Thorpe, 1987)***

Serum awal, fraksi 1, 2, 3 dan 4 kromatografi DEAE-Selulosa digunakan sebagai antigen dan anti IgG ayam spesifik (SIGMA), antiserum ayam buras dan antiserum ras sebagai antibodi.

**4.4. *Konsentrasi protein setiap fraksi tahap fraksinasi dihitung dengan metode Bradford (Bradford, 1976).***

**5. Analisis Sifat Fraksi IgG Ayam Buras dan Ayam Ras**

Analisis sifat fraksi IgG ayam buras dan ras dilakukan dengan mengukur konsentrasi dan berat molekulnya. Konsentrasi fraksi IgG ayam buras dan ras ditentukan dengan metode Bradford (Bradford, 1976) Berat molekul IgG ayam buras dan ras diduga dengan metode elektroforesis SDS-PAGE 8% menurut Weber dan Osborn, 1969; Boyer (1986); Booth dan Hames (1990) yang dimodifikasi dan secara kualitatip digunakan metode imunodifusiganda Ouchterlony (Catty, 1988; Kimball, 1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Percobaan Pendahuluan**

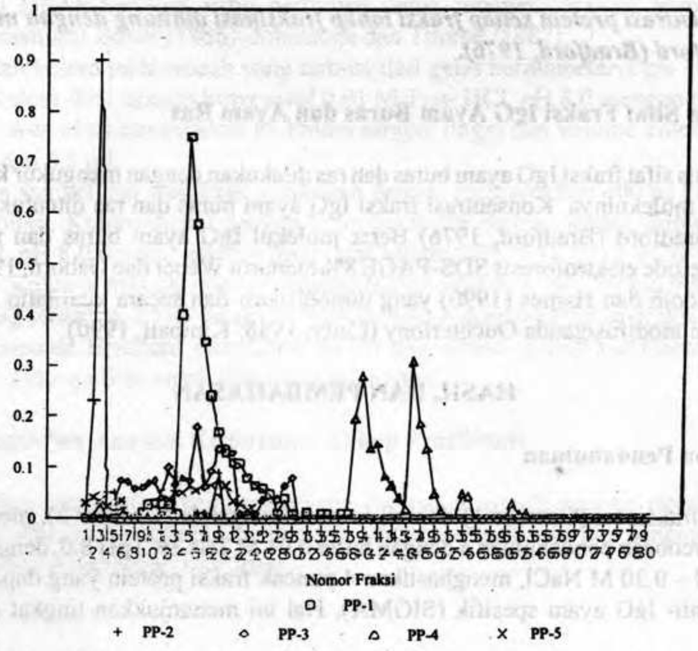
Hasil fraksinasi (Gambar 1) dan uji imunodifusiganda (Gambar 2), menunjukkan bahwa percobaan pendahuluan 4 dengan bufer 0.01 M Tris-HCl pH 8.0, dengan gradien linier 0.01 - 0.30 M NaCl, menghasilkan 4 puncak fraksi protein yang dapat bereaksi dengan anti- IgG ayam spesifik (SIGMA). Hal ini menunjukkan tingkat pemisahan fraksi lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi percobaan pendahuluan lainnya (1, 2, 3 dan 5) yang menggunakan bufer 0.01 M Tris-HCl dengan pH masing-masing larutan adalah 6.3, 4.6, 6.3 dan 4.6.

Selanjutnya untuk percobaan kromatografi DEAE digunakan bufer 0.01 M Tris-HCl pH 8.0 dengan gradien linier NaCl 0.01 - 0.30 M, sesuai dengan pendapat Harlow dan Lane (1988); Boyer (1986); Johnstone & Thorpe (1987), yang mengatakan bahwa bila pH bufer di atas PI IgG, molekul IgG berada dalam bentuk anion yang akan menggantikan ion negatip bufer dan terikat pada gugus kolom yang positip. Peningkatan konsentrasi ion $Cl^-$ menyebabkan terjadinya pertukaran ion negatip antibodi sehingga antibodi terelusi sesuai dengan besar muatannya.

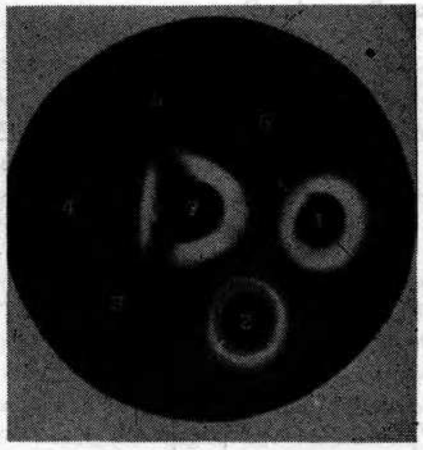
Hasil uji presipitasi serum kelinci yang disuntik dengan serum ayam buras dan ras memberi reaksi positip dengan serum ayam buras dan ras pada metode immunodifusi ganda yang menunjukkan telah terbentuknya anti serum ayam.

**Pembentukan Antibodi**

Dari hasil analisis titer antibodi serum ayam buras dan ras, sebelum dan sesudah pemberian NDV dengan metode uji HI (Gambar 3), peningkatan GMT (Geometric Mean Titer) kelompok ayam buras lebih tinggi yaitu dari 31.6 menjadi 83.2 dibandingkan dengan ayam ras dari 36.3 menjadi 63.1. Uji HI dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi ayam terhadap ND (Beard dan Hanson, 1984). Adanya peningkatan titer antibodi menunjukkan bahwa antibodi terhadap NDV telah terbentuk pada kedua kelompok ayam tersebut.



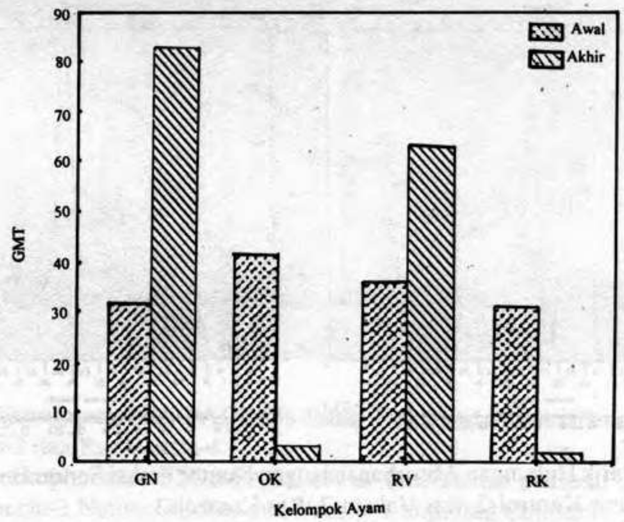

Gambar 1. Grafik Hubungan Absorbansi dengan Nomor Fraksi pada 595 nm.
Figure 1. Relationship between absorbance and Fraction Number at 595 nm ( Preliminary study).




Gambar 2. Garis Presipitasi Fraksi Kromatografi DEAE-Selulosa Serum Ayam Dengan Anti IgG Ayam (SIGMA) Percobaan Pendahuluan 1 Sampai Dengan 5.

Figure 2. Precipitation lines between Fraction of DEAE-cellulose chicken serum Chromatography and anti IgG (Preliminary Study).

Keterangan : (1) fraksi percobaan pendahuluan (pp-1)
(2) fraksi pp-2. (3) fraksi pp-3.
(4) fraksi pp-4. (5) fraksi pp-5.
(6) Serum awal. (7) Anti IgG ayam (SIGMA)

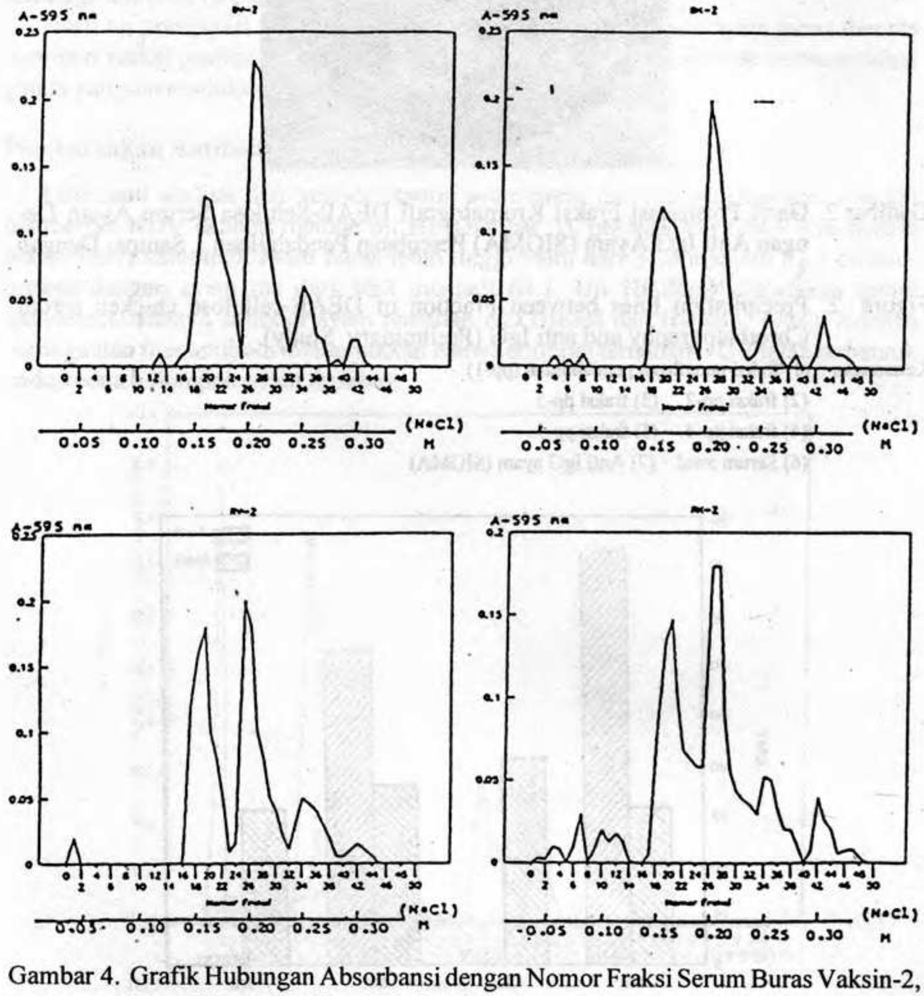



Gambar 3. Titer HI (GMT) Antibodi Serum Ayam Buras dan Ras, Awal dan Akhir.

Figure 3. Titration of HI of serum Antibody of Native & Imported Chicken (Before and After Application of NDV).

**Isolasi IgG Serum Ayam Buras dan Ras**

Fraksinasi serum ayam dengan metode kromatografi DEAE - Selulosa setelah proses penggaraman dengan $Na_2SO_4$ anhidrat 18 dan 14%, menghasilkan 4 puncak fraksi protein hasil elusi bufer berkekuatan ionik antara 0.15-0.30 M (Gambar 4). Puncak fraksi tertinggi umumnya adalah fraksi 2 dengan bufer 0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 0.20 M NaCl . Menurut Verheyden *et al.* (1974) IgG ayam sangat sedikit diperoleh dari bufer berkekuatan ionik rendah, tetapi sebaliknya dengan mamalia. Berdasarkan




Gambar 4. Grafik Hubungan Absorbansi dengan Nomor Fraksi Serum Buras Vaksin-2, Buras Kontrol-2, Ras Vaksin-2, Ras Kontrol-2.

Figure 4. Relationship between absorbance and Fraction number of Serums of Native chicken Vaccin-2, Native chicken Control-2, Imported chicken Vaccin-2, Imported chicken Control-2.

tingkat konsentrasi NaCl dalam bufer yang mengelusi puncak fraksi 1-4, muatan protein fraksi 1-4 cenderung semakin negatip. Sesuai dengan prinsip kromatografi pertukaran anion yang memisahkan protein berdasarkan besar muatan pada pH tertentu (Boyer, 1986), fraksi 1, 2, 3 dan 4 diduga mengandung protein dengan besar muatan negatip yang berbeda.

**Identifikasi dan Analisis Kemurnian Proses Fraksinasi**

Elektroforesis SDS-PAGE 8% fraksi-fraksi serum awal, fraksi salting out, dialisat, fraksi 1-4 kromatografi DEAE-Selulosa menghasilkan jumlah pita fraksi yang semakin berkurang yang menunjukkan bahwa hasil isolasi semakin murni (Gambar 5).

Proses salting out merupakan tahap awal pemurnian protein (Booth dan Hames, 1990) dan dapat digunakan untuk memisahkan fraksi globulin dari komponen serum lain (Tizard, 1988). Proses salting out dengan $Na_2SO_4$ 18 dan 15% (Heide dan Schwick, 1979) dan 18, 14 dan 12.5% (Gallagher dan Voss, 1974) dapat digunakan untuk isolasi gama globulin ayam. Fraksi salting out yang dihasilkan mengandung sekitar 5-9 fraksi berberat molekul antara 237194 - 24211 Dalton dan fraksi 1-4 kromatografi mengandung sekitar 2 fraksi. Menurut Toivanen dan Toivanen (1987), merkaptoetanol 0.05-0.10 M dapat mereduksi IgG ayam dalam larutan sehingga rantai L terlepas. Harlow dan Lane (1988) menyatakan bahwa elektroforesis SDS-PAGE IgG kelinci akan menghasilkan 2 subunit polipeptida berberat molekul 55000 dan 25000 dalton. Dari jumlah pita fraksi yang muncul, diduga fraksi 1-4 kromatografi telah terpisah.

Kd

94000
67000
43000
20000
14000

Kd

94000
67000
43000
20000
14000

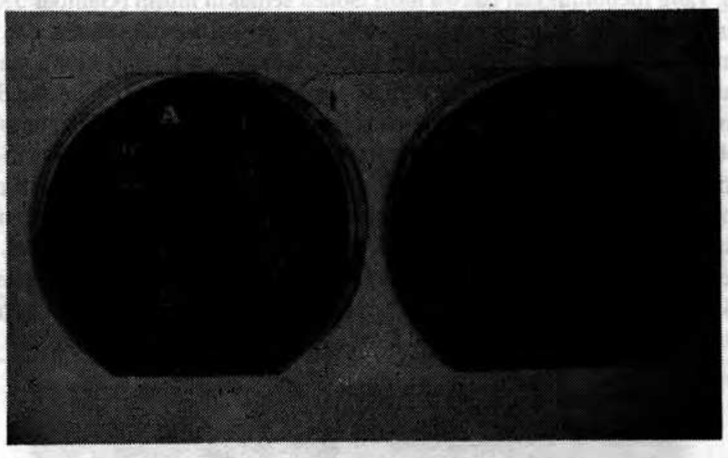
Gambar 5. Elektroforesis SDS-PAGE 8% Tahap Fraksinasi Protein Serum Buras Vaksin-3 dan Ras Vaksin-4

Figure 5. Electrophoresis of SDS-PAGE 8% at Fractination phase of serum protein Vaccin-3 Native Chicken and Vaccin-4 Imported Chicken.

Keterangan: (I) Serum BV-3, (II) Serum RV-4

(1) awal, (2) salting out, (3) olialisat (4) fraksi-1, (5) fraksi-2, (6I) low marker, (6II) fraksi-3, (7I) anti IgC ayam, (7II) low marker, (8) supernatan-1, (9) supernatan-2, (10) supernatan-3.

Hasil pengamatan uji imunodifusiganda Ouchterlony (Gambar 6) menunjukkan bahwa fraksi 1-3 membentuk garis presipitasi dengan anti IgG ayam spesifik (SIGMA), sedangkan fraksi 4 tidak membentuk garis presipitasi. Menurut Kimball (1990), untuk identifikasi garis presipitasi yang menggambarkan suatu sistim antibodi-antigen tertentu, diperlukan larutan antibodi monospesifik. Garis tunggal yang terbentuk antara sumur antibodi monospesifik dengan suatu antigen menunjukkan sistim antibodi-antigen tersebut. Fraksi 1-3 kromatografi DEAE-Selulosa yang membentuk garis peresipitasi tunggal dengan anti IgG ayam spesifik (SIGMA) diduga merupakan fraksi subkelas IgG ayam. Menurut Toivanen dan Toivanen (1987) dan Tizard (1988), IgG serum ayam terbagi 3 subkelas yaitu IgG1, IgG2 dan IgG3.



Gambar 6. Garis Presipitasi Fraksi Serum Awal, Salting Out, Kromatografi DEAE-Selulosa Ayam Ras 3, 4, Buras 3, 4, Vaksin dan Kontrol Terhadap Anti IgG Serum Ayam (SIGMA).

Figure 6. Precipitation lines of Serum Fraction at the Begining, Salting Out and Chromatography DEAE-Cellulose of Imported Chicken 3, 4 and Native Chicken 3, 4.

Keterangan: (A) ayam ras-4 dan buras-4, (B) ras-3, buras-3, (I) buras vaksin, (II) buras kontrol, (III) ras vaksin, (IV) ras kontrol
(1) serum awal, (2) salting-out, (3 s/d 6) masing-masing F-1, F-2, F-3, F-4 kromatografi DEAE-Selulosa, (7) anti IgG serum ayam (SIGMA).

Hasil uji imunoelektroforesis, interaksi fraksi 1-4 kromatografi yang telah mengalami migrasi elektroforetik dengan anti IgG ayam (SIGMA), anti serum buras dan anti serum ras (hasil percobaan pendahuluan), menunjukkan bahwa fraksi 1 dan 2 membentuk busur presipitasi pada bagian katoda plat agar. Sedangkan interaksi komponen serum awal dengan antiserum ras dan anti serum buras membentuk beberapa busur presipitasi (Gambar 7). Menurut Johnstone & Thorpe (1987); Tizard (1988) busur presipitasi IgG pada uji imunoelektroforesis terbentuk jauh ke arah katoda. Busur