



LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
HIBAH BESAING (IVX-2) PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2006/2007 – 2007/2008

**RANCANG STRUKTUR F(ab)<sub>2</sub> ANTI-IDIOTIP HOMOLOG EPITOP  
GLIKOPROTEIN SEBAGAI PROTOTIP VAKSIN RABIES  
DI INDONESIA**

Oleh :

Jola Rahmahani, drh., MKes.  
Dr. Suwarno, drh., MSi.  
Sri Susila Andayani, drh.  
Kusnoto, drh., MSi.

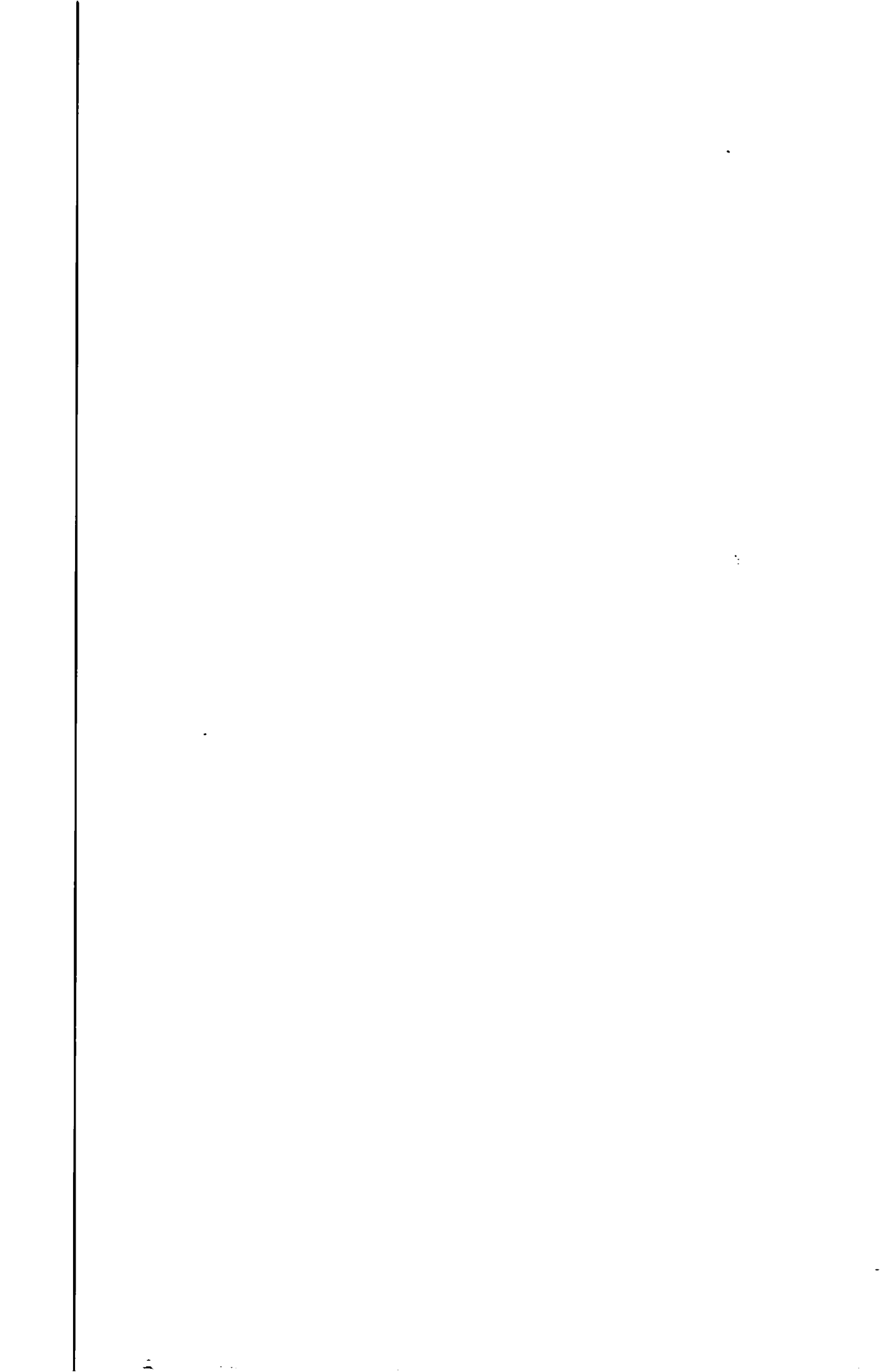
**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Nomor : 318/SP3/PP/DP2M/II/2006  
Tanggal 1 Februari 2006

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun 2003**

6-128







kk  
kfc  
LP. 56/110  
Ran

LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
HIBAH BESAING (IVX-2) PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2006/2007 – 2007/2008

**RANCANG STRUKTUR F(ab)<sub>2</sub> ANTI-IDIOTIP HOMOLOG EPITOP  
GLIKOPROTEIN SEBAGAI PROTOTIP VAKSIN RABIES  
DI INDONESIA**

Oleh :

Jola Rahmahanl, drh., MKes.  
Dr. Suwarno, drh., MSi.  
Sri Susila Andayani, drh.  
Kusnoto, drh., MSi.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Nomor : 318/SP3/PP/DP2M/II/2006  
Tanggal 1 Februari 2006

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun 2008**

LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
HIBAH BESAING (IVX-2) PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2006/2007 – 2007/2008

**RANCANG STRUKTUR F(ab)<sub>2</sub> ANTI-IDIOTIP HOMOLOG EPITOP  
GLIKOPROTEIN SEBAGAI PROTOTIP VAKSIN RABIES  
DI INDONESIA**

Oleh :

**Jola Rahmahani, drh., MKes.  
Dr. Suwarno, drh., MSi.  
Sri Susila Andayani, drh.  
Kusnoto, drh., MSi.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Nomor : 318/SP3/PP/DP2M/III/2006  
Tanggal 1 Februari 2006

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun 2008**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN HIBAH BESAING (IVX-2) PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2006/2007 – 2007/2008

A. Judul : RANCANG STRUKTUR F(ab)<sub>2</sub> ANTI-IDIOTIP HOMOLOG EPITOP  
GLIKOPROTEIN SEBAGAI PROTOTIP VAKSIN RABIES DI INDONESIA

B. Ketua Peneliti :

Nama : Jola Rahmahani, drh., MKes.  
Jenis Kelamin : Perempuan  
NIP : 131576468  
Pangkat/Golongan : Penata Tk I / III-D  
Bidang Keahlian : Biologi Kedokteran  
Jabatan Sekarang : Lektor Kepala  
Jurusan/Fakultas/Pusat Penelitian : Kedokteran Hewan  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C Tim Peneliti :

No.	Nama Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi
1.	Dr. Suwarno, MSi., drh.	Imunovirologi	FKH Unair
2.	Sri Susila Andajani, drh.	Kultur Sel	Pusvetma, SBY
3.	Kusnoto, MSi., drh.	Imunologi	FKH Unair

D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

Jangka Waktu Penelitian yang Diusulkan :

Biaya Total yang Diusulkan : 150.000.000  
Biaya yang Disetujui th 2006/2007 : Rp. 40.000.000,-  
Biaya yang Disetujui th 2007/2008 : Rp. 40.000.000,-

Mengetahui :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,



Prof. Romziah Sidik, drh., PhD.  
NIP. 130 687 305

Surabaya, 12 Januari 2008  
Ketua Peneliti,

Jola Rahmahani, drh., MKes.  
NIP. 131 576 468



Mengetahui :

Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga,

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS.  
NIP. 130 705 125

## RINGKASAN

RANCANG STRUKTUR F(ab)<sub>2</sub> ANTI-IDIOTIP HOMOLOG EPITOP GLIKOPROTEIN SEBAGAI PROTOTIP VAKSIN RABIES DI INDONESIA  
(Jola Rahmahani, Suwarno, Sri Susila Andayani, dan Kusnoto. 30 halaman)

Protein-G virus rabies yang merupakan protein eksternal, mempunyai peran penting dalam patogenitas dan antigenesitas virus, serta mampu menimbulkan antibodi netralisasi yang bersifat protektif. Protein-G bereaksi dengan reseptor seluler dan juga penting untuk menentukan kisaran inang (*host range*) (Tuffereau *et al.*, 1998). Injeksi protein-G virus rabies pada mencit akan menghasilkan antibodi anti-protein-G (Ab1). Injeksi Ab1 pada spesies lain akan menimbulkan respons imun. Mula-mula Ab1 dengan konfigurasi asing akan dianggap sebagai antigen *non-self*, dan akan diproses oleh *antigen presenting cell* (APC). Bagian idiotip yang berada pada ujung *fragment antigen binding* (Fab) dari molekul Ab1 bertindak sebagai imunogen. Bersama dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) II, imunogen akan diekspresikan pada permukaan APC. Pengenalan oleh limfosit, menyebabkan sel B akan berproliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma untuk mensintesis Ab2 (antibodi anti-idiotip).

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yang akan dilakukan selama tiga tahun. Tahap 1 (tahun pertama) adalah perbanyakkan antibodi anti-protein-G (poliklonal dan monoklonal) terhadap protein-G virus rabies yang diperoleh pada penelitian sebelumnya (Rahmahani dkk., 2004), pemurnian antibodi anti-protein-G dengan *coloum chromatography*, uji imunogenesitas anti-protein-G pada kelinci, digesti antibodi anti-protein-G dengan enzim pepsin, karakterisasi antibodi anti-protein-G dengan SDS-PAGE dan *western blot*, serta uji antigenesitas antibodi anti-protein-G dengan *indirect-ELISA*. Tahap II (Tahun II), produksi anti-idiotip pada kelinci, pemurnian anti-idiotip, digesti anti-idiotip dengan pepsin, karakterisasi F(ab)<sub>2</sub> anti-idiotip, uji homologi antigenik antara idiotip pada anti-idiotip dengan epitop pada glikoprotein, uji imunogenesitas F(ab)<sub>2</sub> anti-idiotip pada mencit. Tahap akhir (Tahun III)

penentuan dosis vaksin, pembakuan  $F(ab)_2$  anti-idiotip sebagai vaksin, meliputi serangkaian uji, yaitu uji sterilitas (*sterility*), titrasi vaksin (*quality*), uji inokuitas (*safety*) dan uji potensi (*protectivity*). Sehubungan dengan kebijakan pemerintah melalui Dirjen Dikti, di mana dana penelitian dihentikan hanya sampai pada tahun kedua, maka penelitian tahun ketiga dengan sangat terpaksa tidak dapat dilanjutkan.

Hasil penelitian menunjukkan, bahwa : 1) Imunogenesitas antibodi (Ab1) anti-protein-G monoklonal lebih baik daripada anti-protein-G poliklonal di dalam memicu pembentukan antibodi spesifik, sehingga lebih layak digunakan sebagai bahan baku pembuatan vaksin  $F(ab)_2$  anti-idiotip (Ab2). 2) Antibodi anti-protein-G dan antibodi anti-idiotip dapat didigesti dengan enzim pepsin menjadi fragmen  $F(ab)_2$  dengan berat molekul 114 kDa. 3) Protein-G virus rabies dan fragmen  $F(ab)_2$  anti-idiotip memiliki struktur yang sama dan kedua antigen dapat bereaksi dengan antibodi anti-protein-G.

(Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Airlangga)



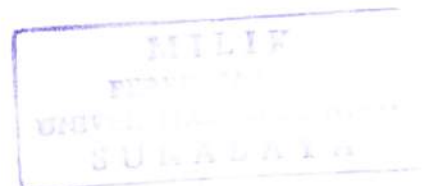
# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Penyakit rabies di Indonesia masih bersifat endemik pada beberapa propinsi, seperti di propinsi Sumatera, Kalimantan, Sulawesi dan Nusa Tenggara (Dibia, 2000; Sugiarto. 2001, Sosiawan dkk, 2005, Supriyadi dkk., 2005). Keterbatasan jumlah vaksin, jangkauan vaksinasi yang masih kurang dan ditunjang kemungkinan adanya karnivora liar (rubah, serigala, musang, anjing hutan dan sebagainya) sebagai reservoir, serta adanya mutasi virus rabies, merupakan problem serius yang sedang dihadapi (Suwarno, 2005).

Virus rabies dengan ukuran  $75 \times 180$  nm dan berat molekul (BM)  $4,6 \times 10^6$  Da, tergolong virus *single stranded ribonucleic acid* (ss-RNA) polaritas minus (-). Virus yang termasuk genus *Lyssavirus* dari famili *Rhabdoviridae* ini, genomnya tersusun atas lima daerah penyandi protein, dengan sekuens 3'-N-P-M-G-L-5'. Genom ini menyandi protein inti (N), fosfo (P), matriks (M), gliko (G) dan polimerase atau transkriptase (L). Protein-G dan M terletak pada amplop virus, sedangkan protein-N, P dan L berada dalam nukleokapsid (Arai, 1996).

Protein-G yang merupakan protein eksternal, mempunyai peran penting dalam patogenitas dan antigenesitas virus, serta mampu menimbulkan antibodi netralisasi yang bersifat protektif. Protein-G bereaksi dengan reseptor seluler dan juga penting untuk menentukan kisaran inang (*host range*) (Tuffereau *et al.*, 1998). Peran respons imun humoral dengan pembentukan antibodi netralisasi akan dapat menetralkan virus rabies dalam tubuh dan yang lebih penting sifat



protektif yang ditunjukkan oleh antibodi anti-protein-G dalam melindungi hewan dari kematian akibat infeksi virus rabies (CDC, 2003).

Injeksi protein-G virus rabies pada mencit akan menghasilkan antibodi poliklonal. Apabila sel B peka antigen (protein-G) dari limpa mencit yang diimunisasi dengan protein-G difusikan dengan sel mieloma, akan dihasilkan hibridoma yang mampu memproduksi antibodi monoklonal anti-protein-G. Spesifikasi antibodi monoklonal anti-protein-G adalah hanya terdiri dari satu subklas immunoglobulin (Ig) dan tertuju hanya terhadap protein-G (Suwarno, 2003; Rahmahani dkk., 2004). Menurut Hermadi dkk.(2002), injeksi Ab1 (antibodi anti-protein-G) pada spesies lain akan menimbulkan respons imun. Mula-mula Ab1 dengan konfigurasi asing akan dianggap sebagai antigen *non-self*, dan akan diproses oleh *antigen presenting cell* (APC). Bagian idiotip yang berada pada ujung *fragment antigen binding* (Fab) dari molekul Ab1 bertindak sebagai imunogen. Bersama dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) II, imunogen akan diekspresikan pada permukaan APC. Pengenalan oleh limfosit, menyebabkan sel B akan berproliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma untuk mensintesis Ab2 (antibodi anti-idiotip).

Melalui digesti dengan enzim pepsin terhadap Ab2, akan diperoleh F(ab)2 anti-idiotip yang bebas dari bagian *fragment crystalizable* (Fc) dan dapat mengurangi reaksi imunologis yang mungkin terjadi (Jones and Landon, 2002). Pepsin akan memotong immunoglobulin (Ig) pada ikatan rantai berat (*Heavy chain*) di belakang ikatan disulfida, sehingga menghasilkan satu bagian F(ab)2, sedangkan bagian Fc (*fragmen crysralizable*) akan terpecah menjadi fragmen

yang lebih kecil. Bagian idiotip F(ab)2 pada *combining site* pada Ab2 telah terdesain secara alamiah, sehingga memiliki struktur yang homolog dengan antigen pemicu pencetusnya.

Apabila F(ab)2 anti-idiotip yang memiliki struktur mirip dengan protein-G virus rabies diinjeksikan pada hewan, dapat membentuk antibodi anti-anti-idiotip. Keistimewaan Ab3 adalah memiliki fungsi yang sama dengan Ab1 (Ameri and Zhou, 2006)). Proses pemblokiran reseptor nikotinik asetilkolin pada *neuromuscular junction* dan sistem syaraf pusat oleh antibodi Ab3 yang mirip dengan Ab1, menyebabkan virus rabies melalui protein-G gagal melakukan *attachment* pada membran plasma. Pada sisi lain Ab3 akan bekerja untuk menetralsir virus rabies (Baer, 1993; Lewis *et al.*, 2000).

Alternatif penggunaan vaksin F(ab)2 anti-idiotip sebagai vaksin rabies dapat diaplikasikan di Indonesia secara aman dan murah. Vaksin F(ab)2 anti-idiotip dapat diproduksi pada hewan coba (kuda, domba atau kelinci), sehingga keberadaannya mirip dengan *equine rabies immunoglobulin* (ERIG) sebagai serum anti-rabies. Keunikan vaksin F(ab)2 anti-idiotip sebagai vaksin yang mampu memicu pembentukan antibodi anti-rabies adalah adanya kemiripan struktur idiotip pada bagian Fab yang homolog dengan struktur epitop pada protein-G virus rabies. Vaksin F(ab)2 anti-idiotip ini diharapkan dapat memicu pembentukan antibodi anti-anti idiotip (Ab3) yang bersifat protektif, dapat menghambat pertumbuhan virus rabies melalui netralisasi dan pemblokiran terhadap reseptor nikotinik asetilkolin pada jaringan syaraf.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka yang menjadi permasalahan adalah :

1. Apakah antibodi anti-protein-G poliklonal dan monoclonal terhadap virus rabies strain alam (Ab1) memiliki imunogenisitas yang sama dalam memicu pembentukan antibodi anti-idiotip (Ab2)?
2. Apakah antibodi anti-protein-G (Ab1) dan antibodi F(ab)2 anti-idiotip (Ab2) memiliki kesamaan karakter berdasarkan berat molekul pasca digesti dengan pepsin?
3. Apakah terdapat kesamaan struktur antara protein-G virus rabies strain alam dengan fragmen F(ab)2 dari Ab2 berdasarkan reaksinya terhadap antibodi anti-anti-idiotip (Ab3)?

## 1.3 Luaran Penelitian

Hasil yang ditargetkan dalam penelitian ini adalah : 1) memproduksi F(ab)2 anti-idiotip terhadap antibodi anti-protein-G virus rabies strain alam, dan 2) pembakuan F(ab)2 anti-idiotip sebagai kandidat vaksin rabies yang bersifat protektif, aman dan murah dengan melihat struktur idiotip pada anti-idiotip dengan epitop pada protein-G.

## **BAB 2**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN I DAN II**

#### **2.1 Tujuan Penelitian**

##### **2.1.1 Tujuan khusus penelitian jangka pendek**

Penelitian pada tahun pertama ini bertujuan untuk :

- 1) Mendapatkan gambaran imunogenesitas antibodi anti-protein-G (poliklonal dan monoklonal) sebagai bahan baku pembuatan vaksin F(ab)2 anti-idiotip.
- 2) Mengetahui karakter antibodi anti-protein-G dan antibodi F(ab)2 anti-idiotip pasca digesti dengan enzim pepsin berdasarkan berat molekul.
- 3) Mengetahui kesamaan antigenik antara protein-G virus rabies dengan F(ab)2 anti-idiotip berdasarkan reaksinya terhadap antibodi anti-anti-idiotip (Ab3).

##### **2.1.2 Tujuan khusus jangka panjang**

Secara keseluruhan selama 3 tahap penelitian ini bertujuan untuk pembakuan F(ab)2 anti-idiotip sebagai kandidat vaksin rabies yang memiliki potensi yang lebih baik dari vaksin rabies inaktif, bersifat protektif, aman dan murah.

#### **2.2 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dengan aplikasi terapan terhadap produk vaksin F(ab)2 anti-idiotip sebagai upaya pencegahan dan pengendalian rabies di Indonesia.

## BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA

### 3.1 Molekul Immunoglobulin

Molekul imunoglobulin (Ig) atau antibodi merupakan molekul glikoprotein, yang tersusun dari 82-96% polipeptida dan 4-18% karbohidrat. Aktivitas biologiknya sebagian besar ditentukan oleh komponen polipeptidanya (Subowo, 1993).

Imunoglobulin dihasilkan oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B yang terjadi setelah kontak dengan antigen. Molekul Ig mempunyai empat rantai polipeptida dasar yang terdiri atas dua rantai berat (*heavy chain*) atau rantai H, dan dua rantai ringan (*light chain*) atau rantai L, yang dihubungkan satu sama lain oleh ikatan disulfide. Rantai L terdiri dari kappa ( $\kappa$ ) dan lambda ( $\lambda$ ), masing-masing disusun oleh 230 asam amino. Rantai H terdiri atas lima jenis, yakni  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  dan  $\epsilon$  yang akan menentukan kelas Ig M, Ig G, Ig A, Ig D dan Ig E, masing-masing disusun oleh 450 -600 asam amino. Berat molekul (BM) berturut-turut masing-masing kelas adalah 900, 150-160, 160-165, 180 dan 190-200 kDa (Baratawidjaja, 2004).

Penambahan enzim papain pada molekul Ig, akan menyebabkan pemutusan rantai H pada daerah engsel di depan ikatan disulfida, sehingga menghasilkan komponen dua fragmen Fab dan satu fragmen Fc. Fragmen Fab masih tetap mampu mengikat antigen dan fragmen Fc tetap dapat terikat pada reseptor Fc pada permukaan sel yang memilikinya. Molekul Ig apabila ditambahkan enzim pepsin atau tripsin, akan mengalami pemutusan rantai H di

belakang ikatan disulfida, sehingga terbentuk satu molekul F(ab)<sub>2</sub> yang masih tetap dapat mengikat antigen dan bagian Fc akan mengalami fragmentasi menjadi fragmen kecil (Kerr *et al.*, 1994; Jones and Landon, 2002).

### 3.2 Jenis Epitop

Epitop atau antigen determinan adalah bagian dari antigen yang dapat membuat kontak fisik dengan reseptor Ig atau antibodi, menginduksi pembentukan antibodi, dapat diikat secara spesifik oleh bagian dari antibodi atau oleh reseptor antibodi. Antibodi dapat bersifat sebagai antigen apabila disuntikan pada spesies lain secara berulang-ulang (Baratawidjaja, 2004).

Molekul Ig memiliki tiga jenis epitop, yaitu isotip, alotip dan idiotip. Isotip merupakan epitop yang menentukan kelas dan subkelas Ig (antibodi) apabila terletak pada rantai H dari regio C (*constant*), dan akan menentukan tipe dan subtype apabila terletak pada rantai L dari regio C. Pemindahan pasif Ig atau anti- $\gamma$  atau anti- $\alpha$  akan mengganggu produksi Ig G atau Ig A (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993).

Alotip merupakan epitop yang bersifat polimorfik dan akan diwariskan menurut hukum Mendel. Epitop ini ditemukan tidak pada setiap kelas yang ada dan biasanya terdapat pada regio C. Apabila alotip terdapat pada rantai- $\gamma$ , maka setiap alotip merupakan nomenklatur Gm1, Gm2, Gm3 dan sebagainya; sedangkan apabila terletak pada rantai- $\kappa$ , maka alotipnya diberi lambing Km1, Km2 dan sebagainya. Penyuntikan antibodi paternal menyebabkan supresi

terhadap munculnya molekul Ig yang membawa alotip paternal (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993).

Idiotip merupakan molekul epitop yang terdapat pada regio V (*variable*) yang memberikan ciri khas antibodi. Idiotip terletak pada daerah pengikat antigen, sehingga apabila idiotip ini menimbulkan respons imun humoral, struktur spesifisitas antibodi yang terbentuk (*anti-idiotip*) akan mirip dengan epitop antigen penyebab antibodi pertama (Ameri and Zhou, 2006). Pemberian antibodi lawan determinan idiotip dapat menekan produksi Ig yang membawa determinan idiotip tertentu (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993). Menurut Poskitt *et al.*(1992), idiotip terdiri dari beberapa idiotop. Idiotop ada yang terletak pada *combining site* dari molekul Ig yang disebut paratop, atau terdapat pada bagian lain dari regio V yang disebut *region frame work*. Diperkirakan terdapat 15-20 idiotop pada setiap idiotip dalam satu molekul Ig, atau satu dari 15-20 reseptor limfosit B terdapat reseptor yang spesifik terhadap idiotop, yang dapat berikatan dengan idiotip antibodi.

### 3.3 Klas Anti-idiotip

Anti-idiotip secara serologik diklasifikasikan menjadi empat kategori, yakni Ab2 $\alpha$ , Ab2 $\beta$ , Ab2 $\gamma$ , dan Ab2. Parameter yang digunakan untuk mendefinisikan masing-masing anti-idiotip didasarkan atas ikatan pada *antigen-binding site* atau pada *framework region* lainnya. Jika target idiotop tertuju pada bagian dalam *antigen-binding site*, maka anti-idiotip lebih dikenal dengan istilah Ab2 $\beta$ . Anti-idiotip yang tidak menghalangi antigen dikenal dengan Ab2 $\alpha$  dan kiranya dapat



mengikat bagian dari *framework region*. Anti-idiotip yang mengenali idiotip dalam *antigen-binding site* tetapi tidak membawa *internal image* dari antigen asli disebut Ab2 $\gamma$ . Anti-idiotip yang mengenali idiotip pada Ab1 dari suatu epitop pada antigen dikenal dengan Ab2 (Poskitt *et al.*, 1992; Ameri and Zhou, 2006).

### 3.3 Virus Rabies

Komposisi kimia virus rabies terdiri dari 3-4% RNA, 67%protein, 3% karbohidrat dan 26% lipid. Struktur protein tersusun dari 5 komponen, yakni protein-G dengan BM 62-76 kDa, protein-N 54 kDa, protein-L 190 kDa, protein-M 24 kDa dan protein-P 37 kDa. Protein L, N dan P terikat secara non-kovalen pada virion RNA, dan menghasilkan kompleks nukleokapsid yang berbentuk gulungan heliks dalam virion. Nukleokapsid dikelilingi amplop lipoprotein yang terdiri dari protein-M dan pada permukaan virion terdapat *spike* protein-G (Plotkin and Koprowski, 1994; Arai, 1996; Edwards, 1999).

### 3.4 Vaksin Rabies

Louis Pasteur pertama kali menemukan vaksin rabies pada tahun 1884. Semenjak saat itu vaksin rabies mengalami perkembangan pesat. Sampai tahun 1950-an semua vaksin rabies yang beredar berasal dari virus rabies yang dibiakkan pada korda spinalis kelinci, otak kambing, domba, kelinci atau mencit dan embrio itik. Virus kemudian diinaktivasi dengan cara pemanasan, sinar ultraviolet, penambahan fenol atau beta-propiolakton (BPL). Vaksin ini banyak menimbulkan efek samping, karena adanya *residual live virus*, mengandung

jaringan syaraf dan protein hewan, serta menyebabkan reaksi alergi pasca vaksinasi. Termasuk vaksin pada periode ini adalah vaksin rabies Fermi, Semple, Fuenzalida, dan *duck embryo* (WHO, 1992).

Vaksin rabies yang dibiakkan pada kultur *human diploid cells* (HDC) mulai dikembangkan pada tahun 1958. Virus dimurnikan dengan ultrasentrifugasi dan diinaktifkan dengan formalin, BPL, atau sinar ultraviolet. Respons imun yang ditimbulkan oleh vaksin generasi kedua ini jauh lebih baik daripada vaksin generasi pertama (WHO, 1992).

Vaksin rabies yang dibiakkan pada kultur sel embrio ayam, embrio itik, ginjal anak hamster dan sel vero telah dikembangkan pada tahun 1960-an. Virus dipisahkan dengan ultrasentrifugasi dengan bahan inaktifan BPL. Efek samping yang muncul lebih ringan atau hanya sedikit reaksi alergi (WHO, 1992).

Vaksin rabies generasi keempat muncul pada tahun 1980-an dengan hadirnya vaksin rekombinan dan vaksin sub-unit. Vaksin rekombinan dibuat dengan menginsersikan gen-G atau gen-N virus rabies ke dalam vektor virus *vaccinia*, *canary pox*, *adeno*, atau *baculo*. Ekspresi protein-G atau protein-N menghasilkan antibodi netralisasi yang dapat melindungi hewan dari serangan virus rabies (Plotkin and Koprowski, 1994; Arai, 1996).

## BAB 4 METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yang akan dilakukan selama tiga tahun.

Tahap 1 (tahun pertama) adalah perbanyakkan antibodi anti-protein-G (poliklonal dan monoklonal) terhadap protein-G virus rabies yang diperoleh pada penelitian sebelumnya (Rahmahani dkk., 2004), pemurnian antibodi anti-protein-G dengan *column chromatography*, uji imunogenesitas anti-protein-G pada kelinci, digesti antibodi anti-protein-G dengan enzim pepsin, karakterisasi antibodi anti-protein-G dengan SDS-PAGE dan *western blot*, serta uji antigenesitas antibodi anti-protein-G dengan *indirect-ELISA*.

Tahap II (Tahun II), produksi anti-idiotip pada kelinci, pemurnian anti-idiotip, digesti anti-idiotip dengan pepsin, karakterisasi  $F(ab)_2$  anti-idiotip, uji homologi antigenik antara idiotip pada anti-idiotip dengan epitop pada glikoprotein, uji imunogenesitas  $F(ab)_2$  anti-idiotip pada mencit.

Tahap akhir (Tahun III) penentuan dosis vaksin, pembakuan  $F(ab)_2$  anti-idiotip sebagai vaksin, meliputi serangkaian uji, yaitu uji sterilitas (*sterility*), titrasi vaksin (*quality*), uji inokuitas (*safety*) dan uji potensi (*protectivity*). Sehubungan dengan kebijakan pemerintah melalui Dirjen Dikti, di mana dana penelitian dihentikan hanya sampai pada tahun kedua, maka penelitian tahun ketiga dengan sangat terpaksa tidak dapat dilanjutkan.

### 4.1 Perbanyakkan Antibodi anti-protein-G

Klon hibridoma penghasil antibodi monoklonal (IgG2a) dikultivasi secara *in vitro* menggunakan medium RPMI-1640 dan DMEM yang mengandung 10%

FCS, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 IU antibiotik (Penstrep). Hibridoma yang tampak konfluen pertumbuhannya kemudian dipanen supernatannya (mengandung antibodi monoklonal (IgG2a). Antibodi tersebut selanjutnya dimurnikan dan ditentukan kadarnya.

#### **4.2 Pemurnian Antibodi Anti-protein-G**

Pemurnian antibodi monoklonal dilakukan dengan teknik *coloum chromatography* menggunakan protein A, yang dipreparasi dalam protein A-*ultrogel coloum* menurut cara Harlow and Lane (1988).

#### **4.3. Digesti Anti-protein-G dengan Pepsin**

Untuk menghasilkan F(ab)<sub>2</sub>, anti-protein-G monoklonal utuh didigesti dengan penambahan enzim pepsin. Antibodi anti-protein-G dimasukkan ke dalam larutan 0,1 M natrium asetat pH 4,2 dan pepsin dengan perbandingan 33:1 dan selanjutnya diinkubasi dalam *waterbath* suhu 37° C selama 8 jam. Reaksi kemudian dihentikan dengan penambahan 2 M Tris pH 7-8 (Kerr *et al.*, 1994).

#### **4.4 Uji Immunogenesitas Anti-protein-G (Monoklonal/ Poliklonal) utuh dan Fragmen anti-protein-G**

Tiga ekor kelinci diinjeksi dengan 50 µg/ml anti-protein-G monoklonal dan tiga ekor yang lain diinjeksi dengan 50 µg/ml anti-protein-G poliklonal, serta tiga ekor kelinci lagi diinjeksi dengan fragmen anti-protein-G (yang telah didigesti dengan pepsin). Injeksi dilakukan sebanyak empat kali (injeksi pertama dengan

*complete Freund's adjuvant*, CFA dan injeksi berikut dengan *incomplete Freund's adjuvant*, IFA). Dua minggu pasca injeksi yang terakhir dilakukan pengambilan darah guna identifikasi anti-protein-G untuk karakterisasi derajat imunogenesitas dan antigenesitasnya.

#### **4.5 Karakterisasi Anti-protein-G Utuh dan Fragmen anti-protein-G dengan SDS-PAGE dan Western Blot**

Antibodi anti-idiotip dianalisis dan dilakukan preparasi protein untuk melihat berat molekul (BM) dengan teknik SDS-PAGE dan akhirnya protein ditransfer ke membran nitrocellulose dan selanjutnya dilakukan *blotting*.

##### **a. Denaturasi partikel imunoglobulin**

Sebanyak 20  $\mu$ l sampel Ig ditambahkan 600  $\mu$ l bufer lisis I kemudian ditambahkan 300  $\mu$ l bufer lisis II dan dicampur baik-baik kemudian dibagi 50  $\mu$ l untuk setiap tabung steril. Sampel yang mengandung 2000 PFU/ $\mu$ l kemudian dipanaskan pada temperatur 65°C selama 15 menit sebelum di-*loading* pada gel atau disimpan pada -80°C sampai digunakan penelitian lanjutan.

##### **b. SDS-PAGE (*Polyacrylamid gel electrophoresis*)**

Setelah larutan gel pemisah 15% dimasukkan pada gel plate pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan whatman paper. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul *set*. Selanjutnya *comb* diambil dan dicuci dengan aquadest kemudian diberi bufer. Sampel yang

sudah diampur dengan bufer lisis I/II dipanaskan 65°C selama 15 menit kemudian 10 ul sampel dimasukkan ke lubang dengan tip 200 µl. Setelah itu *power supply* di-start dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian, di matikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan selanjutnya dicuci dengan bufer.

c. *Semi-dry blotting*

Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Enam *sheets* kertas absorben pada anoda bufer I dan 3 *sheets* pada anoda bufer II dan 6 *sheets* pada katoda bufer. Membran PVDF di inkubasikan pada anoda bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari bufer I, 3 *sheets* dari bufer II, PVDF, poliakrilamid dan 6 *sheets* kertas absorben dari katoda bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan 0,8 mA/cm<sup>2</sup> dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan *blotting*.

d. *Blotting*

PVDF *blot* diblok dengan skim milk 5 % selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS 2 kali. Selanjutnya direaksikan dengan antibodi monoklonal dan poliklonal. Setelah itu diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1 jam. Setelah dicuci dengan larutan TBS sebanyak 3 kali direaksikan dengan konjugat alkalin fosfatase dan substrat p-NPP dan diwarnai dengan *western blue*. Akhirnya dikeringkan pada

temperatur ruangan. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik, berat molekul protein dan kemudian dilakukan isolasi protein.

#### **4.6 Uji Antigenesitas Anti-protein-G Utuh dan Fragmen anti-protein-G dengan Teknik *Indirect*-ELISA**

Sebanyak 2 ug/ml antibodi anti-protein-G virus rabies (utuh / fragmentasi) bentuk monoklonal atau poliklonal dilekatkan pada mikroplat ELISA dalam bufer karbonat pH 9,6 sebanyak 100 µl/sumuran. Plat kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam dan diblok dengan menggunakan bufer bloking (PBS-Tween yang mengandung susu skim 4%), serta diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama satu jam. Plat dicuci dengan bufer pencuci (NaCl-Tween) sebanyak empat dan ditambahkan antibodi yang diuji (anti-protein-G) pada pengenceran 1/100-1/25.600 sebanyak 100 µl/sumuran. Plat diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama satu jam dan kemudian dicuci dengan cara yang sama. Pasca pencucian ditambahkan konjugat goat-anti-rabbit yang berlabel enzim alkali fosfatase pada pengenceran 1/4000 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Selanjutnya plat dicuci kembali untuk kemudian ditambahkan substrat pNPP (2,7 mM/l0 dalam buffer substrat (1 M dietanolamin) sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada ruang gelap selama 10-30 menit. Resapan dibaca pada panjang gelombang 405 nm.

#### **4.7 Produksi Anti-idiotip pada Kelinci**

Antibodi monoklonal anti-glikoprotein yang diperoleh secara *in vivo* dari

cairan ascites mencit diinjeksikan pada dua ekor kuda. Injeksi dilakukan sebanyak empat kali dengan interval waktu 2 minggu. Adanya antibodi anti-idiotipik diuji dengan *indirect-ELISA*. Anti-idiotip dengan titer tinggi selanjutnya dimurnikan dengan *column chromatography*.

#### **4.8 Pemurnian Anti-idiotip**

Pemurnian antibodi anti-idiotipik dilakukan dengan teknik *column chromatography* dengan menggunakan protein A, yang dipreparasi dalam protein A-Ultrogel coloum (25 ml) (Harlow dan Lane, 1999).

#### **4.9 Digesti Anti-idiotip dengan Pepsin**

Untuk menghasilkan  $F(ab)_2$ , antibodi anti-idiotip utuh didigesti dengan penambahan pepsin. Sebanyak 5 mg/ml anti-idiotip diencerkan dalam 10 mMol Na-sitrat pH 3,5 selanjutnya ditambahkan 5 mg pepsin per mg antibodi dan dipanaskan dalam waterbath suhu 37°C selama 12-24 jam. Reaksi kemudian dihentikan dengan menambahkan 1:10 volume 3,0 M Tris pH 8,8, disentrifus pada 10.000 g selama 30 menit. Pemisahan  $F(ab)_2$  dari antibodi utuh dan bagian  $Fc$  dilakukan dengan *coloum chromatography* (Harlow dan Lane, 1999).

#### **4.10 Karakterisasi $F(ab)_2$ Anti-idiotip**

Antibodi anti-idiotip dianalisis dan dilakukan preparasi protein untuk melihat berat molekul (BM) dengan teknik SDS-PAGE dan akhirnya protein ditransfer ke membran nitrocellulose dan selanjutnya dilakukan *blotting*.



#### **4.11 Uji Kesamaan Antigenik antara Idiotip pada Anti-idiotip dengan Epitop pada protein-G**

Adanya kesamaan antigenik antara struktur idiotip pada anti-idiotipik dengan epitop pada glikoprotein dilakukan dengan *competitive-ELISA*. Anti-idiotipik dan glikoprotein virus rabies digunakan sebagai antigen, selanjutnya ditambah dengan antibodi anti-VP2 dari kelinci. Pasca pencucian ditambahkan konjugat *goat anti-Rabbit* yang berlabel enzim *alkaline phosphatase*. Terakhir ditambahkan substrat dan resapan dibaca pada panjang gelombang 405 nm. Hasil kesamaan antigenik didapat dengan membandingkan nilai *optical density* (OD) dari masing-masing antigen.

#### **4.12 Uji Immunogenesitas $F(ab)_2$ Anti-idiotip pada Mencit**

Untuk menguji kemampuan vaksin idiotipik dalam memicu pembentukan antibodi yang bersifat protektif, dilakukan injeksi pada sekelompok mencit, anjing dan kera. Injeksi dilakukan sebanyak tiga kali dengan interval waktu dua minggu. Pengukuran titer antibodi dilakukan dengan uji *indirect-ELISA*.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Imunogenesitas Antibodi Anti-protein-G

Hasil pengujian imunogenesitas antibodi anti-protein-G, baik poliklonal maupun monoklonal dapat dilihat pada Tabel 5.1. Titer antibodi terhadap antibodi anti-protein-G poliklonal ternyata lebih rendah daripada titer antibodi anti-protein-G monoklonal. Antibodi anti-protein-G monoklonal di dalam memicu pembentukan antibodi anti-anti-protein-G sangat spesifik sekali, sehingga dapat menghasilkan titer yang tinggi. Berdasarkan nilai OD terlihat, bahwa antibodi monoklonal memiliki titer 6400, sedangkan antibodi poliklonal dengan titer 800. Spesifisitas ini sangat ditentukan oleh kemurnian antibodi dan jenis subklas Ig dari antibodi monoklonal yang digunakan. Pada penelitian ini antibodi monoklonal yang digunakan adalah dari subklas Ig G2a dan berasal dari klon Jra-2, yang telah teruji kespesifikannya terhadap protein-G virus rabies. Antibodi ini dipanen dari supernatan hibridoma klon Jra-2 dan dimurnikan dengan *coloum chromatography* (Rahmahani dkk., 2004).

Hasil ini menunjukkan, bahwa penggunaan antibodi monoklonal sebagai bahan baku pembuatan vaksin anti-idiotip akan lebih spesifik dan menguntungkan dibanding antibodi poliklonal. Namun demikian untuk melihat karakter dari antibodi tersebut masih diperlukan serentetan uji untuk mengetahui sifat fisik, kimia dan biologik.

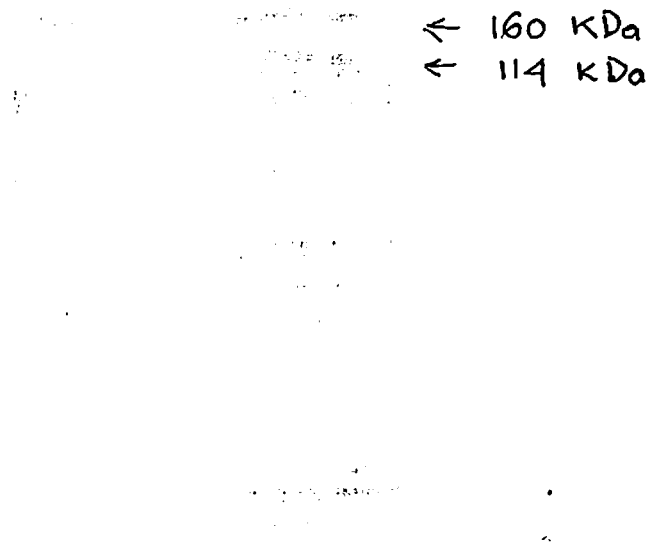
**Tabel 5.1 Hasil Pengujian Immunogenesitas Antibodi Anti-protein-G Virus Rabies pada Kelinci dengan Teknik *Indirect-ELISA***

Jenis Imunogen	Ulangan	Titer Antibodi
Anti-protein-G poliklonal	1	800
	2	800
	3	800
Anti-protein-G monoklonal	1	6400
	2	6400
	3	6400
Kontrol Negatif	1	0
	2	0

## 5.2 Karakterisasi Antibodi Anti-protein-G

Pada penelitian ini sebagai tahap awal untuk mengetahui karakter antibodi anti-protein-G dilakukan digesti terhadap antibodi tersebut dengan menggunakan enzim pepsin. Hasil karakterisasi antibodi anti-protein-G monoklonal dan poliklonal dengan teknik SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5.1. Gambar tersebut memperlihatkan, pita-pita protein dari antibodi-anti-protein-G monoklonal dan poliklonal, baik yang didigesti atau tidak. Pada kolom 1, antibodi monoklonal yang didigesti dengan pepsin, ternyata belum semua molekul terfragmentasi menjadi F(ab)<sub>2</sub>. Kolom tersebut menunjukkan dua pita protein dengan BM 160 kDa dan 114 kDa. Pita protein dengan BM 114 adalah molekul F(ab)<sub>2</sub>. Pada kolom 2 terlihat, bahwa molekul (BM) antibodi monoklonal (IgG<sub>2a</sub>) hanya menampilkan satu pita protein dengan BM 160 kDa; sedangkan pada kolom-3 dan kolom-4 molekul antibodi poliklonal memiliki beberapa pita protein selain protein dengan BM 160 kDa. Hal ini menunjukkan, bahwa antibodi monoklonal anti-protein-G memiliki karakter protein tunggal, sementara antibodi poliklonal masih terdiri dari beberapa jenis protein. Pada penelitian ini digesti

antibodi anti-protein-G asal mencit menggunakan enzim pepsin dilakukan selama 8 jam pada suhu 37° C dengan perbandingan antibodi : pepsin = 33 : 1 pada pH 4,2 (Kerr *et al.*, 1994), Menurut cara ini *relative rate* dari jenis subklas yang terfragmentasi adalah IgG3 = IgG2b > IgG2a > Ig G1. Subklas IgG2a tergolong sulit terfragmentasi. Bagian Fc tidak tampak karena terfragmentasi menjadi bagian yang sangat kecil. Menurut Jones *and* Landon (2002) digesti dengan enzim pepsin terhadap Ig domba dapat menghasilkan F(ab)2 dengan BM 100 kDa dan komponen kecil dengan BM ≤ 13 kDa.



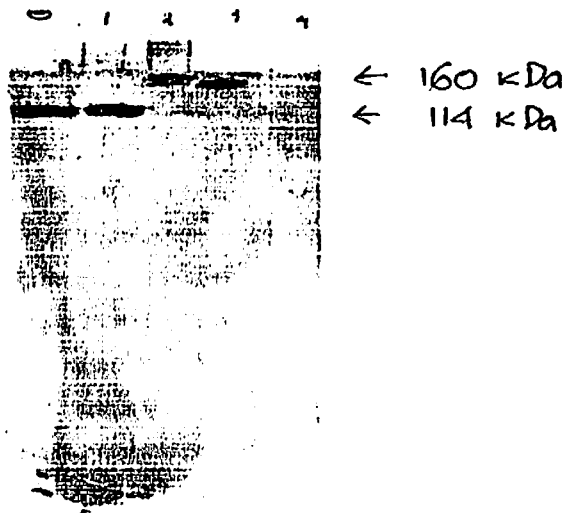
**Gambar 5.1 Hasil Preparasi Antibodi Anti-protein-G dengan Teknik SDS-PAGE.** Kolom 1 anti-protein-G monoclonal yang didigesti dengan pepsin, 2 anti-protein-G monoklonal utuh, 3 dan 4 anti-protein-G poliklonal utuh. M marker.

Digesti dengan cara ini tampaknya kurang sempurna, karena masih banyak molekul IgG2a yang belum terfragmentasi menjadi F(ab)2. Masih

banyaknya IgG2a yang belum terfragmentasi dapat dikarenakan pepsin tidak bekerja secara optimal. Perbedaan pH, waktu dan konsentrasi enzim menyebabkan hasil yang berbeda pula. Menurut Harlow *and* Lane (1988) pepsin dapat memfragmentasi antibody menjadi F(ab)<sub>2</sub> bila bekerja pada pH 3,5 pada suhu 37° C dalam waktu 12-24 jam dengan konsentrasi 5 mg/ml antibody.

Hasil identifikasi anti-protein-G monoklonal dan poliklonal dapat dilihat pada Gambar 5.2. Kolom 1 dan 2 adalah anti-protein-G monoklonal yang didigesti dengan pepsin yang menunjukkan F(ab)<sub>2</sub> dengan BM 114 kDa. Kolom 3 dan 4 berisi anti-protein-G monoclonal utuh. Semua pita protein dari anti-protein-G poliklonal utuh maupun terdigesti dengan pepsin teridentifikasi dengan antibody anti-anti-protein-G. Hasil *western blot* ini memperkuat hasil preparasi protein dari SDS-PAGE. Untuk memperkuat hasil identifikasi ini telah dilakukan pengujian untuk mengetahui antigenesitas dari molekul F(ab)<sub>2</sub> anti-protein-G dengan teknik *indirect-ELISA* (Tabel 5.2).

Hasil pengujian imunogenesitas dan antigenesitas fragmen anti-protein-G terlihat bahwa, spesifikasi F(ab)<sub>2</sub> anti-protein-G tampak lebih menonjol daripada anti-protein-G utuh di dalam mengenali antibody anti-idiotip. Anti-protein-G utuh hanya mengenali anti-F(ab)<sub>2</sub> sampai pada pengenceran 1/400, sedangkan F(ab)<sub>2</sub> anti-protein-G dapat mengenali antibody anti-idiotip sampai pada pengenceran 1/6400. Berdasarkan hasil ini dapat dikatakan, bahwa untuk



**Gambar 5.2 Hasil Identifikasi Fragmen Anti-protein-G dengan Teknik *Western Blot*. Kolom 1 dan 2 anti-protein-G monoklonal yang didigesti dengan pepsin, 3 dan 4 anti-protein-G poliklonal utuh.**

menghasilkan antibodi anti-idiotip yang spesifik sebaiknya digunakan antibodi dari fragmen F(ab)<sub>2</sub>, sehingga anti-idiotip yang terbentuk hanya tertuju pada fragmen F(ab)<sub>2</sub> dan tidak tertuju pada Fc. Hasil ini nantinya akan mendasari dalam pembuatan vaksin F(ab)<sub>2</sub> anti-idiotip yang homolog dengan epitop protein-G virus rabies.

**Tabel 5.2 Hasil Pengujian Immunogenesitas dan Antigenesitas F(ab)<sub>2</sub> Anti-protein-G Virus Rabies terhadap Antibodi anti-idiotip dengan Teknik *Indirect-ELISA***

Jenis Antigen	Pengenceran							
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Anti-protein-G	+	+	+	-	-	-	-	-
F(ab) <sub>2</sub> anti-protein-G	+	+	+	+	+	+	+	-

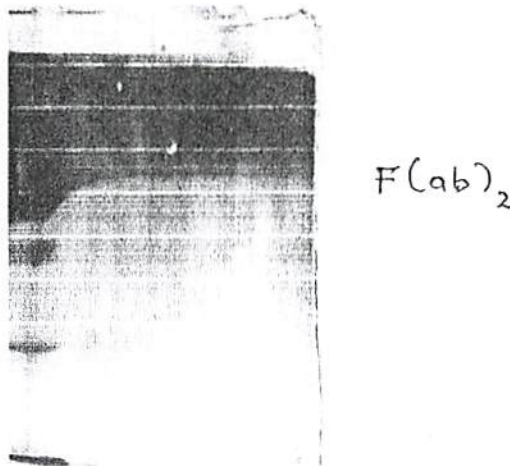
Ket : + positif, - negatif

### 5.3 Produksi Anti-idiotip pada Kelinci

Respons imun kelinci terhadap antibodi monoclonal anti-protein-G (Ab1) asal mencit tergolong baik. Hal ini terbukti dengan terbentuknya antibodi anti-idiotip (Ab2) yang makin meningkat titernya dari minggu ke minggu. Antibodi monoKlonal yang hanya terdiri dari satu subklas immunoglobulin (Ig G2a) dapat dianggap asing oleh tubuh kelinci, karena selain Ig G2a memiliki berat molekul 160 kDa, juga adanya perbedaan spesies yang menyebabkan kelinci dapat merespons Ig G2a asal mencit dengan baik.

### 5.4 Karakterisasi F(ab)2 anti-idiotip

Hasil karakterisasi F(ab)2 anti-idiotip yang telah didigesti dengan pepsin dapat dilihat pada Gambar 5.3. Pada Gambar SDS-PAGE tersebut



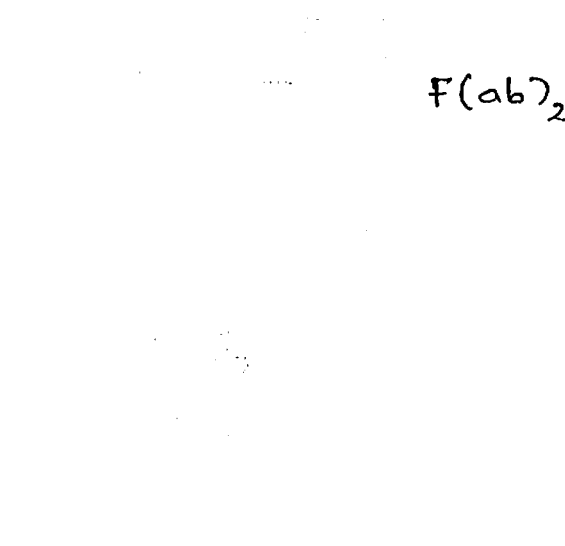
**Gambar 5.3 Hasil karakterisasi antibodi anti-idiotip F(ab)2 dengan teknik SDS-PAGE. Kolom 1-4 fragmen antibodi anti-idiotip F(ab)2, M marker.**

terlihat pita protein F(ab)2 anti-idiotip terlihat tunggal. Hal ini menunjukkan, bahwa proses digesti antibodi anti-idiotip telah terpotong dengan sempurna,



menjadi fragmen F(ab)<sub>2</sub> dengan berat molekul 114 kDa. Pemotongan antibodi anti-protein-G dan anti-idiotip ternyata menghasilkan fragmen F(ab)<sub>2</sub> dengan berat molekul yang sama yakni 114 kDa.

Pada hasil identifikasi protein F(ab)<sub>2</sub> dengan western blot tampak pada Gambar 5.4. Gambar tersebut menunjukkan, bahwa fragmen F(ab)<sub>2</sub> telah terikat dengan antibodi anti-protein-G sehingga menghasilkan pita tunggal



F(ab)<sub>2</sub>

**Gambar 5.4 Hasil identifikasi fragmen antibodi anti-idiotip F(ab)<sub>2</sub> dengan teknik *western blot*. Kolom 1-4 F(ab)<sub>2</sub> anti-idiotip.**

### 5.5 Uji Kesamaan Antigenik

Uji kesamaan antigenik dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran mengenai struktur antara protein-G virus rabies strain alam dengan fragmen F(ab)<sub>2</sub> anti-idiotip berdasarkan reaksinya terhadap antibodi anti-protein-G. Berdasarkan nilai OD dari hasil reaksi dapat dikatakan, bahwa kedua protein memiliki struktur antigenik yang serupa. Hal ini dibuktikan dengan menunjukkan dosis antigen dan pengenceran antibodi yang sama didapatkan nilai OD yang



relatif sama antara kedua protein. Penggunaan antigen dengan dosis 10 µg/ml pada pengenceran antibodi 1/100 didapatkan hasil paling tinggi dengan nilai OD 0,801 dan 0,808. Guancheng *et al.*(2001) menyatakan, bahwa sebagian anti-idiotip yang terbentuk akibat responsnya terhadap Ab1 dapat mengekspresikan determinan idiotip yang meniru antigen aslinya. Menurut Fields *et al.*(2002), antara antigen asli dan antibodi anti-idiotip mempunyai kemampuan berikatan secara kompetitif dengan antibodi anti-anti-idiotip (Ab3).

**Tabel 5.3 Nilai Optical Density Hasil Pengujian Kesamaan Antigenik Antara Protein-G Virus Rabies dengan F(Ab)2 Anti-idiotip terhadap Antibodi Anti-protein-G dengan *Indirect-ELISA***

Antigen	Dosis (µg/ml)	Pengenceran Antibodi					Rata-rata
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
Protein-G	2,5	0,444	0,321	0,279	0,245	0,198	0,297
	5	0,736	0,643	0,551	0,325	0,202	0,491
	10	1,222	0,949	0,847	0,669	0,486	0,834
<i>Rata-rata</i>		<i>0,801</i>	<i>0,638</i>	<i>0,559</i>	<i>0,413</i>	<i>0,295</i>	<i>0,541</i>
F(ab)2	2,5	0,472	0,228	0,201	0,187	0,145	0,246
	5	0,637	0,625	0,576	0,337	0,210	0,477
	10	1,314	1,002	0,598	0,350	0,224	0,698
<i>Rata-rata</i>		<i>0,808</i>	<i>0,618</i>	<i>0,525</i>	<i>0,291</i>	<i>0,193</i>	<i>0,556</i>

### 5.6 Uji Immunogenisitas F(ab)2 anti-idiotip pada Mencit

Hasil pengujian immunogenisitas F(ab)2 pada mencit dapat dilihat pada Tabel 5.6. Tabel tersebut menggambarkan adanya respons imun mencit setelah diinjeksi dengan F(ab)2 anti-idiotip. Pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 terus terjadi peningkatan titer antibodi anti-anti-idiotip. Hal ini menunjukkan, bahwa F(ab)2 anti-idiotip mampu memicu timbulnya antibodi dan kemungkinan besar dapat dimanfaatkan sebagai kandidat vaksin rabies. F(ab)2 anti-idiotip memiliki struktur antigenik yang serupa dengan protein-G virus rabies, oleh

karena anti-anti-idiotip (Ab3) yang terbentuk akan mirip dengan antibodi anti-protein-G (Ab1). Dengan demikian kemungkinan besar Ab3 akan dapat menetralkan virus rabies sama seperti Ab1 yang dapat menetralkan virus rabies.

**Tabel 5.4 Nilai Titer Antibodi Anti-anti-idiotip Hasil Pengujian Imunogenisitas F(ab)2 anti-idiotip pada Mencit dengan Indirect-ELISA**

Ulangan	Minggu				Rata-rata
	0	2	4	6	
1	0	400	3.200	12.800	4.100
2	0	400	6.400	25.600	8.100
3	0	400	3.200	12.800	4.100
4	0	200	1.600	12.800	3.650
5	0	400	6.400	25.600	8.100
Rata-rata	0	360	4.160	17.920	5.610

## **BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan :

- 1) Imunogenesitas antibodi (Ab1) anti-protein-G monoklonal lebih baik daripada anti-protein-G poliklonal di dalam memicu pembentukan antibodi spesifik, sehingga lebih layak digunakan sebagai bahan baku pembuatan vaksin F(ab)2 anti-idiotip (Ab2).
- 2) Antibodi anti-protein-G dan antibodi anti-idiotip dapat didigesti dengan enzim pepsin menjadi fragmen F(ab)2 dengan berat molekul 114 kDa.
- 3) Protein-G virus rabies dan fragmen F(ab)2 anti-idotip memiliki struktur yang sama dan kedua antigen dapat bereaksi dengan antibodi anti-protein-G.

### **6.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan :

- 1) Antibodi (Ab1) anti-protein-G virus rabies (monoklonal) dapat diaplikasikan untuk bahan baku pembuatan vaksin anti-idiotip (Ab2).
- 2) Perlu penelitian lanjutan untuk pengujian klinis F(ab)2 anti-idotip homolog epitop protein-G sebagai kandidat vaksin rabies di Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ameri, M., and E. Zhou. 2006. Idiotypes and anti-idiotypic antibodies : a review. *Comparative Clinical Pathology*. 14 (4) : 171-178.
- Arai, Y.T. 1996. Rabies Vaccine. In : *Vaccine Handbook*. 1<sup>st</sup> Ed. Researcher's Associates National Institute of Health. Maruzen, Tokyo. Pp 145-152.
- Baer, G.M. 1993. Rabies. In : *Mechanisms of Microbial Disease*. 2<sup>nd</sup> Ed. Williams & Wilkind, Baltimore. pp 437-444.
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-6 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- CDC. 2003. Rabies. [http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the\\_virus/virus.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm).
- Dibia, I.N. 2000. Surveilance dan pemberantasan rabies di Pulau Flores NTT. Rapat teknis dan pertemuan ilmiah kesehatan hewan, Departemen Pertanian dan Kehutanan, Bogor, 5-6 Oktober.
- Edward. 1999. Rabies : Disease transmission, progression, and control. <http://www.haverford.edu/biologi/edwards/disease/viralessays/highA.htm1>.
- Fields, B.A., F.A. Goldbaum, X. Ysern, R.J. Poljak, and R.A. Mariuzza. 2002. Molecular basis of antigen Mimicry by ab anti-idiotope. *Nature* 374 (6524) : 739-742.
- Guancheng, L., H. Jinyue, Z. Guohua, Z Jiangao, and S. Qubing. 2001. Monoclonal anti-idiotypic antibody bearing the internal image of nasopharyngeal carcinoma associated antigen. *Chin. Med. J.* 114 (9) : 962-966.
- Harlow, E., and D. Lane 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- Hermadi, H.A., Suwarno dan Kusnoto. 2002. Pengaruh pemberian antibodi anti-inhibin terhadap timbulnya antibodi anti-idiotipik pada mencit. *Media Kedokteran Hewan* 18 (1) : 12-16.
- Herscowitz, M.B. 1993. *Imunofisiologi : Fungsi sel dan interkasi seluler dalam pembentukan antibodi*. Dalam : *Imunologi III*. J.A. Bellanti. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 126-172.
- Jones, R.G.A., and J. Landon. 2002. Enhanced pepsin digestion : a novel process for purifying antibody F(ab')<sub>2</sub> fragments in high yield from serum. *J Immunol Methods*. 263 : 57-74.

- Kerr, M.A., L.M. Loomes, and S.J. Thorpe. 1994. Purification and fragmentation of immunoglobulins. In: *Immunochemistry*. Labrax. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- Lewis, P., Y. Fu, and L.C. Lentz. 2000. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle Nerve* 23 : 720-730.
- Plotkin, S.A., and H. Koprowski. 1994. Rabies Vaccine. In : *Vaccines*. 2<sup>nd</sup> Ed. W.B. Saunders Company Philadelphia.pp : 649-670.
- Poskitt, D., M. Killing, B. Jean-Francois, S. Turbull, L. MacDonald, and D. Yasmeen. 1992. Anti-idiotypic vaccines in theory and practice. *Today's Life Science*. 4 : 44-49.
- Rahmahani, J. Suwarno, S.S. Andajani, dan Kusnoto. 2004. Karakterisasi glikoprotein virus rabies strain alam pada pembuatan antibodi monoklonal untuk deteksi dini dengan DAS-ELISA. Laporan Penelitian Hibah Bersaing X Perguruan Tinggi. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Sosiawan, H.B., Y. Miswati, dan D. Faizal. 2005. Laporan Kasus Rabies di Wilayah BPPV Regional II Bukittinggi. Rakor rabies se-Sumatera di Padang, Agustus.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa Bandung. Hal 75-89.
- Sugiarto. 2001. Laporan Diagnosis Rabies Periode 1996/2001 di Wilayah Kerja BPPV Regional VII Maros.
- Supriyadi, A., S. Hadi, dan J.S. Kalianda. 2005. Perkembangan pembebasan rabies di Kalimantan. Rakor rabies se-Kalimantan di Pontianak ,25 – 27 Juli.
- Suwarno. 2003. Produksi antibody monoclonal dengan antigen spesifik untuk tujuan imunodiagnosis dan imunoterapi. *Media Ked Hewan* 10 (3) : 97-101.
- Suwarno. 2005. Karakterisasi molekuler protein serta gen penyandi nukleoprotein dan glikoprotein virus rabies dari beberapa daerah geografik di Indonesia. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Tuffereau, C., J. Benejean, A.M.R. Alfonso, A. Fahmad, and M.C. Fishman. 1998. Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant Baculovirus on the surface of lepidopteran cells. *J Virol* 72 : 1075 – 1081.

WHO. 1992. Expert Committee on Rabies. 8<sup>th</sup> Report, WHO Technical Report Series. No. 824. Geneva.







