

Penelitian

Preparasi Immunoglobulin Yolk (IgY) Spesifik Virus Rabies untuk Pengembangan Kit Diagnostik

*Preparation of RabiesVirus -Specific Yolk Immunoglobulin (IgY)
for The Development of Diagnostic Kits*

Suwarny Ruhi¹, Sri Murtini^{2*}, Okti Nadia Poetri², Retno D. Soejoedono²

¹Sekolah Pascasarjana, Program Studi Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

²Bagian Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

*Penulis untuk korespondensi: smurtinifs@yahoo.com

Diterima 2 Agustus 2017, Disetujui 7 Desember 2017

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan mengkarakterisasi IgY anti rabies sebagai bahan diagnostik. Ayam petelur usia produktif divaksinasi dengan vaksin rabies inaktif secara parenteral melalui rute intramuskular dengan dosis 0,5 ml sebanyak 2 kali. Keberadaan IgY pada telur dievaluasi dengan metode ELISA. Konsentrasi total protein IgY di hitung dengan metode Bradford. IgY dipurifikasi menggunakan dua metode yaitu : 1) pengendapan dengan NaCl, PEG 6000-amonium sulfat; 2) teknik *Water Soluble Fraction* (WSF), dilanjutkan pengendapan dengan PEG 6000-amonium sulfat. Titer IgY spesifik di tentukan dengan uji ELISA dan karakterisasi protein dengan metode SDS-PAGE. Hasil pengujian menunjukkan, antibodi anti-rabies dapat dideteksi pada kuning telur di minggu kedua setelah vaksinasi pertama. Purifikasi IgY dengan NaCl menghasilkan konsentrasi 331 µg/ml dan teknik WSF 184 µg/ml. Karakterisasi protein pada teknik NaCl menghasilkan 6 pita protein dengan berat molekul 164,16 kDa, 126,43 kDa, 97,36 kDa, 68,73 kDa, 40,76 kDa, 28,77 kDa sedangkan teknik WSF hanya terdiri dari 3 pita dengan berat molekul 94,03 kDa, 65,61 kDa, dan 31,94 kDa. Titer antibodi spesifik menggunakan teknik NaCl lebih besar dari 0,5 IU/ml dan teknik WSF dengan titer antibodi di bawah 0,5 IU/ml . Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa IgY spesifik rabies dapat diproduksi pada ayam petelur dan menghasilkan titer antibodi ≥ 0,5 IU/ml, dengan titer antibodi spesifik rabies sebesar ≥ 0,5 IU/ml.

Kata kunci: Immunoglobulin yolk, rabies, kuning telur, ayam

ABSTRACT

This study aims to produce and characterize IgY anti rabies as diagnostics. Laying hens productive age were vaccinated with inactivated rabies vaccine is administered parenterally via intramuscular route at a dose of 0.5 ml twice. The existence of IgY in eggs is evaluated by ELISA. The concentration of IgY is calculated by the method of Bradford. IgY purified using two methods: 1) precipitation by NaCl, PEG 6000-ammonium sulfate; 2) techniques *Water Soluble Fraction* (WSF), followed by precipitation with ammonium sulfate PEG-6000. Specific IgY titers determined by ELISA and protein characterization using SDS-PAGE. The results showed that the anti-rabies antibodies can be detected in egg yolk in the second week after the first vaccination. Purification of IgY with NaCl resulted in the concentration of 331 µg / ml and techniques WSF 184 µg / ml. Protein characterization using SDS-PAGE protein bands on technique produces NaCl kDa molecular weight of 164.16, 126.43 kDa, 97.36 kDa, 68.73 kDa, 40.76 kDa, 28.77 kDa and techniques WSF molecular weight 94.03 kDa, 65.61 kDa and 31.94 kDa. Titers of specific antibodies using techniques NaCl is greater than 0.5 IU / ml and techniques WSF with antibody titers lower than 0.5 IU / ml. Based on the results, it can be concluded that the specific IgY Rabies can be produced in laying hens and produce protective antibody titers.

Keywords: Immunoglobulin yolk, rabies, egg yolk, chicken

PENDAHULUAN

Rabies adalah penyakit yang disebabkan oleh virus neurotropik genus *Lyssavirus* famili *Rhabdoviridae* dan dapat ditularkan dari hewan ke hewan lain maupun hewan ke manusia. Rabies merupakan salah satu penyakit zoonosis dan berakibat fatal pada manusia, sehingga semua material yang dicurigai terinfeksi virus rabies harus ditangani dengan memperhatikan aspek keamanan sesuai dengan spesifikasi *World Health Organization* (WHO 1992). Diagnosis penyakit rabies di Indonesia selama ini hanya berdasarkan gejala klinis dan pemeriksaan histopatologis preparat otak yang berasal dari hewan tersangka.

Penyakit rabies bersifat enzootik di beberapa provinsi di Indonesia. Pengendalian penyakit rabies umumnya dilakukan dengan vaksinasi, sosialisasi, eliminasi anjing tidak berpemilik/diliarkan, dan pengawasan lalu lintas hewan penular rabies (HPR). Upaya pemerintah untuk mengendalikan rabies melalui vaksinasi dan eliminasi anjing tidak berpemilik belum optimal, bahkan di beberapa daerah tertentu kasus rabies semakin meningkat (Adjid et al., 2005). Kondisi ini meningkatkan kewaspadaan masyarakat dalam upaya pengendalian penyakit. Salah satu bentuk kewaspadaan adalah dengan pengembangan teknis diagnosa laboratorium terhadap rabies yang cepat dan akurat.

Berbagai uji dapat dilakukan untuk diagnosa penyakit rabies. Pengujian dapat berupa uji deteksi antigen maupun antibodi dengan uji serologis. Beberapa metode uji serologis yang sering digunakan dalam mendeteksi keberadaan antibodi terhadap rabies adalah *serum netralisasi test* (SNT), *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) dan *Fluorescent Antibodi Virus Neutralisation* (FAVN). Pada kedua metode uji, digunakan virus rabies hidup, sehingga dalam pelaksanaannya memerlukan laboratorium dengan fasilitas biosekuriti level 3 (BSL3) serta staf yang telah terlatih dan divaksinasi rabies. Uji *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) juga digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik rabies. ELISA digunakan untuk mendeteksi antibodi rabies pada serum hewan (anjing dan kucing) serta pada serum manusia (Meslin & Kaplan 1996). Teknik diagnosa untuk mendeteksi virus rabies saat ini masih terus dikembangkan. Pengujian untuk diagnosa virus rabies, memerlukan antigen serta antibodi standar.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi standar terhadap virus rabies pada ayam

petelur yang nantinya dapat digunakan dalam pengembangan kit diagnostik rabies serta untuk membandingkan dua metode purifikasi IgY spesifik rabies asal kuning telur.

BAHAN DAN METODE

Vaksin Rabies

Vaksin yang digunakan dalam penelitian ini adalah vaksin rabies inaktif komersial yang diproduksi oleh salah satu produsen vaksin lokal.

Produksi Antibodi

Produksi antibodi terhadap virus rabies menggunakan dua ekor ayam petelur ras Isa Brown berumur 24 minggu. Vaksinasi pertama dilakukan dengan menyuntikkan 1 dosis (0,5 ml) vaksin rabies inaktif yang telah dicampur dengan *complete adjuvant* melalui rute intramuskular pada otot dada. Penyuntikan diulang kembali dua minggu kemudian dengan dosis yang sama menggunakan vaksin rabies inaktif yang telah dicampur dengan *incomplete adjuvant*. Satu ekor ayam petelur digunakan sebagai ayam kontrol yang tidak divaksin. Telur dikoleksi setiap hari mulai satu minggu setelah vaksinasi pertama.

Ekstraksi dan Pemurnian Imunoglobulin Yolk dari Kuning Telur

Ekstraksi dan pemurnian Ig Y dilakukan dengan dua metode, yaitu pengendapan dengan NaCl (Hodek et al., 2013) dan teknik *Water Soluble Fraction* (WSF), hasil dari kedua metode masing-masing dilanjutkan pengendapan dengan *Polyethylenglycol* (PEG) 6000-amonium sulfat (Jensenius et al. 1981; Akita dan Nakai 1992; Polson et al. 1980).

Pengendapan NaCl (Hodek et al., 2013) dilakukan dengan cara : Kuning telur dipisahkan dari putih telur, kuning telur diencerkan dengan PBS yang mengandung 0,1 % Sodium azida dengan perbandingan 1:1, selanjutnya ditambahkan 0,5M HCl hingga pH menjadi 5.0 dan dibekukan pada suhu -20 °C. Kuning telur kemudian dicairkan dan disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 13.500 g selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dikumpulkan untuk uji selanjutnya. Supernatan kemudian ditambahkan dengan NaCl, sehingga kandungan NaCl menjadi 2M. Tingkat keasaman campuran selanjutnya disesuaikan menjadi pH 4 sambil dihomogenkan menggunakan pengaduk magnet

selama 2 jam pada suhu ruangan. Campuran tersebut disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3700 g selama 20 menit. Supernatan dibuang dan peletnya dikumpulkan serta dilarutkan dalam PBS.

Ekstraksi IgY menggunakan teknik WSF dilakukan dengan cara memisahkan kuning telur dari bagian putihnya, kemudian diletakkan di atas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur dilubangi dengan cara diangkat dengan pinset, kemudian cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam milli-Q pH 4 dengan perbandingan 1 : 4 hingga homogen. Larutan kuning telur yang telah homogen ditambahkan lagi milli-Q pH 2 hingga pH suspensi mencapai 5.0 sampai 5.2 dan di simpan pada suhu 4 °C minimal 12 jam. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3125 g pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil sebagai WSF.

IgY yang telah diekstraksi menggunakan pengendapan NaCl dan teknik WSF, dimurnikan lebih lanjut menggunakan PEG 6000 dan amonium sulfat 40% seperti yang dilakukan oleh Polson *et al.* (1980). Hasil ekstraksi IgY yang berupa pelet dilarutkan dalam PBS sampai volume 1 ml kemudian diendapkan dengan PEG 6000 3,5% dan dilanjutkan dengan pengendapan dengan PEG 6000 12%. Ekstraksi IgY selanjutnya didialisis dalam dalam PBS pH 8 selama 24 jam dengan perbandingan 1:150.

Deteksi Imunoglobuli Yolk Spesifik Rabies pada Kuning Telur

Deteksi imunoglobulin yolk dilakukan dengan uji ELISA (*Enzyme-linked immnosorbent assay*) (Shimizu *et al.*, 1988). Preparasi antigen dilakukan dengan memecah vaksin rabies inaktif menggunakan sonikator. Antigen yang telah disonikasi diukur konsentrasi proteinnya dengan metode Bradford. Antigen kemudian diencerkan menggunakan *coating buffer* (0,05 M *carbonate-bicarbonate* pH 9,5) sehingga konsentrasi akhir yang digunakan adalah 5 µg/ml. Antigen yang telah diencerkan kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumur dari *mikroplate* sebanyak 100 µl/sumur dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalam. *Plate* selanjutnya dicuci lima kali menggunakan PBS-T (PBS p-H 7,4 + 0,05% Tween-20) sebanyak 300 µl tiap sumur. Masing-masing sumur pada *plate* uji di-*blocking* menggunakan larutan PBS *skim milk* 5% sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. *Plate* kemudian dicuci seperti pada langkah sebelumnya.

Sampel IgY dan IgY kontrol negatif diencerkan 1:1000 kemudian ditambahkan pada masing-masing sumur sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Anti IgY yang telah dikonjugasikan dengan *Horse Reddish Peroxydase* (HRP) (pengenceran 1:10.000) ditambahkan pada tiap sumur sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Plate* kemudian dicuci dan selanjutnya ditambahkan substrat *Tetramethylbenzidine* (TMB) pada tiap sumur sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 20-30 menit. Reaksi ELISA dihentikan dengan menambahkan 50 µl H₂SO₄ 3M dan dilakukan pembacaan *optical density* (OD) pada 655 nm.

Pengukuran Konsentrasi Total dan Berat IgY

Pengukuran konsentrasi IgY hasil pemurnian dengan pengendapan NaCl dan teknik WSF ditentukan dengan spektrofotometer menggunakan metode Bradford. Berat molekul IgY spesifik rabies ditentukan dengan metode SDS PAGE (Wilson dan Walker 2009).

Penentuan titer IgY Spesifik Rabies Menggunakan ELISA

Titer IgY spesifik rabies ditentukan dengan uji ELISA menggunakan kit Platelia II (Biorad®). Kit ini terdiri dari serum kontrol positif dan serum kontrol negatif. Masing-masing serum kontrol diencerkan 1:100 menggunakan larutan pengencer serum yang tersedia. Serum kontrol positif standar WHO diencerkan menjadi 1:100 dengan pengencer serum sehingga titernya adalah 4 EU. Serum standar tersebut selanjutnya diencerkan secara seri dua kali sehingga titernya menjadi 2 EU, 1 EU, 0.5 EU, 0.25 EU dan 0.125 EU. IgY hasil pemurnian menggunakan NaCl dan WSF serta serum kontrol (positif dan negatif) dan serum standar dimasukkan ke dalam sumuran dari *mikroplate* sesuai pola yang ditentukan sebelumnya. Masing-masing serum tersebut dimasukkan sebanyak 100 µl pada setiap sumur. *Mikroplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Mikroplate* dicuci sebanyak 3 kali, kemudian ditmbahkan 100 µl konjugat yang telah diencerkan pada semua lubang *mikroplate*. *Mikroplate* ditutup dan diinkubasi 1 jam pada suhu 37° C. Selanjutnya *mikroplate* dicuci sebanyak 5 kali kemudian ditambah 100 µl substrat pada semua lubang dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit dalam kondisi gelap. *Mikroplate* selanjutnya diisi dengan 100 µl stop solution pada semua sumur. Tiga puluh menit kemudian dilakukan pembacaan

optical density pada panjang gelombang 450 nm sampai 620 nm (Biorad 2009). Penghitungan titer hasil pembacaan absorbansi masing-masing sampel dengan menggunakan rumus yang sudah disediakan dalam Kit interpretasi hasil dari titer ditentukan berdasarkan manual kit Platelia II (Biorad 2009, OIE 2007)

HASIL PENELITIAN

Produksi dan Deteksi IgY Spesifik Rabies dalam Kuning Telur

Hasil dari uji ELISA sampel kuning telur ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi lebih pekat (Gambar 1). Semakin pekat warna yang dihasilkan menunjukkan bahwa nilai absorbansi dari sampel semakin besar. Banyaknya substrat yang terurai dalam larutan akan mempengaruhi kekuatan warna yang terbentuk. Kekuatan warna menunjukkan jumlah ikatan antigen dan antibodi primer (Collin 2002)

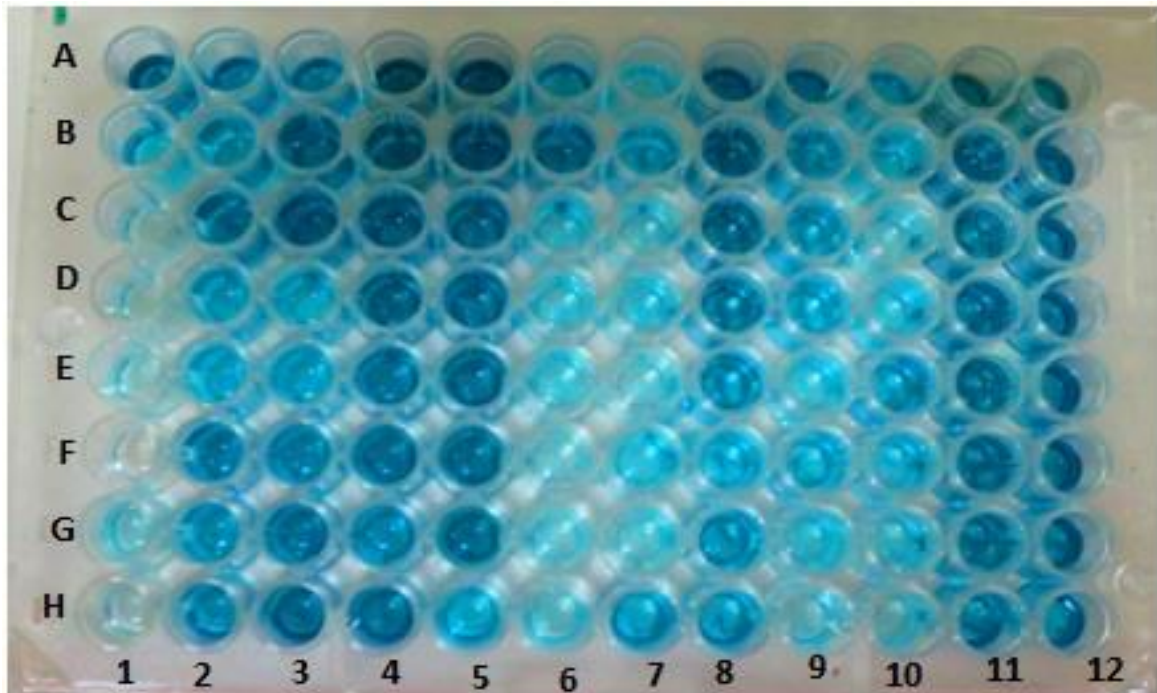
Berdasarkan nilai absorbansi IgY kontrol, ditentukanlah nilai *cut off* sebesar 0.779, sehingga apabila kuning telur memiliki nilai absorbansi di atas nilai *cut off*, maka kuning telur tersebut positif

mengandung antibodi terhadap virus rabies. Kuning telur positif mengandung IgY spesifik rabies sejak minggu kedua setelah vaksinasi pertama hingga minggu ke 6 setelah vaksinasi kedua (Tabel 1).

Konsentrasi total IgY dalam kuning telur, diukur berdasarkan konsentrasi standar IgY dan nilai absorbansi kemudian dibuat persamaan regresi liniernya. Berdasarkan nilai absorbansi IgY total setiap minggunya diperoleh konsentrasi seperti yang tesaji pada Tabel 1.

Konsentrasi dan Karakterisasi IgY Spesifik Rabies Hasil Pemurnian

Pemurnian dengan pengendapan NaCl menghasilkan konsentrasi protein total IgY 331 µg/ml, sedangkan pemurnian dengan teknik WSF menghasilkan konsentrasi 184 µg/ml. Hasil elektroforesis tersaji pada Gambar 2 dan Tabel 2. Hasil pemurnian IgY menggunakan metode pengendapan NaCl menghasilkan 6 pita protein pada berat molekul 164.16 kDa, 126.43 kDa, 97.36 kDa, 68.73 kDa, 40.76 kDa, 28.77 kDa sedangkan pemurnian IgY menggunakan teknik WSF menghasilkan 3 pita protein pada berat molekul 94.03 kDa, 65.61 kDa, dan 31.94 kDa.



Gambar 1 Uji ELISA IgY pada kuning telur. Keterangan : A1-H1 : IgY kontrol dengan konsentrasi bertingkat (0 s/d 10 µg/ml); A2-12 s/d H2-12 : sampel kuning telur dari ayam yang divaksinasi antigen rabies

Tabel 1 Deteksi dan pengukuran konsentrasi IgY dalam kuning telur

Minggu Ke-	Absorbansi (655 nm)	Interpretasi ^P	Konsentrasi IgY (mg/ml) X ± SD
I*	0.274	-	0.377 ± 0.010 ^a
II	1.422	+	2.965 ± 0.409 ^b
III	1.367	+	2.840 ± 0.784 ^b
VI**	1.326	+	2.749 ± 0.341 ^b
V	1.266	+	2.612 ± 0.562 ^b
VI	1.129	+	2.304 ± 0.227 ^b
VII	1.341	+	2.782 ± 0.509 ^b
VIII	1.256	+	2.591 ± 0.601 ^b
IX	1.128	+	2.302 ± 0.702 ^b
X	1.082	+	2.198 ± 0.393 ^b

* : vaksinasi pertama

** : vaksinasi kedua

^P(+) positif IgY spesifik rabies pada kuning telur jika rata-rata nilai absorbansi ≥ cut off (0.779); (-) negatif IgY spesifik rabies jika rata-rata nilai absorbansi ≤ cut off (0.779)

^{a, b} Superscript yang tidak sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 2 Berat molekul komponen-komponen protein dan masing-masing pita penyusunnya

Jenis Sampel	Pita yang ditemukan	Berat molekul pita (kDa)	Estimasi Protein
IgY Kontrol	A	181.55	IgY
	B	71.78	Rantai Berat
	C	41.47	Fragmen Fab
IgY anti- rabies (NaCl) ^a	D	164.16	IgY
	E	126.43	LDL dan a-Livetin
	F	97.36	LDL dan a-Livetin
	G	68.73	Rantai berat
	H	40.76	Fragmen Fab
	I	28.77	Rantai ringan
IgY anti-rabies (WSF) ^b	J	94.03	LDL dan a-Livetin
	K	65.61	Rantai berat
	L	35.26	Fragmen Fab

^aPemurnian dengan pengendapan NaCl

^bPemurnian dengan WSF

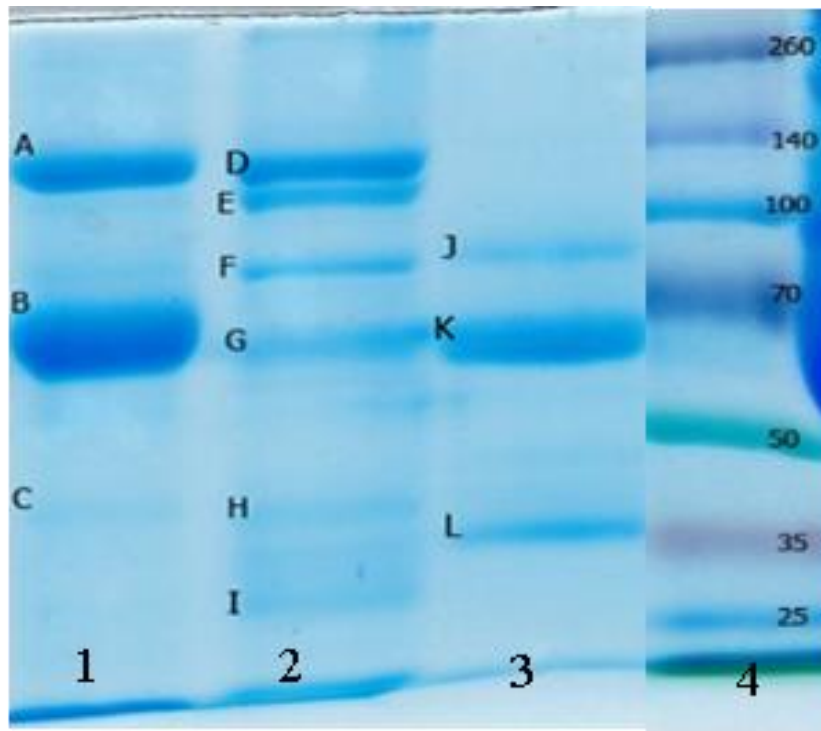
Titration IgY Anti Rabies

Uji ELISA terhadap IgY hasil pemurnian pengendapan NaCl dan WSF menunjukkan bahwa titer IgY spesifik rabies yang dimurnikan dengan pengendapan NaCl adalah lebih besar dari 0.5 EU/ml, sedangkan dengan teknik WSF lebih rendah dari ≤ 0.5 EU/ml.

PEMBAHASAN

Produksi dan Deteksi IgY Spesifik Rabies dalam Kuning Telur

Antigen rabies inaktif yang digunakan dalam penelitian ini merupakan antigen yang baik karena terbukti dapat menggertak sistem imunitas ayam petelur untuk menghasilkan antibodi spesifik terhadap virus rabies dalam kuning telur. Mekanisme transfer IgY dari serum ke dalam kuning telur sama seperti proses kelangsungan transfer antibodi lintas plasenta pada mamalia. Imunoglobulin Yolok diproduksi oleh limfosit B yang mengalami pematangan dalam bursa Fabricius ayam.



Gambar 2 Profil pita protein (dalam kDa) IgY spesifik rabies yang telah dipurifikasi. Keterangan: 1. IgY kontrol; 2. IgY spesifik rabies yang dipurifikasi dengan metode NaCl; 3. IgY spesifik rabies yang dipurifikasi dengan metode WSF; 4. Marker protein

Imunoglobulin Yolk akan mengalir ke dalam pembuluh darah dan beredar ke seluruh bagian tubuh termasuk ke dalam ovarium. Imunoglobulin yolk didepositkan melalui jaringan arteri kecil ovarium-oosit ke dalam kuning telur sebagai bahan perlindungan bagi embrio ayam untuk berkembang (Carlander 2002).

Penelitian Paryati (2006) menggunakan IgY yang merupakan antibodi anti-idiotipe (Ab₂) terhadap rabies sebagai antigen dengan konsentrasi 0.940 mg/ml dapat memicu terbentuknya antibodi pada hewan coba. Liddell dan Weeks (1995) menyatakan, bahwa pembentukan antibodi dengan afinitas tinggi dapat diinduksi melalui imunisasi dengan dosis antigen relatif rendah. Pada penelitian ini digunakan dosis 0.665 mg/ml/ekor ayam dapat memicu pembentukan antibodi pada kuning telur ayam yang divaksin. Pembentukan sistem imun pada hewan tergantung pada kondisi dan spesies hewan yang diimunisasi, pada hewan tertentu dosis imunogen umumnya berkisar antara 0.01-0.10 mg. Namun, untuk sebagian besar antigen protein, karbohidrat dan asam nukleat dianjurkan memakai dosis antara 50-1000 µg (Leenaars et al., 1994).

Berdasarkan pemeriksaan keberadaan IgY spesifik rabies dalam kuning telur menggunakan uji *indirect* ELISA diketahui bahwa IgY spesifik rabies telah muncul dan terdeteksi pada dua minggu

setelah vaksinasi pertama. Kuning telur yang mengandung IgY spesifik rabies masih terdeteksi sampai dengan minggu ke 6 setelah vaksinasi kedua. Hasil dari uji ini diekspresikan dalam nilai absorbansi. Semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh maka semakin tinggi pula konsentrasi antibodi yang terdapat pada kuning telur.

Konsentrasi IgY dalam kuning telur sebelum vaksinasi adalah 0.377 ± 0.010 mg/ml. Namun konsentrasi IgY menunjukkan peningkatan yang signifikan pada minggu ke 2 setelah vaksinasi pertama 2.965 ± 0.409 mg/ml (Tabel 1). Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi IgY kuning telur setiap minggunya menunjukkan bahwa konsentrasi IgY mengalami penurunan dari minggu ketiga 2.840 ± 0.784 mg/ml hingga minggu kesepuluh 2.198 ± 0.393 mg/ml, kecuali pada minggu ketujuh IgY mengalami kenaikan 2.782 ± 0.509 mg/ml dibandingkan minggu kelima dan keenam (2.612 ± 0.562 mg/ml dan 2.304 ± 0.227 mg/ml). Penurunan IgY setelah vaksinasi ulang mulai terlihat pada minggu ke 8 (2.591 ± 0.601 mg/ml) hingga minggu ke 10 (2.198 ± 0.393 mg/ml), penurunan ini merupakan cermin dari hilangnya populasi sel plasma penghasil antibodi spesifik. Sekali berdiferensiasi penuh, sel plasma mati setelah tiga sampai enam hari dan imunoglobulin yang dihasilkan ini menurun perlahan-lahan karena terjadi proses katabolisme (Tizard 2004).

Konsentrasi dan Karakterisasi IgY Spesifik Rabies Hasil Pemurnian

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemurnian dengan NaCl menghasilkan konsentrasi IgY yang lebih tinggi daripada pemurnian dengan teknik WSF. Perbedaan konsentrasi IgY hasil pemurnian dipengaruhi oleh metode pemurnian yang digunakan, menurut Shimizu *et al.* (1988) dan Sunwoo *et al.* (1996), perbedaan cara pemurnian IgY akan menghasilkan perbedaan konsentrasi, kemurnian, stabilitas dan aktivitas IgY. Konsentrasi IgY dari pemurnian kuning telur sangat dipengaruhi oleh tingkat kelarutan kuning telur pada saat pemisahan lemak telur dan pH larutan (Akita dan Nakai 1992). Prosedur kerja dari pemurnian menggunakan teknik WSF lebih rumit dan membutuhkan waktu yang relatif lebih lama dibandingkan pemurnian dengan pengendapan NaCl. Dalam pemilihan metode pemurnian sebaiknya perlu dipikirkan juga faktor biaya dan waktu yang dibutuhkan, sehingga metode yang digunakan lebih efisien.

Hasil elektroforesis IgY hasil ekstraksi tersaji pada Gambar 5 dan Tabel 2. Sebagai kontrol IgY digunakan IgY standar produksi PROMEGA®. Susunan protein pada IgY kontrol terdiri atas 3 pita protein yaitu 181.55 kDa, 71.78 kDa dan 41.47 kDa. Protein dengan berat molekul 181.55 kDa pada IgY kontrol dan 164,16 kDa pada IgY spesifik rabies (kolom A) diduga merupakan IgY utuh. Sun *et al.* (2001) menyatakan bahwa berat molekul IgY sebesar 167.25 kDa dan Narat (2003) menyatakan bahwa IgY mempunyai berat molekul yang lebih besar dibandingkan IgG (160 kDa), yaitu sekitar 180 kDa atau lebih. Pita protein dengan berat molekul 68.73 kDa (pita G) untuk NaCl dan 65.61 kDa (pita K) untuk WSF diduga sebagai rantai berat IgY, sedangkan pita protein dengan berat molekul 28.77 kDa (Pita I) pada kolom B merupakan rantai ringan IgY. Beberapa peneliti melaporkan bahwa ukuran berat molekul dari rantai berat IgY adalah 65-70 kDa, sedangkan untuk rantai ringan 20-30 kDa (Yokohama *et al.* 1993; Hatta *et al.* 1993; Bhanushali *et al.* 1994; Schade *et al.* 1996).

Sun *et al.* (2001) menyatakan, bahwa degradasi IgY akan menghasilkan fragmen Fc dan Fab, Fab mempunyai berat molekul 45 kDa. Pita protein dengan ukuran 41.47 kDa pada IgY kontrol dan 40.76 kDa pada IgY spesifik rabies dengan teknik NaCl serta pita protein dari teknik WSF dengan ukuran 35.26 kDa di duga adalah fragmen dari Fab. Hasil SDS-PAGE pada gambar juga memperlihatkan pita protein lain yaitu pada pita E, F, dan J dengan estimasi berat molekul masing-masing 126.43 kDa,

97.36 kDa, dan 94.03 kDa memiliki kemungkinan LDL terlarut dan a-livetin. Adanya pita protein selain IgY kemungkinan disebabkan belum murninya IgY yang diekstraksi.

Titration IgY Spesifik Rabies

Berdasarkan acuan dari WHO (1992), bahwa hewan atau orang yang divaksinasi rabies dikatakan berhasil bila titer antibodi minimal mendekati 0.5 EU/ml untuk dapat terlindung dari penyakit rabies (OIE 2007). Titer IgY spesifik rabies yang dihasilkan pada penelitian ini di tunjukkan pada Tabel 3. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bahwa ayam mampu merespon virus rabies dan dapat memproduksi IgY spesifik rabies yang titernya cukup tinggi. Perbedaan titer antibodi dari IgY yang diuji diduga akibat adanya perbedaan teknik pemurnian, seperti yang disampaikan Shimizu *et al.* (1988) dan Sunwoo *et al.* (1996).

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa IgY spesifik rabies dapat diproduksi pada ayam petelur, dan memiliki titer yang protektif. IgY spesifik rabies hasil pemurnian dengan pengendapan NaCl menghasilkan konsentrasi (331 µg/ml) dan titer (≥ 0.5 EU/ml) yang lebih tinggi dibandingkan IgY hasil pemurnian dengan WSF (konsentrasi 184 µg/ml; titer ≤ 0.5 EU/ml). Pemurnian IgY dengan pengendapan NaCl membutuhkan waktu yang relatif lebih singkat dibandingkan pemurnian dengan WSF.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Laboratorium Immunologi, Program Studi Mikrobiologi Medik, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- Adjid RMA, Sarosa A, Syapriati T, dan Yuningsih. 2005. Penyakit rabies di Indonesia dan pengembangan teknik diagnosis. *Wartazoa*. 15(4):165-172.
- Akita EM, Nakai S. 1992. Comparison of Four Purification Methods for The Production of Immunoglobulin from Eggs Laid by Hens Immunized with Enterotoxigenic *E.coli* Strain. *Journal of Immunological Methods* 160 : 207-214.

- Bhanushali JK, Gilbert JM, Mc Dougald LR. 1994. Simple Method to Purify Chicken Immunoglobulin G. *Poultry Science*. 73:1158-1161.
- [Biorad]. 2009. User's manual Platelia Rabies II Kit [Internet]. [diunduh 2016Maret 13]. Tersedia pada: http://web.oie.int/VCD/eng/Registre/User's%20manual_PlateliaRabiesII.pdf.
- Carlander D. 2002. Avian Immunoglobulin Y Antibody in Vitro and in Vivo. [disertations]. Faculty of Medicine Uppsala University. Swedia (SE) p.16-30
- Collins MT. 2002. Interpretation of a Commercial Bovine Paratuberculosis Enzyme-Linked Immunosorbent Assay by Using Likelihood Ratios. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9(6):1367-1371.
- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. 1993. Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 57:450-454.
- Hodek P, Pavel T, Jiri S, Jiri H, Marie S. 2013. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *International Journal of Electrochemical Science*. 8:113 - 124.
- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. 1981. Eggs: Conveniently Packaged Antibodies Methods for Purification of Yolk IgG. *Journal of Immunological Methods*. 46(1):63-68.
- Leenaars PPAM, Claassen E, Boersma WJA. 1997. Antigen and Antigen Presentation. In: *Immunology Methods Manual*, I. Lefkovits (Ed.). London (GB). Academic Press Ltd.p.63-64.
- Liddell E, Weeks I. 1995. *Antibody Technology*. Oxford (UK). Bios Scientific Publisher Ltd.p.146.
- Meslin FX, Kaplan MM. 1996. An Overview of Laboratory Techniques in The Diagnosis and Prevention of Rabies and in Rabies Research . Chapter 2 in *Laboratory Techniques in Rabies* Ed-4. Geneva (CH): WHO Pr.p.53-122.
- Narat M. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*. 41(3):259-267.
- [OIE] Office International des Epizootis. 2007. *Kit for In Vitro Detection and Titration of IgG anti Rabies Virus Glycoprotein in Dogs, Cats and Foxes Serum*. User's manual. Biorad.p.278-285.
- Paryati, SPY. 2006. Antibodi Anti-Idiotipe Sebagai Kandidat Vaksin Rabies. [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.p.159-169.
- Polson A, Von Wechmar MB, Van Regen-mortel MHV. 1980. Isolation of viral IgY anti-bodies from yolks of immunized hens. *Immunol Communications*. 9(5):475-493.
- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugi H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, Rogenmortel M, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D. 1996. The Production of avian (egg yolk) antibodies : IgY. *Alternatives to Laboratory Animals*. 24:925-934.
- Shimizu M, Fotsimmons RC, Nakai S. 1988. Anti-E.coli Immunoglobulin Y Isolated From Egg Yolk of Immunized Chicken as Potential Food Ingredient. *Journal of Food Science*. 53: 1360.
- Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. 2001. Preparation and Mass Spectrometric Study of Egg Yolk Antibody (IgY) Againsts Rabies Virus. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*. 15:708-712.
- Sunwoo HH, Nakano T, Dixon WT, Sim JS. 1996. Immune Responses in Chickens Against Lipopolysaccharide of *Escherichiacoli* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*. 75:342-345.
- Tizard.2004. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi II. Partodiredjo M, penerjemah. Surabaya (ID): Airlangga University Pr. p.18-120.
- [WHO] World Health Organization. 1992. *WHO Expert Consultation on Rabies*. Geneva (CH):WHO Pr.p.42-46.
- Wilson K, Walker J. 2009. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology 7th ed. Cambridge University Press, New York. p307-339
- Yokohama H, Peralta RC, Horikoshi T, Hiraoka J, Ikemori Y, Kuroki M, Kodama Y. 1993. A Two-step Procedure for Purification of Hen Egg Yolk Immunoglobulin G : Utilization of Hydroxypropylmethylcellulose Phthalate and Synthetic Affinity Ligand Gel (Avil ALB). *Poultry Science*. 72:275-281.