

AKTIVITAS IMUNOGLOBULIN Y ANTI-WSSV PADA SERUM DAN TELUR AYAM

Betutu Senggagau, Manja Meyky Bond

*Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang
Jl. Raya Carita, Desa Umbul Tanjung, Kecamatan Cinangka, Kabupaten Serang
bsenggagau@yahoo.com*

ABSTRAK

Penyakit *White Spot Syndrom Virus (WSSV)* merupakan salah satu jenis patogen yang sering terjadi dalam budidaya udang pada skala intensif maupun tradisional. Penggunaan antibiotik untuk menangani penyakit ini dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan masalah baru antara lain terjadinya resistensi bakteri atau virus patogen terhadap antibiotik, residu antibiotik dalam produk udang dan dapat menurunkan kualitas lingkungan budidaya. Salah satu alternatif penanganan penyakit WSSV ini adalah dengan pendekatan sistem imun secara pasif menggunakan imunoglobulin Y (IgY) anti-WSSV. Kegiatan ini mempunyai tujuan untuk mengetahui aktivitas imunoglobulin Y anti-WSSV terhadap patogen WSSV dalam telur dan serum ayam. Antigen WSSV berasal dari sampel udang positif WSSV berdasarkan hasil uji PCR. Sampel positif diekstraksi dan dipurifikasi, lalu diukur konsentrasi DNA dengan nanodrop. Antigen-WSSV dinaktivasi pada suhu 60° selama 1 jam dan disuntikan pada 2 ekor ayam petelur selama 4 minggu berturut-turut dengan dosis sebanyak 0,4 ml pada penyuntikan awal, 0,3 ml pada minggu ke-2 hingga ke-3 dan 0,5 ml pada minggu ke-4. Serum dan telur ayam yang dihasilkan dikoleksi selama 4 minggu. Aktivitas IgY anti-WSSV pada serum dan telur ayam diuji dengan metode AGP (Presipitasi Gel Agar). Karakteristik serum yang mengandung IgY anti-WSSV diukur dengan SDS-PAGE. Konsentrasi DNA antigen WSSV dan rasio kemurniannya diperoleh dengan rerata sebesar 2452,75 ng/ μ ldan 1,605 untuk karkas (udang utuh) ditambah elution buffer, 30,35 ng/ μ l dan 1,83 untuk tahapan ekstraksi, 2,55 ng/ μ l dan 1,935 untuk tahapan purifikasi. Hasil uji AGP menunjukkan bahwa serum dan telur ayam positif mengandung antibodi WSSV berupa IgY anti-WSSV mulai minggu ke-2 setelah vaksinasi ke-2 dengan terbentuknya garis presipitasi dalam agar gel antara antigen WSSV dengan IgY anti-WSSV. Hasil pembacaan SDS-PAGE, pita protein menunjukkan berat molekul IgY spesifik anti-WSSV sebesar 38,8 kDa. Adanya aktivitas IgY anti-WSSV dalam serum dan telur ayam berpotensi untuk menangani penyakit WSSV melalui metode pasif imunoterapi.

Kata-kata kunci : *WSSV, serum ayam, telur, imunoglobulin Y*

ABSTRACT

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a type of shrimps pathogen on an intensive or traditional scale. The use of antibiotics can cause new problems including the occurrence of bacterial or viral pathogen resistance to antibiotics, antibiotic residues in shrimp products and can reduce the quality of the aquaculture environment. One alternative treatment for WSSV is passively immune system approaches using anti-WSSV immunoglobulin Y (IgY). This research aimed to determine the anti-WSSV immunoglobulin Y activity against WSSV pathogens in eggs and chicken serum. WSSV antigen derived from WSSV positive shrimp samples based on PCR test results. Positive samples were extracted and purified, then DNA concentrations were measured with nanodrop. WSSV antigen was inactivated at 60° for 1 hour and injected in 2 laying hens for 4 consecutive weeks at a dose of 0.4 ml at the initial injection, 0.3 ml at 2 to 3 and 0 weeks, 5 ml at the 4th week. Chicken serum and eggs were collected for 4 weeks. Anti-WSSV IgY activity in serum and chicken eggs was tested by AGP (Precipitation Gel Agar) method. The characteristics of serum containing anti-WSSV IgY were measured by SDS-PAGE. WSSV antigen DNA concentration and purity ratio were obtained with an average of 2452.75 ng / μ l and 1.605 for carcass (whole shrimp) plus elution buffer, 30.35 ng / μ l and 1.83 for extraction stages, 2.55 ng / μ l and 1.935 for the purification stage. The AGP test results showed that serum and chicken eggs positively contained WSSV antibodies in the form of anti-WSSV IgY starting from the 2nd week after the second vaccination with the formation of precipitation lines in the gel agar between WSSV antigens and anti-WSSV IgY. From the SDS-PAGE reading, the protein band shows a specific IgY anti-WSSV molecular weight of 38.8 kDa. The presence of anti-WSSV IgY activity in serum and chicken eggs has the potential to treat WSSV through passive immunotherapy methods.

Key words: *WSSV, chicken serum, eggs, immunoglobulin Y*

PENDAHULUAN

Penyakit *White Spot Syndrom Virus* (WSSV) merupakan salah satu jenis patogen yang paling virulen yang menyebabkan mortalitas yang tinggi dan sangat merugikan dalam kegiatan budidaya udang (Lu et al., 2009) baik pada skala intensif maupun tradisional. Teknik pengobatan yang sangat efektif untuk mengendalikan infeksi virus ini belum ditemukan. Umumnya pengendalian penyakit ini menggunakan antibiotik dan beberapa jenis obat ikan lainnya. Namun demikian, pembudidaya memahami bahwa penggunaan antibiotik yang berkepanjangan tanpa prosedur yang tepat akan membawa masalah baru antara lain terjadinya resistensi patogen terhadap antibiotik, adanya residu antibiotik dalam produk udang dan dapat menurunkan kualitas lingkungan budidaya.

Oleh karenanya pembudidaya mulai beralih menggunakan produk bioteknologi yang aman dan ramah lingkungan seperti imunostimulan, vaksin dan antibodi dalam menangani penyakit ini. Vaksinasi pada kelompok crustacea tidak menghasilkan sistem kekebalan humoral karena tidak memiliki sistem respon imun spesifik seperti halnya kelompok vertebrata (Feriza, 2010). Sedangkan imunostimulan merupakan zat yang meningkatkan mekanisme

pertahanan non-spesifik dan memberikan resistensi inang terhadap organisme patogen (Citarasu et al., 2006). Pendekatan imunostimulan dan imunisasi pasif pada udang menjadi alternatif pengendalian infeksi WSSV (Witteveldt et al., 2004). Imunisasi pasif digunakan ketika terjadi infeksi dengan resiko tinggi, tubuh organisme terinfeksi tidak dapat memproduksi respon imun secara cepat, atau untuk mengurangi gejala penyakit immunosupresi (Feriza, 2010). Penggunaan antibodi yang berasal dari kuning telur ayam dapat digunakan untuk mengembangkan imunodiagnostik atau imunoterapi pasif sebagai tindakan pencegahan dalam pengelolaan penyakit ikan dan kerang (Kumaran et al., 2010).

Kuning telur ayam dapat dimanfaatkan untuk produksi imunoglobulin Y (IgY) dalam jumlah yang banyak dikarenakan ayam memiliki sensitifitas yang tinggi terhadap pemaparan antigen asing dan sistem imun ayam juga sangat responsif sehingga persisten untuk memproduksi IgY (Hau & Hendriksen, 2005). Telur ayam mudah diperoleh dan antibodi yang dihasilkan dalam satu butir telur setara dengan antibodi yang dihasilkan sekali pemanenan darah kelinci. IgY yang

terkandung dalam sebutir telur adalah 10-20 mg/ml kuning telur (Carlander, 2002).

Beberapa penelitian terkait penggunaan antibodi atau imunoglobulin Y spesifik anti-WSSV dari kuning telur ayam sebagai imunoterapi pasif antara lain pada udang windu (*Penaeus monodon*) (Alday-Sanz et al., 1998; Kumaran et al., 2010; Witteveldt et al., 2004), udang oriental (*P. chinensis*) (Kim et al., 2004), udang batu (Lu et al., 2008), ubur-ubur (*Procambius clarkiaii*) (Lu et al., 2009), dan udang putih (*Litopenaeus vannamei*) (Feriza, 2010).

Antibodi spesifik yang dihasilkan dari serum dan telur ayam yang berasal dari ayam petelur yang divaksinasi dengan antigen WSSV perlu dikonfirmasi keberadaan IgY anti-WSSV dengan beberapa pengujian kualitatif dan kuantitatif. Kegiatan ini mempunyai tujuan untuk mengetahui aktivitas imunoglobulin Y anti-WSSV terhadap patogen WSSV dalam serum dan telur ayam.

METODE PENELITIAN

Isolasi dan Purifikasi Antigen WSSV

Antigen WSSV diperoleh dari sampel positif udang vanamei hasil kegiatan monitoring tim LP2IL Serang. Sampel udang vanamei yang terindikasi positif diperiksa dengan metode PCR.

Setelah dinyatakan positif, sampel udang vanamei di simpan dalam *deep freezer* pada suhu -80°C . Isolasi antigen WSSV dilakukan dengan cara memberikan pakan berupa sampel udang positif WSSV yang telah dihaluskan ke dalam wadah yang berisi 20 ekor udang vanamei sehat. Setelah 2-3 hari udang vanamei yang sehat terlihat sakit dan mati (timbul gejala bintik putih), maka udang tersebut diambil dan diperiksa dengan metode PCR. Setelah diperiksa PCR dan dinyatakan positif WSSV, sampel udang di simpan dalam *deep freezer* pada suhu -80°C . Selanjutnya untuk mendapatkan antigen WSSV dari sampel positif WSSV, udang vanamei digerus hingga halus. Lalu ditambahkan dengan *elution buffer* dan divortex hingga homogen. Setelah itu sampel positif WSSV disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Ambil supernatan, masukkan ke dalam tabung reaksi 50 ml. Antigen WSSV dinaktivasi dengan cara dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 1 jam. Lalu disaring menggunakan filter $0,45\ \mu\text{m}$. Hasil saringan disimpan dalam refrigerator pada suhu 4°C .

Untuk mengetahui konsentrasi antigen WSSV, maka dilakukan pengukuran konsentrasi antigen WSSV dengan metode nanodrop. Sebanyak 2 μl pelarut sampel diletakkan pada pedestal

mesin. Selanjutnya dibaca sebagai *Blank*. Bersihkan pedestal, lalu letakkan 2 μ l sampel pada pedestal mesin, dan baca sebagai *Measure*. Pembacaan pengukuran konsentrasi DNA antigen WSSV dilakukan pada panjang gelombang 260 nm untuk panjang DNA dan 280 nm untuk panjang protein. Konsentrasi DNA sampel dihitung dengan mengalikan absorbansi sampel pada 260 nm dengan faktor pengenceran. Sedangkan untuk mengetahui nilai kemurnian antigen WSSV dilihat dari rasio absorbansi A 260/280 nm. Adapun rumus perhitungan konsentrasi DNA sampel adalah:
Konsentrasi DNA = Abs₂₆₀ x faktor pengenceran.

Vaksinasi

Sebanyak 2 ekor ayam petelur berumur 40 minggu digunakan untuk memproduksi IgY anti-WSSV. Vaksinasi dilakukan dengan metode aplikasi penyuntikan. Ayam divaksinasi secara intramuskular pada otot dada sebanyak 0,4 ml antigen WSSV dalam adjuvan komplit, satu minggu kemudian ayam divaksinasi dengan 0,3 ml antigen WSSV dalam Freund adjuvan komplit secara intramuskular pada otot dada. Kemudian vaksinasi pada minggu ketiga dan keempat dilakukan seperti pada minggu sebelumnya, dengan jumlah

antigen WSSV 0,5 ml dalam Freund adjuvan inkomplit secara intramuskular (otot dada).

Pengambilan Serum

Pengambilan darah dilakukan mulai minggu ke-2 hingga minggu ke-4 setelah vaksinasi. Darah ayam petelur diambil sebanyak 2-3 ml melalui *vena axillaris*. Darah yang telah diambil diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit, lalu serum dipisahkan dari gumpalan darah. Serum dapat disimpan dalam *microtube* pada suhu 4°C dan jika digunakan jangka waktu yang lama dapat disimpan pada suhu -20°C.

Koleksi IgY dari Kuning Telur

Sebanyak 20 butir telur ayam dikumpulkan untuk dipisahkan antara kuning telur dan putih telur. Pemisahan dilakukan dengan cara mengeluarkan cairan putih telur hingga hanya tersisa kuning telur. Kuning tersebut diletakkan di atas kertas tisu untuk membersihkan dari sisa putih telur. Kemudian kuning telur yang sudah dipisahkan dari putih telurnya di simpan dalam wadah tertutup dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 10°C.

Pengujian AGP

Agar gel dibuat dengan melarutkan 0,25 gr agarose, 0.1% *sodium azide* dalam 12,5 ml PBS pH 7,4 dan 12,5 ml akuades pH 7,4. Larutan ini dipanaskan dalam penangas air sampai larut dan warna larutan menjadi bening. Kemudian larutan dipipet sebanyak 10 ml, dicetak pada cawan petri Ø50 mm dan ditunggu sampai berbentuk agar semi-solid. Setelah agar menjadi semi-solid, agar tersebut dilubangi dengan menggunakan alat *gel puncher*. Lubang tengah diisi dengan antigen WSSV sebanyak 25 µl dan lubang disekitarnya diisi dengan serum atau kuning telur yang mengandung IgY anti-WSSV sebanyak 25 µl. Kuning telur yang mengandung IgY anti-WSSV yang akan diuji diencerkan dengan PBS pH 7 dengan perbandingan 1 : 1. Agar disimpan pada tempat lembab dan suhu ruang. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam sampai 48 jam. Reaksi positif dicirikan dengan munculnya garis berwarna buram putih (presipitasi) pada daerah antara sumur antigen dengan serum atau sumur antigen dengan kuning telur.

Uji Karakteristik IgY

Penentuan berat molekul dianalisis dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrilamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) (Gordon, 1983).

Pengukuran berat molekul ini disesuaikan dengan teknik yang dilakukan oleh Laemmli pada tahun 1970 (Gordon, 1983). SDS-PAGE ini menggunakan gel pemisah dengan konsentrasi 7,5 %, gel pengumpul 4%, larutan pewarna *Commassie Blue* dan larutan pencuci. Pembuatan agar akrilamid dilakukan dengan bantuan dua lempeng kacayang berukuran 18 X 15,5 cm (Pharmacia-Biotech®) yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%, pada kedua sisi tepi bagian dalam diberi *spacer*, kedua lempeng kaca dihimpitkan dan selanjutnya dijepit. Dibagian atas lempeng kaca disisipkan sisir pembuat jalur dan kemudian diisi gel pemisah (12% poliakrilamida) sampai 1 cm di bawah ujung sisir dengan bantuan mikropipet dan dibiarkan sekitar 30 menit kemudian diisi gel pengumpul (4% poliakrilamida) hingga mencapai permukaan lempeng kaca.

Sampel IgY yang telah didapatkan dari hasil purifikasi, ditambahkan dengan larutan *buffer* sampel perbandingan 1:1 dan campuran ini kemudian ditangas 60°C selama 5 menit sebelum dimasukkan kedalam sumur gel elektroforesis. Sebanyak 10 µl sampel dimasukkan kedalam masing-masing sumur, kemudian perangkat elektroforesis dijalankan dengan arus 50 mA dengan voltase 100 V selama 3 jam. Elektroforesis berakhir

apabila pewarna sampelmencapai batas 0,5 cm dari bagian bawah gel. Setelah elektroforesis berakhir, gel diangkat dari lempeng kaca dan direndam di dalam pewarnaan *Commasie Brilliant Blue* (Sigma® Chemical Co) selama 3 jam pada suhu ruang sambil diagitasi perlahan. Pewarna yang tidak terikat pada protein dihilangkan denganmerendam gel pada larutan pemucat metanol dan asam asetat sehingga gel berwarna bening atau pita-pita protein yang telah terbentuk terlihat jelas. Mobilitas relatif protein dihitung dengan membandingkan jarak migrasi proteindihitung dari garis awal separating gel sampai ujung protein yang dibandingkandengan jarak migrasi *tracking dye* (Gordon, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Purifikasi Antigen WSSV

Antigen WSSV diperoleh dari hasil kegiatan kohabitasi udang vanamei yang sehat diberi pakan berupa sampel positif udang vanamei. Setelah timbul gejala klinis dan kematian udang, sampel diperiksa menggunakan metode PCR. Hasil pemeriksaan udang vanamei menunjukkan positif terserang WSSV dengan munculnya pita pada 941 bp. Kematian dan gejala klinis udang vanamei yang terserang WSSV mulai timbul pada hari ke-2 pasca kohabitasi. Selain

didominasi oleh kematian udang, juga disebabkan telah terjadinya penularan WSSV terhadap udang perlakuan yang semula sehat oleh udang terinfeksi WSSV. Kematian udang hingga 100% akan terjadi pada udang terinfeksi WSSVmulai hari ke-3 hingga harike-10 (Lightner, 1996).

Sampel udang vanamei yang positif terserang WSSV kemudian dijadikan sebagai antigen WSSV yang akan divaksinasikan ke ayam petelur. Antigen WSSV terlebih dulu dipurifikasi dari antigen lainnya. Untuk mengetahui konsentrasi DNA dari antigen WSSV maka dilakukan pengukuran konsentrasi DNA WSSV dengan nano drop. Berikut adalah hasil pengukuran konsentrasi DNA antigen WSSV pada panjang gelombang 260 nm.

Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa konsentrasi asam nukleat antigen WSSV mulai dari karkas udang (udang utuh), hasil ekstraksi sampel hingga tahap purifikasi sampel mengalami penurunan konsentrasi. Hal ini diduga disebabkan adanya protein-protein lain yang bukan DNA WSSV yang telah banyak terbuang ketika dilakukan purifikasi. Banyaknya radiasi ultraviolet yang diserap oleh larutan DNA berbanding lurus dengan banyaknya DNA sampel udang yang diekstraksi. Penyerapan sinar ultraviolet oleh nukelotida secara maksimal dapat

dicapai pada panjang gelombang 260 nm, panjang gelombang 280 nm (Mustafa et al., 2016).

maksimal oleh protein dicapai pada

Tabel 1. Data konsentrasi DNA antigen WSSV dari sampel udang vanamei

Kode Sampel	Ulangan	[Asam Nuleat]	Satuan	A 260 nm	A 280 nm	Rasio A260/280
Karkas + EB	1	2462,4	ng/ μ l	49,247	30,664	1,61
Karkas + EB	2	2443,3	ng/ μ l	48,867	30,518	1,60
<i>Rerata</i>		2452,75	ng/ μ l	49,057	30,591	1,605
Ekstraksi	1	28,6	ng/ μ l	0,572	0,303	1,89
Ekstraksi	2	32,1	ng/ μ l	0,642	0,362	1,77
<i>Rerata</i>		30,35	ng/ μ l	0,607	0,3325	1,83
Purifikasi	1	2,9	ng/ μ l	0,059	0,030	1,94
Purifikasi	2	2,2	ng/ μ l	0,044	0,023	1,93
<i>Rerata</i>		2,55	ng/ μ l	0,0515	0,0265	1,935

EB = Elution Buffer

Tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, faktor suhu inkubasi. Sampel yang telah dicampur dengan larutan lysis buffer diinkubasi pada suhu tertentu. Larutan tersebut berfungsi untuk menghancurkan jaringan dan membran sel, mengeliminasi kontaminan, sehingga yang didapatkan pada tahapan ini adalah DNA genom yang terdapat dalam sel, yaitu DNA inti dan mitokondria. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka dapat merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah maka membran serta jaringan sel tidak dapat hancur. Larutan lysis buffer bekerja dengan optimal pada suhu yang tidak terlalu rendah. Kedua, lama waktu inkubasi. Jika terlalu lama diinkubasi maka dapat merusak DNA dan jika terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel. Oleh karena itu, baik suhu dan waktu, kedua-duanya harus diatur dengan sebaik mungkin agar diakhir isolasi didapatkan DNA dalam konsentrasi yang diharapkan.

Isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0 (Muladno, 2002). Hasil kemurnian DNA antigen WSSV berada pada rerata rasio antara 1,605 sampai 1,935. Jika nilai rasio A260/A280 kurang dari 1,8 maka hal ini menunjukkan bahwa

isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio A260/A280 lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Sambrook & Russel, 2001). Beberapa hal yang sangat berperan dalam mempengaruhi konsentrasi dan kemurnian DNA yang dihasilkan adalah metode ekstraksi yang digunakan, rusaknya DNA dan adanya zat pengotor/kontaminan seperti fenol atau protein lainnya (Mustafa et al., 2016).

Aktivitas Imunoglobulin Y (IgY) anti-WSSV

Vaksinasi antigen-WSSV pada ayam petelur dilakukan dalam upaya menghasilkan imunoglobulin Y anti-WSSV atau antibodi anti-WSSV. Kegiatan vaksinasi dilakukan hingga minggu ke-4. Serum ayam diperoleh mulai minggu ke-2 hingga minggu ke-4. Selanjutnya dilakukan pengujian secara kualitatif.

Serum ayam yang dipanen berasal dari ayam yang telah divaksinasi dengan antigen-WSSV. Serum kemudian diuji dengan uji agar gel presipitasi (AGP). Uji agar gel presipitasi untuk mengetahui adanya respon ayam yang telah divaksinasi, dibuktikan dengan

terbentuknya garis presipitat berwarna putih. Prinsip uji agar gel presipitasi yakni reaksi pengendapan antigen oleh antibodi spesifik. Pengendapan antigen ini diperlihatkan dengan adanya garis presipitasi di media agar gel. Jika sediaan antibodi tidak homolog dengan antigen maka tidak akan berbentuk garis presipitasi. Uji agar gel presipitasi, memperlihatkan proses penetralan antigen. Maka antibodi berfungsi sebagai presipitin yang mengendapkan antigen (Wibawan et al., 2003). Uji AGP merupakan uji yang bersifat kualitatif untuk mengetahui keberadaan antibody (Tizard, 1987).

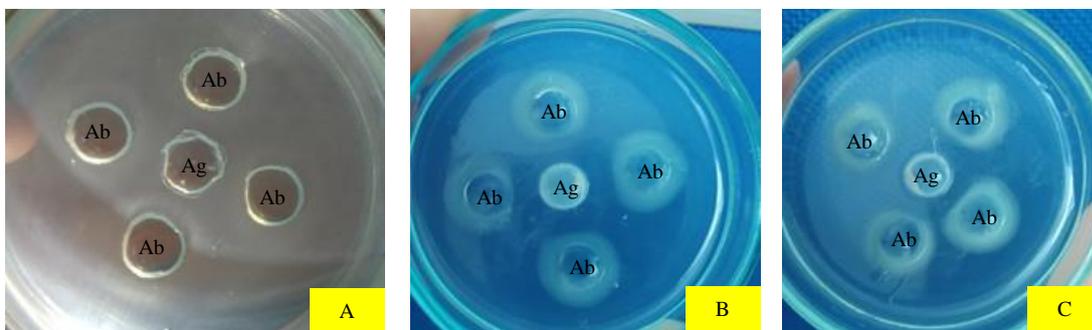
Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa sampel serum minggu ke 0 (sebelum vaksinasi) dan minggu ke-1 (1 minggu pasca vaksinasi) menunjukkan hasil uji AGP negatif pada ketiga ayam yang ditandai tidak terbentuknya garis presipitasi (Gambar 1A-1C) karena belum dilakukannya pengujian serum (pengumpulan serum). Pembentukan antibodi kedua ayam (B9 dan B10) ditunjukkan oleh adanya reaksi positif dari AGP serum ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi (Gambar 2A-2C) yang diperoleh setelah vaksinasi kedua pada minggu ke-2 pasca vaksinasi sedangkan ayam kontrol menunjukkan hasil yang negatif.

Tabel 2. Hasil uji AGP pada serum ayam

Minggu ke-	Ayam B9	Ayam B10	Ayam Kontrol
0	-	-	-
1	-	-	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	-

Keterangan :

- tidak terjadi presipitasi
- + terjadi presipitasi



Gambar 1. Uji AGP serum ayam terhadap antigen-WSSV. (a) Serum ayam kontrol minggu ke-0, (b) Serum ayam B9 minggu ke-0, (c) Serum ayam B10 minggu ke-0 (Ab : antibodi anti-WSSV, Ag : antigen WSSV)

Uji AGP juga dilakukan terhadap kuning telur hasil dari ayam petelur yang telah divaksinasi dengan antigen-WSSV minggu ke-2 pasca penyuntikan. Hasil uji presipitasi gel menunjukkan bahwa kuning telur dari ayam B9 dan B10 positif mengandung IgY anti-WSSV yaitu terbentuknya garis presipitasi antara sumur antigen WSSV dengan sumur antibodi anti-WSSV (Gambar 3).

Hasil dari uji agar gel presipitasi terdapat garis presipitat berwarna putih diantara sumur antigen dan antibodi, membuktikan bahwa ayam tersebut memberikan respon terhadap antigen WSSV yang disuntikkan. Hal ini diduga bahwa pada saat paparan kedua, antigen akan dikenal oleh sel pertahanan dengan lebih efisien. Karena jumlah sel B dan sel T spesifik juga lebih banyak, kemungkinan untuk beraksi dengan antigen akan lebih besar, sehingga titer antibodi juga cepat meningkat (Wibawan et al., 2003). Disamping itu antibodi yang tersisa juga dapat bereaksi dengan antigen, sehingga kompleks antibodi-antibodi menjadi lebih mudah ditangkap oleh APC (*antigen presenting cells*) dan diproses.

Selanjutnya sel T dan sel B akan terstimulasi seperti halnya dengan respon imun primer dengan kecepatan dan efisiensi yang lebih tinggi. Daerah variabel suatu antibodi atau bagian dari

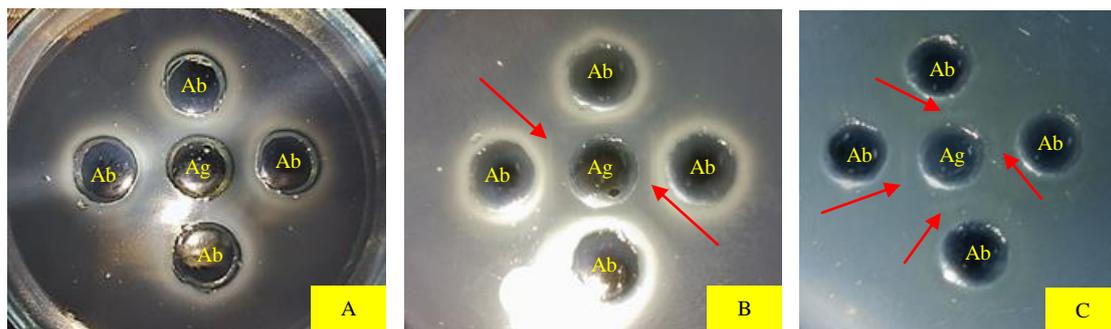
molekul yang mengikat antigen bersifat antigenik dan dapat menggertak terbentuknya antibodi terhadap variabel itu sendiri bila disuntikkan pada hewan yang berbeda spesiesnya atau bahkan pada hewan yang sama spesiesnya (Migliorini & Schwartz (1988) dalam Paryati et al., 2006).

Sistem imun ayam sangat responsif terhadap protein asing atau mikroorganisme yang memaparnya (akibat vaksinasi atau infeksi alami) (Davis & Reeves (2002) dalam Rawendra, 2005). Ayam memiliki sensitivitas tinggi terhadap protein asing sehingga walaupun dalam jumlah sedikit dapat memberikan respon pembentukan antibody (Carlander, 2002). Keberadaan *Hadrian gland* di daerah nasotrakheal, *payer patches* dan *Bursa Fabricius* memungkinkan unggas sangat responsif terhadap berbagai protein asing (Coleman (2002) dalam Rawendra, 2005).

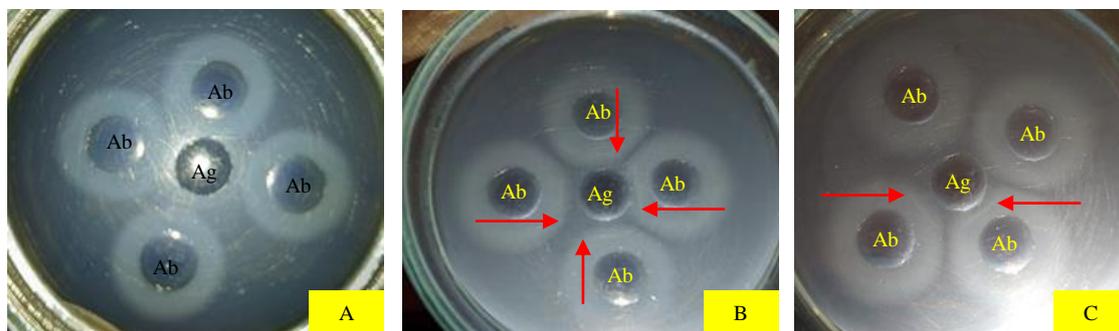
Reaksi positif hasil AGP berlangsung sampai minggu ke-10 (antibodi bertahan selama 7 minggu) sampai pengujian terakhir (Dora, 2007). Penurunan produksi antibodi dapat terjadi apabila jumlah antigen berkurang sehingga tidak mampu menggertak sistem kekebalan. Respon imun primer terjadi apabila antigen pertama kali masuk ke dalam tubuh ditandai dengan munculnya

IgM beberapa hari setelah pemaparan. Kadar IgM mencapai puncaknya setelah kira-kira 7 hari. Enam sampai 7 hari setelah pemaparan dalam serum mulai dapat dideteksi adanya IgG, kadar IgG mencapai puncaknya yaitu 10 – 14 hari setelah pemaparan antigen (Wibawan et

al., 2003) dan reaksi antibodi akan terbentuk 10 – 14 hari pasca injeksi (Bellanti, 1993).



Gambar 2. Uji AGP serum ayam terhadap antigen-WSSV. (a) Serum ayam kontrol minggu ke-2, (b) Serum ayam B9 minggu ke-2, (c) Serum ayam B10 minggu ke-2



Gambar 3. Uji AGP kuning telur ayam terhadap antigen-WSSV. (a) Kuning telur ayam kontrol minggu ke-2, (b) Kuning telur ayam B9 minggu ke-2, (c) Kuning telur ayam B10 minggu ke-2

Pembentukan antibodi dipengaruhi beberapa faktor diantaranya: imunogenesitas, kualitas, bentuk kelarutan stimulan, spesies hewan yang diimunisasi, rute aplikasi, dan *sensitifitas assay*. Pada kegiatan ini, vaksinasi dilakukan secara intramuskular dengan penambahan Freund adjuvan komplit dan Freund adjuvant

inkomplit. Adjuvan merupakan substansi yang apabila dicampurkan antigen dapat meningkatkan imunogenitas antigen tersebut. Freund adjuvan terdiri dari campuran minyak mineral dan pengemulsi, adjuvan yang mengandung larutan minyak mineral dan zat emulsi seperti *Mannide monooleate* (Freund

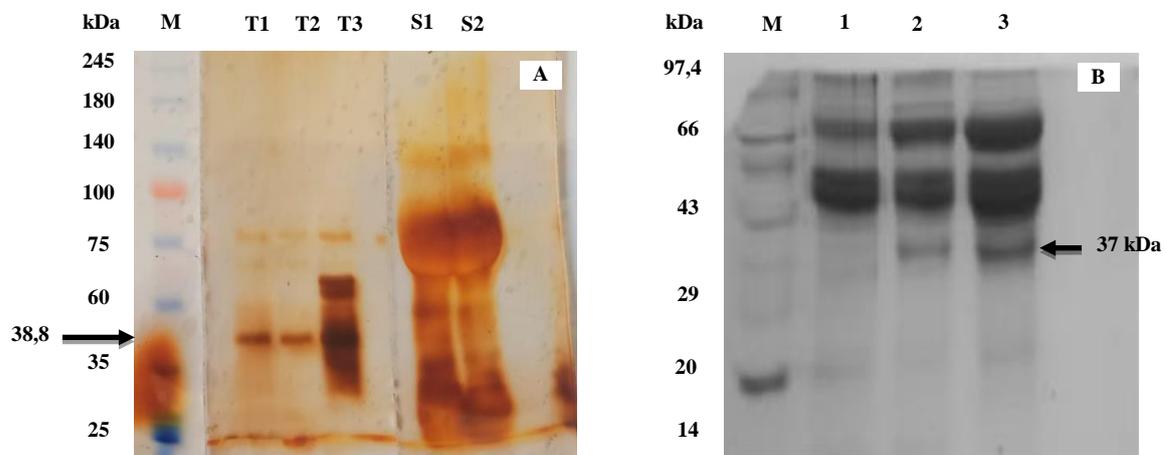
adjuvant in komplit) mengedarkan minyak menjadi droplet kecil mengelilingi antigen. Kemudian antigen dilepaskan secara perlahan dari tempat penyuntikan. Sedangkan campuran minyak mineral dan zat emulsi yang mengandung mikobakteria dengan komponen tambahan *Muramyl dipeptida* (freund adjuvant komplit). *Muramyl dipeptida* dapat mengganti mikobakteria dalam emulsi minyak, dan mengaktifasi makrofag sehingga freund adjuvan komplit lebih kuat dari freund adjuvan inkomplit (Kuby, 1997; Smith, 1995). Penambahan adjuvant juga mempertahankan keberadaan antigen dalam tubuh sehingga dapat menyediakan rangsangan antigenik yang lama. Adjuvan dapat efektif pada setiap tingkat proses imunisasi yang dapat memodifikasi imunogen atau bekerja pada tingkat sel dari respon imun inang. Pada tingkat sistem imun inang, penambahan adjuvan dapat memodifikasi membran sel (mengaktifkan agen di permukaan) sehingga mempermudah pengikatan imunogen ke makrofag dan limfosit, merangsang aktivitas sel yang terlibat dalam respon imun terutama fagositosis oleh makrofag, dan membentuk depot imunogen sehingga memperlambat pelepasannya dari lokasi inokulasi (Smith, 1995). Keberadaan antigen yang berkesinambungan bertujuan

untuk meningkatkan produksi antibodi dan mempertahankan keberadaan antibodi untuk waktu yang lama di dalam tubuh. Penyuntikan antigen menyebabkan terbentuknya antibodi yang bereaksi dengan antigen, antibodi hanya berikatan dengan antigen yang merangsang pembentukannya (Tizard, 1987).

Jenis adjuvan sangat mempengaruhi rute injeksinya, tetapi apabila menggunakan adjuvan yang diserap lambat terutama freund adjuvan sebaiknya tidak diberikan secara intravena. Aplikasi penyuntikan melalui intravena dan intramuskular dengan penambahan freund adjuvan komplit merangsang respon antibodi yang kuat untuk waktu yang lama dengan membebaskan tetes-tetes emulsi dengan perlahan dan merangsang fungsi makrofag serta dapat mempercepat proses induksi sehingga antigen cepat menyebar dalam darah dan segera merangsang terbentuknya antibody (Smith, 1995). Sedangkan aplikasi penyuntikan melalui intramuskular dengan penambahan freund adjuvan komplit maupun freund adjuvan inkomplit diharapkan agar penderitaan hewan minimum dan dapat merangsang pembentukan antibodi yang berkesinambungan dan dalam jumlah yang lebih banyak (Bellanti, 1993; Smith, 1995).

Antibodi yang direaksikan dengan antigen spesifik membentuk kompleks yang tidak larut (presipitat) diukur dengan reaksi presipitasi. Hal yang palingmenentukan adalah spesifisitas antiserum yang digunakan, dan larutan standar yang stabil dengan kadar yang pasti serta afiditas antibodi. Afiditas antibodi menentukan derajat stabilitas kompleks antigen-antibodi pada tempat pengikatan (*antigen binding site*); kompleks yang terbentuk cenderung berdisosiasi bila antibodi mempunyai afiditas yang lemah, sebaliknya makin tinggi afiditas antibodi makin stabil kompleks antigen-antibodi yang terbentuk. Faktor-faktor lain yang

berpengaruh yaitu suhu, pH dan molaritas larutan yang dipakai serta perbandingan antara konsentrasi antigen dan antibodi (Kresno, 2010). Apabila digunakan beberapa campuran antigen-antibodi, setiap komponen akan mencapai proporsi optimal pada posisi yang tidak sama. Bila kedua garis tepat bersesuaian, maka kedua antigen dianggap identik. Bila garis-garis bersilangan, maka kedua antigen berbeda, sedangkan bila garis-garis bersatu dengan pembentukan taji, maka terdapat identitas parsial dengan masing-masing antigen mempunyai determinan antigen bersama (Tizard, 1987).



Gambar 4. Profil pita protein hasil SDS-PAGE (A) Profil pita protein M : Marker, T : kuning telur ayam, S : serum ayam hasil kegiatan rekayasa 2018 (B) Profil pita protein M : Marker, 1 : IgY, 2 : Produk IgY Anti-WSSV tanpa adjuvant, 3 : Produk IgY Anti-WSSV dengan immuno-adjuvant (Kumaran *et al.*, 2010)

Karakteristik IgY spesifik anti-WSSV dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Pita protein dari hasil elektroforesis SDS-PAGE (Gambar 4) menunjukkan karakteristik dari polipeptida dari sampel yang digunakan, pita dapat menunjukkan polipeptida yang penting dan juga bisa menunjukkan molekul lain dalam sampel. Hasil pembacaan SDS-PAGE, pita protein menunjukkan berat molekul IgY spesifik anti-WSSV diestimasi 38,8 kDa (Gambar 4A), kemungkinan adalah fragmen Fc dari IgY WSSV. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Kumaran et al. (2010) yang berada pada 37 kDa (Gambar 4B). Perbedaan hasil pengukuran pita protein IgY spesifik anti-WSSV diduga disebabkan oleh penggunaan konsentrasi gel pemisah SDS-PAGE. Konsentrasi gel pemisah pada kegiatan ini adalah 7,5% sedangkan Kumaran *et al.* (2010) menggunakan konsentrasi gel pemisah sebesar 12%. Penentuan dari berat molekul IgY spesifik WSSV tidak dapat dipastikan hal ini dikarenakan adanya kemungkinan pita rantai berat dan rantai ringan pada pita protein yang merupakan sub unit dari IgY yang belum dirakit dari serum.

SDS-PAGE memiliki kelebihan yaitu mekanismenya dalam

mengklasifikasikan suatu protein berdasarkan berat molekulnya dari bahan yang digunakan. Mekanisme dari perjalanan penentuan berat molekul ini diawali dengan imunoglobulin yang telah diperoleh di masukkan ke dalam sumur gel yang terdapat paling atas, dimana gel tersebut adalah bufer gel pengumpul dengan pori yang lebih besar. Gel ini kemudian mengumpulkan protein (imunoglobulin yang diperoleh), selanjutnya imunoglobulin akan bermigrasi dari yang memiliki berat molekul paling tinggi akan berada pada lapisan paling atas dari gel pemisah sampai yang memiliki berat molekul yang paling rendah berada pada lapisan paling bawah sekitar 0,5 cm dari dasar gel pemisah. Hal ini karena dari sifat gel pemisah memiliki ukuran yang lebih kecil dari gel pengumpul (Wilson & Walker, 2000). Proses ini tidak lain karena dari sifat gel poliakrilamida yang memiliki kemampuan sebagai katalisator pada tahap awal polimerase dalam migrasi imunoglobulin.

Gel poliakrilamida ini diperoleh dengan cara polimerisasi akrilamida dengan adanya sejumlah kecil ikatan silang dari methylene bis-acrilamide dan ammonium persulphate sebagai katalisator (Wilson and Walker, 2000).

Koleksi kuning telur yang mengandung IgY anti-WSSV dilakukan pada telur ayam yang diproduksi pada minggu ke-3 dan minggu ke-4 pasca vaksinasi. Hal ini dilakukan dalam upaya memperbanyak jumlah IgY yang ditransfer dari serum ke kuning telur lebih optimal. Secara umum, satu minggu setelah vaksinasi antibodi dapat dideteksi di dalam darah dalam jumlah yang cukup tinggi. Pada saat ini antibodi belum ditransfer dalam jumlah banyak ke dalam telur. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dibutuhkan waktu 7 hari untuk mentransfer antibodi dari dalam darah ke kuning telur (Wibawan, 2008). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa transfer IgY secara transovarial berlangsung kurang lebih 3-6 hari, tergantung dari jumlah sel telur yang ada di dalam tubuh ayam (Patterson et al. (1962); Wooley et al. (1995) dalam Wibawan, 2008). IgY ditransfer dari serum melewati oolemma ke dalam oosit yang telah matang dalam folikel ovarium (Rose & Orland (1981) dalam Wibawan, 2008). Transfer ini terjadi melalui reseptor spesifik di permukaan membran kantung kuning telur (Tressler & Roth (1987) dalam Wibawan, 2008).

Tingginya kadar IgY di dalam darah tidak selaras dengan dengan kadar IgY di dalam kuning telur karena transfer IgY ke dalam kuning telur diketahui terjadi dalam 2 tahap. Setiap tahap memerlukan waktu tertentu. Tahap awal, IgY ditransfer dari serum menuju kuning telur dengan proses yang analog dengan proses transfer antibodi (IgY) pada fetus melalui plasenta pada mamalia. Tahap berikutnya terjadi transfer antibody (IgY) dari kantung embrio kepada embrio yang sedang berkembang (Wibawan, 2008).

KESIMPULAN

1. IgY anti-WSSV dalam serum dan kuning telur mulai muncul pada minggu ke-2 pasca penyuntikan antigen WSSV ke-2
2. Berat molekul IgY anti-WSSV yang terbentuk sebesar 38,8 kDa
3. Aktivitas antibodi IgY anti-WSSV dalam serum dan telur ayam dapat berpotensi untuk menangani penyakit WSSV melalui metode pasif imunoterapi

DAFTAR PUSTAKA

- Alday-Sanz, V., Thaikua, S., Yousif, A.N., Albright, L.J., Flegel, T.W., 1998. Studies on IgY for Passive Immunization of Shrimp Against White Spot Syndrome Virus. *Adv. Shrimp Biotechnol.* 141–145.

- Bellanti, J.A., 1993. *Imunologi III*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Carlander, D., 2002. Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo. In *Vitro*. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V., 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 372–384. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.01.002>
- Dora, G., 2007. Respon Imun Ayam Single Comb Brown Leghorn Terhadap Koi Herpes Virus (KHV). Institut Pertanian Bogor.
- Feriza, D., 2010. Prospek Pemberian Imnuoglobulin Y (IgY) secara Peroral pada Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) sebagai Imunisasi Pasif terhadap Penyakit White Spot Syndrom Virus (WSSV). Institut Pertanian Bogor.
- Gordon, A.H., 1983. Laboratory technique in biochemistry and molecular biology: Part I. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. North-Holland Publishing Company, London.
- Hau, J., Hendriksen, C.F.M., 2005. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. *ILAR J.* 46, 294–299. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.294>
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y., Kim, J.W., 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture* 237, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.015>
- Kresno, S.B., 2010. *Imunologi: Diagnostik dan Prosedur Laboratorium*, Ke-5. ed. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kuby, J., 1997. *Immunology*, 3rd. ed. W.H Freeman and Company, New York.
- Kumaran, T., Michaelbabu, M., Selvaraj, T., Albinthas, S., Citarasu, T., 2010. Production of Anti WSSV IgY Edible Antibody Using Herbal Immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its Immunological Influence against WSSV Infection in *Penaeus monodon*. *J. Aquac. Feed Sci. Nutr.* 2, 1–5. <https://doi.org/10.3923/joafsnu.2010.1.5>
- Lightner, D. V., 1996. *A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. Baton Rouge, World Aquaculture Society, Los Angeles.
- Lu, Y., Liu, J., Jin, L., Li, X., Zhen, Y., Xue, H., Lin, Q., Xu, Y., 2009. Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkiaii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 750–758. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8555-6>
- Lu, Y., Liu, J., Jin, L., Li, X., Zhen, Y.H., Xue, H., You, J., Xu, Y., 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody

- from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.010>
- Muladno, 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor.
- Mustafa, H., Rachmawati, I., Udin, Y., 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris*. *J. Vektor Penyakit* 10, 7–10. <https://doi.org/10.22435/vektor.p.v10i1.6251.7-10>
- Paryati, S.P.Y., Wibawan, I.W.T., Soejoedono, R.D., Pasaribu, F.H., 2006. Immunoglobulin Ayam sebagai Antibodi Anti-idiotipe terhadap Rabies. *J. Vet.* 7 (3), 92–103.
- Rawendra, R., 2005. *Prospek Pengembangan Immunoglobulin Y (IgY) Kering Beku sebagai Nutraceutical Food Anti Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)*. Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol 2, 3rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Smith, J.R., 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosa dan Penelitian: Produksi Serum Imun*, Cetakan Pe. ed. Gajahmada University Press, Yogyakarta.
- Tizard, I.R., 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner*, 2nd ed. Universitas Airlangga Press, Surabaya.
- Wibawan, I.W., Soejoedono, R.D., Damayanti, S.C., Tauffani, B.T., 2003. *Diktat Immunologi*. Departemen Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wibawan, I.W.T., 2008. *Pemanfaatan Telur Ayam sebagai Pabrik Biologis (Kajian Pustaka)*. *Maj. Ilm. Peternak.* 11, 36–41.
- Wilson, K., Walker, J.M. (Eds.), 2000. *Principle and Techniques of Practical Biochemistry*, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M., van Hulten, M.C.W., 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *J. Virol.* 78, 2057–2061. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.4.2057-2061.2004>