

Aktivitas Biologis Immunoglobulin Yolk Anti Parvovirus Setelah Perlakuan Suhu

(BIOLOGY ACTIVITIES OF IgY PARVOVIRUS AFTER HEAT TREATMENT)

I Gusti Ayu Agung Suartini¹, Ni Luh Putu Agustini², Ni Luh Eka Setiasih³, Sisyawati
Putriningsih⁴, Defi Lega Nurwidana⁵

¹Laboratorium Biokimia Veteriner Universitas Udayana

²Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Denpasar

³Laboratorium Histologi Veteriner Universitas Udayana

⁴Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner Universitas Udayana

⁵Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl. PB. Sudirman Denpasar-Bali

Email: gaa.suartini@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh berbagai suhu terhadap aktivitas biologi Immunoglobulin (Ig)Y *crude* dan presipitat spesifik *Canine parvovirus* (CPV). Hiperimun serum dilakukan pada ayam *Isa Brown* yang diinjeksi dengan antigen CPV. Ig yolk sediaan *crude* berasal dari serum ayam tanpa pemurnian sedangkan Ig yolk presipitat diperoleh dengan mengendapkan serum ayam dengan ammonium sulfat dan didialisis. Kedua jenis Ig yolk diberikan perlakuan suhu 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C selama 15 menit. Aktivitas biologi kedua jenis Ig dideteksi dengan uji Hambatan Hemaglutinasi (HI). Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas IgY *crude* dan presipitat. Aktivitas IgY *crude* maupun presipitat turun pada perlakuan suhu 50°C, 60°C, 70°C, dan 80°C. *Geometric Mean Titer* IgY *crude* berturut - turut $2^{6.67}$, 2^6 , $2^{5.33}$, dan $< 2^0$ Unit HI sedangkan IgY presipitat berturut-turut adalah $2^{6.33}$, $2^{5.67}$, 2^4 , dan $< 2^0$ Unit HI. Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa aktivitas biologi IgY *crude* lebih baik dibandingkan IgY presipitat.

Kata kunci : immunoglobulin yolk, *crude*, presipitat, canine parvovirus, suhu

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of temperature on the biological activity of various *crude* and precipitate specific Immunoglobulin (Ig)Y Canine parvovirus (CPV). Hiperimun serum conducted on Isa Brown chickens injected with antigen CPV. *Crude* yolk Ig preparations derived from chicken serum without purification while the yolk Ig preparations precipitates obtained by the chicken serum was precipitated with ammonium sulfate and dialyzed. Both types of Ig yolk given treatment temperature 50°C, 60°C, 70°C, and 80°C for 15 minutes. To test Gel Precipitation Test (AGPT) is performed to determine whether there is a specific IgY CPV in the serum of chickens. Biological activity of both types of Ig detected with Barriers Haemagglutination test (HI). The design used in this study is completely randomized design factorial. The results of this study indicate that the temperature was highly significant on the activities of IgY *crude* and precipitates. Activities IgY *crude* and precipitate down to the treatment temperature of 50°C, 60°C, 70°C, and 80°C. Geometric Mean Titer *crude* IgY respectively - were $2^{6.67}$, 2^6 , $2^{5.33}$, and $< 2^0$ Unit HI while IgY precipitates are respectively $2^{6.33}$, $2^{5.67}$, 2^4 , and $< 2^0$ Unit HI. Based on the results of this study concluded that the biological activity of *crude* IgY better than IgY precipitates after treatment of a wide range of temperatures.

Keywords: immunoglobulin yolk, *crude*, precipitates, canine parvovirus, temperature

PENDAHULUAN

Parvovirus merupakan penyakit yang umum ditemukan pada anjing dan kucing. Pada tahun 1970-an saat vaksin belum tersedia, parvovirus merupakan penyakit endemik dan membunuh ribuan anjing di seluruh dunia (Kapil *et al.*, 2007). Angka kematian pada kejadian parvovirus mencapai 15-90 % (Ettinger dan Feldman, 1995; Yilmaz, 2005)

Vaksinasi merupakan langkah awal pencegahan infeksi parvovirus pada anjing. Vaksinasi mulai dilakukan pada anak anjing umur dibawah enam bulan. Namun pemilihan waktu vaksinasi yang tidak tepat dapat menimbulkan kegagalan vaksinasi karena antibodi maternal dalam darah anak anjing akan menetralkan virus parvo yang ada di dalam vaksin. Hal ini menyebabkan respon pembentukan antibodi di dalam tubuh anjing tidak mencapai kadar yang protektif terhadap virus parvo. Selain itu vaksinasi secara intramuskular menimbulkan rasa sakit dan abses akibat jarum suntik pada jaringan yang disuntik (Ziad *et al.*, 2000).

Teknik immunisasi pasif secara oral telah banyak digunakan, terutama untuk penyakit-penyakit yang menyerang saluran pencernaan. Pada metode ini digunakan antibodi yang spesifik terhadap antigen tertentu, selanjutnya antibodi tersebut diaplikasikan langsung secara oral. Aplikasi metode ini lebih mudah daripada menyuntikkan vaksin ke dalam tubuh, selain tidak harus merestrain hewan yang akan disuntik, juga akan menghindari efek sakit, mengurangi kesalahan teknik dalam pemberian vaksin dan biaya yang murah.

Penggunaan ayam sebagai pabrik biologis penghasil antibodi memiliki peluang yang sangat baik untuk di masa depan. Ayam yang diimmunisasi dengan antigen tertentu akan menghasilkan antibodi (Imunoglobulin yolk) yang spesifik terhadap antigen yang disuntikkan kedalam tubuhnya. Antibodi

tersebut beredar didalam darah dan terakumulasi didalam kuning telur. Ayam memiliki sensitifitas yang tinggi terhadap antigen asing sehingga respon untuk terbentuknya antibodi sangat baik (Hau dan Hendriksen, 2005). Imunoglobulin Yolk dapat diisolasi dari kuning telur sehingga dalam proses produksinya tanpa harus menyakiti ayam (Narat, 2003).

IgY yang terdapat dalam kuning telur merupakan substansi yang dipilih untuk immunisasi pasif oral. Selain dapat dipanen dalam jumlah banyak dari kuning telur (Schade *et al.*, 2008) IgY juga mempunyai valensi yang tinggi, sehingga dapat berikatan dengan berbagai epitop dari antigen (Nolan and Mine, 2004). Menurut Hau dan Hendriksen (2005) kemampuan IgY dalam menetralisasi virus parvo di dalam usus anjing bertahan sampai 48 jam setelah pemberian.

Imunoglobulin yolk spesifik terhadap virus parvo nampaknya sangat menjanjikan digunakan untuk immunisasi pasif pada anak anjing, tapi dalam aplikasinya secara oral, IgY harus melalui pemanasan/perebusan telur agar terhindar dari infeksi bakteri yang mungkin masih ada di dalam telur, misalnya *Salmonella* dan *Escherichia coli*. Berdasarkan hal di atas perlu diketahui bagaimana aktivitas biologis IgY spesifik terhadap parvovirus setelah mengalami pemanasan berbagai suhu. Penelitian ini bertujuan memberikan informasi tentang pengaruh berbagai suhu pemanasan terhadap aktivitas biologis IgY *crude* dan presipitat spesifik canine parvovirus

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Delapan ekor ayam petelur galur Isabrown diadaptasikan selama satu minggu. Ayam dikandangkan dengan sistem *batterai*, diberi pakan komersial dan air minum secukupnya.

Hiperimun Serum Ayam

Ayam diimunisasi dengan antigen *Canine Parvovirus* titer 2^{13} HA. Imunisasi dilakukan secara *intramuscular* (Carlender, 2002). Sebanyak 0,5 cc antigen dihomogenkan dengan 0,5 cc adjuvan komplit (*Freund's adjuvant complete*) digunakan untuk imunisasi pertama. Imunisasi ke dua dan ke tiga dilakukan dengan interval dua minggu setelah imunisasi pertama. Imunisasi ayam pada minggu ke dua dan ke tiga berturut-turut adalah 0,75 cc antigen dihomogenkan dengan satu cc adjuvan tidak komplit (*Freund's adjuvant incomplete*) (Narat, 2003). Serum diambil seminggu sebelum dan setelah penyuntikan antigen. Darah diambil sebanyak dua ml melalui vena *Brachialis* menggunakan *spute*.

Keberadaan IgY spesifik terhadap CPV dalam serum ayam dideteksi dengan metode AGPT. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi diantara sumur tengah dan sumur luar yang menunjukkan adanya reaksi antigen dan antibodi spesifik dalam serum ayam. Immunoglobulin yolk dimurnikan dengan cara diendapkan menggunakan amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) jenuh konsentrasi 60%, selanjutnya didialisis menggunakan kantong dialisis untuk menghilangkan garam ammonium sulfat (Carlender, 2002 ; Woolley *et al.*, 1995).

Uji Haemaglutinasi (HA)

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk mendapatkan antigen CPV delapan unit HA. Antigen CPV delapan unit HA akan digunakan sebagai standar antigen pada uji hambatan hemaglutinasi (HI). Hasil positif HA ditandai dengan terjadinya aglutinasi yang jelas dari eritrosit babi. Titer HA menunjukkan pengenceran tertinggi yang masih memperlihatkan 100% aglutinasi eritrosit. Titer HA dinyatakan sebagai antilog dari pengenceran tertinggi serum CPV yang masih mampu mengaglutinasi eritrosit

babi 0,5 % dengan sempurna.

Perlakuan Suhu Pada IgY Crude Dan Presipitat

Lima botol masing-masing sampel IgY *crude* dan presipitat disiapkan untuk perlakuan berbagai suhu. Titer awal sampel diketahui 2^7 HI unit berdasarkan uji HI. Tiap botol sampel dipanaskan di *waterbath* selama 15 menit pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, 80°C. Setelah 15 menit, sampel diambil dan langsung dicelupkan pada *icebath* untuk menghentikan reaksi. Selanjutnya sampel siap untuk diuji aktivitasnya.

Uji Hambatan Haemaglutinasi (HI)

Serum ayam yang telah mendapatkan perlakuan suhu selanjutnya diuji menggunakan uji Hambatan Hemaglutinasi (Sendow dan Syafriati, 2004). Kedalam lubang mikrotiter bentuk dasar V, ditambahkan 50µl serum yang akan diuji yang telah diencerkan dengan larutan buffer. Pengenceran dilakukan dua kali mulai dari lubang pertama hingga lubang ke-10 secara duplo sedangkan lubang 11-12 digunakan untuk kontrol. Sebanyak 50 µl *Canine parvovirus* yang telah disiapkan dengan konsentrasi delapan HA unit, dimasukkan ke dalam lubang 1-12. Campuran tersebut dibiarkan pada suhu 4°C selama satu jam. Setelah itu masing-masing lubang ditambahkan 100 µl sel darah merah (SDM) babi dengan konsentrasi 0,5% dan diinkubasikan pada suhu 4°C selama semalam. Reaksi positif ditandai dengan tidak terjadi aglutinasi sel darah merah. Titer antibodi tertinggi adalah tingkat pengenceran tertinggi yang mampu menghambat aglutinasi sel darah merah.

Titer HI dihitung dengan asumsi bahwa serum awal telah diencerkan sebanyak empat kali saat penambahan kaolin, sehingga titer pada lubang pertama adalah 2^3 Unit HI dan seterusnya. Titer yang dibawah 2^2 Unit HI di asumsikan sebagai $< 2^0$ Unit HI.

Selanjutnya titer ditranformasikan ke dalam bentuk $-\log 2$.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial, IgY *crude* dan presipitat yang dipanaskan pada suhu 50°C, 60°C, 70°C dan 80°C dengan tiga kali ulangan. Nilai titer IgY ditranformasikan kedalam $-\log 2$ Unit HI. Selanjutnya data tersebut dianalisis Ragam, jika didapatkan pengaruh yang nyata selanjutnya dilakukan uji berganda Duncan menggunakan program SPSS 12 (Sampurna dan Nindhia, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Garis presipitasi yang terbentuk pada uji AGPT menunjukkan bahwa di dalam serum ayam telah terbentuk antibodi yang spesifik terhadap CPV. Garis presipitasi terdeteksi diantara sumur luar (IgY) dan

sumur dalam (CPV). Reaksi ini terjadi karena adanya reaksi homolog antara antibodi dengan antigen CPV. Teknik AGPT merupakan uji serologis yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi spesifik dalam serum secara kualitatif. Mohammad *et al.* (2001) menyebutkan bahwa AGPT dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen maupun antibodi secara kualitatif, bersifat dan murah. Aktivitas IgY *crude* dan presipitat sebelum perlakuan berbagai suhu adalah 2^7 HI unit. Aktivitas IgY *crude* dan presipitat setelah perlakuan suhu ditunjukkan pada (Tabel 1). Pembacaan titer IgY pada lubang plate yang pertama dianggap memiliki titer 2^3 Unit HI karena pada proses penambahan kaolin dilakukan pengenceran. Penambahan kaolin pada sampel IgY menyebabkan pengenceran empat kali.

Tabel 1. Hasil uji hi terhadap IgY sediaan kasar dan IgY presipitat pada berbagai perlakuan suhu ($-\log 2$ Unit HI)

Jenis IgY	Ulangan	Titer HI pada Berbagai Suhu				
		37°C (kontrol)	50°C	60°C	70°C	80°C
IgY <i>crude</i>	1	7	7	6	5	0
	2	7	7	6	5	0
	3	7	6	6	6	0
GMT (Unit HI)		7	6,67	6	5,33	0
IgY presipitat	1	7	6	5	4	0
	2	7	7	6	4	0
	3	7	6	6	4	0
GMT (Unit HI)		7	6,33	5,67	4	0

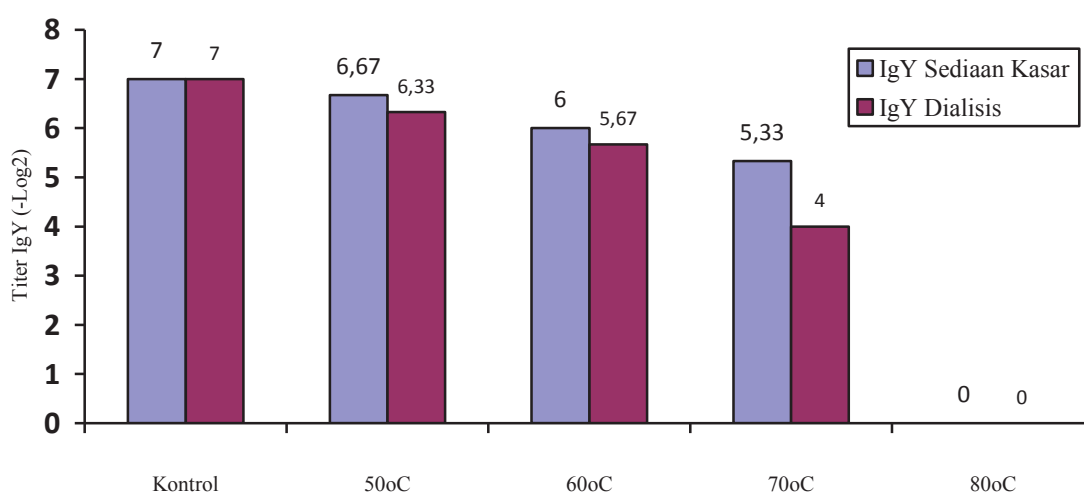
Ket: GMT=*Geometric Mean Titer* (Titer Rataan Geometrik)

Perlakuan suhu 50°C, 60°C, 70°C dan 80°C pada IgY *crude* dan presipitat menyebabkan penurunan aktivitas biologis yang ditunjukkan dari penurunan titer antibodi. *Geometric Mean Titer* (GMT) IgY *crude* setelah perlakuan suhu

berturut-turut adalah $2^{6,67}$, 2^6 , $2^{5,33}$, dan 2^0 Unit HI dan *Geometric Mean Titer* IgY presipitat berturut-turut adalah $2^{6,33}$, $2^{5,67}$, 2^4 , dan $< 2^0$ Unit HI. Besar pengaruh suhu terhadap aktivitas IgY *crude* dan presipitat (Gambar 1).

Perlakuan suhu berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas IgY crude dan presipitat. Perlakuan suhu 50°C pada IgY crude dan presipitat tidak menyebabkan penurunan aktivitas biologi yang nyata dibandingkan dengan kontrol ($P > 0,05$). Sedangkan perlakuan suhu 60°C , 70°C , dan 80°C pada IgY crude dan presipitat menunjukkan penurunan titer yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan control.

Uji HI sensitif dan mampu mengukur titer antibodi dengan indikator berupa ada-tidaknya aglutinasi sel darah merah (Sendow dan Syafrinati, 2004). Jika terdapat antibodi spesifik dalam serum maka aglutinasi sel darah merah akan dihambat dan pada dasar lubang mikroplate terbentuk bulatan seperti kancing (Wise *et al.*, 2005; Swango, 1995).



Gambar 4. Diagram GMT (-Log 2) IgY sediaan kasar dan IgY presipitat setelah perlakuan suhu

Hasil tersebut membuktikan bahwa titer IgY spesifik CPV mengalami penurunan sejalan dengan semakin tinggi pemanasan. IgY *crude* memiliki titer IgY lebih tinggi dibanding dengan IgY presipitat. IgY presipitat memiliki aktivitas lebih rendah sebagai akibat dari adanya komponen permukaan yang hilang pada saat presipitasi (Narat, 2003). Sedangkan pada IgY *crude* ada komponen-komponen permukaan yang membantu untuk terjadinya perlekatan antigen-antibodi secara sempurna (Polson *et al.*, 1990). Menurut Burgess (1995) semakin spesifik suatu antibodi maka akan semakin berkurang sensitifitasnya.

Pada perlakuan suhu 80°C aktivitas IgY *crude* dan IgY presipitat mengalami penurunan secara drastis. Hasil uji HI

menunjukkan pada suhu 80°C kedua jenis IgY tersebut sebesar $< 2^0$ Unit HI. Denaturasi pada molekul IgY menyebabkan terjadi pemecahan ikatan-ikatan non kovalen pada struktur IgY. Winarno (1998) menjelaskan bahwa denaturasi dapat diartikan suatu proses terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam dan terbukanya lipatan molekul protein. Pemanasan akan mengakibatkan terputusnya interaksi ikatan non-kovalen yang ada pada struktur protein tetapi tidak memutuskan ikatan peptidanya (Ophart, 2003; Suartini *et al.*, 2007). Hatta *et al.* (1993) menyebutkan bahwa IgY mulai terdenaturasi pada suhu 74°C . Ziad *et al.* (2000) melaporkan bahwa pada suhu 80°C dan 90°C menyebabkan IgY

kehilangan aktivitasnya. Hal tersebut juga dilaporkan oleh Suartini (2007) menyebutkan bahwa pemanasan pada suhu di atas 70°C IgY menunjukkan penurunan aktivitas secara signifikan.

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa titer IgY *crude* dan IgY presipitat mulai menunjukkan penurunan titer yang nyata pada suhu 70°C. IgY *crude* dan IgY presipitat kehilangan aktivitasnya pada suhu 80°C. Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh suhu terhadap titer IgY diperlukan rentang perlakuan suhu yang lebih sempit antara 70°C sampai 80°C.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Perlakuan suhu 50°C tidak menurunkan aktivitas biologis IgY *crude* dan presipitat secara nyata dibandingkan kontrol. Aktivitas biologis IgY *crude* dan presipitat turun drastis setelah perlakuan suhu 80°C.

Saran

Untuk mengetahui aktivitas IgY spesifik CPV diperlukan rentang perlakuan suhu yang lebih sempit. Sehingga seberapa besar pengaruh suhu terhadap setiap penurunan titer IgY dapat dilihat dengan jelas sampai titer IgY menunjukkan $< 2^0$ Unit HI.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Ketua LPPM Unud dan Kepala BBVet yang memberikan fasilitas Lab. selama penelitian serta petugas teknis yang membantu proses penelitian

DAFTAR PUSTAKA

Burgess GW. 1995. *Teknik serologi dalam mendiagnosis penyakit infeksius*. Penerjemah WT Artama. Gajah Mada University Press.

Yogyakarta.

Carlender D. 2002. Avian IgY antibody in vitro and in vivo. Acta Universitas Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, Uppsala.

Ettinger SJ, Feldman EC. 1995. *Text book of Veterinary Internal Medicine* Vol. 2. Academic Press. USA.

Hatta H, Tsuda K, Kim M, Yamamoto T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57: 450-454.

Hau J, Hendriksen 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.

Kapil S, Cooper E, Lamm C, Murray B, Rezabek G, Johnston L, Cambell G, Johnson B. 2007. Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*, 45(12): 4044-4047.

Muhammad KF, Rabbi I, Seed K, Hussain T. 2001. Passive immunization against infectious disease in chicks. *Int J Agric Biol*, 3(2):12-18.

Narat M. 2003. Production of *Antibodies in Chickens*. *Food Technol Botechnol*, 41:259-267.

Nolan JK, Mine Y. 2004. Avian egg Antibodies: basic and potential application. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 15(1): 25-46.

Ophart CE. 2003. *Virtual chembook*. elmhurst college. London.

Polson A, von Wechmar MB, Rogenmortel J. 1990. Antigenion of

- viral igy antibodies from yolk of immunized hens. *Immunogical Communication*. 9:75-83.
- Sampurna IP, Nindhia TS. 2007. *Metodologi ilmiah dan rancangan percobaan*. Udayana University Press. Denpasar.
- Schade R. 2008. Chicken egg yolk antibodies production and application: IgY-technology.
- Suartini IGAA, Wibawan IWT, Suhartono MT, Suartha IN. 2007. Aktivitas IgY dan IgG antitetanus setelah perlakuan pada berbagai pH, suhu dan enzim proteolitik. *J Veteriner*, 8(4): 160-166.
- Sendow I, Syafriati. 2004. Seroepidemiologi infeksi canine parvovirus pada anjing. *J ITV*, 9(3): 54-58.
- Swango LJ. 1995. *Canine viral diseases: textbook of veterinary internal medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Winarno FG. 1998. *Kimia pangan dan gizi*. Gramedia. Jakarta.
- Wise DJ, Carter GR, Flores EF. 2005. Laboratory diagnosis of viral infections. in: a concise review of veterinary virology. *IVIS*. A 3407.0305.
- Woolley JA, London J, Failen T. 1995. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (Il-6) by sheep and chicken. *Immunol Methods*, 2: 253-256.
- Yilmaz Z. 2005. Distribution of antigen types of canine parvovirus type 2 in dogs with hemorrhagic enteritis in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 73-76.
- Ziad W, Ronald J, Marquardt R. 2000. Studies on the stability of chicken igy in different sugars, complex carbohydrates. *J Food and Agric Immunology*. 12(4): 263-272.