

Produksi IgY Spesifik *Staphylococcus aureus* dari Isolat Asal Kasus *Staphylococcosis* pada Kelinci

(Production of Specific IgY *Staphylococcus aureus* Origin from *Staphylococcosis* Case in Rabbits)

Triwardhani Cahyaningsih^{1,3*}, Fachriyan Hasmi Pasaribu², Agustin Indrawati²

(Diterima Januari 2016/Disetujui Januari 2017)

ABSTRAK

Percobaan ini bertujuan untuk memproduksi immunoglobulin yolk (IgY) anti *Staphylococcus aureus* dengan isolat asal kasus *staphylococcosis* pada kelinci. Vaksinasi dilakukan pada ayam *brown leg horn* sebanyak empat kali menggunakan *Staphylococcus aureus* aktif 10^9 cfu/ml. Penyuntikan pada ayam dilakukan empat minggu berturut-turut, minggu pertama dilakukan penyuntikan intravena dengan antigen *S. aureus* sebanyak 0,5 ml, minggu kedua penyuntikan sub kutan *S. aureus* diemulsikan dengan *Complete Freund Adjuvant*, dilanjutkan minggu ketiga dan keempat penyuntikan antigen *S. aureus* diemulsikan dengan *Freund Adjuvant Incomplete*. Sampel telur diambil setelah empat minggu injeksi terakhir untuk identifikasi, purifikasi, dan penentuan kadar IgY spesifik terhadap *S. aureus* dalam kuning telur. Uji spesifisitas IgY secara kualitatif dilakukan dengan uji *Agar Gel Precipitation* (AGP). Ekstraksi IgY dilakukan menggunakan PEG – Ammonium sulfat, konsentrasi IgY yang telah dimurnikan dihitung dengan metode *Bradford*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa IgY mulai terdeteksi pada kuning telur pada minggu keenam pascaimmunisasi, dengan rata-rata kadar IgY, yaitu 1,7 mg/ml.

Kata kunci: IgY, kelinci, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

This experiment aims to produce immunoglobulin Y (IgY) *Staphylococcus aureus* isolates origin *staphylococcosis* case in rabbits. Vaccination is done several times using *Staphylococcus aureus* active in 10^9 cfu/ml. Injecting the chicken is done four weeks in a row, the first week is done by intravenous injection of *S. aureus* antigens, the second week of the injection sub cutan *S. aureus* emulsified with Freund's complete adjuvant, followed by the third and fourth week of the injection of *S. aureus* antigen emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Egg samples were taken after four weeks of the last injection for identification, purification, and determination of specific IgY against *S. aureus* in egg yolk. IgY specificity qualitatively tests performed by the AGP test (To Gel Precipitation). IgY extraction is done using PEG - Ammonium sulfate, purified IgY concentration calculated by the method of Bradford. The results showed that IgY began to be detected in egg yolk at week six after immunization, with the average levels of IgY is 1.7 mg/ml.

Keywords: IgY, rabbit, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus adalah bakteri yang umum ditemukan pada kulit dan hidung manusia maupun hewan. Bakteri ini dapat menginfeksi kelinci dari berbagai umur, dengan gejala dermatitis supuratif, abses multisistemik, pododermatitis, dan mastitis (Mahde 2011). Mastitis merupakan gambaran patologi yang paling banyak ditemukan pada induk kelinci, diikuti abses organ internal dan pyometra. Pada anak kelinci yang masih menyusui pada induknya, tipe lesi yang

umum adalah dermatitis eksudatif sedangkan pada kelinci pedaging, sering ditemui abses pada paru, hepar, dan uterus sehingga menyebabkan penurunan produksi, infertilitas, serta kematian. Secara umum, *staphylococcosis* pada kelinci yang disebabkan oleh *S. aureus* mempunyai ciri khas berupa *septicaemia* atau inflamasi supuratif yang dapat muncul pada berbagai organ (Bien *et al.* 2011).

Pencegahan terhadap *staphylococcosis* pada kelinci merupakan hal yang penting, namun sulit untuk dilakukan. Pengendalian dapat dilakukan dengan melakukan pemeriksaan pada hewan baru yang datang sebelum dimasukkan ke dalam *flok*. Penggunaan antibiotik untuk pencegahan, terapi terhadap penyakit (dosis profilaksis) maupun untuk *growth promotor* (dosis subterapi), dan sebagai pengobatan (dosis terapi) telah digunakan sejak berpuluh tahun silam. Penelitian maupun penggunaan di lapangan menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik mampu meningkatkan performa ternak secara signifikan (Diraviyam

¹ Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

² Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

³ Balai Penelitian Ternak PO BOX 221, Ciawi-Bogor 16002.

* Penulis Korespondensi: E-mail: ctriwardhani@yahoo.com

et al. 2014). Namun, penggunaan antibiotik pada pakan menimbulkan masalah serius berupa residu pada produk hewan dan peningkatan resistensi bakteri, sehingga dibutuhkan suatu strategi pada produksi ternak yang dapat mengurangi kejadian penyakit maupun resistensi obat akibat penggunaan antibiotik.

Imunisasi pasif menjadi pondasi dasar kesehatan manusia dan hewan, salah satunya dengan penggunaan antibodi. Kemampuan antibodi untuk mengikat antigen dengan tingkat afinitas dan spesifisitas yang tinggi menjadikannya bermanfaat, baik untuk pengujian diagnostik maupun sebagai terapeutik dan memiliki pengaruh nyata terhadap kesehatan manusia maupun hewan (Prabhudas *et al.* 2011). Imunisasi pasif adalah suatu usaha untuk mendapatkan kekebalan tubuh ternak dengan cara memindahkan antibodi dari ternak resisten kepada ternak yang rentan. Resistensi yang dihasilkan hanya bersifat sementara, memberi perlindungan yang cepat namun cepat pula dikatabolisme (Kalenik *et al.* 2014)

Pemanfaatan imunoglobulin Y (IgY) spesifik sebagai imunisasi pasif telah banyak diteliti dan diterapkan, antara lain dalam pengendalian penyakit bakteri, virus, dan protozoa. Penggunaan IgY spesifik sebagai imunoterapi terhadap bakteri antara lain *Streptococcus mutans* penyebab karies pada gigi (Sentila *et al.* 2013), *Campylobacter jejuni* penyebab diare pada manusia (Hermans *et al.* 2014), *S. aureus* dan *E. coli* (Tobias *et al.* 2012) serta *Helico-bacter pylori* (Wang *et al.* 2014). Beberapa virus yang dilaporkan dapat dikendalikan menggunakan IgY spesifik antara lain *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV) pada ayam broiler (Farooq *et al.* 2012), rotavirus dan norovirus penyebab gastroenteritis (Dai *et al.* 2013), dan produksi telur anti flu burung dan anti diare (Indrawati 2010). Penggunaan IgY *S. aureus* diharapkan mampu dijadikan alternatif pencegahan yang efektif dalam mengatasi kejadian *staphylococcosis* pada kelinci. Tujuan yang hendak diperoleh dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan IgY spesifik *S. aureus* dari isolat asal kasus *staphylococcosis* pada kelinci.

METODE PENELITIAN

Isolat Bakteri

S. aureus diisolasi dari organ paru kelinci yang menderita gangguan pernafasan yang dipelihara di kandang percobaan Balai Penelitian Ternak Ciawi. Koloni yang terduga pada media agar manitol dan agar darah diidentifikasi dengan pewarnaan gram, morfologi koloni, dan tipe hemolisis. *Strain* dikonfirmasi dengan uji koagulase dengan plasma kelinci.

Preparasi Antigen Utuh

Isolat bakteri ditumbuhkan pada 1.000 ml media BHI dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet diresuspensikan dengan 5 ml NaCl, disentrifugasi pada 10.000 rpm 10 menit, dilakukan 2 kali. Pelet dilarutkan dalam 5 ml NaCl,

dihomogenkan dan disetarakan dengan standar *McFarland 3* (10^9 CFU). Suspensi diinaktifkan dalam penangas air dengan suhu 52 °C selama 60 menit, didinginkan dan siap digunakan sebagai antigen untuk memproduksi antibodi.

Imunisasi Ayam Petelur

Produksi antibodi spesifik *S. aureus* dilakukan dengan mengimunisasi enam ayam petelur *Single Comb Brown Leghorn* berumur 16 minggu yang siap bertelur. Selama penelitian, semua ayam diberi air minum secara *ad libitum* dan ransum pakan komersil standar. Proses imunisasi ayam diawali dengan menyuntikkan secara intra vena sebanyak 0,5 ml (10^9 CFU) sediaan *S. aureus* tanpa *adjuvant* selama tiga hari berturut-turut (Kovacs-Nolan & Mine 2012). Kemudian sebanyak 1 ml (10^9 CFU) campuran antigen dengan *Freund's Adjuvant Complete* disuntikkan secara *subcutan* pada minggu kedua, sedangkan minggu ketiga dan keempat menggunakan *Freund's Adjuvant Incomplete* sebanyak 1 ml (10^9 CFU). Serum darah dan telur dikoleksi seminggu pascaimunisasi, keberadaan antibodi diuji menggunakan teknik *Agar Gel Precipitation Test*.

Ekstraksi IgY dengan Menggunakan Metode *Water Soluble Fraction*

Kuning telur dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4, setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi mencapai pH 5,0–5,2 dan disimpan pada suhu 4 °C minimal 12 jam. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3.125x g pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil sehingga diperoleh *water soluble fraction* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7,5, kemudian ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6.000 dan amonium sulfat (Tan *et al.* 2012). WSF ditambahkan PEG 6.000 sehingga konsentrasi akhir 12% (w/v). Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit suhu 20 °C. Pelet ditambahkan dengan amonium sulfat 40% sebanyak 5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 11.700x g selama 15 menit, pencucian dilakukan tiga kali. Pelet disuspensikan dengan PBS sebanyak 1 ml, dan ditambahkan dua tetes 0,1% Na acide. Suspensi didialisis selama 24 jam dengan PBS pH 8,0.

Penentuan Konsentrasi dan Berat Molekul IgY

Konsentrasi protein IgY ditentukan dengan menggunakan metode *Bradford* (Priyanka *et al.* 2014). Absorbansi sampel ditentukan dengan pembacaan pada UV spektrofotometer pada λ 595 nm. Konsentrasi sampel dihitung berdasarkan kurva larutan standar dengan *bovine serum albumin*. Penentuan bobot molekul IgY dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) menggunakan konsentrasi gel pemisah 12% dan gel pengumpul 14%. Perwarnaan gel menggunakan *silver staining*, dan perkiraan bobot molekul protein berdasarkan perbandingan dengan bobot molekul *marker* umum *fermentas life science*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi *S. aureus*

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa semua isolat *S. aureus* yang berasal dari organ paru kelinci penderita *staphylococcosis* mampu menfermentasi MSA, gram positif, berbentuk kokus, positif pada uji: koagulasi, katalase, uji fermentasi glukosa, dan laktosa. Isolat bakteri pada biakan agar darah menunjukkan dengan adanya pertumbuhan sel bakteri berukuran ± 2 mm berwarna putih dan koloni berwarna kuning pada biakan agar manitol, sedangkan pada media selektif *baird parker* agar menunjukkan pertumbuhan koloni hitam mengkilap dengan zona bening disekelilingnya (Gambar 1a). *Lesi post mortem* dari kelinci yang dinekropsi, yaitu berupa gejala *septicaemia*, hemoragi, serta abses pada organ internal, yaitu paru (Gambar 1b). Ferreira *et al.* (2014) menyatakan bahwa gambaran patologis paru kelinci penderita pneumonia yang diakibatkan oleh *S. aureus* memiliki gejala berupa penumpukan *exudat mukopurulen* pada *trakea* dan abses pada paru maupun hati.

Imunisasi Ayam Petelur

Percobaan ini dilakukan dengan melakukan penyuntikan pada ayam umur 16 minggu, selama proses imunisasi ayam petelur tetap dalam kondisi sehat tanpa ada gejala yang abnormal, tidak ada kematian, dan semua hewan menunjukkan perilaku normal. Selama proses imunisasi tidak terjadi penurunan kapasitas bertelur, dan tetap stabil selama empat bulan dengan jumlah rata-rata satu telur per hari. Hal ini sesuai dengan percobaan yang dilakukan Matheis dan Schade (2011) dimana kapasitas bertelur ayam tidak terpengaruh terhadap penyuntikan antigen. de Paula *et al.* (2011) menyatakan bahwa penyuntikan

pertama yang dilakukan pada umur 14 minggu, 30 hari sebelum periode awal bertelur tidak ditemukan penurunan kemampuan bertelur maupun efek samping selama proses imunisasi.

Keberadaan IgY spesifik *S. aureus* ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi pada agar gel (Gambar 2a & b). Garis presipitasi yang terbentuk pada media agar terjadi karena adanya keseimbangan antara jumlah antigen dan antibodi dalam kuning telur maupun serum. Perbandingan konsentrasi antigen dan antibodi adalah faktor penting dalam reaksi presipitasi. Pada rasio yang seimbang, akan terbentuk ikatan silang yang ekstensif dan terjadi bentukan kisi-kisi. Kisi-kisi ini berkembang menjadi lebih besar, tidak larut, dan akhirnya mengendap. Ikatan kompleks antigen-antibodi yang mengendap dan terlihat seperti garis berwarna putih ini disebut garis presipitasi (presipitat).

Molekul IgY *S. aureus* terdeteksi di dalam serum tujuh hari setelah imunisasi terakhir. Molekul IgY – *S. aureus* yang terbentuk di dalam serum pada minggu kelima merupakan antibodi spesifik terhadap *S. aureus*, hal ini sejalan dengan Lin *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa injeksi dosis pertama akan menghasilkan antibodi spesifik di dalam serum dan injeksi dengan sel-sel bakteri akan memunculkan reaksi antibodi 10–14 hari pascainjeksi. IgY dalam telur mulai terdeteksi pada minggu keenam setelah imunisasi pertama, dan tujuh hari setelah ditemukannya IgY dalam serum, hal ini terjadi karena diperlukan waktu dari sirkulasi darah sampai terakumulasi dalam telur (Tabel 1).

Konsentrasi dan Bobot Molekul IgY

IgY yang didapatkan memiliki konsentrasi rata-rata sebesar 1,7 mg/ml. Hasil ini relatif lebih rendah

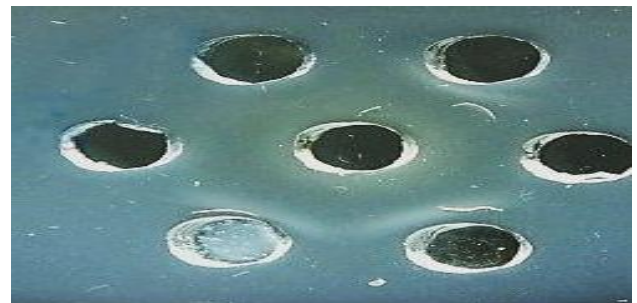


a

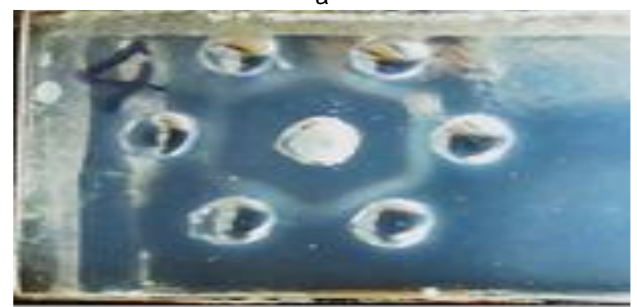


b

Gambar 1 *S. aureus* pada media *Baird Parker Agar* (a); Organ paru kelinci (b).



a



b

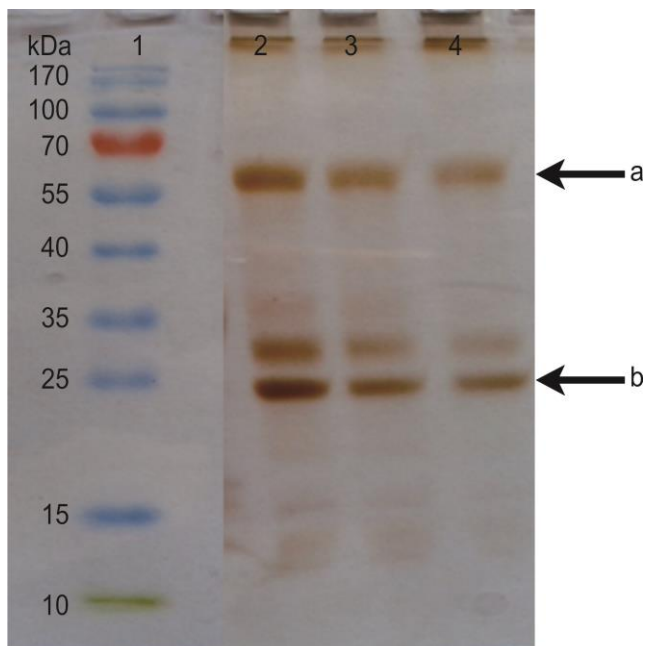
Gambar 2 Hasil uji AGPT pada kuning telur (a); hasil uji AGPT serum (b).

dibandingkan dengan hasil IgY WSF yang dihasilkan oleh Pauly *et al.* (2011), yaitu 2,6 mg/ml. Rendahnya IgY yang dihasilkan kemungkinan diakibatkan oleh tertinggalnya IgY pada saat proses purifikasi akibat protein tidak terpisah dengan baik sehingga tidak didapat konsentrasi maksimal. Proses dan lama penyimpanan juga dapat memengaruhi konsentrasi protein dalam telur (Hiroko *et al.* 2014).

Hasil ekstraksi IgY yang berasal dari kuning telur kemudian dianalisis profil pita proteinnya menggunakan SDS-PAGE. IgY *S. aureus* hasil ekstraksi menunjukkan beberapa profil pita protein, yaitu pita protein IgY rantai berat yang berada pada 60 kDa, dan pita protein IgY rantai ringan yang memiliki berat molekul 25 kDa. Abdou *et al.* (2014) mengemukakan bahwa struktur IgY terdiri atas dua rantai berat dengan berat molekul masing-masing 67–70 kDa dan dua rantai ringan dengan berat molekul masing-masing 25 kDa. (Gambar 3).

Tabel 1 Hasil uji AGP pada serum dan kuning telur

Status vaksinasi	Serum	Kuning telur
Pra vaksinasi	-	-
Minggu 1	-	-
Minggu 2	-	-
Minggu 3	-	-
Minggu 4	-	-
Minggu 5	+	-
Minggu 6	+	+
Minggu 7	+	+
Minggu 8	+	+
Minggu 9	+	+
Minggu 10	+	+
Minggu 11	+	+
Minggu 12	+	+



Gambar 3 Profil pita protein IgY *S. aureus* yang telah dipurifikasi (1) marker umum (2, 3, dan 4) IgY hasil purifikasi (a) IgY rantai berat 60kDa (b) IgY rantai ringan 25kDa.

KESIMPULAN

Ayam petelur yang diimunisasi dengan *S. aureus* mampu menghasilkan IgY spesifik yang terdeteksi pada kuning telur pada minggu keenam pasca-imunisasi, dengan rata-rata kadar IgY sebesar 1,7 mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou AM, Manal MME, Yamashita Y, Kim M. 2014. Immunoglobulin: A Natural Way to Suppress *Helicobacter pylori* in Humans. *Health*. 6: 781–791. <http://doi.org/b4pk>
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*. 2011. Article ID 601905. 13 pages. <http://doi.org/djr3w6>
- Dai YC, Zhang XF, Tan M, Huang P, Lei W, Fang H, Zhong W, Jiang X. 2013. A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. *Antiviral Research*. 97(3): 293–300. <http://doi.org/f4ttz5>
- Diraviyam T, Zhao B, Wang Y, Schade R, Michael A, Zhang X. 2014. Effect of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) against Diarrhea in Domesticated Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 9(5): e97716. <http://doi.org/b2qm>
- de Paula VS, da Silva AS, de Vasconcelos GA, Iff ET, Silva ME, Kappel LA. 2011. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*. 171(1): 102–106. <http://doi.org/cw52n7>
- Farooq A, Rabbani M, Muhammad K, Akram Z, Ahad A, Fatima Z, Kamal T, Anwar Z. 2012. Passive immunization in infectious bursal disease virus infected birds using chemically purified immune yolk immunoglobulins (IgY). *African Journal of Microbiology Research*. 6(12): 2993–2998. <http://doi.org/b2qn>
- Ferreira A, Monteiro JM, Vieira-Pinto M. 2014. The importance of subcutaneous abscess infection by *Pasteurella* spp. And *Staphylococcus aureus* as a cause of meat condemnation in slaughtered commercial rabbits. *World Rabbit Science*. 22(4): 311–317. <http://doi.org/b2qp>
- Hermans D, Steendam K, Verbrugghe E, Verlinden M, Martel A, Seliwiorstow T, Heyndrick M, Haesebrouck F, Zutter L, Deforce D, Pasman F. 2014. Passive immunization to reduce *Campylobacter* jejuni colonization and transmission in broiler chicken. *Veterinary Research*. 2014. 45: 27. <http://doi.org/b2qq>

- Hiroko SP, Kurtini T, Riyanti. 2014. Pengaruh lama simpan dan warna kerabang telur ayam ras terhadap indeks albumin, indeks yolk dan pH telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3): 108–114.
- Indrawati A. 2010. Telur Ayam 3 in One Anti Flu Burung dan Anti Diare: Produksi, Efikasi dan Aplikasinya. [Laporan Akhir Penelitian]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Kalenik B, Sawicka R, Góra-Sochacka A, Sirko A. 2014. Influenza prevention and treatment by passive immunization. *Acta Biochimica Polonica*. 61(3): 573–587.
- Kovacs-Nolan J, Mine Y. 2012. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3: 163–182. <http://doi.org/b2qr>
- Lin YF, Liou JF, Chen LR, Lien TF. 2014. IgY Production by Taiwan Native Tsaiya Ducks and White Leghorn Laying Hens. *Journal of Agricultural Science*. 6(9): 106–112. <http://doi.org/b2qs>
- Matheis W, Schade R. 2011. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 369(1–2): 125–132. <http://doi.org/b85sqv>
- Mahde NK. 2011. The pathogenesis of experimental infection by *Staphylococcus aureus* in rabbits. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*. 2(2): 127–140.
- Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *Journal of Visualized Experiments*. 51: 167–174. <http://doi.org/ccvjm2>
- Prabhudas M, Adkins B, Gans H. 2011. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nature Immunology*. 12: 189–194. <http://doi.org/fjfvqk>
- Priyanka BS, Abhijith KS, Navin KR, Raghavarao MS, Thakur MS. 2014. Integrated Approach for the Extraction and Purification of IgY from Chicken Egg Yolk. *Separation Science and Technology*. 49(4): 562–568. <http://doi.org/b2qt>
- Sentila R, Karthika S, Michael A, Gandhimathi A. 2013. Protection against Dental Carries by Passive Immunization with Hen Egg Yolk Antibody Using Cell Associated Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*. 2(3): 1–5. <http://doi.org/b2qv>
- Tan SH, Mohamedali A, Kapur A, Lukjanenko L, Baker MS. 2012. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. *Journal of Immunological Methods*. 380(1–2): 73–76. <http://doi.org/b2qw>
- Tobias FL, Garcia LNN, Kanashiro MM, Acosta EM, João G, Vieira-da-Motta O. 2012. Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Strains by Neutralizing IgY Antibodies from Ostrich Egg Yolk. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(2): 544–551. <http://doi.org/b2qx>
- Wang B, Yang J, Cao S, Wang H, Pan X, Zhu J, Zhou Y, Gao L, Li W, Li M. 2014. Preparation of specific anti-*Helicobacter pylori* yolk antibodies and their antibacterial effects. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*. 7(10): 6430–6437.