

**DETEKSI IMMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) Anti-*plasmodium falciparum*
Lactate Dehydrogenase (pfLDH) PADA TELUR AYAM MENGGUNAKAN
TEKNIK *IN-HOUSE INDIRECT ELISA***

PUBLIKASI ILMIAH

Diserahkan Guna Memenuhi Sebagian Syarat yang Diperlukan
untuk Mendapat Derajat Sarjana Peternakan pada
Program Studi Peternakan

PROGRAM STUDI PETERNAKAN



oleh

AGIL DARMAWAN
B1D 014 009

FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS MATARAM
MATARAM
2019

**DETEKSI IMMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) Anti-plasmodium falciparum
Lactate Dehydrogenase (pfLDH) PADA TELUR AYAM MENGGUNAKAN
TEKNIK IN-HOUSE INDIRECT ELISA**

PUBLIKASI ILMIAH

OLEH:

**AGIL DARMAWAN
B1D 014 009**

Diserahkan Guna Memenuhi Sebagian Syarat yang Diperlukan
untuk Mendapat Derajat Sarjana Peternakan pada
Program Studi Peternakan

**Menyetujui,
Pembimbing Utama**



Prof. Ir. Sulaiman Ngongu Depamede, M.Biotech, Ph.D
NIP. 19590430 198703 1001

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS MATARAM
MATARAM
2019**

DETEKSI IMMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) Anti-*plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pfLDH) PADA TELUR AYAM MENGGUNAKAN TEKNIK IN-HOUSE INDIRECT ELISA

**AGIL DARMAWAN
B1D 014 009**

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi antibodi IgY anti-*pfLDH* pada kuning telur dari ayam yang divaksinasi dengan antigen *pfLDH* rekombinan. Deteksi tersebut dilakukan dengan menguji sampel IgY menggunakan teknik *In-House Indirect ELISA*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram dan Laboratorium Pusat Unggulan Biosains dan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram dari bulan Februari 2018 sampai September 2018. Bahan pada penelitian ini adalah telur dari ayam ras yang sudah divaksinasi sebanyak tiga kali menggunakan antigen *pfLDH* rekombinan. Sampel IgY telur dimurnikan menggunakan pengendapan PEG. Hasil pemurnian sampel tersebut kemudian digunakan sebagai sampel uji pada uji *In-House Indirect ELISA* untuk mengetahui keberadaan dan kuantitas antibodi IgY anti *pfLDH* pada tiap sampel IgY telur ayam dengan melihat nilai/angka absorbansi setiap sampelnya. Dilakukan juga beberapa perlakuan pengenceran pada antibodi dan antigen pada uji ELISA untuk mengetahui konsentrasi yang paling optimal untuk mendeteksi antibodi IgY spesifik tersebut. Kesimpulan dari penelitian ini adalah telur yang dihasilkan oleh ayam ras *Rhode Red Island* yang telah divaksin dengan antigen *pfLDH* rekombinan positif mengandung antibodi IgY anti-*pfLDH* dan dapat dideteksi menggunakan uji *In-house Indirect ELISA*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi antibodi IgY spesifik tertinggi terdapat pada sampel IgY dari telur ayam 7 hari setelah *booster* ke-2 dengan konsentrasi sebesar 0,01895 mg/ml terhadap antigen *pfLDH* rekombinan sebesar 0,044 mg/ml.

Kata Kunci: ELISA, *In-house Indirect ELISA*, *plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (*pfLDH*), IgY (*Immunoglobulin Yolk*)

DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) Anti-*plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pfLDH) IN CHICKEN EGG USING IN-HOUSE INDIRECT ELISA TECHNIQUES

**AGIL DARMAWAN
B1D 014 009**

ABSTRACT

This research aimed to detect the specific IgY antibodies called IgY anti-*pfLDH* in egg yolks from chickens which had previously been vaccinated with antigens from Malaria, recombinant *pfLDH*. Detection was carried out by testing IgY samples using the In-house Indirect ELISA technique. The research was carried out in the Microbiology and Biotechnology Laboratory of the Faculty of Animal Science, University of Mataram, and the Laboratory of Center for Excellence in Bioscience and Biotechnology of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Mataram from February 2018 to September 2018. This research material was eggs from purebred layer chicken which had been vaccinated three times using *pfLDH* antigens. IgY samples of eggs were purified using ethylene glycol (PEG). The purification results then used as test samples in the In-House Indirect ELISA test to determine existence and quantity of anti-*pfLDH* IgY antibody in each IgY sample of chicken eggs by looking at the absorbance value/number of each sample. Dilution treatments on antibodies and antigens in the ELISA test also applied to determine the most optimal dilution to detect these specific IgY antibodies. The conclusion of this study is eggs which produced by Rhode Red Island race chickens that have been vaccinated with recombinant *pfLDH* antigen are containing positive anti-*pfLDH* IgY antibodies and could be detected using the In-house Indirect ELISA test. The results of this study indicate that the highest concentration of specific IgY antibodies was found in IgY samples from chicken eggs 7 days after the second booster with a concentration of 0.01895 mg/ml against recombinant *pfLDH* antigens of 0.044 mg/ml.

Keywords: ELISA, In-house Indirect ELISA, *plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (*pfLDH*), IgY (Immunoglobulin Yolk)

PENDAHULUAN

Telur ayam adalah salah satu produk dari hewan unggas yang mengandung banyak protein, terutama protein hewani yang kaya akan manfaat bagi kesehatan tubuh manusia yang mengkonsumsinya. Telur ayam juga merupakan bahan pangan yang berkualitas tinggi, murah dan mudah untuk didapatkan. Selain itu telur ayam memiliki potensi sebagai pabrik biologis untuk produksi zat anti terhadap agen penyakit. Zat anti ini dapat digunakan dalam upaya pencegahan, pengobatan dan diagnostika (Carlander, 2002).

Immunoglobulin atau antibodi dibentuk oleh sistem kekebalan tubuh sebagai respon terhadap masuknya benda asing (antigen) dalam tubuh. *Immunoglobulin* yang dibentuk dalam darah ayam sebagai akibat masuknya antigen tertentu, dapat ditransfer ke dalam kuning telur yang dikenal dengan *Immunoglobulin Yolk* (IgY). Kuning telur (*yolk*) dari ayam sangat terkenal sebagai salah satu sumber antibodi, terutama antibodi IgY. IgY dalam kuning telur ayam berfungsi sebagai kekebalan bawaan pada anak yang diperoleh dari induk (*maternal antibody*). IgY juga dapat digunakan sebagai imunoterapi untuk memberikan kekebalan pasif pada tubuh (Soejoedono *et al.*, 2005). Selain itu, ayam memiliki sensitifitas yang tinggi terhadap pemaparan antigen asing, sehingga sistem imun ayam sangat responsif dan persisten untuk produksi IgY (Hau dan Hendriksen, 2005). Keunggulan lainnya adalah IgY dapat diperoleh dari telur dengan konsisten menjaga *animal welfare*, tanpa harus menyakiti hewan. Oleh sebab itu, penggunaan telur ayam dapat dijadikan alternatif produksi antibodi berbasis bahan lokal di Indonesia. Kelebihan telur sebagai tempat produksi antibodi IgY tersebut diantaranya produksi antibodi yang lebih banyak dan murah, mudah didapatkan,

mudahnya pengontrolan inang, dan menghindari pengambilan sampel darah yang berlebih pada unggas (Müller *et al.*, 2015).

Penggunaan ayam sebagai inang yang menghasilkan antibodi menunjukkan **efek positif** antibodi IgY kuning telur terhadap bakteri penyebab intoksikasi pada hewan dan manusia. Menurut Müller *et al.*, (2015) menyatakan bahwa ternyata vaksinasi ayam dengan antigen spesifik menawarkan kemungkinan untuk menciptakan suatu antibodi spesifik pula terhadap antigen tersebut. Selain terbentuk di dalam sistem imun tubuh ayam, antibodi spesifik tersebut juga diekspresikan pada antibodi IgY pada kuning telur, atau yang lebih dikenal dengan antibodi IgY spesifik.

Plasmodium falciparum merupakan protozoa yang menyebabkan penyakit malaria. Menurut White (2008) protozoa tersebut merupakan komplikasi utama penyebab penyakit malaria selain *Plasmodium Vivax*. *Plasmodium falciparum* *Lactate Dehydrogenase* (*pfLDH*) merupakan salah satu enzim yang menentukan siklus hidup protozoa *Plasmodium falciparum* tersebut. Menurut Coutinho (2011) *pfLDH* dianggap sebagai target molekuler yang potensial untuk pembuatan antibodi malaria (anti-malaria) karena ketergantungan protozoa ini terhadap proses glikolisis untuk memproduksi energinya. Enzim LDH (*Lactate Dehydrogenase*) ditemukan sebanyak 90% dalam *pfLDH*, hal ini memunculkan kemungkinan besar untuk memproduksi antibodi baru untuk pengobatan malaria, terutama pengobatan terhadap parasit/antigen dari *pfLDH* itu sendiri.

Pada penelitian ini dilakukan deteksi kandungan antibodi IgY pada kuning telur dari ayam yang telah divaksinasi dengan *pfLDH* rekombinan atau yang disebut antibodi IgY anti-*pfLDH*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *In-*

house Indirect ELISA untuk mendeteksi kandungan antibodi IgY anti-*pf*LDH pada kuning telur ayam. Diharapkan antibodi IgY informasi tentang anti-*pf*LDH pada penelitian ini dapat menjadi data bermanfaat dan acuan untuk kepentingan imunodiagnostik penyakit Malaria melalui reaksi spesifik antigen-antibodi.

METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Juni – September 2018 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram. Pembuatan *buffer* dan lain-lain dilakukan di lab ini. Pada Laboratorium Pusat Unggulan Biosains dan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram dilakukan pembacaan absorbansi warna ELISA pada ELISA *reader* dan juga pengukuran konsentrasi antigen maupun antibodi sampel ELISA.

Antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah antigen *pFLDH* rekombinan hasil penelitian dari peneliti sebelumnya yakni Ali *et al.*, (2013). Sedangkan antibodi IgY yang digunakan berasal dari telur ayam *Red Rhode Island* yang divaksinasi menggunakan antigen *pFLDH*. Jadi selain digunakan pada uji *In-house Indirect* ELISA, antigen tersebut juga digunakan pada proses vaksinasi ayam yang dilakukan peneliti sebelumnya sebagai salah satu penelitian dari skripsi Umi Kalsum (B1D 012 296). Selanjutnya sebagai kontrol, telah digunakan telur dari ayam yang tidak divaksinasi. Sampel IgY telur yang dijadikan sebagai sampel penelitian disajikan pada **Tabel 1**.

Kemudian dilakukan isolasi dan pemurnian IgY menggunakan metode pemurnian *Polyethylene Glycol* (PEG) dari Pauly *et al.*, (2011) sebagaimana yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya yakni Suci (2018) meliputi: 1) Pemisahan kuning telur dari putih telur; 2) Penambahan PBS 1x dan PEG; 3) Sentrifugasi; 4) Koleksi supernatan; 5) Penambahan PEG; 6) Sentrifugasi #2; 7) Koleksi pellet; 8) Penambahan PBS 1x dan PEG; 9) Sentrifugasi #3; 10) Dialisis; 11) Koleksi pellet antibodi IgY poliklonal. Seluruh sampel IgY dimurnikan dengan *Polyethylene*

Glycol (PEG) 6000 bermerek SERVA. Hasil isolasi IgY dari didapatkan antibodi IgY poliklonal yang digunakan sebagai antibodi primer pada uji *In-house Indirect* ELISA. Kemudian sampel pemurnian IgY diberi kode sampel sesuai pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Data Pemurnian Telur dari Ayam yang divaksinasi Antigen *pfLDH*

No	Sampel Telur	Kode	Volume (μ l)	Konsentrasi (mg/ml)
1	Kontrol	T0	1900	4,34
2	1/2/2018	T3	2500	7,95
3	5/2/2018	T7	1900	18,95
4	9/2/2018	T11	2700	14,17
5	13/2/2018	T15	1650	11,83
6	17/2/2018	T19	2600	29,08
7	21/2/2018	T23	2000	7,32

Keterangan Sampel:

Tanggal vaksinasi terakhir = **29 Januari 2018**

T0 = telur kontrol

T3 = telur koleksi 3 hari pasca vaksinasi terakhir

T7 = telur koleksi 7 hari pasca vaksinasi terakhir

T11 = telur koleksi 11 hari pasca vaksinasi terakhir

T15 = telur koleksi 15 hari pasca vaksinasi terakhir

T19 = telur koleksi 19 hari pasca vaksinasi terakhir

T23 = telur koleksi 23 hari pasca vaksinasi terakhir

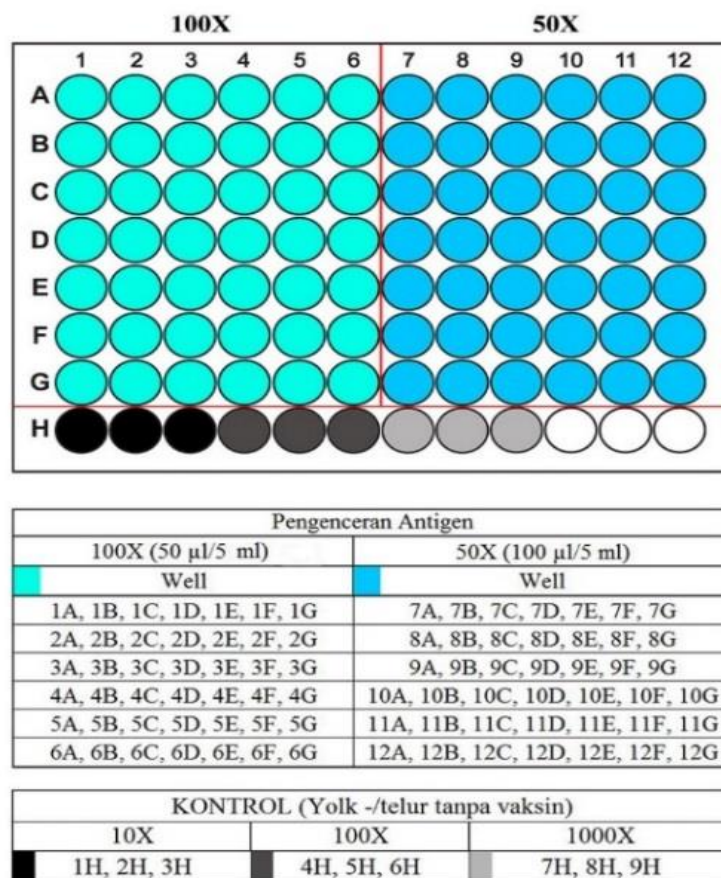
Persiapan

Antigen *pfLDH* rekombinan disiapkan sebagai komponen yang mengikat antibodi pada uji *In-house Indirect* ELISA. Antigen *pfLDH* disiapkan dengan konsentrasi 4.4 mg/ml. Kemudian digunakan sebagai pelapis pada tahapan *coating* antigen dengan konsentrasi 0.044 mg/ml (diencerkan dengan PBS 100x) dan 0.088 mg/ml (diencerkan dengan PBS 50x).

Pelapisan Antigen (*Antigen Coating*)

Pada tahapan ini, *plate* ELISA *dicoating* (dilapisi) dengan antigen *pfLDH* diencerkan dengan PBS 1x. Terdapat 2 pengenceran antigen *pfLDH* yakni sebesar 50x (0.088 mg/ml) dan 100x (0.044 mg/ml) yang dibuat sebanyak masing-masing

5 ml. Sementara itu, untuk mengetahui apakah reaksi ELISA bekerja dengan baik ketika dilakukan penambahan antibodi sekunder (*Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit (SIGMA-ALDRICH)*), maka pada *plate* ELISA juga dilapisi dengan sampel IgY telur dari ayam yang tidak divaksinasi atau yang disebut kontrol reaksi positif (T0+). Pengenceran yang digunakan adalah 10x (0.434 mg/ml), 100x (0.043 mg/ml), dan 1000x (0.004 mg/ml) dengan pengenceran PBS 1x.



*Ditambahkan masing-masing 100 µl/well
 *Sampel Antigen dan Kontrol diencerkan dengan PBS 1X

Gambar 1. Penempatan *Coating* Antigen pada *Plate* ELISA

Hasil pengenceran antigen diteteskan pada sumuran *plate* ELISA sebanyak 100 µl/sumuran sesuai penempatannya pada **Gambar 1**. Masing-masing pengenceran diberlakukan tiga ulangan (3x) pada sumuran tersebut. Sedangkan tiga

sumuran H10-H12 dijadikan sebagai blanko yang merupakan indikator cemaran awal sumuran terhadap kontaminan. Kemudian *plate* ELISA ditutupi dengan plastik bening dan alumunium foil dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

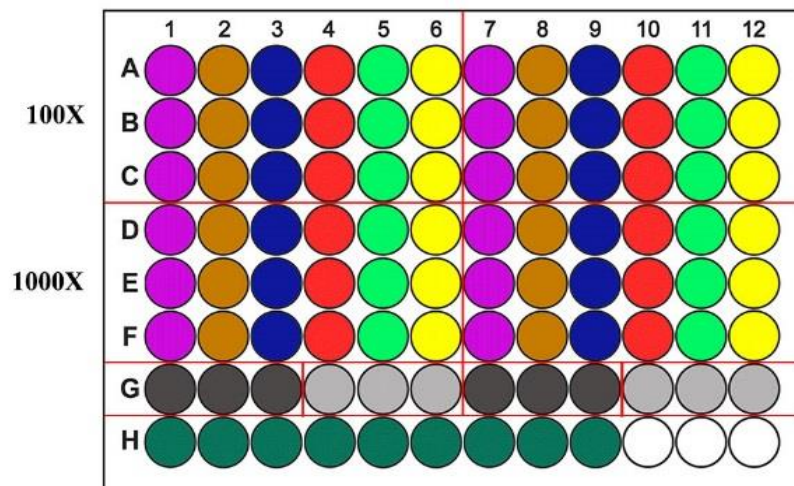
Blocking Sumuran Plate ELISA

Cairan hasil inkubasi dibuang dan *plate* ELISA dikepak-kepakkan pada tumpukan tisu untuk menghilangkan sisa cairan pada sumuran. Kemudian seluruh *plate* ELISA dicuci dengan *washing buffer* menggunakan 8-kanal (*multichannel*) mikropipet sebanyak 200 µl/sumuran. Didiamkan selama 1 menit, kemudian dibuang dengan dikepak-kepakkan pada alas bertisu. Proses tersebut diulangi sebanyak 4 kali/periode pencucian. Selanjutnya ditambahkan *blocking buffer* sebanyak 200 µl/sumuran. *Plate* ELISA ditutupi menggunakan plastik bening dan alumunium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

Penambahan Antibodi Primer (Primary Antibody Sampling)

Sampel IgY telur T3-T23 sebagai antibodi primer ditambahkan pada *plate* ELISA dengan pengenceran 100x dan 1000x menggunakan PBS.T yang mengandung 1% BSA. Begitu juga pada sampel T0. Pengenceran sampel T0 pada tahap *sampling* ini akan menjadi indikator **kontrol negatif (T0-)** di uji *In-house Indirect* ELISA. Pada penelitian ini, sampel IgY dari ayam yang tidak divaksinasi atau sampel T0 memiliki dua fungsi yakni 1) sebagai kontrol reaksi positif melalui ikatan “*Direct*” (langsung) dengan antibodi sekunder (*Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit (SIGMA-ALDRICH)*). Penambahan sampel ini dilakukan pada tahapan *coating* antigen; 2) sebagai kontrol “negatif” terhadap antigen *p/*LDH yang dilapisi pada *plate* ELISA.

Penambahan sampel antibodi IgY sesuai penempatan pada **Gambar 2**. Pengenceran sampel IgY masing-masing sebanyak 50 µl/sumuran ditambahkan pada 6 sumuran *plate* ELISA. Pada sumuran baris 1H-9H (T0+) hanya ditambahkan dengan PBS 1x. Selanjutnya *plate* ELISA ditutupi kembali dengan plastik bening dan alumunium foil dan iinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam di inkubator. Setelah itu hasil inkubasi pada sumuran dibuang dan *plate* ELISA dikepak-kepakkan pada alas bertisu. *Plate* ELISA dicuci sebanyak 4 kali sesuai prosedur sebelumnya.



Sampel	Pengenceran Antibodi	
	100X	1000X
1 Februari 2018	1A, 1B, 1C, 7A, 7B, 7C	1D, 1E, 1F, 7D, 7E, 7F
5 Februari 2018	2A, 2B, 2C, 8A, 8B, 8C	2D, 2E, 2F, 8D, 8E, 8F
9 Februari 2018	3A, 3B, 3C, 9A, 9B, 9C	3D, 3E, 3F, 9D, 9E, 9F
13 Februari 2018	4A, 4B, 4C, 10A, 10B, 10C	4D, 4E, 4F, 10D, 10E, 10F
17 Februari 2018	5A, 5B, 5C, 11A, 11B, 11C	5D, 5E, 5F, 11D, 11E, 11F
21 Februari 2018	6A, 6B, 6C, 12A, 12B, 12C	6D, 6E, 6F, 12D, 12E, 12F

Sampel	
Kontrol 100X	1G, 2G, 3G, 7G, 8G, 9G
Kontrol 1000X	4G, 5G, 6G, 10G, 11G, 12G
PBS 1X	1H - 9H

*Ditambahkan masing-masing 50 µl/well

*Sampel Antibodi dan Kontrol diencerkan dengan PBS.T + 1% BSA

Gambar 2. Penempatan *Sampling* Antibodi Primer pada *Plate* ELISA

Penambahan Antibodi Sekunder (*Secondary Antibody Sampling*)

Seluruh sumuran *Plate* ELISA ditambahkan antibodi sekunder *Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit* (SIGMA-ALDRICH) dengan pengenceran 20.000x menggunakan PBS.T yang mengandung 1% BSA dan ditambahkan 50 µl/sumuran *plate* ELISA. Seluruh sumuran *plate* ELISA diisi dengan antibodi sekunder kecuali sumuran blanko. Selanjutnya *Plate* ELISA kembali dilapisi alumunium foil dan *plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian cairan pada sumuran sampel dibuang dan dicuci sesuai dengan prosedur sebelumnya.

Reaksi Enzimatis dan Pembacaan Absorbansi

Plate ELISA ditambahkan substrat TMB (*Tetramethylbenzidine*) sebanyak 50 µl/sumuran. Didiamkan selama 15 menit pada ruang minim cahaya hingga absorbansi warna muncul optimal pada tiap sumuran sampel. Kemudian ditambahkan HCl 1 N (*stop Sslution*) pada seluruh sumuran sampel sebanyak 50 µl/sumuran. Hasil absorbansi warna yang terbentuk segera dibaca menggunakan ELISA *reader* merek DYNEX MRX dengan panjang gelombang 450 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembacaan Absorbansi Warna Hasil ELISA dengan ELISA Reader

Pada pembacaan hasil absorbansi sampel ELISA di ELISA Reader merek DYNEX MRX, terlihat perbedaan nilai absorbansi pada sampel IgY telur T3-T23 dengan nilai absorbansi sampel IgY telur T0-. Begitu juga dengan sampel IgY telur T0+ memiliki perbedaan nilai absorbansi dengan sampel IgY telur T0-. Secara keseluruhan, nilai absorbansi sampel IgY telur T3-T23 dan T0+ memiliki angka lebih tinggi dibandingkan dengan sampel IgY telur T0-.

Pada **Tabel 2** ditampilkan nilai rata-rata absorbansi sampel IgY telur dengan masing-masing perlakuan pengenceran yang telah dikurangi dengan nilai rata-rata dari blanko yang bernilai **0,040**. Pada tabel tersebut terlihat jelas perbedaan rata-rata nilai absorbansi dari sampel IgY telur T0- dengan sampel IgY telur T3-T23 dan T0+. Pada sampel IgY telur T3-T23, nilai rata-rata absorbansi tertinggi terdapat pada perlakuan pengenceran 100x antibodi dan 50x antigen pada sampel IgY telur T7 (0.1895 mg/ml antibodi IgY) dengan nilai 0,766.

Sedangkan nilai rata-rata absorbansi terendah terdapat pada perlakuan pengenceran 1000x antibodi dan 100x antigen pada sampel IgY telur T23 (0.00732 mg/ml) dengan nilai 0,268. Ini berarti sampel IgY telur yang dikoleksi 7 hari pasca vaksinasi dan diencerkan 100x (0.1895 mg/ml antibodi IgY) memberi reaksi antigen-antibodi yang paling tinggi terhadap 50x Antigen *pfLDH* yang diencerkan 50x (0.086 mg/ml) dibandingkan dengan seluruh sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi. Sedangkan sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi yang dikoleksi 23 pasca vaksinasi terakhir/*booster* 2 memiliki ikatan antigen-antibodi yang lemah diantara seluruh sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi, dengan nilai

absorbansi terendahnya pada perlakuan pengenceran 1000x antibodi (0.00732 mg/ml antibodi IgY) dan 100x antigen (0.043 mg/ml antigen *pfl*LDH) yakni 0,268.

Tabel 2. Nilai Rata-rata Absorbansi Sampel IgY pada uji *In-house Indirect* ELISA

Telur Sampel	pengenceran 1	pengenceran 2	pengenceran 3	pengenceran 4
T0-	0.315	0.328	0.217	0.251
T3	0.642	0.730	0.635	0.699
T7	0.732	0.766	0.684	0.707
T11	0.570	0.604	0.632	0.631
T15	0.662	0.701	0.452	0.563
T19	0.640	0.704	0.495	0.568
T23	0.455	0.481	0.268	0.272
T0+	0,411		0,493	

Keterangan Pengenceran:

1: (100x Antibodi dan 100x Antigen) 3: (1000x Antibodi dan 100x Antigen)

2: (100x Antibodi dan 50x Antigen) 4: (1000x Antibodi dan 50x Antigen)

Rata-rata nilai absorbansi warna lebih tinggi pada sampel T3-T23 disebabkan karena telur tersebut dihasilkan dari ayam yang sebelumnya sudah divaksinasi dengan antigen *pfl*LDH, akibatnya sistem imun ayam bereaksi dalam wujud pembentukan/produksi antibodi spesifik terhadap antigen *pfl*LDH atau disebut IgY anti-*pfl*LDH, sehingga membuat telur dari ayam yang divaksinasi tersebut dapat memproduksi antibodi IgY lebih banyak dari produksi antibodi normalnya, terutama yang spesifik terhadap *pfl*LDH.

Pada **Tabel 2** juga ditampilkan rata-rata nilai absorbansi warna sampel IgY telur T0+. Sampel tersebut memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata nilai absorbansi warna sampel T0-. Tetapi nilai absorbansi sampel T0+ relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata nilai absorbansi sampel IgY telur T3-T23, terutama sampel T0+ pada perlakuan pengenceran 100x antibodi IgY yang bernilai 0,411 dan 1000x yang bernilai 0,493.

Sampel IgY telur T0+ merupakan sampel IgY telur dari ayam yang tidak divaksinasi yang tidak direaksikan dengan antigen *pfl*LDH, melainkan murni

antibodi IgY pada telur dari ayam yang tidak divaksinasi direaksikan dengan antigen *pfl*LDH. Pembacaan sampel tersebut pada ELISA *Reader* menunjukkan ikatan langsung protein antibodi IgY yang menempel pada dinding sumuran *plate* ELISA, kemudian direaksikan dengan antibodi sekunder (*Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit (SIGMA-ALDRICH)*) yang menyebabkan munculnya absorbansi warna dari ikatan Enzim-substrat atau yang disebut *Enzim-linked*. Mengacu pada hal tersebut dapat dikatakan bahwa nilai absorbansi warna dari sampel IgY telur T0+ adalah hanya ikatan antibodi IgY, bukan ikatan antara antigen *pfl*LDH dengan antibodi IgY telur. Dalam penelitian ini IgY telur T0+ digunakan sebagai “kontrol positif” untuk menunjukkan *In-house Indirect* ELISA yang digunakan bekerja dengan baik.

Analisis Varian (ANOVA) Nilai antar Perlakuan Pengenceran Sampel.

Pada analisis ini diuji perbedaan nilai rata-rata absorbansi warna sampel IgY telur T3-T23 dengan empat macam jenis perlakuan pengenceran. Mengacu pada **Tabel 2**, terdapat beberapa perlakuan pengenceran yakni **pengenceran 1** (100x Antibodi dan 100x Antigen); **pengenceran 2** (100x Antibodi dan 50x Antigen); **pengenceran 3** (1000x Antibodi dan 100x Antigen); dan **pengenceran 4** (1000x Antibodi dan 50x Antigen). Pada uji analisis ini diberlakukan dua hipotesis, yakni H0 dan H1. H0 merupakan hipotesis yang menyimpulkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan pengenceran sampel. Sedangkan H1 merupakan hipotesis yang menekankan pada adanya perbedaan nyata pada tiap perlakuan pengenceran. Hipotesis H0 akan terpenuhi jika nilai F hitung kurang dari nilai F tabel. Sedangkan Hipotesis H1 akan terpenuhi jika nilai F hitung lebih tinggi dari nilai F tabel.

Pada **Tabel 3** diperlihatkan hasil analisis dari ANOVA menunjukkan grup perlakuan pengenceran, jumlah sampel yang diuji perperlakuan pengenceran, jumlah total, rata-rata, varian dari empat perlakuan pengenceran. Tercantum juga nilai F hitung dan F tabel. Pada data analisa tersebut, F hitung memiliki nilai yang lebih kecil yakni **1,18087** jika dibandingkan dengan nilai F tabel yang bernilai **3,09839**. Maka dapat disimpulkan bahwa H0 diterima dan H1 ditolak yang berarti **tidak terdapat perbedaan yang nyata** diantara grup perlakuan pengenceran antibodi maupun antigen terhadap hasil nilai absorbansi warna sampel IgY telur pada uji *In-house Indirect* ELISA.

Tabel 3. Hasil Uji Analisis Varian Terhadap Perlakuan Pengenceran Sampel IgY telur pada Uji *In-house Indirect* ELISA

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
pengenceran 1 (100x Ab dan 100x Ag)	6	3.701333	0.616888889	0.00902
pengenceran 2 (100x Ab dan 50x Ag)	6	3.987	0.6645	0.01095
pengenceran 3 (1000x Ab dan 100x Ag)	6	3.166	0.527666667	0.02429
pengenceran 4 (1000x Ab dan 50x Ag)	6	3.439333	0.573222222	0.02563

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.061896755	3	0.020632252	1.18087	0.34206	3.09839
Within Groups	0.349440685	20	0.017472034			
Total	0.41133744	23				

Perbedaan Nilai Absorbansi Sampel IgY Telur

Secara teori, perlakuan pengenceran akan menurunkan nilai konsentrasi yang terkandung dalam suatu sampel/bahan. Semakin tinggi jumlah pengenceran, semakin sedikit nilai konsentrasi pada bahan/sampel tersebut. Sebaliknya semakin rendah jumlah pengenceran, maka semakin banyak nilai konsentrasi pada bahan/sampel. Pada perlakuan pengenceran sampel IgY telur penelitian ini,

pengenceran 1 dan 2 memiliki pengenceran antibodi lebih rendah dengan pengenceran 100x dibandingkan pengenceran 3 dan 4 yang memiliki pengenceran antibodi lebih tinggi yakni 1000x. Mengacu pada data **Tabel 2**, sampel IgY telur T3-T23 dengan perlakuan pengenceran 1 dan 2 memiliki rata-rata nilai absorbansi yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan pengenceran 3 dan 4. Hal tersebut dikarenakan pengenceran 3 dan 4 memiliki jumlah pengenceran yang lebih tinggi pada antibodinya sehingga secara otomatis nilai ikatan antibodi yang mengikat antigen pada sampel tersebut lebih rendah.

Perbandingan nilai absorbansi sampel IgY telur dilakukan untuk mengetahui perbedaan kandungan antibodi IgY anti-*pf*LDH pada sampel IgY telur dari ayam yang tidak divaksinasi (T0) dengan sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi antigen *pf*LDH (sampel T3-T23). Seluruh rata-rata nilai absorbansi warna sampel T3-T23 dan juga sampel T0+ dikurangi dengan nilai rata-rata blanko, kemudian dikurangi dengan rata-rata nilai absorbansi warna sampel T0-. Melalui hasil data tersebut dapat diketahui seberapa besar perbedaan nilai absorbansi warna sampel T3-T23 dan juga sampel T0+ dengan sampel T0- atau telur dari ayam yang tidak divaksinasi. Standar deviasi sampel dihitung untuk melihat sebaran nilai rata-rata absorbansi tiap sampel.

Pada **Gambar 3** ditampilkan grafik nilai rata-rata absorbansi sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi atau sampel T3-T23 terhadap nilai *cut-off* (*cut-off value*). Nilai *cut-off* adalah nilai yang digunakan untuk memastikan derajat kebutuhan kriteria apakah penting atau tidaknya nilai pada suatu sampel (Gupta *et al.*, 2016). Lardeux *et al.*, (2016) menambahkan bahwa pada uji ELISA, penentuan nilai *cut-off* dibutuhkan untuk penilaian terhadap positif atau negatifnya nilai

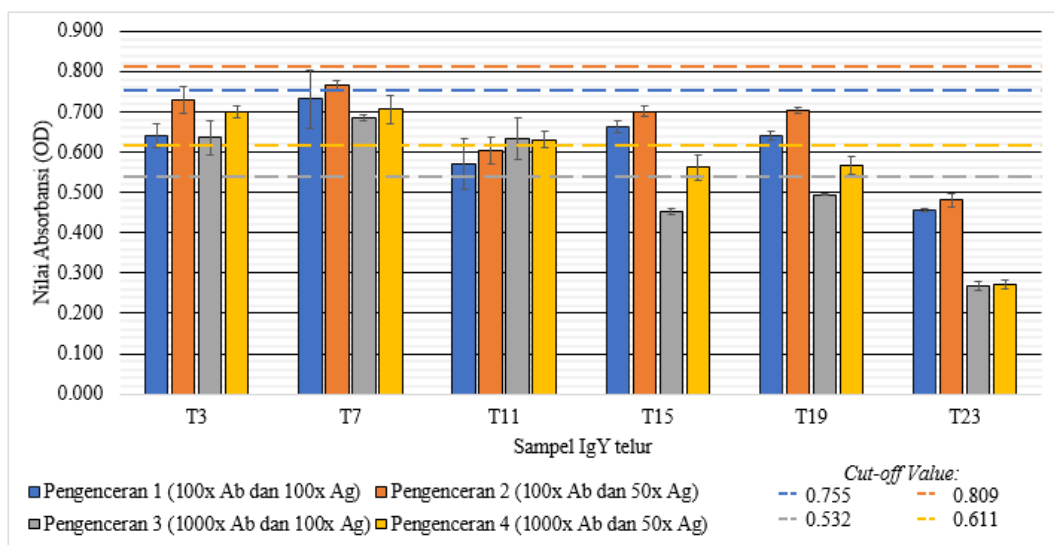
absorbansi warna atau *Optical Density* (OD) sampel, terlebih pada uji *In-house Indirect* ELISA. Secara garis besar, nilai absorbansi warna sampel yang berada di bawah nilai *cut-off* dapat dinyatakan negatif. Sedangkan nilai absorbansi warna sampel dianggap positif ketika nilai sampel IgY di atas nilai *cut-off*.

Nilai *cut-off* didapatkan menggunakan rumus perhitungan dari Lardeux *et al.*, (2016) dengan *Cut-off Value = (3 x rata-rata kontrol negatif) ± SD*. Angka 3 pada rumus tersebut merupakan pengganda yang menandakan signifikansi sampel. Jadi untuk dapat dikatakan positif, sampel harus memiliki perbedaan nilai tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatifnya. Seluruh sampel yang kurang dari pada itu dinyatakan negatif. Selanjutnya dinyatakan pula bahwa pengganda atau taraf signifikansi dapat diatur sesuai kebutuhan peneliti yang menggunakan rumus tersebut (Lardeux *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan nilai 2.5 sebagai pengganda atau taraf signifikansi untuk membandingkan sampel IgY dari ayam yang divaksinasi atau T3-T23 dan sampel IgY kontrol negatif atau T0-. Nilai 2.5 dimasukkan pada rumus perhitungan nilai *cut-off* dan perhitungan dilakukan pada masing-masing pengenceran. Hasilnya didapatkan 4 nilai *cut-off* dari masing-masing 4 perlakuan pengenceran dengan perhitungan terlampir. Pada pengenceran 1 sampai 4 didapatkan nilai *cut-off* berturut-turut yakni 0.755; 0.809; 0.532; 0.611. Selanjutnya nilai *cut-off* tersebut dibandingkan dengan nilai absorbansi warna atau OD sampel IgY telur dari ayam yang divaksinasi untuk mengetahui sampel positif maupun negatif.

Pada **Gambar 3**, terlihat hampir seluruh sampel memiliki nilai absorbansi dengan nilai di bawah *cut-off*. Namun terdapat beberapa sampel IgY telur yang

memiliki nilai absorbansi warna di atas nilai *cut-off* yang menyatakan sampel tersebut positif. Seluruh pengenceran yang digunakan pada sampel positif tersebut adalah pengenceran 3 (1000x antibodi dan 100x antigen) dan pengenceran 4 (1000x antibodi dan 50x antigen). Sampel yang positif diantaranya terdapat pada sampel IgY telur T3 (0.0795 mg/ml antibodi IgY); sampel IgY telur T7 (0.1895 mg/ml antibodi IgY); sampel IgY telur T11 (0.1417 mg/ml antibodi IgY) terhadap antigen *p*fLDH pada pengenceran 3 (0.0434 mg/ml) dan pengenceran 4 (0.0868 mg/ml).



Gambar 3. Nilai *Cut-off* pada Uji *In-house Indirect ELISA*

Pada analisa statistik (ANOVA) yang membandingkan nilai absorbansi sampel pada tiap perlakuan pengencerannya, tidak didapatkan hasil yang berbeda nyata antara nilai absorbansi sampel IgY pengenceran 1 dengan pengenceran yang lain. Namun berdasarkan nilai *cut-off* masing-masing pengenceran, terdapat beberapa sampel IgY yang dinyatakan positif dan berbeda nyata terhadap kontrol negatifnya. Perhitungan nilai *cut-off* didukung oleh perumusan *cut-off value* yang juga digunakan Lardeux *et al*, (2016) untuk menentukan sampel positif dan negatif pada penelitiannya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Diketahui terdapat kandungan *Immunoglobulin Yolk* (IgY) *Anti-plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* (pfLDH) pada telur dari ayam yang divaksinasi antigen pfLDH rekombinan dan dapat dideteksi menggunakan teknik *In-house Indirect* ELISA.
2. Didapatkan konsentrasi antibodi IgY spesifik tertinggi adalah pada sampel IgY dari telur ayam 7 hari setelah *booster* ke-2 dengan konsentrasi sebesar 0,01895 mg/ml terhadap antigen pfLDH rekombinan sebesar 0,044 mg/ml.

Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui secara pasti telur hasil panen hari beberapa yang memiliki produksi antibodi spesifik yang optimal.
2. Perlu dilakukan uji *Western Blot* untuk menambah data dan memperkuat hasil penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M., Hidayatullah, T., Alimuddin, Z. & S., 2013. Sequence diversity of *pfmdr1* and sequence conserve of *pldh* in *Plasmodium falciparum* from Indonesia: its implication on designing a novel antimalarial drug with less prone to resistance. *Iranian J. Parasitology*, 8, pp. 522-529.
- Carlander, D., 2002. *Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo*, Uppsala: Dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis.
- Coutinho, J. P., Cortopassi, W. A., Oliveira, A. A. & Costa, T. C., 2011. *Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies*, 6 (7).
- Gupta, N., Chaudhry, R. & Thakur, C. K., 2016. *Determination of Cutoff of ELISA and Immunofluorescence Assay for Scrub Typhus*, 3 (8), pp. 97-99.
- Lardeux, F., Torrico, G. & Aliaga, C., 2016. *Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of Trypanosoma cruzi infection in Bolivian dogs in the absence of controls*, 8 (111), pp. 501-504.
- Müller, S. et al., 2015. *IgY Antibodies in Human Nutrition for Disease Prevention*, Nutrition Journal, p. 14:109.
- Pauly, D. et al., 2011. *Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation*, 3084, p. 51.
- Soejoedono, R., Wibawan, I. & Hayati, Z., 2005. *Pemanfaatan Telur Ayam Sebagai Pabrik Biologis: Produksi "Yolk Immunoglobulin" (IgY) Anti Plaque dan Diare dengan Titik Berat pada Anti Streptococcus mutans, Escherichia coli dan Salmonella enterotidis*, Laporan Riset Unggulan Terpadu: Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia.
- Suci, I. P., 2018. *Purifikasi Immunoglobulin Yolk (IgY) dari Telur Ayam Hasil Vaksinasi dengan plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pLDH) Menggunakan Polyethylene Glycol (PEG)*. Mataram: UNRAM Press.
- White, N. J., 2008. *Plasmodium knowlesi: the ffh human malaria*, 46 (Clinical Infectious Diseases), p. 172–173.