

**PURIFIKASI IMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) DARI TELUR AYAM
HASIL VAKSINASI DENGAN ANTIGEN *Plasmodium falciparum*
LACTATE DEHYDROGENASE (pfLDH) MENGGUNAKAN
POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

PUBLIKASI ILMIAH

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

PROGRAM STUDI PETERNAKAN



Oleh

**INDAH PURNAMA SUCI
B1D 014 114**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS MATARAM
MATARAM
2018**

**PURIFIKASI IMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) DARI TELUR AYAM
HASIL VAKSINASI DENGAN ANTIGEN *Plasmodium falciparum*
LACTATE DEHYDROGENASE (pfLDH) MENGGUNAKAN
POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

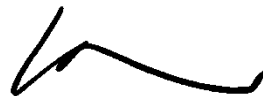
PUBLIKASI ILMIAH

OLEH :

**INDAH PURNAMA SUCI
B1D 014 114**

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

**Menyutui :
Pembimbing Utama**



**(Muhamad Ali, S.Pt., M.Si., Ph.D)
NIP : 19720727 199903 1 002**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS MATARAM
MATARAM
2018**

**PURIFIKASI IMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) DARI TELUR AYAM
HASIL VAKSINASI DENGAN ANTIGEN *Plasmodium falciparum*
LACTATE DEHYDROGENASE (pLDH) MENGGUNAKAN
POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

**INDAH PURNAMA SUCI
B1D 014 114**

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan Imunoglobulin Yolk (IgY) murni dari telur ayam hasil vaksinasi dengan antigen *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pLDH) dengan teknik pengendapan menggunakan Polyethylene Glycol (PEG). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram dari bulan Desember 2017 sampai Mei 2018. Bahan yang digunakan adalah telur dari ayam ras yang sudah divaksinasi sebanyak tiga kali menggunakan antigen pLDH. IgY dari telur ayam hasil vaksinasi dimurnikan menggunakan PEG. Hasil pemurnian IgY menggunakan PEG terlihat jelas dengan berat molekul dari beberapa IgY adalah 180 kDa. Hal ini dapat disimpulkan bahwa IgY telah berhasil dimurnikan dalam keadaan bersih menggunakan PEG dan hasil purifikasi menggunakan PEG lebih bersih dibandingkan hasil purifikasi menggunakan NaCl. Profil IgY terlihat sama, namun terdapat variasi berat molekul dari IgY. Dari hasil SDS-PAGE didapatkan berat molekul 180 kDa pada pemurnian IgY dari beberapa telur dan didapatkan pula berat molekul di bawah dan di atas 180 kDa. Pada hasil SDS-PAGE tidak ada perbedaan antara IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi dan IgY dari telur hasil vaksinasi menggunakan pLDH.

Kata Kunci : Pemurnian, Imunoglobulin Yolk (IgY), *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pLDH) dan Polyethylene Glycol (PEG)

**PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN YOLK (IgY) FROM THE
EGGS CHICKEN RESULT OF VACCINATION WITH
Plasmodium falciparum LACTATE DEHYDROGENASE (pfLDH)
ANTIGEN USING POLYETHYLENE GLYCOL (PEG)**

**INDAH PURNAMA SUCI
B1D 014 114**

ABSTRACT

The aim of this research to get pure Immunoglobulin Yolk (IgY) from the eggs chicken result of vaccination with *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pfLDH) antigen using Polyethylene Glycol (PEG) precipitation technique. This intensive research was conducted in the Microbiology and Biotechnology Laboratory of Faculty of Animal Science, University of Mataram from December 2017 to May 2018. The material used was eggs from vaccinated chicken three times using pfLDH antigen. IgY from the eggs chicken result of vaccination to be purified using PEG. The purification result of IgY using PEG has molecular weight is 180 kDa from some IgY. It can be concluded that IgY has been successfully purified in a clean state using PEG and purified results using PEG cleaner than purified results using NaCl. The IgY profile looks the same, but there is a variation in the molecular weight of IgY. From SDS-PAGE results obtained molecular weight of 180 kDa on IgY purification of some eggs and also obtained molecular weight below and above 180 kDa. In SDS-PAGE results there was no difference between IgY from control eggs without vaccination and IgY from vaccinated eggs using pfLDH.

Keywords : Purification, Immunoglobulin Yolk (IgY), *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pfLDH) dan Polyethylene Glycol (PEG)

PENDAHULUAN

Telur ayam dan unggas lainnya merupakan sumber protein hewani yang umum digunakan sebagai bahan pangan yang berkualitas tinggi, murah dan mudah di jangkau. Selain itu, telur memiliki potensi penting sebagai sumber antibodi sehingga dapat digunakan sebagai pabrik biologis alternatif untuk produksi antibodi konvensional (Wibawan, 2008).

Penggunaan ayam untuk menghasilkan antibodi dalam 20 tahun terakhir menunjukkan peningkatan. Hal ini disebabkan karena produksi antibodi pada

mamalia memiliki beberapa kelemahan, diantaranya i) memerlukan multi injeksi (*booster*) antigen dengan adjuvan, ii) biaya mahal karena membutuhkan antigen dan adjuvant yang lebih banyak, iii) membutuhkan prosedur sampling darah yang berulang-ulang, sehingga diperlukan pengambilan darah yang berulang-ulang (Hau dan Hendriksen, 2005). Lebih lanjut dijelaskan keuntungan penggunaan ayam untuk menghasilkan antibodi, terutama karena antibodi dapat diperoleh pada telur dari ayam yang telah diimunisasi, sehingga koleksi darah dapat dihindari. Selain itu produktifitas antibodi dari ayam jauh lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan hewan lain dalam berat badan hewan yang sama.

Imunoglobulin Yolk (IgY) merupakan imunoglobulin unggas dengan fungsi biologi seperti Imunoglobulin Gamma (IgG) pada mamalia. Imunoglobulin merupakan senyawa protein yang disekresikan oleh plasma sel sebagai respon terhadap paparan antigen dan efektor utama dari produk imunitas humoral. Pada unggas, IgY terdapat dalam darah dan fraksi cairan pada telur untuk melindungi ayam yang baru menetas. IgY yang diisolasi dari *egg yolk* dapat menjadi alternatif yang sesuai untuk produksi antibodi konvensional. Dalam aplikasinya, imunoglobulin biasanya digunakan dalam diagnostik dan penelitian ilmiah untuk mendeteksi ataupun menghitung antibodi dan antigen spesifik yang berasosiasi dengan suatu penyakit (Tizard, 2002).

Penelitian ini berfokus pada teknik pemurnian Imunoglobulin Yolk (IgY) dari telur ayam yang divaksinasi dengan antigen *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)* menggunakan pengendapan *Polyethylene Glycol (PEG)*. Diharapkan IgY murni yang diperoleh dari penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk kepentingan imunodiagnostik yang dapat mendeteksi penyakit malaria melalui reaksi homolog antigen-antibodi.

METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2017 - Mei 2018. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram. Penelitian ini menggunakan telur dari ayam ras yang sudah divaksinasi sebanyak tiga kali yaitu pada tanggal 25 Desember 2017, 11 Januari 2018 dan 29 Januari 2018 menggunakan antigen *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)* milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi

Fakultas Peternakan, Universitas Mataram yang telah dibuat oleh peneliti sebelumnya. Telur kontrol yang digunakan adalah telur dari ayam ras yang tidak divaksin dengan antigen *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* (pfLDH).

Telur dipecahkan dan kuning telur dipisahkan dari putih telur menggunakan *Yolk Separator*. Selanjutnya kuning telur dipindahkan ke kertas saring untuk membersihkan sisa-sisa putih telur yang masih menempel. Kemudian kulit kuning telur dipotong menggunakan lancet atau instrumen serupa, kemudian kuning telur dituangkan ke dalam tabung baru dan volume telur dicatat.

Pemurnian Menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG)

Menurut Pauly *et al.*, (2011), teknik pemurnian IgY menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG) dilakukan sebagai berikut :

Kuning telur yang sudah dipisahkan dari putih telur ditambahkan PBS sebanyak 2x volume kuning telur, selanjutnya ditambahkan 3,5% PEG 6000 (dalam gram) dari total volume, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Diikuti dengan 10 menit *rolling* pada *rolling mixer*. Setelah itu sampel disentrifugasi pada suhu 4°C selama 30 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Supernatan dituang melalui kertas saring dan dipindahkan ke tabung baru.

Sebanyak 8,5% PEG 6000 dari volume supernatan ditambahkan ke tabung kemudian divortex dan dirolling pada *rolling mixer*. Selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C selama 30 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Supernatan dibuang dan pellet dikoleksi.

Pellet dilarutkan dengan hati-hati dalam 1 ml PBS dengan menggunakan stik kaca kemudian divortex. Setelah itu PBS ditambahkan sampai volume akhir menjadi 10 ml. Sebanyak 12% PEG 6000 dari volume sampel akhir ditambahkan kemudian divortex dan dirolling pada *rolling mixer*. Selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C selama 30 menit dengan kecepatan 8.000 rpm. Supernatan dibuang dan pellet dikoleksi.

Pellet dilarutkan secara hati-hati dengan 1200 µl PBS menggunakan stik kaca hingga larut sempurna, kemudian didialisis. Larutan ekstrak kuning telur didialisis menggunakan membran dialisis dalam saline 0,1% sebanyak 1.600 ml

selama 24 jam dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian saline diganti dengan PBS dan dialisis dilanjutkan selama 3 jam.

Pemurnian Menggunakan NaCl

Menurut Hodek *et al.*, (2011), teknik pemurnian IgY menggunakan NaCl dilakukan sebagai berikut :

Kuning telur yang sudah dipisahkan dari putih telur dilusi atau diencerkan menggunakan aquades sampai volume akhirnya menjadi 7x volume kuning telur. Selanjutnya tingkat pH dari hasil dilusi kuning telur diatur dengan menambahkan HCl dan diukur menggunakan pH meter sampai menunjukkan pH 5,0. Setelah itu sampel dibekukan pada suhu -20°C selama 24 jam. Setelah itu sampel *dithawing* atau dicairkan. Sampel yang telah cair kemudian disaring menggunakan kertas saring.

Sampel yang telah disaring kemudian ditambahkan NaCl sebanyak 9% dari volume hasil filtrasi. Kemudian tingkat pH diatur kembali dengan menambahkan HCl dan diukur menggunakan pH meter sampai menunjukkan pH 4,0. Setelah itu sampel dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Sampel yang telah dihomogenkan kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C selama 40 menit dengan kecepatan 700 g. Pellet hasil sentrifugasi dilarutkan secara hati-hati dengan 3 ml PBS.

Pengujian hasil purifikasi melalui SDS-PAGE

Dalam elektroforesis SDS-PAGE terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan bawah (Separation gel 8%) merupakan gel sebagai media untuk pemisah protein dan lapisan kedua yaitu lapisan atas (stacking gel 8%) merupakan gel sebagai tempat sampel.

1. Preparasi Gel

a. Separation Gel

Dalam pembuatan separation gel 8% yaitu menggunakan 2,13 ml 30% *acrylamide*; 2 ml 4x *separation gel*; 3,6 ml dH_2O ; 120 μl 10% APS; dan 12 μl TEMED. Semua bahan dicampurkan dengan menggunakan gelas ukur kecil dan

magnetic stirrer. Kemudian dimasukkan ke dalam cetakan. Tambahkan cairan *overlay* ke dalam cetakan sebelum gel padat, lalu cairan *overlay* dibuang.

b. Stacking Gel

Komposisi dalam membuat stacking gel 8% membutuhkan 0,375 ml 30% *acrylamide*; 0,625 ml 1x *stacking gel*; 1 ml dH₂O; 20 µl 10% APS, dan 2 µl TEMED yang dicampur menggunakan tabung reaksi. Kemudian masukkan ke dalam cetakan menggunakan mikropipet dan diamkan hingga gel menjadi padat.

2. Preparasi Sampel

Sampel yang telah melalui tahap purifikasi menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000 yang telah didialisis dan NaCl diambil 20 µl dan ditambah 20 µl 2x *lisis buffer*. Setelah itu, sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit pada air mendidih. Kemudian *dirunning* pada gel.

3. Elektroforesis Gel

Mesin *running* diisi dengan *elektroforesis buffer*. Sampel yang terdenaturasi kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel. Setelah semua sampel dimasukkan, tutup mesin *running* dan nyalakan mesin dengan voltase 100 volt selama 2 jam. Gel selanjutnya diwarnai menggunakan CBB (*Commassie Brilliant Blue*) sambil digoyangkan menggunakan mesin shaker selama 30 menit. Kemudian gel dibilas (*destaining*) menggunakan campuran larutan aquades, methanol, dan asam asetat dengan perbandingan 6 : 3 :1. Kertas tisu ditambahkan pada gel yang dibilas yang berfungsi sebagai penyerap warna pada saat pembilasan. Pembilasan dilakukan sampai gel bersih dari sisa pewarna CBB.

Menghitung Berat Molekul Imunoglobulin Yolk (IgY)

Berat molekul IgY dari hasil purifikasi dihitung berdasarkan nilai R_f seperti rumus yang disarankan oleh Hames (1998) sebagai berikut :

a.
$$R_f = \frac{\text{Jarak Migrasi Protein (JMP)}}{\text{Jarak Migrasi Gel (JMG)}}$$

b.
$$Y = (-1,0308 \times R_f \text{ Protein}) + 2,3535$$

$$Y = \text{Log MW}$$

$$\text{Jadi MW} = 10^Y = 10^{(-1,0308 \times R_f \text{ Protein}) + 2,3535}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Telur Ayam hasil Vaksinasi dengan antigen *Plasmodium falciparum* *Lactate Dehydrogenase (pfLDH)*

Pada penelitian ini digunakan telur dari ayam petelur tipe medium atau ayam petelur cokelat dari bangsa *Rhode Island Red* yang dipelihara di peternakan ayam petelur milik UD. Mitra Bersama. Peternakan tersebut terletak di Desa Batuyang, Kecamatan Pringgabaya, Kabupaten Lombok Timur.

Telur yang digunakan adalah telur dari 3 ekor ayam yang sudah divaksinasi menggunakan antigen *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)* milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan, Universitas Mataram yang telah dibuat oleh peneliti sebelumnya. Ayam yang divaksin adalah ayam petelur produktif dengan umur 12 bulan yang divaksinasi menggunakan 600 μ L antigen *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)* yang telah dicampur dengan adjuvan inkomplet secara intramuscular di bawah otot dada. Vaksinasi pertama dilakukan pada tanggal 25 Desember 2017. Setelah 17 hari dari vaksinasi pertama, pada tanggal 11 Januari 2018 dilakukan *booster* menggunakan antigen yang sama dalam jumlah dan cara yang sama menggunakan adjuvan inkomplet. Adjuvan adalah bahan yang dapat meningkatkan respons imun antigen yang dicampurkan dengannya. Adjuvan dapat meningkatkan imunogenesitas dengan jalan mengubah antigen protein terlarut menjadi partikulat. Berdasarkan bahan yang digunakan, adjuvan dibagi menjadi dua, yaitu adjuvan komplet (menggunakan minyak nabati dan mikrobakteri) dan adjuvan inkomplet (menggunakan minyak nabati tanpa mikroba). Setelah 18 hari dari vaksinasi ke dua, pada tanggal 29 Januari 2018 dilakukan *booster* lagi menggunakan cara yang sama seperti *booster* kedua. *Booster* merupakan vaksin tambahan yang dilakukan setelah vaksin pertama dengan tujuan meningkatkan respon imun spesifik. Multi injeksi (*booster*) ini dilakukan karena menurut Pauly *et al.*, (2011) seekor ayam petelur yang diimunisasi beberapa kali dengan antigen (Ag) tertentu dapat menghasilkan antibodi (Ab) spesifik.

Telur ayam dikoleksi sebanyak 58 butir dari ayam yang sudah divaksinasi dengan *pfLDH* dan 2 butir sebagai kontrol. Pengkoleksian telur ayam dilakukan

pada minggu keenam setelah vaksin pertama dan 2 hari setelah vaksin terakhir yaitu mulai tanggal 31 Januari 2018 sampai 23 Februari 2018. Karena pada ayam yang telah diimunisasi, antibodi dapat terdeteksi pada minggu keempat, kelima dan keenam pasca imunisasi (Darmawi *et al*, 2010). Telur yang telah dikoleksi kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram dan disimpan di refrigerator pada suhu 4°C untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada telur ayam sebelum tahap purifikasi. Telur yang telah dikoleksi ditampilkan pada pada Tabel 1

Tabel 1. Hasil koleksi telur dari ayam yang telah divaksinasi

No.	Hari, Tanggal	Ayam yang Divaksinasi		
		I	II	III
1	Rabu, 31 Januari 2018	1	1	1
2	Kamis, 01 Februari 2018	1*	1	1
3	Jumat, 02 Februari 2018	1	1	-
4	Sabtu, 03 Februari 2018	1	1	1
5	Minggu, 04 Februari 2018	1	1	1
6	Senin, 05 Februari 2018	1*	1	-
7	Selasa, 06 Februari 2018	1	1	1
8	Rabu, 07 Februari 2018	1	1	1
9	Kamis, 08 Februari 2018	1	-	1
10	Jumat, 09 Februari 2018	1*	1	1
11	Minggu, 11 Februari 2018	1	1	-
12	Senin, 12 Februari 2018	1	1	1
13	Selasa, 13 Februari 2018	1*	1	-
14	Rabu, 14 Februari 2018	1	1	1
15	Kamis, 15 Februari 2018	1	1	1
16	Jumat, 16 Februari 2018	1	1	1
17	Sabtu, 17 Februari 2018	1*	1	-
18	Minggu, 18 Februari 2018	1	1	1
19	Senin, 19 Februari 2018	1	1	1
20	Selasa, 20 Februari 2018	1	1	1
21	Rabu, 21 Februari 2018	1*	1	1
22	Jumat, 23 Februari 2018	1	-	-

Keterangan : * = Telur yang digunakan untuk tahap purifikasi

Dalam tahap purifikasi peneliti menggunakan 6 butir telur dari total 58 butir telur ayam yang sudah divaksinasi menggunakan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)*. Penentuan 6 butir telur yang digunakan ditentukan berdasarkan tanggal telur tersebut dikoleksi. Sedangkan untuk purifikasi telur

kontrol, peneliti menggunakan 2 butir telur ayam yang tidak divaksin dengan tujuan 1 butir telur untuk dipurifikasi menggunakan pengendapan *Polyethylene glycol* (PEG) dan 1 butir telur untuk dipurifikasi menggunakan NaCl. Purifikasi menggunakan NaCl ini dilakukan sebagai pembandingan dengan purifikasi menggunakan *Polyethylene glycol* (PEG).

Telur yang digunakan untuk purifikasi adalah telur dari ayam pertama dari total 3 ayam yang divaksin menggunakan antigen *pfl*LDH yang dikoleksi pada tanggal 01 Februari 2018, 05 Februari 2018, 09 Februari 2018, 13 Februari 2018, 17 Februari 2018 dan 21 Februari 2018. Telur-telur tersebut adalah telur dengan jarak koleksi 4 hari, sedangkan telur pertama yang digunakan adalah telur yang dikoleksi pada hari ketiga setelah vaksin terakhir.

Purifikasi dan Karakterisasi IgY

Pada proses purifikasi dan karakterisasi, tahap yang harus dilakukan adalah pemisahan kuning telur dari putih telur, kemudian dilanjutkan ke tahap pemurnian menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG) dan NaCl, kemudian hasilnya dianalisis menggunakan SDS-PAGE 8% untuk melihat profil pita protein hasil pemurnian pada gel elektroforesis.

Pemisahan kuning telur dari putih telur dilakukan menggunakan *Yolk Separator* gunting untuk memotong kalaza yang masih menempel pada kuning telur. Kemudian kuning telur dipisahkan ke kertas saring menggunakan kertas saring Whatman. Pemisahan kuning telur ini dilakukan karena IgY merupakan imunoglobulin yang tersedia dalam jumlah yang paling banyak ditemukan pada serum dan didepositkan ke dalam kuning telur (Carlander, 2002). Kuning telur yang sudah dipisahkan dari putih telur kemudian volumenya dibagi menjadi dua, hal ini dilakukan dengan tujuan setengah dari volume kuning telur dilakukan pemurnian menggunakan pengendapan *Polyethylene Glycol* (PEG) dan setengah dari kuning telur dilakukan pemurnian menggunakan NaCl dengan tujuan sebagai pembandingan dengan purifikasi menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG).

Purifikasi IgY Telur menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG)

Pada pemurnian menggunakan PEG, kuning telur yang sudah dipisahkan dari putih telur ditambahkan PBS dan PEG lalu divortex dan diinkubasi

menggunakan *rolling mixer* selama 10 menit. Menurut Polson *et al.*(1980) proses inkubasi menggunakan *rolling mixer* dapat memisahkan suspensi menjadi dua fase yaitu fase padatan terdiri dari padatan kuning telur dan zat lemak dan fase berair yang mengandung IgY dan protein lainnya. Kemudian sampel disentrifugasi pada putaran 8000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian ditambahkan PEG lalu divortex, diinkubasi dan disentrifugasi seperti langkah sebelumnya dengan perbedaan supernatan dibuang dan pellet digunakan untuk tahap purifikasi selanjutnya.

Pellet ditambahkan dengan PBS dan PEG kemudian divortex, diinkubasi dan disentrifugasi kembali. Pellet yang didapatkan kemudian dilarutkan dengan PBS 1200 µl kemudian didialisis pada saline 0,1% selama 24 jam dan PBS selama 3 jam. Hasil dialisis kemudian dipindahkan ke tabung baru dan dibekukan pada suhu -20°C dan siap dianalisis menggunakan SDS-PAGE. dan volume dari hasil pemurnian IgY menggunakan PEG dan NaCl disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Volume hasil pemurnian IgY menggunakan PEG dan NaCl

No. Telur	Tanggal Telur Dikoleksi	Volume hasil pemurnian	
		PEG	NaCl
I	01 Februari 2018	1900 µl	3000 µl
II	05 Februari 2018	1800 µl	3000 µl
III	09 Februari 2018	2000 µl	3000 µl
IV	13 Februari 2018	2000 µl	3000 µl
V	17 Februari 2018	2200 µl	3000 µl
VI	21 Februari 2018	2200 µl	3000 µl

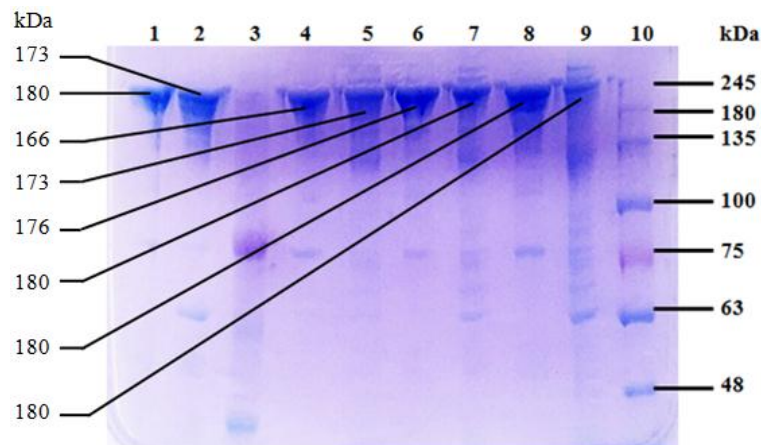
Tabel 2 menunjukkan perbedaan volume yang dihasilkan dari tahap purifikasi IgY menggunakan PEG dan NaCl. Dari hasil pemurnian IgY menggunakan PEG dari telur yang dikoleksi pada tanggal 01 Februari 2018, 05 Februari 2018, 09 Februari 2018, 13 Februari 2018, 17 Februari 2018, dan 21 Februari 2018 berturut-turut adalah 1900 µl, 1800 µl, 2000 µl, 2000 µl, 2200 µl dan 2200 µl. Perbedaan volume hasil purifikasi IgY ini disebabkan karena setelah tahap purifikasi, sampel melalui tahap dialisis sehingga menghasilkan volume akhir yang berbeda. Sedangkan dari volume hasil purifikasi menggunakan NaCl didapatkan volume akhir sebanyak 3000 µl, karena pada tahap akhir purifikasi sampel pellet setelah disentrifugasi ditambahkan PBS sebanyak 3000 µl, tanpa

melalui tahapan dialisis, sehingga volume akhir dari semua sampel IgY setelah purifikasi volumenya sama. Tabung dialisis yang digunakan bersifat semi permeable dengan ukuran pori-pori lebih kecil dari 22 kDa. Hal ini memungkinkan H₂O atau pelarut dengan konsentrasi (molaritas) lebih rendah untuk masuk ke dalam tabung dialisis. Sementara yang berada di dalam tabung dialisis dengan konsentrasi lebih tinggi akan keluar. Komponen atau senyawa dengan ukuran lebih besar daripada 11 kDa (termasuk IgY) akan tertahan di dalam tabung dialisis dan terbebas dari PEG yang mengalir keluar bersama pelarut H₂O, saline dan PBS.

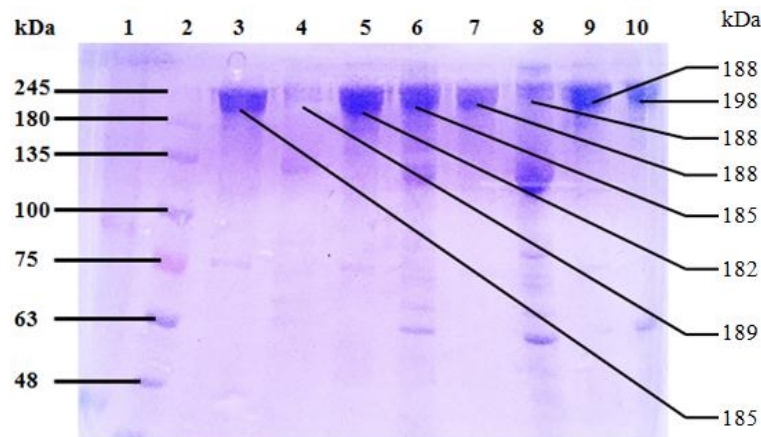
Analisis Profil Pita Protein Immunoglobulin Yolk (IgY)

Analisis profil pita protein dilakukan dengan cara menggunakan SDS-PAGE. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Bachrudin, 1999). SDS-PAGE digunakan untuk analisis pita protein karena menurut Yepyhardi (2009) penggunaan poliakrilamid mempunyai keunggulan dibanding dengan gel lainnya, karena tidak bereaksi dengan sampel dan tidak membentuk matrik dengan sampel, sehingga tidak menghambat pergerakan sampel yang memungkinkan pemisahan protein secara sempurna.

Sebelum dilakukan analisis, semua sampel hasil purifikasi diencerkan 10x menggunakan dH₂O. Selanjutnya masing-masing sampel dimasukkan kedalam sumuran SDS-PAGE, sebanyak 20 µl per sumuran. SDS-PAGE untuk analisis profil pita protein Immunoglobulin Yolk (IgY) dilakukan dua kali. Hasil analisis SDS-PAGE 8% disajikan pada Gambar 1. dan Gambar 2.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE 8% yang dipurifikasi dari telur ayam. (1) IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi pemurnian dengan PEG, (2) IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi pemurnian dengan NaCl, (3) Marker (GangNam-STAIN), (4,6,8) IgY dari telur hasil vaksinasi dengan *pfl*LDH pemurnian dengan PEG, (5,7,9) IgY dari telur hasil vaksinasi dengan *pfl*LDH pemurnian dengan NaCl, (10) Marker (Prestained Protein Ladder).



Gambar 2. Hasil SDS-PAGE 8% yang dipurifikasi dari telur ayam. (1) Marker (GangNam-STAIN), (2) Marker (Prestained Protein Ladder), (3,5,7) IgY dari telur hasil vaksinasi dengan *pfl*LDH pemurnian dengan PEG, (4,6,8) IgY dari telur hasil vaksinasi dengan *pfl*LDH pemurnian dengan NaCl, (9) IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi pemurnian dengan PEG, (10) IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi pemurnian dengan NaCl).

Dari Gambar 1 dan 2 nampak bahwa pita protein terbentuk sangat baik dan jelas pada SDS-PAGE 8%. Konsentrasi *acrylamide gel* yang digunakan untuk analisis pita protein ditentukan berdasarkan berat molekul pita protein yang diamati. Semakin tinggi konsentrasi *acrylamide* maka diameter pori-pori akan

semakin kecil. Apabila protein berukuran besar atau memiliki berat molekul yang besar, maka diperlukan gel dengan konsentrasi *acrylamide* yang rendah. Untuk itu analisis deskriptif dilakukan berdasarkan hasil SDS-PAGE 8%, bukan 10% atau 12,5%.

Hasil SDS-PAGE tersebut menunjukkan Marker (GangNam-STAIN) yang terletak pada sumuran 3 (Gambar 1) dan sumuran 1 (Gambar 2) tidak terlihat jelas, hal ini dapat disebabkan karena marker (GangNam-STAIN) sudah rusak karena lama penyimpanan atau kurang baik dalam menyimpannya. Sehingga yang menjadi penanda pada hasil SDS-PAGE ini adalah marker (Prestained Protein Ladder) yang terletak pada sumuran 10 (Gambar 1) dan sumuran 2 (Gambar 2). Protein marker digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul dari campuran *polypeptida* (Hames dan Rickwood, 1990). Marker protein yang digunakan memiliki rentang berat molekul 48 kDa - 245 kDa

Dari profil protein Imunoglobulin Yolk (IgY) tersebut nampak bahwa pita protein yang paling tebal terletak antara marker 135 kDa dan 245 kDa pada pemurnian menggunakan PEG maupun menggunakan NaCl. Sutiman *et al.* (1996) menjelaskan bahwa molekul protein dengan pita dan muatan yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita protein yang berdekatan sehingga akan terbentuk pita dengan intensitas yang lebih terang dan tebal. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan.

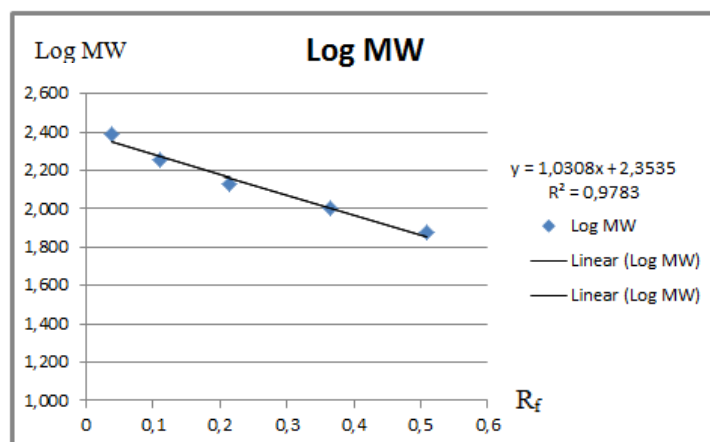
Pada hasil pemurnian menggunakan NaCl yaitu pada sumuran 2,5,7,9 (Gambar 1) dan sumuran 4, 6, 8, 19 (Gambar 2) masih terlihat adanya pita protein lain dari hasil SDS-PAGE pada gel elektroforesis yang menandakan pemurnian menggunakan NaCl tidak bersih dari protein lain yang terdapat pada kuning telur. Hal ini terlihat pada setiap sumuran yang diisi dengan IgY yang dimurnikan dengan NaCl masih banyak terlihat pita protein yang masih menempel pada pita protein target sehingga hasil SDS-PAGE IgY pada gel tidak bersih. Sedangkan pada hasil pemurnian menggunakan PEG yaitu pada sumuran 1, 4, 6, 8 (Gambar 1) dan sumuran 3, 5, 7, 9 (Gambar 2) terlihat lebih bersih dibandingkan dengan hasil pemurnian menggunakan NaCl. Hal ini terlihat pada setiap sumuran yang

diisi dengan IgY yang dimurnikan dengan PEG memiliki pita protein yang bersih tanpa adanya pita protein lain yang menempel pada pita protein target, sehingga hasil SDS-PAGE IgY pada gel elektroforesis terlihat bersih. Pada pemurnian menggunakan PEG ini juga melalui tahap dialisis yang digunakan untuk menghilangkan molekul-molekul lain yang masih berikatan pada saat melalui tahap purifikasi. Dengan demikian pemurnian menggunakan PEG dapat menghasilkan Imunoglobulin Yolk (IgY) yang lebih bersih dibandingkan menggunakan NaCl.

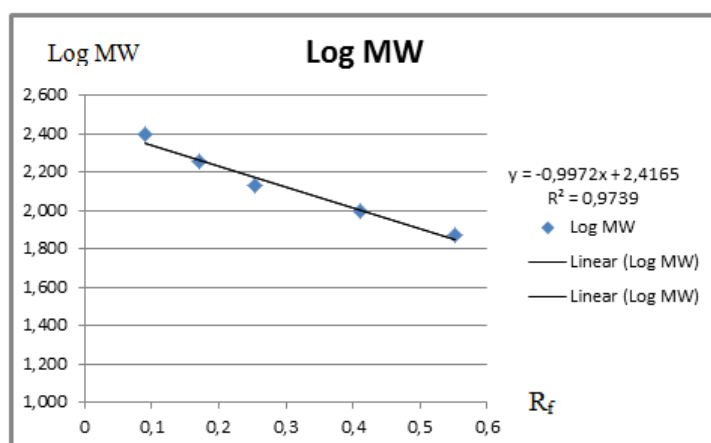
Pada hasil SDS-PAGE, dari segi intensitas kejelasan atau ketebalan dari pita protein tidak ada perbedaan antara IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi dan IgY dari telur yang sudah divaksinasi menggunakan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase (pfLDH)*. Hal ini dapat disebabkan karena kadar IgY spesifik yang terkandung dalam IgY sangat rendah, kerana menurut Haak-Frendscho (1994) tiap-tiap butir telur dari ayam yang divaksin sebanyak empat kali dengan antigen tertentu secara subkutan akan menghasilkan IgY dimana 1 – 10 % merupakan IgY spesifik, sehingga tidak terlihat perbedaan yang signifikan dari hasil SDS-PAGE.

Analisis Berat Molekul Pita Protein Imunoglobulin Yolk (IgY)

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE 8% terhadap hasil pemurnian IgY maka didapat perhitungan berat molekul IgY menggunakan persamaan garis linier. Analisis dilakukan berdasarkan nilai R_f dan Log MW (Hames,1998), disajikan pada grafik dan tabel di bawah ini.



Gambar 3. Grafik persamaan garis linier berat molekul IgY pada Gambar 1



Gambar 4. Grafik persamaan garis linier berat molekul IgY pada Gambar 2

Tabel 3. Rincian Ukuran Berat Molekul Hasil SDS-PAGE

Sumuran	Gambar 1		Gambar 2	
	Jenis sampel	Berat Molekul (kDa)	Jenis Sampel	Berat Molekul (kDa)
1	Telur Kontrol (PEG)	180	Marker (GangNam-STAIN)	-
2	Telur Kontrol (NaCl)	173	Marker (Prestained Protein Ladder)	-
3	Marker (GangNam-STAIN)	-	Telur IV Vaksin (PEG)	185
4	Telur I Vaksin (PEG)	166	Telur IV Vaksin (NaCl)	188
5	Telur I Vaksin (NaCl)	173	Telur V Vaksin (PEG)	182
6	Telur II Vaksin (PEG)	176	Telur V Vaksin (NaCl)	185
7	Telur II Vaksin (NaCl)	180	Telur VI Vaksin (PEG)	188
8	Telur III Vaksin (PEG)	180	Telur VI Vaksin (NaCl)	188
9	Telur III Vaksin (NaCl)	180	Telur Kontrol (PEG)	188
10	Marker (Prestained Protein Ladder)	-	Telur Kontrol (NaCl)	198

Dari Gambar 1 dan Gambar 2 serta Tabel 3 tersebut nampak bahwa ukuran berat molekul IgY dari masing-masing telur sangat bervariasi yaitu 166 kDa sampai 198 kDa. Dari hasil SDS-PAGE tersebut didapatkan berat molekul 180

kDa pada pemurnian IgY beberapa telur yaitu pada IgY dari telur kontrol pemurnian dengan PEG, IgY dari telur II vaksin pemurnian dengan NaCl, IgY dari telur III vaksin pemurnian dengan PEG dan pada IgY dari telur III vaksin pemurnian dengan NaCl. Hal ini sesuai menurut Adham (2014), yaitu IgY memiliki berat molekul 180 kDa Sedangkan dari hasil SDS diatas juga didapatkan berat molekul di bawah 180 kDa yaitu pada IgY dari telur kontrol pemurnian dengan NaCl, IgY dari telur I vaksin pemurnian dengan PEG, IgY dari telur I vaksin pemurnian NaCl, dan pada IgY dari telur II vaksin pemurnian PEG dengan berat molekul berturut-turut 173 kDa, 166 kDa, 173 kDa dan 176 kDa. Hal ini dapat disebabkan proses migrasi protein yang kurang sempurna sehingga berat molekul menjadi menurun. Hasil SDS diatas juga didapatkan berat molekul di atas 180 kDa yaitu pada IgY dari telur IV vaksin pemurnian PEG, IgY dari telur IV vaksin pemurnian NaCl. IgY dari telur V vaksin pemurnian PEG, IgY dari telur V vaksin pemurnian NaCl, IgY dari telur VI vaksin pemurnian PEG dan pada IgY dari telur VI vaksin pemurnian NaCl dengan berat molekul berturut-turut 185 kDa, 188 kDa, 182 kDa, 185 kDa, 188 kDa, 188 kDa, 188 kDa dan 198 kDa. Hal ini dapat disebabkan karena masih ada molekul lain yang berikatan dengan protein IgY sehingga berat molekul IgY menjadi meningkat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka kesimpulan yang dapat dirangkum adalah sebagai berikut :

1. Imunoglobulin Yolk (IgY) telah berhasil dimurnikan dalam keadaan bersih menggunakan *Polyethylene Glycol* (PEG) dan hasil purifikasi menggunakan PEG lebih bersih dibandingkan hasil purifikasi menggunakan NaCl.
2. Profil Imunoglobulin Yolk (IgY) terlihat sama, namun terdapat variasi berat molekul dari IgY. Dari hasil SDS-PAGE didapatkan berat molekul 180 kDa pada pemurnian IgY dari beberapa telur dan didapatkan pula berat molekul di bawah dan di atas 180 kDa.
3. Pada hasil SDS-PAGE tidak ada perbedaan antara IgY dari telur kontrol tanpa vaksinasi dan IgY dari telur hasil vaksinas menggunakan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* (pfLDH) rekombinan.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih berupa uji spesifisitas IgY hasil vaksinasi menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dan *Western Blot*. Selain itu perlu juga diteliti apakah ada perbedaan antara IgY telur dari ayam yang divaksinasi menggunakan *Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase* (pfLDH) rekombinan milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas peternakan Universitas Mataram yang digunakan dalam skripsi ini, dengan antigen pfLDH komersial.

DAFTAR PUSTAKA

- Adham, 2014 Adham M. Abdou^{1,2*}, Manal M. E. Ahmed² and Yusuke. Immunoglobulin: A Natural Way to Suppress *Helicobacter pylori* in Humans. authors and Scientific Research Publishing Inc. http://file.scirp.org/Html/17-8202744_44320.htm. Diakses 30/04/2018.
- Bachrudin, Z. 1999. *Petunjuk Laboratorium: Isolasi, Identifikasi, dan Pewarnaan Protein*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Carlander D. 2002. *Avian IgY Antibody. In Vitro and In Vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from Faculty of Medicine 119*. ACTA Universitatis Uppsala, Center Texas A & M University Kingsville.
- Darmawi, Balqis U., Tiuria R., Hambal M., dan Samadi. *Purifikasi Immunoglobulin Yolok pada Ayam yang Divaksin terhadap Ekskretori/Sekretori Stadium L₃ Ascaridia galli*. Agripet Vol 10, No 2:9-15.
- Diana Pauly, Pablo A. Chacana, Esteban G. Calzado, Bjorn Brems and Rudiger Schade. 2011. *Ig Y Technology : Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolok by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation*. Jove Journal of Visualized Experiments. Exp (51), e3084.
- Haak-Frendscho, M., 1994. *Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, an Appealing Alternative, Promega Notes Magazine* (46):11.
- Hames, B. D. 1998. *Gel Elektroforesis of Proteins : a Practical Approach*. 3rd edn. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Hames, B.D., and Rickwood.1990. *A Practical Approach: Gel elektroforesis protein*. Huntington: Robert E Krieger Publishing Company.
- Hau, J. and Hendriksen, C.F.M., 2005. *Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolok*. *J. ILAR*. 46(3) (online issues).

- Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., and Stiboroval, M. 2013. *Optimized Protocol of chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations*. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (2013): 113 –124.
- Polson, A., von Wechmar, M.B and van Regenmortel, M.H. *Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens*. *Immunol. Commun.* 9, 475-493 (1980).
- Sutiman, B. S., Rahayu, S., Fatchyah, widyawati, S. dan E. A. Laras. 1996. *Teknik Biologi Molekuler*. Jurusan Biologi. MIPA Universitas Brawijaya. Malang. Hal. 23-90.
- Tizard, I. 2002. *The avian antibody response*. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, Vol.11(1): 214.
- Wibawan, I.W.T. 2008. *Pemanfaatan Telur Ayam Sebagai Pabrik Biologis (Kajian Pustaka)*. *Majalah Ilmiah Peternakan*. Vol.11(1): p.36-41.
- Yepyhardi. 2009. *Elektroforesis: Putu Gerbang Penelitian Biologi Molekular*. UI-Press. Jakarta.