

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

IMUNOGLOBULIN YOLK ANTI *Streptococcus agalactiae* UNTUK IMUNOTERAPI PENYAKIT STREPTOCOCCOSIS PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Tatik Mufidah[#], Uni Purwaningsih, Nunak Nafiqoh, dan Angela Mariana Lusiastuti

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129

(Naskah diterima: 8 Oktober 2019; Revisi final: 19 Februari 2020; Disetujui publikasi: 19 Februari 2020)

ABSTRAK

Serangan penyakit *Streptococcus agalactiae* pada ikan nila dapat menimbulkan kerugian yang besar. Salah satu cara pencegahan dan penanggulangan Streptococcosis adalah melalui vaksinasi, baik vaksinasi aktif maupun vaksinasi pasif. *Immunoglobulin yolk* (IgY) merupakan salah satu jenis antibodi yang dapat digunakan untuk vaksinasi pasif. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan *immunoglobulin yolk* (IgY) yang spesifik terhadap *Streptococcus agalactiae* untuk imunoterapi penyakit streptococcus pada ikan nila. IgY anti *S. agalactiae* dihasilkan dari telur ayam yang divaksinasi dengan bakteri *S. agalactiae* inaktif. Dalam penelitian ini dilakukan preparasi dan perbanyakkan *S. agalactiae*, imunisasi ayam, koleksi telur ayam, dan purifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa IgY yang diproduksi terbukti spesifik terhadap *S. agalactiae* dengan uji *immunoblotting* dan *dot blot*. Uji biologis menggunakan cairan peritoneum mencit menunjukkan aktivitas opsonisasi oleh makrofag yang meningkat dibanding cairan peritoneum tanpa pemberian IgY. Hasil aplikasi IgY pada ikan nila menunjukkan IgY dapat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan terhadap infeksi *S. agalactiae*. IgY anti-*S. agalactiae* yang diproduksi dapat digunakan untuk imunoterapi dan mengendalikan streptococcosis yang disebabkan oleh *S. agalactiae* pada nila baik untuk pencegahan maupun pengobatan.

KATA KUNCI: *immunoglobulin yolk* (IgY); *S. Agalactiae*; ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT: *Immunoglobulin yolk anti Streptococcus agalactiae for immunotherapy of Streptococcosis disease in tilapia (Oreochromis niloticus). By: Tatik Mufidah, Uni Purwaningsih, Nunak Nafiqoh, and Angela Mariana Lusiastuti*

The infection of Streptococcus agalactiae in an aquaculture system can cause significant economic losses to the fish farmers. An efficient method to prevent the infection and control the distribution of Streptococcosis is through either active or passive vaccination. The use of immunoglobulin yolk as one of the passive antibodies has shown a promising result. This study's aim was to obtain immunoglobulin yolk (IgY) specific to S. agalactiae for immunotherapy of streptococcus disease in tilapia. IgY was produced from vaccinated chicken eggs using inactivated S. agalactiae bacteria. In the present study, preparation and propagation of S. agalactiae, immunization of chickens, and collection of chicken eggs and purification were carried out. The result show that produced IgY was proved to be specific to S. agalactiae through immunoblotting and dot blot tests. Biological tests using mice peritoneum fluid to determine macrophages opsonization activity showed increased opsonization activity compared to peritoneal fluid without IgY administration. The application of IgY on reared tilapia showed that IgY anti-S. agalactiae protected the fish against S. agalactiae infection. The produced IgY anti-S. agalactiae can be used for immunotherapy and controlling streptococcosis caused by S. agalactiae in tilapia both for prevention and treatment.

KEYWORDS: *immunoglobulin yolk* (IgY); *S. Agalactiae*; *tilapia* (*Oreochromis niloticus*)

PENDAHULUAN

Serangan penyakit terbukti sebagai salah satu penyebab utama kegagalan produksi pada beberapa komoditas unggulan perikanan budidaya. Kerugian

akibat serangan penyakit antara lain penurunan produksi, produktivitas kualitas, efisiensi, penurunan daya saing, penolakan pasar, menghambat intensifikasi, dan ekstensifikasi budidaya karena usaha budidaya menjadi berisiko tinggi dan tidak berkelanjutan. Salah satu penyakit yang sering menyerang budidaya ikan nila adalah *Streptococcosis* (Evans *et al.*, 2009). Penyakit ini merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri gram positif yang berbentuk *coccus*. Barnes & Ellis

[#] Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan.
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16129, Indonesia
Tel. + 62 251 8313200
E-mail: fida.annisa@gmail.com

(2004) melaporkan beberapa agen penyebab yang paling sering ditemukan menjadi penyebab *streptococcosis* adalah *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Lactococcus garviae*.

Usaha pengendalian penyakit ikan merupakan hal yang memerlukan perhatian besar karena akan berkaitan dengan penyebaran penyakit, mortalitas ikan yang tinggi, dan kerugian ekonomi yang besar (Dunn *et al.*, 1990). Manajemen kesehatan yang baik merupakan hal yang sangat penting dalam usaha pencegahan penyakit ikan. Vaksinasi merupakan salah satu cara yang efektif dalam mencegah *streptococcosis*, karena terapi dengan antibiotik dapat menyebabkan resistensi dan residu. Oleh karena itu, perlu mencari metode alternatif yang lebih luas dalam arti mampu mengobati ikan sakit tapi juga mampu menekan dan mencegah terjadinya infeksi *S. agalactiae*.

Tindakan vaksinasi adalah upaya agar ikan mempunyai kekebalan terhadap penyakit tertentu. Antibodi spesifik dibentuk oleh tubuh ikan sendiri melalui vaksinasi aktif atau diberikan secara langsung melalui vaksinasi pasif. Dewasa ini produksi antibodi melalui koleksi telur ayam yang telah divaksinasi dengan antigen tertentu menjadi salah satu pilihan. Antigen yang diperoleh dari kuning yang disebut *immunoglobulin yolk* (IgY). Produksi antibodi melalui kuning telurnya menjadi alternatif karena membutuhkan biaya yang relatif lebih murah dan bisa mendapatkan antibodi dengan jumlah yang lebih banyak dibanding jika memanen antibodi dari hewan uji lain seperti kelinci, mencit, maupun hewan besar seperti kuda atau domba. Di samping itu, produksi antibodi melalui kuning telur juga lebih diterima dari sisi *animal welfare* (Nakai *et al.*, 1994). Berkaitan dengan *animal welfare* dan efisiensi biaya maka penggunaan antibodi dalam telur lebih bisa diterima dibanding dengan penggunaan hewan percobaan mamalia (Svendsen *et al.*, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi IgY yang spesifik terhadap *S. agalactiae* dan memanfaatkan potensinya sebagai bahan imunisasi pasif untuk pengendalian penyakit *Streptococcosis*, yang disebabkan oleh *S. agalactiae* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

BAHAN DAN METODE

Produksi IgY anti *S. agalactiae*

Produksi IgY anti *S. agalactiae* dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan preparasi perbanyak bakteri *S. agalactiae* sebagai bahan untuk vaksinasi ayam petelur. Isolat bakteri *S. Agalactiae* yang digunakan berasal dari Instalasi Riset Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan BRPPBAT Bogor. Suspensi bakteri dicuci tiga kali dengan PBS steril pH 7,2 dan

konsentrasi dibuat 1×10^9 cfu/mL. Isolat kemudian dilemahkan dengan pemanasan 100°C selama 60 menit dan diuji kembali viabilitasnya. Resuspensi Pelet dengan 5 mL NaCl fisiologis dan diukur pada panjang gelombang pada λ 620 nm dengan transmisi 10% untuk mendapat konsentrasi sel bakteri 10^9 cfu/mL. Suspensi selanjutnya siap digunakan untuk vaksinasi pada ayam petelur.

Produksi IgY anti *S. agalactiae* dilakukan dengan melakukan vaksinasi pada ayam petelur yang dipelihara dalam kandang baterai dan diberi makan standar dan air minum secara *ad libitum*. Vaksinasi dilakukan dengan cara yaitu pada minggu ke-1 ayam petelur divaksinasi dengan 1 mL suspensi *S. agalactiae* secara intra vena selama tiga hari berturut-turut. Pada minggu kedua vaksinasi dilakukan injeksi secara intra muskular suspensi antigen dalam *freund's complete adjuvant* (FCA) sebesar 0,5 mL. *Booster* dilakukan secara intramuskular dengan dosis antigen 0,5 mL dalam *freund's incomplete adjuvan* (FIA) pada empat lokasi (0,25 mL tiap lokasi) dan diulang sebanyak tiga kali. Telur dikoleksi setelah minggu pertama vaksinasi sampai akhir masa percobaan.

Purifikasi Imunoglobulin dan Pemeriksaan Titer Antibodi

Purifikasi dan perhitungan konsentrasi protein hasil purifikasi dengan *promegas EGGstract IgY purification system* teknik dilakukan sesuai dengan prosedur kit. Konsentrasi IgY diukur dengan absorban 280 nm, menggunakan *extinction coefficient* 1,33 dan konsentrasi dalam mg/mL.

Pemeriksaan titer antibodi ayam petelur dilakukan untuk mengetahui keberadaan antibodi pada serum. Antibodi tersebut kemudian diteruskan ke kuning telur yang akan dipanen. Pengukuran titer antibodi sesuai metode yang dikembangkan oleh Roberson (1990). Metode ini menggunakan teknik aglutinasi langsung dengan menggunakan *microtitre plate*. Proses aglutinasi diamati dengan bantuan mikroskop inverted pada pembesaran 100-400 kali. Serum yang diperiksa adalah serum ayam minggu sebelum vaksinasi, serum minggu kesatu setelah vaksinasi hingga minggu ke-12.

SDS Page dan Uji Spesifisitas IgY anti *S. agalactiae*

Pemisahan protein antigen bakteri *S. agalactiae* dan IgY anti *S. agalactiae* dilakukan dengan SDS-PAGE, uji spesifisitas IgY dilakukan dengan uji immunoblotting dan *dot blot*. Konjugat yang dipakai pada *western blot* adalah *chicken anti rabbit*, pewarna menggunakan DAB. *Block-ing* dilakukan dengan inkubasi membran *nitrocelulose* semalaman dengan skim.

Uji Aktivitas IgY dengan Reaksi Oponisasi

Uji aktivitas IgY dilakukan menurut metode Wibawan *et al.* (1999) dengan modifikasi. Peritonium mencit BALB C (Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia) dicuci dengan PBS, 15 menit kemudian dibedah bagian perutnya, cairan peritoneum dipanen dan dihitung dengan haemositometer jumlah makrofag yang tersedia. Inkubasi 100 μ g/mL IgY; 0,5 x 10⁶ sel/mL suspensi makrofag dan bakteri *S. agalactiae* 0,5 x 10⁸ cfu/mL selama satu jam pada suhu 37°C, kemudian disentrifugasi dan dibuat preparat ulas dengan Giemsa, selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Penentuan nilai aktivitas dan kapasitas fagositosis dihitung sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas makrofag} = \frac{\text{Jumlah makrofag aktif}}{\text{Jumlah makrofag total}} \times 100\%$$

Aplikasi IgY Spesifik Anti *S. agalactiae* pada Ikan Nila

Metode aplikasi IgY pada ikan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2006). Setiap grup terdiri atas 20 ekor ikan nila yang telah dikohabitasi dengan rerata bobot badan 30 ± 1,8 g. Grup-I merupakan perlakuan IgY untuk pencegahan infeksi bakteri, sedangkan grup-II adalah perlakuan pemberian IgY untuk pengobatan infeksi *S. agalactiae*. Kedua perlakuan tersebut diuji tantang dengan isolat *S. agalactiae* yang telah diuji dengan postulat KOCH. Pada aplikasi IgY untuk pencegahan, ikan yang telah diadaptasi diberikan injeksi IgY secara intraperitoneal dengan dosis 0,25 mL (5 mg/mL IgY); 0,5 mL (10 mg/mL IgY), dan 0,75 mL (15 mg/mL IgY). Pada ikan kontrol diinjeksi dengan PBS steril 0,25 mL. Setelah empat jam semua ikan uji diinjeksi secara intraperitoneal dengan isolat *S. agalactiae* 0,1 mL (1 x 10³ cfu/mL). Pada aplikasi IgY untuk terapi dilakukan infeksi *S. agalactiae* terlebih dahulu dengan menyuntikkan isolat *S. agalactiae* 0,1 mL (1 x 10³ cfu/mL) secara intra peritoneal dan setelah empat jam ikan uji diberikan injeksi IgY 0,25 mL (5 mg/mL IgY); 0,5 mL (10 mg/mL IgY) dan 0,75 mL (15 mg/mL IgY) dan untuk kelompok ikan kontrol disuntikkan PBS steril dengan volume 0,25 mL. Reisolasi bakteri pada ikan uji dilakukan pada organ otak ikan nila pada hari kelima setelah infeksi yang kemudian ditanam pada media BHIA (Li *et al.*, 2006). Penghitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode *total plate count* (TPC).

HASIL DAN BAHASAN

Produksi IgY Anti *S. agalactiae*

Ayam yang divaksinasi dengan suspensi *S. agalactiae* dan adjuvan mulai menunjukkan reaksi

positif seminggu setelah vaksinasi. Adjuvan digunakan untuk meningkatkan induksi respon imun pada ayam. Reaksi positif tersebut dapat dilihat dari hasil uji titer antibodi (Tabel 1). Antibodi anti *S. agalactiae* dalam serum masih terdeteksi sampai delapan minggu setelah booster terakhir (minggu ke-12). Hal yang berbeda didapat pada ayam yang dijadikan kontrol, dari awal perlakuan sampai berumur delapan minggu masih menunjukkan reaksi negatif.

Antigen yang diimunisasikan pada ayam memberikan respons yaitu terbentuknya antibodi. Antibodi terhadap antigen terbentuk selama satu minggu. Hal ini sejalan dengan pernyataan Tizard (1998) dan Subowo (1993), bahwa antibodi terhadap satu antigen terbentuk selama satu minggu setelah antigen tersebut diimunisasikan. Faktor-faktor yang memengaruhi terbentuknya antibodi di antaranya adalah umur hewan percobaan yang digunakan, ukuran molekul antigen, kerumitan struktur kimiawi antigen, konstitusi genetik, metode pemasukan antigen, dan dosis antigen yang digunakan (Subowo, 1993).

Konsentrasi IgY dalam kuning telur pada dasarnya konstan selama pematangan oosit pada telur. Pada telur yang telah matang konsentrasi IgY sekitar 10-20 mg/mL (Carlendar, 2002). Antibodi akan ditransfer ke kuning telur sebagai kekebalan maternal untuk anaknya. Proses transfer ini terdiri atas dua tahap yaitu IgY ditransfer ke serum menuju kuning telur dengan proses yang analog dengan proses transfer antibodi (IgY) pada fetus melalui plasenta pada mamalia, kemudian antibodi (IgY) ditransfer ke kantung embrio-embrio yang sedang berkembang.

Eksktraksi IgY dari Kuning Telur

Pada ekstraksi menggunakan kit *promegas EGGstract IgY purification system* didapat 40-80 mg IgY dengan kemurnian 75% per satu butir telur. Kemurnian dapat ditingkatkan hingga 90% dengan melakukan presipitasi lagi, hasil purifikasi didapatkan konsentrasi IgY adalah 60,701 mg/mL. Zhang (2003) menyebutkan bahwa dalam sebutir telur ayam mengandung 100-150 mg IgY. Hal ini berbeda dengan Schade *et al.* (1996) dalam laporan penelitian ECVAM bahwa jumlah antibodi unggas adalah 50-100 mg dalam satu butir telur. Hal senada juga disebutkan oleh Carlendar (2002) bahwa satu butir telur ayam dapat menghasilkan 100 mg IgY. Perbedaan jumlah IgY yang dihasilkan diduga karena perbedaan metode ekstraksi. Identifikasi kemurnian IgY dilakukan dengan analisis pita protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan diwarnai dengan *Fast Coomassive® stain*. Berdasarkan karakterisasi protein IgY dengan elektroforesis SDS-PAGE diketahui bahwa IgY terdiri atas sekurang-kurangnya enam jenis protein utama

Tabel 1. Uji titer antibodi serum ayam dalam 12 minggu
 Tabel 1. Chicken antibody serum test for 12 weeks

Serum	Periode koleksi telur (Collecting eggs periode)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
F	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: A= serum ayam kontrol minggu ke-1; B= serum ayam kontrol minggu ke-8. C= serum ayam perlakuan-1 minggu ke-1; D= serum ayam perlakuan-2 minggu ke-1; E= serum ayam perlakuan-1 minggu ke-6; F= serum ayam perlakuan-2 minggu ke-8; G= serum ayam perlakuan-1 minggu ke-14; H= serum ayam perlakuan-2 minggu ke-14

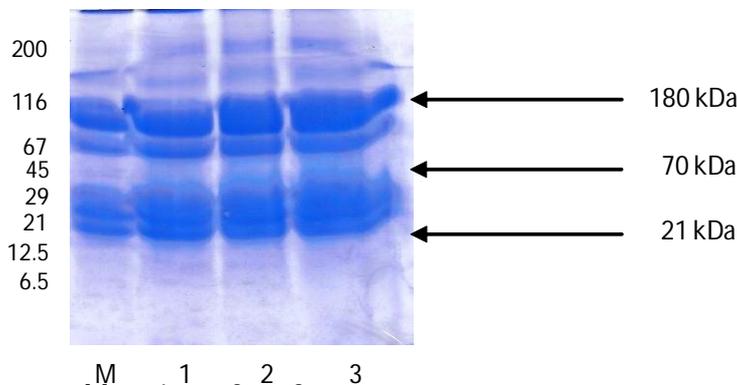
Note: A= control chicken serum in 1st week; B= control chicken serum 2nd week; C= chicken serum of treatment 1 in 1st week; D= chicken serum of 2nd treatment in 2nd week; E= chicken serum of 1st treatment in 6th week; F= chicken serum of 2nd treatment in 8th week; G= chicken serum of treatment 1 in 14th week; H= chicken serum of 2nd treatment in 14th week

yang masing-masing berukuran 225 kD; 150kD; 100kD; 75 kD; 57,5kD; serta 35 kD. Pita dengan berat molekul 180 kD diduga sebagai protein IgY yang tersusun atas dua rantai berat dengan berat molekul 70 kD dan dua rantai ringan dengan berat molekul 20 kD (Gambar 1). Pita rantai berat dan rantai ringan merupakan subunit IgY yang belum dirakit dalam kuning telur. Penelitian ini belum memberikan tingkat kemurnian yang terbaik. Terlihat dari keberadaan pita protein selain IgY dan subunitnya.

Spesifisitas IgY

Imuno blot blot dan dot blot merupakan sebuah teknik analisis yang digunakan untuk mendeteksi pro-

tein tertentu, teknik ini menggunakan elektroforesis gel untuk memisahkan protein asli oleh 3-D struktur atau protein di denaturasi dengan panjang polipeptida. Protein tersebut kemudian dipindahkan ke membran nitroselulosa dan terdeteksi menggunakan antibodi spesifik untuk protein target. Protein dari bakteri *S. agalactiae* yang telah dipindah ke membran nitroselulosa berikatan dengan IgY anti *S. agalactiae*. Ikatan antigen dan antibodi tersebut kemudian dikenali oleh antibodi sekunder yang kemudian bereaksi dengan substrat *Diaminobenzidine* (DAB). Hasil uji dot blot dan imunoblot menunjukkan hasil bahwa IgY yang dihasilkan spesifik terhadap *S. agalactiae*, band tampak pada konsentrasi IgY 10⁻¹⁰, 10⁻⁴⁰, dan 10⁻¹⁶⁰, hal



Keterangan: SA= sel bakteri *S. agalactiae*; 1-2= IgY 10 mL; 3= IgY 15 mL; 4-5= IgY 20 mL
 Notes: SA = *S. agalactiae*; 1-2 = IgY 10 mL; 3 = IgY 15 mL; 4-5 = IgY 20 mL

Gambar 1. Hasil SDS PAGE bakteri *S. agalactiae* dan IgY anti *S. agalactiae*.
 Figure 1. SDS PAGE of *S. agalactiae* and IgY anti-*S. agalactiae*.

yang sama terlihat pada uji *dot blot*, di mana terdapat dot positif hingga pengenceran IgY 10^{-160} (Gambar 2). Uji *dot blot* dan imunoblot selama ini dikenal luas banyak digunakan dalam diagnosa pada patogen. Kedua metode ini dikenal sensitif dan spesifik karena berdasarkan prinsip ikatan antigen dan antibodi.

Dari hasil tersebut diketahui bahwa antigen yang diimunisasikan pada ayam memberikan respons dengan terbentuknya antibodi. Hal ini terjadi karena adanya ikatan antara antigen dan antibodi homolog yang menghasilkan garis presipitasi pada daerah agar antara antigen-antibodi. Terjadi reaksi antara antigen dan antibodi dalam kondisi yang tepat dalam gel membentuk kompleks yang tidak larut (presipitat) berupa garis keruh pada daerah dipainya proporsi optimal. Dari hasil terlihat bahwa terdapat garis presipitasi antara sumur antigen dengan serum maupun IgY. Sehingga dapat dikatakan bahwa imunoglobulin yang dihasilkan adalah spesifik untuk *S. agalactiae*.

IgY yang dipurifikasi dari kuning telur pada dasarnya merupakan antibodi yang terjadi sebagai respons imun dan terdapat pada serum kemudian ditransfer ke kuning telur. Proses transfer terdiri atas dua tahap yaitu IgY ditransfer ke serum menuju kuning telur dengan proses yang analog dengan proses transfer antibodi (IgY) pada fetus melalui plasenta pada mamalia, kemudian antibodi (IgY) tersebut ditransfer ke kantung embrio yang sedang berkembang. Menurut Carlendar (2002), konsentrasi IgY dalam

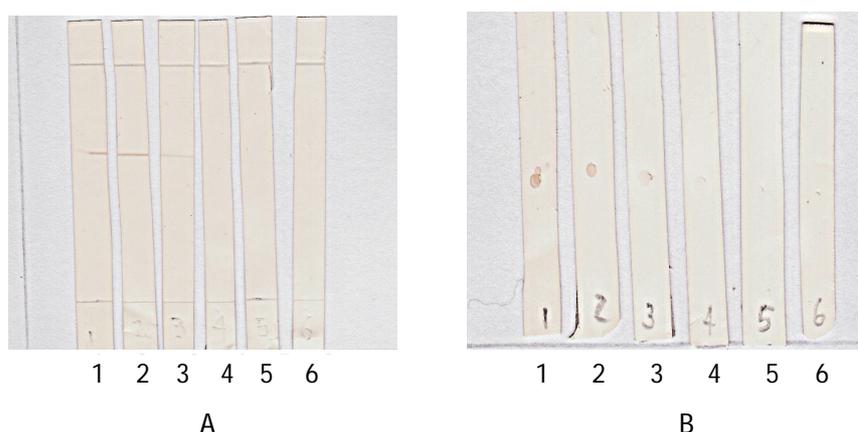
kuning telur pada dasarnya konstan selama pematangan oosit pada telur. Pada telur yang telah matang konsentrasi IgY sekitar 10-20 mg/mL, antibodi yang dihasilkan akan ditransfer ke kuning telur sebagai kekebalan maternal untuk anaknya.

Aktivitas IgY dengan Reaksi Opsonisasi

Uji opsonisasi dilakukan untuk mengetahui aktivitas IgY dalam mekanisme sistem imun seluler yaitu dalam mengeliminasi antigen bakteri *S. agalactiae*. Opsonisasi merupakan salah satu kemampuan antibodi untuk melapisi antigen sehingga aktivitas fagositosis oleh sel makrofag akan meningkat (Abbas *et al.*, 2012). Dari hasil percobaan didapatkan aktivitas makrofag pada bakteri yang telah diopsonisasi oleh IgY mempunyai aktivitas sebesar 55% dan aktivitas makrofag tanpa proses opsonisasi IgY pada *S. agalactiae* sebesar 35% (Gambar 3).

Peningkatan aktivitas fagositosis oleh makrofag yang tidak begitu besar jika dibandingkan kontrol (20%) bisa terjadi karena bagian Fab IgY anti *S. agalactiae* tidak memiliki afinitas yang besar. Fab sendiri merupakan bagian dari molekul imunoglobulin di mana terdapat reseptor epitop antigen yaitu tempat antigen dapat dikenali oleh antibodi sedangkan afinitas merupakan daya ikat antibodi terhadap antigen (Abbas *et al.*, 2012).

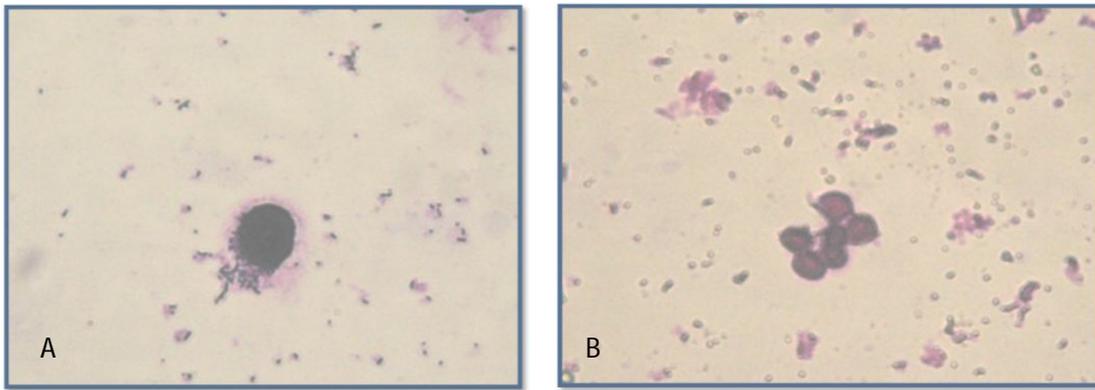
Hal lain yang bisa terjadi adalah karena bagian *fragment crystallizable region* (Fc) dari antibodi yang berperan dalam fungsi efektor dari suatu molekul



Keterangan: Pengenceran IgY 10^{-2} (1); pengenceran IgY = 10^{-40} (2); pengenceran IgY = 10^{-160} (3); pengenceran IgY = 10^{-320} (4); pengenceran IgY = 10^{-640} (5); pengenceran IgY = 10^{-1280} (6)

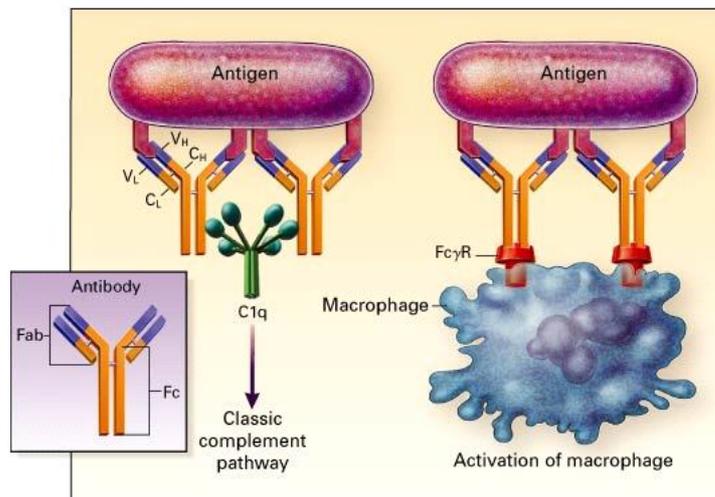
Notes: Dilution of IgY 10^{-2} (1); dilution of IgY = 10^{-40} (2); dilution of IgY = 10^{-160} (3); dilution of IgY = 10^{-320} (4); dilution of IgY = 10^{-640} (5); dilution of IgY = 10^{-1280} (6)

Gambar 2. Hasil uji immunoblotting (A) dan hasil *dot blot* (B).
Figure 2. Result of immunoblotting (A) and result of *dot blot* test (B).



Gambar 3. Aktivitas fagositosis makrofag dengan opsonisasi oleh IgY (A) dan aktivitas fagositosis makrofag tanpa opsonisasi oleh IgY (B).

Figure 3. Phagocytic activity of macrophages with opsonization by IgY (A) and phagocytic activity of macrophages without opsonization by IgY (B).



Sumber (Source): Abbas et al. (2012)

Gambar 4. Mekanisme opsonisasi.
Figure 4. Opsonization mechanism.

antibodi tidak berjalan optimal. Bagian Fc dari antibodi akan berikatan dengan resptor Fc di permukaan makrofag dan aktivasi komplemen. Jika fungsi efektor tidak berjalan optimal maka opsonisasi oleh IgY pada sel bakteri tidak akan menghasilkan peningkatan fagositosis oleh sel makrofag secara optimal. Kemungkinan lain yang bisa terjadi adalah waktu inkubasi IgY dengan *S. agalactiae* dan makrofag perlu ditambah.

Efektivitas IgY

Hasil pengujian efektivitas IgY terhadap infeksi bakteri *S. agalactiae* pada ikan uji disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan IgY untuk pengobatan terhadap infeksi *S. agalactiae* memberikan pengaruh yang lebih besar pada nilai SR (80%) dengan pemberian IgY 0,25 mL (± 5 mg/mL IgY) dan 0,5 mL (± 10 mg/mL IgY) bila dibandingkan dengan perlakuan IgY sebagai pencegahan dengan sintasan (SR) sebesar 60% dengan dosis yang sama. Pemberian IgY 0,75 mL (15 mg/mL IgY) menghasilkan nilai SR hanya 20%. Pertumbuhan koloni bakteri menunjukkan hasil yang berbeda, di mana pada kelompok kontrol koloni bakteri yang tumbuh lebih banyak ($80 \pm 2.47 \times 10^6$) dibanding kelompok dengan pemberian IgY 0,75% (83×10^4). Koloni bakteri yang tumbuh pada IgY 0,25 mL dan 0,5 mL hampir sama. Pada grup-II nilai SR ikan uji

Tabel 2. Efektivitas IgY anti *S. agalactiae* pada ikan nila melalui penyuntikan
 Table 2. Effectivity of anti *S. agalactiae* IgY on tilapia through injection

Grup (Group)	Sintasan Survival rate (%)	Rata-rata jumlah koloni bakteri Average number of bacterial colonies
I	IgY 0.75	20 ± 2.74
	IgY 0.5	80 ± 1.87
	IgY 0.25	80 ± 3.41
	Kontrol (Control)	60 ± 1.77
II	IgY 0.75	40 ± 0.98
	IgY 0.5	80 ± 1.22
	IgY 0.25	60 ± 3.11
III	Kontrol (Control)	20 ± 1.73

Keterangan (Note): TBUD= terlalu banyak untuk dihitung (TMTC= *to many to count*)

paling tinggi pada pemberian IgY 0,5 mL; akan tetapi jumlah koloni bakteri yang tumbuh tidak bisa dihitung pada pengenceran 1×10^2 dan tidak tumbuh pada pengenceran selanjutnya. Jika dibandingkan kontrol maka pemberian IgY dengan dosis ini signifikan memberikan perlindungan, akan tetapi data secara seluler di mana jumlah koloni bakteri yang tumbuh kurang mendukung.

Dari hasil di atas, beberapa kemungkinan yang bisa terjadi adalah pemberian dosis IgY sebesar 0,75 mL adalah bersifat toksik, hal ini bisa juga terjadi karena pada IgY yang merupakan protein mudah terdegradasi dan terkontaminasi dan dilarutkan dalam PBS ditambahkan zat natrium azide (NaN_3). Sebagaimana diketahui NaN_3 bersifat toksik dan harus hati-hati dalam penggunaannya. Pada percobaan dengan isolasi otak ikan nila untuk ditumbuhkan dalam media agar dan dilihat hubungan pemberian IgY dengan pertumbuhan koloni bakteri, hasil yang diperoleh belum berkorelasi dengan baik dengan nilai SR ikan uji. Pada pelaksanaannya prosedur isolasi telah dilakukan dengan cara yang aseptis, akan tetapi banyak faktor yang memengaruhi di antaranya adalah penggunaan ose yang terlalu panas pada waktu kultur, penimbangan, dan pengenceran organ otak dengan PBS yang kurang tepat sehingga memengaruhi hasil kultur bisa terjadi.

Dari hasil aplikasi IgY dengan suntikan tersebut dapat disimpulkan bahwa efektivitas berkaitan dengan dosis dan aplikasi pemberian IgY. Hal yang perlu diperhatikan adalah penyimpanan IgY, karena sebagai antibodi IgY mempunyai kerentanan terhadap suhu,

maupun penurunan pH. Uji coba efektivitas IgY juga harus memperhatikan kondisi hewan pada waktu vaksinasi di mana harus dihindari ikan stres akibat penyuntikan/vaksinasi, berpindah wadah/lingkungannya.

Pemanfaatan IgY yang diisolasi dari telur unggas belum banyak dilakukan dan terbatas pada skala laboratorium. Arasteh *et al.* (2004) melaporkan bahwa IgY spesifik terhadap *Vibrio anguillarum* yang diberikan secara pasif pada *rainbow trout* mampu menahan infeksi bakteri *Vibrio anguillarum*. Efek yang sama terhadap *Carassius auratus* yang diberi imunisasi secara pasif IgY anti *Aeromonas hydrophila* (Xiao-liang *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

IgY anti *S. agalactiae* yang diproduksi sensitif dan spesifik terhadap bakteri *S. agalactiae* dan dapat digunakan dalam pengendalian penyakit streptococosis untuk imunoterapi infeksi yang disebabkan oleh *S. agalactiae* pada ikan nila baik untuk pencegahan maupun untuk pengobatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan yang telah mendanai penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Drs. Simson Tarigan, M.Sc. dari Balai Besar Penelitian Veteriner, dan tak lupa ucapan terima kasih juga untuk teman-teman teknisi yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai S. (2012). Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders.
- Arasteh, N., Aminirisseh, A.H., Yousif, A.N., Albright, L.J., & Durance, T.D. (2004). Passive immunization of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). *Aquaculture*, 231, 23-36.
- Barnes, A.C. & Ellis, A.E. (2004). Bacterial disease of fish. where do we go from here. Yin, L.K. (Ed.). Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp disease. *Molecular Aspect of Fish and Marine Biology*, 3, 421 pp.
- Carlendar, D. (2002). Avian IgY antibody: In vitro and in vivo. Uppsala. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Dunn, E.J., Polk, A., Scarrett, D.J., Olivier, G., Lall, S., & Goosen, M.F.A. (1990). Vaccine in aquaculture: The search for efficient delivery system. *Aquaculture Engineering*, 9, 23-32.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Pasnik, D.J., & Bosnsack, J.F. (2009). Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Disease*, 15(5), 774-778.
- Li, X-L., Shuai, J-b., & Fang, W-h, (2006). Protection of *Carrasius auratus* Gibelio against infection by *Aeromonas hydrophilla* using specific immunoglobulin from hen egg yolk. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(11), 922-928.
- Nakai, S., Li-chan, E., & Lo, K.V. (1994). Separation of immunoglobulin from egg yolk. In Egg uses and Processing Technologies. Sim, J.S. & Nakai, S. (Eds.). *CAB Intl.*, p. 94-105.
- Pareira, U.P., Mian, G.F., Oliveira, I.C.M., Benchetrit, L.C., Costa, G.M., & Figueiredo, H.C.P. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human, and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140, 186-192.
- Roberson, B.S. (1990). Bacterial agglutination in fish immunology technical communication No. 1. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., & van Muiswinkel, W.B. (Eds.). Fair Haven. N.J.: SOS Publications, 197 pp.
- Schade, R., Stack, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, H., Koch, G., Larsson, A.,, & Straughan, D. (1996). The production of avian (egg yolk) antibodies. *IgY Alternatives to Laboratory Animal*, 24, 925-934.
- Subowo. (1993). *Imunologi*. Edisi ke-2. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Svendsen, L., Crowley, A., Ostergaard, L., Stodulski, H.G., & Hau, J. (1995). Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab. Anim. Sci.*, 45, 89-93.
- Tizard. (1998). *Pengantar imunologi veteriner*. Surabaya: Airlangga University.
- Wibawan, I.W.T, Pasaribu, F.H., Utama, I.H., Mawjood, A., & Laemmler, C.H. (1999). The role of hyaluronic acid capsular material of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in mediating adherence to HeLa cells and in resisting phagocytosis. *Res. Vet. Sci.*, 67, 131-135.
- Zhang, W. (2003). The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *DDT*, 8(8). Elsevier science Ltd.