

PRODUKSI ANTIBODI (IgY) TERHADAP *Entero Pathogenic Escherichia coli* (EPEC) DALAM KUNING TELUR

Production of IgY Specific Antibody Against Entero Pathogenic Escherichia coli (EPEC) in Egg Yolk

I Wayan Teguh Wibawan¹, Fachriyan H. Pasaribu¹, dan Rudi Rawendra²

¹Bagian Mikrobiologi, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Sekolah Tinggi Penyuluhan Peternakan Malang

E-mail: wiban@yahoo.com.

Telp/faks: 0251-8629574/0251-8629459

ABSTRAK

Antibodi terhadap *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) K1.1 dapat diproduksi dalam kuning telur melalui aplikasi bakterin inaktif secara intravena pada ayam. Keberadaan antibodi spesifik di dalam serum dan kuning telur dideteksi dengan teknik imunodifusi (*Agar Gel Precipitation Test/AGPT*), ditandai adanya reaksi presipitasi spesifik antara antibodi dan antigen homolognya dan tidak ada reaksi silang dengan antigen *Salmonella sp.* dan *Klebsiella sp.* Antibodi terhadap EPEC K1.1. terlebih dahulu dideteksi dalam serum dan 1 minggu kemudian antibodi ini baru dapat dideteksi dalam kuning telur. Antibodi spesifik ini dapat dideteksi di dalam serum dan kuning telur dalam jumlah yang cukup banyak selama 7 minggu dan mulai menurun pada minggu ke-8. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa telur dapat digunakan sebagai pabrik biologis untuk produksi antibodi secara massal.

Kata Kunci: antibody, EPEC, kuning telur

ABSTRACT

Antibody to Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) K1.1. can be produced in egg yolk by the application of inactivated bacterial cells intravenously in layer chicken. The presence of specific antibody in sera and egg can be detected with immunodiffusion techniques (Agar Gel Precipitation Test/AGPT), expressed by the occurrence of specific precipitation reaction between antibody and homolog antigen and no cross reaction of this antibody with antigen of Salmonella sp. and Klebsiella sp. The presence of specific antibody previously can be detected in sera, then 1 week after this the antibody start to be able be detected in egg yolk. The antibody is still present in sera as well as in egg yolk in large amount for 7 weeks and decrease significantly in the 8th week. This results indicated that the egg can be used in the producing specific antibody in the large quantity.

Keywords: antibody, EPEC, egg yolk

PENDAHULUAN

Telur ayam yang mengandung immunoglobulin Y (IgY) spesifik terhadap *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) belum banyak dimanfaatkan untuk tujuan terapi dan pencegahan. Penggunaan telur untuk tujuan ini sangat menjanjikan karena mudah diaplikasikan secara per oral dan memiliki sasaran pada permukaan mukosa saluran pencernaan. Preparasi bahan kuning telur dapat dilakukan dalam berbagai bentuk, misalnya sebagai sediaan natif, bubuk telur dan dalam bentuk kapsul sehingga IgY yang terkandung dapat efektif sampai pada bagian usus halus (intestinal).

Pengebalan pasif terhadap infeksi EPEC penyebab diare dengan cara ini memiliki prospek komersial yang sangat tinggi karena dapat meningkatkan nilai tambah telur ayam, di samping sebagai sumber protein yang sangat penting preparasi dan produksinya secara massal relatif mudah dan kesinambungan produksinya dapat dijaga.

Escherichia coli K1.1 dan metabolitnya dipilih sebagai sumber antigen karena bakteri ini merupakan penyebab utama diare di negara berkembang dan khususnya di Indonesia, terutama pada bayi dan anak-anak. Sebanyak 55% bayi dan anak-anak penderita diare disebabkan oleh EPEC. Diare merupakan penyebab utama ketiga kematian bayi setelah

gangguan perinatal dan infeksi saluran atas (ISPA). Bakteri ini mengekskresikan protease sebagai salah satu faktor virulennya dan mampu merusak sel epitel mukosa usus, mengakibatkan gangguan pada sistem pengeluaran cairan pada traktus digesti (Anonymous, 1996).

Penggunaan antibiotika dalam penanganan penyakit diare memiliki beberapa kendala diantaranya adalah adanya aturan yang ketat penggunaan antibiotika untuk penanganan *E. coli* K1.1 dengan memperhatikan reaksi alergi dan kondisi pasien dan masalah resistensi sehingga perlu diupayakan alternatif lain, yakni penggunaan pengebalan pasif dengan pemberian IgY anti *E. coli* K1.1 dalam telur ayam kepada penderita dan kelompok yang berisiko tinggi. Hal ini sangat mungkin dilakukan karena IgY yang terdapat dalam darah mudah ditransfer ke dalam telur dengan konsentrasi yang sangat tinggi, proses pengebalan ayam mudah dilakukan, dan produksi telur anti *E. coli* K1.1 secara massal sangat mungkin dilakukan. Meskipun demikian perlu dilakukan penelitian untuk melihat keunggulan aktivitas biologis (efikasi) IgY khususnya dikaitkan dengan antigen *E. coli* K1.1, melihat respon imunogenik IgY ayam terhadap *E. coli* K1.1, tinggi dan masa bertahannya titer IgY dalam telur, menguji daya netralisasi IgY terhadap antigen *E. coli* K1.1 serta perannya sebagai opsonin, dan aplikasi penggunaan telur anti *E. coli* K1.1 di lapangan.

Sampai saat ini, pemanfaatan IgY spesifik dalam telur ayam untuk pengobatan dan pencegahan penyakit masih terbatas pada skala laboratorium. Pada hewan, pemanfaatan IgY pernah dilaporkan oleh Kermani-Araeb *et al.* (2001), yang menyatakan bahwa IgY spesifik terhadap penyakit Marek yang diaplikasi secara pasif mampu menahan infeksi virus Marek. Dilaporkan pula bahwa penyakit colibacillosis dan influenza pada unggas dapat dicegah dengan pemberian IgY spesifik secara pasif. Studi vaksinasi pasif dengan menggunakan IgY hasil purifikasi kuning telur yang diambil dari ayam yang telah divaksin dengan *whole cell* dari *S. mutans* pada percobaan secara *in vitro* maupun *in vivo* mampu mencegah kerusakan gigi manusia (Hatta *et al.*, 1997). Immunoglobulin IgY spesifik terhadap *S. mutans* GBP-B (*Glucan Binding Protein-B*) dapat menghambat akumulasi *S. mutans* pada biofilm gigi dan dapat

memproteksi kerusakan gigi yang disebabkan oleh *S. mutans* (Smith *et al.*, 2001). Hasil studi Sugita-Konishi *et al.* (1996) menunjukkan adanya fungsi imun IgY yang dihasilkan dari ayam yang divaksinasi dengan campuran formalin dan bakteri patogenik. Immunoglobulin IgY menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aerogenosa*, produksi enterotoksin-A dari *Staphylococcus aureus* dan adhesi *Salmonella enteritidis* pada kultur sel intestinal manusia. Hasil ini menunjukkan bahwa IgY spesifik untuk berbagai bakteri dapat digunakan untuk mencegah penyakit bakterial.

MATERI DAN METODE

Kultur Bakteri

Dalam penelitian ini digunakan *E. coli* enteropatogenik isolat K 1.1 yang diisolasi dari kasus diare pada anak dari daerah Depok yang dikoleksi oleh Laboratorium Biotek Hewan dan Biomedis. Isolat disediakan atas kebaikan Dr.dr. Sri Budiarti Poerwanto.

Produksi Serum Anti *E. coli* K1.1 dari Telur

Produksi IgY anti *E. coli* K1.1 dalam telur ayam dilakukan dengan menyuntik 1 ml suspensi bakteri EPEC K1.1 yang telah diinaktifkan dengan formaldehida 0,5% (10^9 cfu/ml) secara *intra vena* pada minggu ke-1, minggu ke-2 (3x @ 1ml) dan pada minggu ke-3 (3x@ 1ml) ke 100 ekor ayam betina dewasa (*tipe large size hens*) siap bertelur (umur 20 minggu) yang dipelihara dalam kandang baterai dan diberi makanan komersial standar. Jika titer antibodi tinggi dalam darah, maka telur yang dihasilkan dikoleksi dan disimpan hingga untuk penelitian selanjutnya.

Uji Spesifitas IgY Murni Anti *E. coli* K1.1.

Imunoglobulin IgY yang telah dimurnikan diuji spesifitasnya terhadap anti *E. coli* K1.1 dan strain *E. coli* lain menggunakan teknik imunodifusi (Wibawan, 1993).

Ekstraksi dan Pemurnian IgY dari Kuning

Metode ekstraksi dilakukan menurut metode Polson (1980). Metode ini menggunakan PEG yang terdiri dari PEG 3,5% untuk menghilangkan partikel lemak dan PEG 12% untuk mempresipitasi IgY. Pengendapan enzim dengan PEG tidak mempengaruhi tahap pemurnian berikutnya, misalnya dengan kromatografi penukar ion atau kromatografi afinitas.

Ekstrak IgY yang dihasilkan mempunyai konsentrasi 1,6 mg/ml. Zhang (2003) menyebutkan bahwa dalam sebutir telur ayam mengandung 100-150 mg IgY. Hal ini berbeda dengan Schade *et al.* (1997) dalam laporan penelitian ECVAM bahwa jumlah antibodi unggas adalah 50-100 mg dalam satu butir telur. Perbedaan jumlah IgY yang dihasilkan dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan.

Ekstrak IgY yang diperoleh didialisa. Dialisa berfungsi untuk menghilangkan sisa garam. Untuk memisahkan IgY dengan komponen yang lainnya dilakukan pemurnian dengan metode kromatografi pertukaran ion. Dalam pemurnian ini menggunakan matrik DEAE-sephacel yang merupakan penukar anion. Hasil kromatografi pertukaran ion disajikan pada Gambar 5.

Penentuan Pola Pembentukan IgY anti E coli K1.1 dalam Darah dan Telur

Penentuan pola pembentukan IgY diikuti setiap minggu dengan melacak keberadaan IgY spesifik menggunakan teknik imunodifusi (*Agar Gel Precipitation/AGPT*).

Purifikasi IgY dari Kuning Telur

Purifikasi IgY dari kuning telur dilakukan dengan ion-exchange chromatography menggunakan DEAE-sephacel. Telur dipecahkan, dan kuning telur dipisahkan dengan menggunakan *egg separator*. Gel DEAE cellulose dalam column chromatography dibilas dengan Tris buffer 10 mM. Sejumlah 5 ml supernatan cairan kuning telur yang telah dipisahkan tadi dimasukkan ke dalam kolom, sehingga gel akan berikatan dengan IgY dengan sempurna. Pada saat ini, protein-protein ini akan lolos yang dapat dilihat dari kenaikan garis grafik. Protein-protein ini dibuang. Selanjutnya dilakukan elusi IgY gel matrix DEAE-Sephacell.

Imunoglobulin (IgY) terelusi dengan meningkatnya kadar NaCl dalam Tris buffer 10 mM. Elusi dilakukan dengan menambahkan Tris buffer 10 mM yang mengandung 100 mM dan 300 mM NaCl. Imunoglobulin yang terelusi akan terdeteksi oleh monitor absorban yang ditandai dengan naiknya garis sampai terbentuk garis puncak grafik. Larutan ditampung dalam gelas erlenmeyer. Selanjutnya dilakukan dialisis dalam larutan PBS pH 8,0 selama satu malam pada suhu 2–8 °C. Gel kemudian dicuci kembali dengan Tris buffer 10 mM pH 8,0.

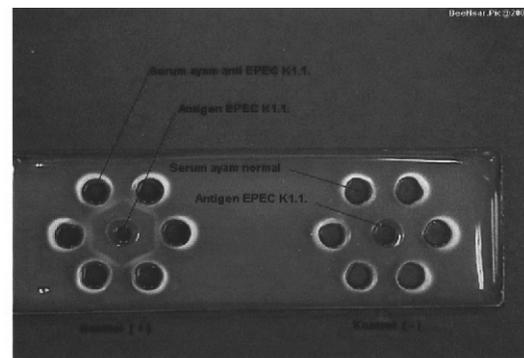
HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Serum spesifik terhadap EPEC K 1.1

Sebelum ayam digunakan, seluruh serum ayam ternyata tidak mengandung antibodi spesifik terhadap EPECK 1.1 pada uji AGPT. Ayam yang divaksinasi dengan preparat sel utuh EPECK 1.1 mulai menunjukkan reaksi positif setelah penyuntikan ke-2. Reaksi positif tersebut tampak dari hasil uji AGPT. Penyuntikan antigen ke hewan percobaan akan membangkitkan produksi antibodi terhadap antigen tersebut. Faktor-faktor yang mempengaruhi terbentuknya antibodi diantaranya adalah umur hewan percobaan yang digunakan, ukuran molekul antigen, kerumitan struktur kimiawi antigen, konstitusi genetik, metode pemasukan antigen dan dosis antigen yang diberikan.

Pola Transfer Antibodi dari darah ke Telur dan Spesifisitas Serum (IgY)

Agar Gel Precipitation Test (AGPT) adalah uji cepat dan sederhana untuk mengetahui keberadaan antibodi spesifik terhadap EPEC K1.1. Reaksi positif ditandai dengan adanya garis presipitasi antara serum dan antigen homolog (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi presipitasi spesifik serum ayam yang mengandung IgY dengan antigen E. coli K1.1

Pada minggu pertama keberadaan antibodi spesifik belum dapat dideteksi pada semua serum. Pembentukan antibodi pada semua serum ayam baru dapat dideteksi 2 minggu setelah penyuntikan. Transfer antibodi spesifik dari darah ke dalam kuning telur terjadi satu minggu setelah antibodi beredar dalam darah. Hal ini dapat dipahami dan dikaitkan dengan waktu perkembangan kuning telur dan pembentukan kerabang yang kurang lebih memerlukan waktu 4-7 hari. Hal yang sama diutarakan juga oleh Wolley *et al.* (1995)

yang menyatakan bahwa IgY spesifik terhadap antigen tertentu baru dapat dideteksi setelah 34 hari. Keberadaan antibodi dalam serum dan kuning telur tetap dapat dideteksi hingga minggu ke-8, mulai menurun dan tidak dapat dideteksi lagi pada minggu ke-9 (Tabel 1 dan 2). Hal ini menunjukkan bahwa ayam mampu mentransferkan antibodi hasil vaksinasi selama 7 minggu dan perlu dilakukan booster setiap 6 atau 7 minggu. Transfer IgY dari darah ke dalam kuning telur melalui 2 tahap, yakni (1) IgY dari serum ditransfer dengan proses yang analog dengan transfer antibodi ke fetus dan (2) dari kantung embryo ke dalam embryo yang sedang berkembang (Carlender, 2002). Loeken dan Roth (1983), menyatakan bahwa terdapat reseptor IgY pada oosit yang menangkap IgY yang berada dalam serum ke kuning telur yang secara penuh berlangsung dalam 18 hari. Antibodi akan ditransfer ke kuning telur sebagai kekebalan maternal untuk anaknya. Menurut Wolley *et al.* (1995) keberadaan antibodi dalam kuning telur mempunyai jarak 34 hari setelah pemunculan antibodi dalam serum.

Tabel 1. Keberadaan antibodi spesifik EPEC K1.1 di dalam serum ayam pada berbagai masa pengambilan dan diuji dengan AGPT

No Ayam	Hasil AGPT								
	Mg-1	Mg-2	Mg-3	Mg-4	Mg-5	Mg-6	Mg-7	Mg-8	Mg-9
1	-	+	+	+	+	+	+	+	-
2	-	+	+	+	+	+	+	+	-
3	-	+	+	+	+	+	+	+	-
4	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	-	+	+	+	+	+	+	+	-
6	-	+	+	+	+	+	+	+	-
7	-	+	+	+	+	+	+	+	-
8	-	+	+	+	+	+	+	+	-
9	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabel 2. Keberadaan antibodi spesifik EPEC K1.1 dalam kuning telur

Telur Ayam No	Hasil AGPT								
	Mg-1	Mg-2	Mg-3	Mg-4	Mg-5	Mg-6	Mg-7	Mg-8	Mg-9
1	-	-	+	+	+	+	+	+	-
2	-	-	+	+	+	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	+	+	+	-
9	-	-	+	+	+	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Imunoglobulin Y terelusi pada konsentrasi NaCl 100-350 mM pada fraksi 6 - 19. Konsentrasi IgY tertinggi didapat pada fraksi 14 yaitu 8,1 mg/ml. Keberhasilan pemisahan dengan menggunakan kolom penukar ion, antara lain ditentukan kemampuan protein terikat pada kolom penukar ion dan kekuatan ion pelarut IgY dari ekstrak kuning telur relatif tidak mengalami penurunan aktivitas dengan penambahan NaCl sampai konsentrasi 0,35 M.

Spesifitas IgY anti EPEC K1.1 yang telah dimurnikan dari kuning telur, diuji dengan AGPT terhadap berbagai antigen bakteri enterobakter. Imunoglobulin IgY anti EPEC K1.1 hanya bereaksi spesifik terhadap antigen homolognya dan tidak dengan antigen heterolog (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil uji IgY anti EPEC K1.1 dalam kuning telur terhadap antigen homolog dan heterolog

IgY Kuning Telur anti EPEC	Antigen		
	EPEC K1.1	Salmonella sp	Klebsiella sp
Telur 1	+	-	-
Telur 2	+	-	-

Serum spesifik terhadap EPEC K1.1 bereaksi spesifik hanya dengan antigen *E. coli* bukan K1.1 dan tidak bereaksi dengan antigen beberapa bakteri enterobakter (*Salmonella sp.* dan *Klebsiella sp.*) pada uji AGPT. Hal ini menunjukkan spesifitas antibodi EPEC K1.1 (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil uji reaksi serum EPEC K1.1 terhadap antigen homolog dan heterolog

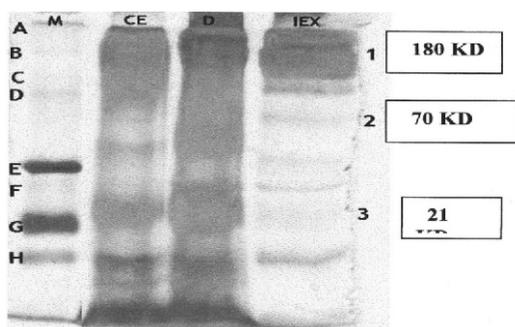
Serum Dari	Antigen		
	EPEC K1.1	Salmonella sp	Klebsiella sp
Ayam 1	+	-	-
Ayam 2	+	-	-

Pola Pita Protein IgY

Identifikasi kemurnian IgY ditentukan secara fatometris (A= 280 nm) dan analisis pita protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* dan diwarnai dengan *Fast Coomassie Blue*.

Imunoglobulin IgY kuning telur yang telah diurnikan dianalisis jumlah pita protein dan berat molekulnya dengan SDS-PAGE.

Hasil SDS-PAGE menggunakan pewarna silver staining menunjukkan pita IgY dengan berat molekul 180.000 dalton, dua pita (molekul) IgY 70.000 dalton (rantai berat) dan 21.000 dalton (rantai ringan) (Gambar 2). Anonimus (2004) melaporkan pita rantai berat dan rantai ringan merupakan subunit IgY yang belum dirakit dalam kuning telur.



Gambar 2. Profil pita protein ekstrak keruh IgY (CE), setelah dialisa (D), setelah kolom DEAE-sephacel (EI X), dan-Broad Marker (M). (1) IgY, (2) rantai berat IgY, (3) rantai ringan IgY, (A) myosin, (B) galactosidase, (C) phosphorylase, (D) serum albumin, (E) ovalbumin, (F) carbonic anhydrase, (G) tripsin inhibitor, (H) lysozyme inhibitor

KESIMPULAN

Antibodi terhadap EPEC K 1.1 dapat diproduksi dalam kuning telur melalui aplikasi bakteri inaktif secara intra vena pada ayam. Antibodi anti EPEC K1.1. dalam serum mampu ditransferkan ke dalam kuning telur selama 7 minggu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Bersaing. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Eri Hermawan yang banyak membantu dalam menyiapkan bahan tulisan dan editing publikasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1996. **Survey Kesehatan Rumah Tangga 1995**. Studi *follow up* Ibu Hamil, Studi Morbiditas dan Disabilitas di Jawa-Bali, Studi Pola Penyakit Penyebab Kematian di Jawa-Bali. Balai Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia Jakarta.
- Anonimus. 2004. CAP-8 IgG Purification Kit™. Sterogen Technical profile. www.sterogen.com/cap-8.htm.
- Carlender, D. 2002. **Avian IgY Antibody: In vitro and in vivo**. Acta Universities Upsaliensis. Uppsala.
- Finlay, B. 2002. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC, *E. coli* O157:H7). Dr. Brett Finlay's Laboratory <http://www.hhmi.org/grant/lectures/1999/index.htm>.
- Hatta H., K. Tsuda, M. Ozeki, M. Kim, T. Yamamoto, S. Otake, M. Hirasawa, J. Katz, N.K. Childers S.M. Michalek. 1997. Passive immunization against dental plaque formation In humans: Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Research**. 31(4):268-74.
- Kermani-Araeb, V.T. Moll, B.R. Cho, W.C. Davis, Y.S. Lu. 2001. Effects of IgY antibody on the development of Marek's disease. **Avian Dis.** (20):32-41.
- Loeken, M.R. and T.F Roth. 1983. Analysis of maternal IgG subpopulation which are transported into chicken oocyte. **J. Immunol.** 49:21-27
- Schade, R., P. Henklein, and A. Hlinak. 1997. Egg yolk antibody: State of the art and advantageous in the life sciences. In **Animal Alternatives, Welfare And Ethics** (Zutphen, L. F. M., And Balls, M., eds) Elsevier, Amsterdam.
- Smith, D.J., W.F. King, and R. Godiska. 2001. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* Glucan Binding Protein B can confer protection against experimental dental caries. **Infection and Immunity**. 69(5):3135-3412
- Wolley, G. W., K.E Magor, and D.A. Higgins. 1995. Ig-Y: Cluest to the origins of modern antibodies. **J. Immunol.** 6:392-388
- Wibawan, I.W.T. 1993. Untersuchungen an Typenantigenen von streptokokken der serologischen Guppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren. **Dissertation**, Justus Liebig Universitaet Giessen Deutschland.
- Zhang, W. 2003. **The Use of Gene-Specific IgY Antibodies for Drug Target Discovery**. DDT vol. 8. Elsevier Science Ltd.