

ISSN : 1411-8327

Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

B₁

Vol. 7, No. 4, Desember 2006

Terakreditasi Dirjen Dikti S.K. No. 55/DIKTI/Kep/2005

TINGKAT EFIKASI BERBAGAI VAKSIN IBR INAKTIF
ISOLAT LOKAL PADA SAPI PERAH

PERANAN β KAROTEN DALAM MEMPERTAHANKAN
DAYA HIDUP SPERMATOZOA

PERBANDINGAN METODE PEG - AMMONIUM SULEAT
DAN PEG - KLOOROFORM UNTUK EKSTRAKSI
DAN PURIFIKASI IgY KUNING TELOR

PENGARUH FREKUENSI DAN WAKTU INSEMINASI
TERHADAP FERTILITAS TELOR AYAM KAMPUNG
YANG DI INSEMINASI SEMEN AYAM HUTAN HIJAU

KAJIAN TENTANG BERAT RELATIF BEBERAPA ORGAN
VISCERAL ITIK BALI

POTENSI VIRUS NEWCASTLE DISEASE SEBAGAI AGEN
ANTI KANKER PADA MANUSIA



Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali

Perbandingan antara Metode PEG-Ammonium sulfat dan PEG-Kloroform untuk Ekstraksi dan Purifikasi IgY Kuning Telur

(THE COMPARISON OF PEG-AMMONIUM SULPHATE AND PEG-CHLOROFORM METHODS FOR THE EXTRACTION AND PURIFICATION OF Ig Y FROM EGG YOLK)

I Nyoman Suartha¹, I Wayan Teguh Wibawan², dan Ratu Shinta Mayasari²

1. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Denpasar.
2. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Abstrak

Metode ekstraksi protein kuning telur dengan polyethyleneglycol (PEG) yang dikombinasi dengan ammonium sulfat (P-A) dan PEG yang dikombinasi dengan kloroform (P-C) merupakan metode yang relative sederhana dan murah. Dalam metode P-A, protein dalam kuning telur yang telah dilarutkan dalam larutan PEG diendapkan dengan ammonium sulfat. Sementara itu, pada metode P-C, pengendapan protein dilakukan dengan PEG dan pengendapan lipid dilakukan dengan kloroform. Konsentrasi IgY kasar yang didapat dari metode P-A adalah 53.40% (W/V) sedangkan dengan metode P-C adalah 50.48%. Analisis pita protein dengan SDS-PAGE didapatkan dua band protein yaitu dengan berat molekul 65 kDa untuk IgY rantai berat dan 30 kDa untuk IgY rantai ringan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode P-A sedikit lebih baik jika dibandingkan dengan metode P-C.

Kata-kata kunci : Ekstraksi, IgY, Polyethylene glycol, ammonium sulfat

J Vet 2006 7 (4) : 157-162

Abstract

Two methods of IgY extraction from egg yolk, polyethyleneglycol (PEG)- combined with ammonium sulfate (P-A) and PEG combined with chloroform (P-C), were compared. Both methods were cheap and simple to perform. In P-A method, egg yolk was firstly dissolved in 3.5% PEG solution (W/V), and followed by protein precipitation using ammonium sulfate. In P-C method, protein in the yolk was firstly precipitated by PEG and followed treatment with chloroform to resolve the lipid component. The recovery rate of IgY by using P-A methods was 53.40% (W/V) and by P-C method was 50.48%. The presence of IgY was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Two protein bands with molecular weight 65 kDa for IgY heavy chain and 30 kDa for IgY light chain were detected by SDS-PAGE. The result of this study indicated that P-A method is slightly better than P-C method in extracting the IgY from yolk.

Key words : Extraction, IgY, Polyethylene glycol, ammonium sulfate.

J Vet 2006 7 (4) : 157-162

PENDAHULUAN

Pengembangan industri perunggasan difokuskan untuk menjadikan ayam sebagai sumber gizi. Hanya sedikit ahli yang mengetahui bahwa ayam merupakan sumber produksi IgY yang sangat baik dan berpotensi untuk dipakai dalam menanggulangi berbagai penyakit infeksi. Terhambatnya penerimaan atau sedikitnya dukungan ahli terhadap hal ini sangat mungkin disebabkan oleh terbatas atau kurangnya informasi yang tersedia (Schade dan Hlinak 1996). Para peneliti masih lebih banyak menggunakan imunoglobulin dari mamalia seperti kelinci, tikus putih, tikus, quinea pig dan hewan mamalia besar seperti kuda, kambing, domba, dan sapi (Svendsen *et al.* 1995).

Imunoglobulin yang dipisahkan dari kuning telur (IgY) dapat diaplikasikan secara luas dalam teknik imunologi dan dalam pencegahan penyakit. Berbagai teknik telah digunakan untuk memisahkan dan memurnikan IgY dari kuning telur. Banyak teknik juga masih dikembangkan dalam upaya untuk mencari teknik yang tidak menggunakan zat kimia atau pelarut organik yang berkonsentrasi tinggi (Nakai *et al.* 1994).

Beberapa metode ekstraksi dan pemurnian IgY adalah presipitasi protein dengan garam, presipitasi isoelektrik, presipitasi dengan larutan garam atau kombinasi di antara beberapa metode tersebut. Metode presipitasi dengan garam lebih sering digunakan bila dibandingkan dengan metode presipitasi lainnya. Sebagian IgY biasanya hilang dalam tahapan purifikasi sehingga tidak mungkin untuk mendapatkan IgY 100% murni (Wilson dan Walker 2000). Metode ekstraksi PEG-kloroform (P-C) dan PEG ammonium sulfat (P-A) memiliki langkah-langkah pemurnian yang relatif lebih

sederhana, lebih cepat, dan lebih murah dari metode lainnya. Dalam tulisan ini dibandingkan tingkat kemurnian IgY anti tetanus hasil ekstraksi PEG-kloroform dan PEG ammonium sulfat berdasarkan konsentrasinya.

METODE PENELITIAN

Produksi IgY pada Telur

Produksi IgY menggunakan 5 ekor ayam betina dewasa siap bertelur yang dipelihara dalam kandang baterai dan diberi makanan komersial standar dan air minum secara *ad libitum*. Hewan coba diimunisasi dengan toksoid tetanus dengan dosis bertingkat secara intra muskular. Bila titer antibodi cukup tinggi dalam darah, maka telur yang dihasilkan dikoleksi (Suartha *et al.* 2004).

Ekstraksi dan Purifikasi Ig Y

Metode PEG - Chloroform. Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur dan diletakan diatas kertas saring. Selaput kuning telur diangkat dengan pinset dan cairan kuning telur ditampung pada tabung dengan volume 50 ml. Tambahkan 25 ml sodium phosphat buffer (100 mM, pH 7,6) dan campurkan secara perlahan. Selanjutnya tambahkan 20 ml kloroform dan campur secara perlahan sampai terlihat bentukan semisolid. Larutan itu disentrifus dengan kecepatan 1200 g selama 30 menit. Supernatan diambil dan tambahkan PEG 6000 sehingga didapat konsentrasi akhir 12% (w/v). Larutan itu kemudian disentrifus dengan kecepatan 15700 g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensikan dengan 2 ml phosphat buffer, tambahkan dua tetes 0,1% Na azide, dan simpan pada suhu - 20°C sampai digunakan untuk uji selanjutnya (Camenisch *et al.* 1999).

Metode PEG-Ammonium Sulfat. Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur dan diletakan diatas kertas saring. Lubangi membran kuning telur, dan cairan kuning telur diambil dengan pipet dan dimasukkan kedalam tabung volume 50 ml. Kuning telur dilarutkan dengan larutan 3,5% PEG dalam buffer fosfat pH 7,6 dengan perbandingan 1 : 3 (1 bagian kuning telur : 3 bagian 3,5% PEG), dan di goyang-goyangkan selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian disentrifugasi selama 25 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu kamar, supernatan yang didapat selanjutnya dilarutkan kembali dengan larutan 12% PEG dan di sentrifugasi lagi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan kemudian dibuang dan presipitan dilarutkan ke dalam PBS. Larutan tersebut ditambahkan ammonium sulphate jenuh sampai konsentrasi akhir 40%. Setelah disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 13 000g, pelet dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan ammonium sulphate 40%. Larutan kemudian di dialisis dengan larutan bufer dengan volume larutan sampai 150 kali dari

volume awal. Larutan PBS yang terdapat dalam tabung dialisis ditampung. Larutan itu kira-kira mengandung 95% IgY murni. Kemudian larutan itu ditambahkan dengan PBS yang mengandung 0,1 % azide (NaN₃) untuk mencegah pertumbuhan bakteri (Polson et al. 1980).

Identifikasi Kemurnian Ig Y

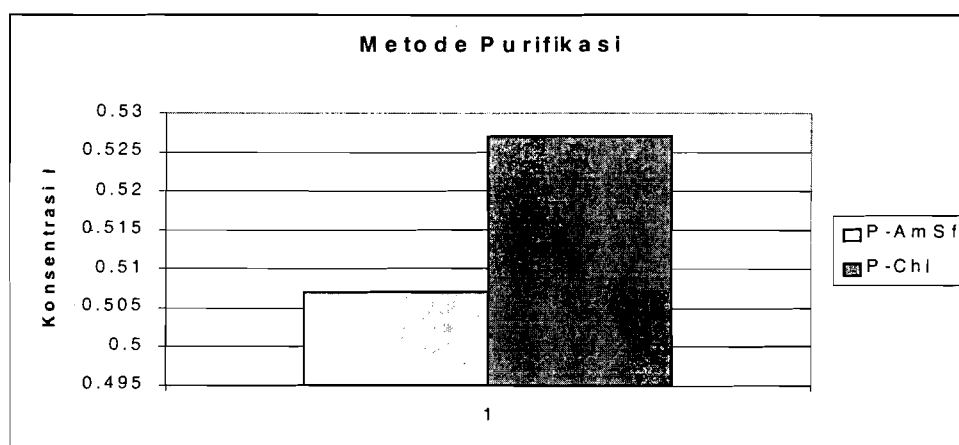
Identifikasi kemurnian Ig Y ditentukan secara fatometris ($\lambda = 595 \text{ nm}$) menggunakan metode bradford (Wilson dan Walker 2000), dan analisis pita protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Carlander, 2002).

Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh di analisis secara statistik menggunakan program SPSS 10 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rataan konsentrasi IgY yang dapat diisolasi pada telur dengan menggunakan metode PEG-Chloroform sebesar $0,527 \pm 0,031 \text{ mg/ml}$ sedangkan dengan metode



Keterangan :

P-AmSf : PEG-Amonium Sulfat

P-Chl : PEG-Chloroform

Gambar 1. Perbandingan Hasil Purifikasi IgY Pada Telur.

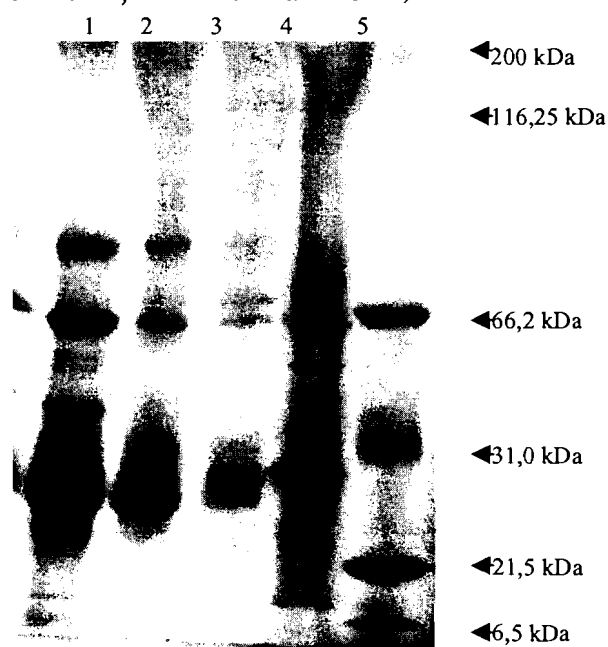
PEG-ammonium sulfat yaitu $0,507 \pm 0,025$ mg/ml (Gambar 1). Secara statistik tidak ada perbedaan antara kedua metode tersebut, tetapi pengerjaan purifikasi dengan metode PEG-Chloroform lebih cepat dan sederhana dibandingkan dengan metode PEG-Amonium sulfat.

Konsentrasi IgY dari ekstraksi kuning telur sangat dipengaruhi oleh tingkat kelarutan kuning telur pada saat pemisahan lemak telur dan pH larutan (Akita dan Nakai, 1992). Kontaminasi lemak dapat dihilangkan dengan penambahan sodium alginate atau l-carrageenan (Hatta *et al.* 1993). Polson *et al.* (1980) melaporkan penggunaan Polyethylene glycol (PEG) 6000 sangat baik untuk memisahkan IgY dibandingkan menggunakan pelarut organik yang lain seperti ether dan toluene. Penggunaan kloroform juga dilaporkan sangat baik untuk memisahkan lemak telur dan tanpa merusak aktivitas IgY yang diisolasi. Metode itu sangat sederhana, memerlukan waktu singkat untuk isolasi, dan sangat efisien dengan kehomogenan IgY yang diperoleh lebih dari 90% (Polson 1990).

Hasil ekstraksi di atas kemudian dimurnikan dengan kromatografi gel filtrasi menggunakan kolom sephadex G150 didapatkan konsentrasi IgY dari metode P-A dan P-C masing-masing 2.44 mg/ml dan 1.39 mg/ml. Carlander (2002) mendapatkan konsentrasi IgY yang diekstraksi dengan metode PA 2.21 mg/ml. Besarnya konsentrasi IgY yang dapat ditampung sangat dipengaruhi oleh banyak faktor seperti hilang saat pencucian, tertinggal pada dinding tabung, dan ikut mengendap saat pengendapan lipid. Sehingga dalam pengerjaan perlu ketelitian dan hati-hati. Prosedur kerja dari ekstraksi P-A lebih rumit dibandingkan dengan P-C, sehingga

pengerjaan dengan metode P-A lebih lama. Salah satu dari metode ekstraksi IgY itu atau metode yang lain dapat digunakan untuk ekstraksi. Dalam pemilihan metode itu perlu dipikirkan faktor biaya dan waktu yang dibutuhkan sehingga metode yang kita gunakan menjadi efisien. Sedangkan metode purifikasi dengan cara filtrasi gel atau DAEA dilaporkan sederhana, cepat dan murah dibanding metode lain (Akita dan Nakai, 1992).

Analisis pita protein dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil SDS-PAGE didapatkan dua band protein dari IgY yaitu dengan berat 65 kDa untuk IgY rantai berat dan 30 kDa untuk IgY rantai ringan. Beberapa peneliti melaporkan berat molekul dari rantai berat IgY adalah 65 sampai 70 kDa, sedangkan rantai ringan 20 sampai 30 kDa (Yokohama *et al.* 1993; Hatta *et al.* 1993; Bhanushali *et al.* 1994; Schade *et al.* 1996).



Gambar 2. Pita protein dari IgY dengan pewarnaan perak nitrat. (1) WSF, (2) purifikasi dengan PEG-Chloroform, (3) purifikasi dengan PEG Amonium sulfat, (4) Serum, dan (5) Marker.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan konsentrasi rata-rata total protein yang di dapat ekstraksi IgY dengan metode P-A dan P-C masing-masing sebesar 53.40% dan 50.43%. Penggunaan metode ekstraksi PEG – Chloroform lebih sederhana dibandingkan metode PEG ammonium sulfat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, atas bantuan biaya penelitian melalui Proyek Penelitian Hibah Bersaing XII dengan Surat Perjanjian kontrak No : 028/P4T/DPPM/PHBXII/III/2004 Tanggal 1 Maret 2004

DAFTAR PUSTAKA

- Akita, E. M., dan S. Nakai.** 1992. Immunoglobulins from Egg Yolk : Isolation and Purification. *J. Food Sci.* 57(3):629-634.
- Bhanushali, J.K., J.M.Gilbert and L.R. McDougald.** 1994. Simple Method to Purify Chicken Immunoglobulin G. *Poultry Sci* 73:1158-1161.
- Camenisch, G. M., D. Tini, I. Chilov, V. Kvietikova, J.Srinivas, P.Caro, R.H. Spielmann, M. Wenger, and Gassmann.** 1999. General Applicability of Chicken Egg Yolk Antibodies: The Performance of IgY Immunoglobulins Raised Against The Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha. *FASEB J.* 13: 81-88
- Carlander, D.** 2002. Avian IgY Antibody. In Vitro and In Vivo. Dissertations. Canada:Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala.
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, and T.Yamamoto.** 1993. Productivity and Some Properties of Egg Yolk Antibody (IgY) Against Human Rotavirus Compared with Rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 450-454
- Nakai, S., E. Li-Chan, and K.V.Lo.** 1994. Separation of Immunoglobulin from Egg Yolk. in Eggs Uses and Processing Technologies new Developments. Edited by J.S. Sim and S. Nakai. *Cab International.* pp 95-105
- Polson, A., M. B. von Wechmar, and M. H. V. von Regenmortel.** 1980. Isolation of viral IgY Antibodies from Yolk of Immunized Hens. *Immunological Communication* 9 : 475 – 493.
- Polson, A.** 1990. Isolation of IgY from The Yolks of Eggs by a Chloroform Polyethylene Glycol Procedure. *Immunol Invest.* 19 (3) : 253-258.
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, M. Erhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M van Rogemortel, E. Rijke, H Spielmann, H Steinbusch, and D. Straughan.** 1996. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies : Ig Y. Alternatives to Laboratorium Animal. 24 : 925 – 934.
- Schade, R., and A. Hlinak.** 1996. Egg Yolk Antibodies. State of The Art and Future Prospects. *ALTEX.* 13(5):5-9.
- Suartha, I.N., I.W.T. Wibawan, dan I.W. Batan.** 2004. Studi Tentang Penggunaan Telur Unggas Sebagai “Pabrik Bahan Biologis” Produksi Antibodi Spesifik untuk Imunoterapi dan Immunodiagnostik. Laporan penelitian hibah bersaing XII perguruan tinggi tahun anggaran 2004

- Svendsen, L., A. Crowley, L.H. Ostergaard, G. Stodulski, and J. Hau.** 1995. Development and Comparison of Purification Strategies for Chicken Antibodies from Egg Yolk. *Lab. Anim. Sci.* 45:89-93.
- Wilson, K., and J. Walker, Editor.** 2000. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edisi ke-7. United Kingdom. Cambridge University.
- Yokohama, H., R.C. Peralta, T. Horikoshi, J. Hiraoka, Y. Ikemori, M. Kuroki, and Y. Kodama.** 1993. A Two-step Procedure for Purification of Hen Egg Yolk Immunoglobulin G : Utilization of Hydroxypropylmethylcellulose Phthalate and Synthetic Affinity Ligand Gel (Avil AL®). *Poultry Sci.* 72: 275-281.