

ISSN : 1411-8327

# Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

B6

**Vol. 8, No. 4, Desember 2007**

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

BIOPRESERVATIF  
DARI LIMBAH RUMEN SAPI BALI

IgY & IgG ANTITETANUS

PROSTAGLANDIN F 2 ALPHA  
PRODUK VESIKA SEMINALIS SAPI BALI

NILAI KARDIORESPIRASI  
BAYI DUGONG

Q FEVER PADA DOMBA DAN SAPI  
DI BOGOR DAN BALI

KRIOPRESERVASI SPERMATOZOA  
KERBAU BELANG

GOLONGAN DARAH  
ANJING KAMPUNG

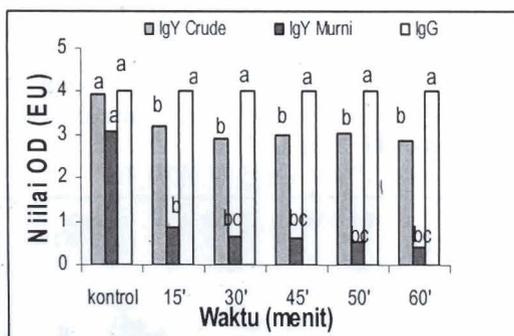
EFEK ALPHA TOKOFEROL  
TERHADAP STRES



Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali  
Bekerjasama dengan Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia

Hasil serupa juga ditemukan pada IgG yang aktivitasnya menurun secara nyata pada inkubasi selama 15 menit dengan persentase penurunan aktivitas sebesar 35%. Inkubasi dengan pepsin selama 30 menit, 45 menit, 50 menit dan 60 menit sangat nyata menurunkan aktivitas IgG antitetanus dengan persentase penurunan berturut-turut 38%, 43%, 42% dan 47%. Tampak bahwa aktivitas IgY dan IgG antitetanus mulai menurun setelah inkubasi selama 15 menit dengan pepsin dan penurunan aktivitas yang sangat nyata umumnya terjadi setelah inkubasi selama 30 menit. Penurunan aktivitas IgG setelah perlakuan dengan pepsin tampaknya tidak sebesar IgY *crude* dan IgY murni. Hasil ini menunjukkan bahwa molekul IgY memang peka terhadap pengaruh enzim lambung, yaitu pepsin (Sunwoo *et al.*(2000). Dalam hal ini, pepsin tampaknya dapat menghidrolisis molekul IgY menjadi peptida kecil (Hatta *et al.* 1993) sehingga aktivitasnya menjadi sangat menurun.

Hasil yang sedikit berbeda diperoleh dari hasil perlakuan ketiga jenis antibodi terhadap tripsin. Dalam hal ini perlakuan aktivitas IgY *crude* dan IgY murni dengan tripsin sangat nyata menurunkan aktivitasnya dengan persentase penurunan setelah inkubasi 15 menit, IgY *crude* (19%) dan IgY murni (72%). (Gambar 7).



Gambar 7. Pola aktifitas IgY *Crude*, IgY Murni dan IgG setelah perlakuan tripsin.

Diagram batang dengan motif sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0.05

Penurunan aktivitas IgY murni pada perlakuan inkubasi 30 menit, 45 menit, 50 menit dan 60 menit sangat berbeda nyata dibandingkan kontrol namun penurunan

aktivitasnya sama antar perlakuan waktu inkubasi antara 30 menit sampai 60 menit. Pengaruh inkubasi tripsin terhadap aktifitas IgY juga pernah diteliti oleh Hatta *et al.* (1993) diketahui bahwa inkubasi tripsin tidak mengubah ikatan rantai berat maupun rantai ringan IgY.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada BPPS Direktorat Jendral Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini dalam rangka penulisan tesis ini. Terimakasih yang tidak terhingga penulis sampaikan kepada DR. Supar MS, APU, DR. Drh. I W Teguh Wibawan, Prof. DR. Ir. Maggy T. Suhartono, mbak Tati Ariyanti dan seluruh teknisi laboratorium Bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, atas segala bantuannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

#### SIMPULAN

Dari penelitiannya dapat disimpulkan bahwa: suhu berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas IgY *crude*, IgY murni dan IgG. Makin tinggi suhu, makin rendah pula aktivitas. Pada pH 2-3 aktivitas IgY *crude* dan IgY murni juga tampak sangat menurun. Selain itu enzim proteolitik terutama pepsin juga sangat menurunkan aktivitas pada IgY *crude*, IgY murni dan IgG. Karena itu, jika IgY antitetanus diproduksi dalam telur ayam, maka aktivitasnya akan menurun ketika pemanasan saat telur direbus, saat melewati asam dan enzim lambung.

#### SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi IgY dalam menggantikan peran IgG dan kemungkinan aplikasi IgY *crude* lebih baik secara oral dibandingkan dengan IgY murni.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Carlender D, 2002. Avian Ig Y antibody. In vitro and in vivo of chicken immunoglobulin G, M, and A using monoclonal antibodies. Comprehensive summaries of Uppsala Dissertation from Faculty of Medicine 119. ACTA Universitatis Uppsala. Center. Texas A&M University Kingsville.

## Aktivitas IgY dan IgG Antitetanus setelah Perlakuan pada Berbagai pH, Suhu dan Enzim Proteolitik

(ACTIVITIES OF ANTITETANUS IgY AND IgG FOLLOWING TREATMENT WITH DIFFERENT LEVEL OF pH, TEMPERATURES AND PROTEOLYTIC ENZYMES)

I Gusti Ayu Agung Suartini<sup>1</sup>, I Wayan Teguh Wibawan<sup>2</sup>,  
Maggy T. Suhartono<sup>2</sup>, Supar<sup>3</sup>, I Nyoman Suarta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jln. Sudirman, Denpasar Bali  
Faks./ tilpon (0361)8423062 email: gaa.suartini@gmail.com

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Institut pertanian Bogor

<sup>3</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor

### ABSTRACT

A study was carried out to find out an alternative method of producing antitetanus antibody (IgY) in chicken and to evaluate its activity at different levels of pH, temperatures and proteolytic enzymes. Antitetanus IgY was produced by immunization of chickens with tetanus toxoid, three times weekly at gradual doses of 100, 200, and 300 Lf, respectively. Serum samples were collected 4 weeks following the last immunization. IgY was purified by ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography (Sephadex G. 120). The purified IgY was then treated at different levels of temperatures and pH as well as proteolytic enzymes. Commercial antitetanus IgG was used as control. The activities of treated IgY and IgG were tested by *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). IgY and IgG activities were significantly reduced at 80°C and completely destroyed at 90°C. Treatment with pepsin significantly reduced IgY and IgG whereas trypsin slightly reduced IgY activities and has no effect on IgG activities. IgY and IgG activities were reduced significantly at pH < 3 and only slightly reduced at pH > 10. It is evident that heating at > 90°C, pH at < 3 and treatment with pepsin significantly reduced IgY activities and it appears that IgG was more resistant to the effect of temperatures, pH and proteolytic enzymes

Key words: IgY, IgG, antibodies, activities, pH, heat, enzyme, ELISA.

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang cara alternatif untuk memproduksi antibodi antitetanus (IgY) pada ayam dan untuk mengevaluasi aktivitasnya setelah perlakuan pada berbagai suhu, dan pH, serta enzim proteolitik. IgY diproduksi dengan cara mengimunitasi ayam dengan toksoid tetanus sebanyak 3 kali setiap minggu dengan dosis bertingkat, yaitu 100, 200, and 300 Lf. Sampel serum diambil 4 minggu setelah imunitasi terakhir. IgY selanjutnya dimurnikan dengan presipitasi amonium sulfat dan dilanjutkan dengan kromatografi filterasi gel (Sephadex G. 120). IgY kemudian diberi perlakuan berbagai suhu, pH dan enzim proteolitik. Sebagai kontrol dipakai IgG antitetanus yang diperlakukan secara serupa. Aktivitasnya diuji dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Aktivitas IgY dan IgG secara nyata menurun pada 80°C dan menghilang pada suhu di atas 90°C. Perlakuan dengan pepsin secara nyata menurunkan IgY dan IgG. Tripsin sedikit menurunkan aktivitas IgY dan tidak mempengaruhi aktivitas IgG. Aktivitas IgY dan IgG antitetanus juga secara nyata menurun pada pH < 3 dan sedikit menurun pada pH > 10. Pemanasan pada suhu > 90°C, pH < 3 dan perlakuan dengan pepsin secara nyata menurunkan aktivitas IgY dan IgG antitetanus dan tampaknya IgG sedikit lebih tahan terhadap pengaruh pemanasan, pH dan enzim proteolitik

Kata kunci: IgY, IgG, Antibodi, aktivitas, pH, suhu, enzyme, ELISA

### PENDAHULUAN

Sampai saat ini kejadian tetanus masih banyak ditemukan, baik pada hewan maupun manusia. Pada manusia, kejadian tetanus sering menimpa penduduk, relawan dan korban pada bencana alam. Di dunia, sekurang-kurangnya satu juta orang meninggal akibat tetanus, dan setengahnya terjadi pada bayi yang baru lahir akibat penanganan yang kurang aseptis

(Prabhakar *et al.* 2002). Penanganan tetanus umumnya dilakukan dengan penyuntikan serum antitetanus (*antitetanus serum/ ATS*) yang diproduksi pada kuda. ATS umumnya diproduksi pada kuda dengan cara imunitasi dengan toksoid tetanus. Masalah yang sering timbul adalah timbulnya respon imun yang kurang spesifik akibat penyuntikan toksoid secara berulang dan terus menerus. Selain itu, produksi ATS pada kuda juga dapat

menimbulkan amiloidosis, kurang memperhatikan aspek kesejahteraan hewan (*animal welfare*) dan biaya produksinya sangat tinggi. Pembuatan ATS pada kuda juga dapat menimbulkan stres, baik pada saat imunisasi maupun saat pengambilan darah untuk penyiapan antibodi (Narat 2003). Karena itu, upaya mencari alternatif untuk memproduksi antibodi antitetanus menjadi amat penting misalnya pada telur ayam.

Penggunaan ayam untuk memproduksi antibodi belakangan ini mulai dikembangkan. Beberapa keunggulan penggunaan ayam sebagai sumber antibodi adalah biaya produksinya rendah, isolasi dan preparasinya mudah, dan daya produktivitasnya tinggi dan cepat. Pada ayam antibodi yang terbentuk biasanya ditransfer ke embrio melalui telur sehingga antibodi dengan titer yang tinggi dapat ditemukan dalam telur ayam setelah imunisasi. Karena itu, produksi antibodi antitetanus pada telur merupakan salah satu metode alternatif yang sangat potensial untuk dikembangkan. Penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi Ig Y dalam serum ayam tidak berbeda nyata dengan yang ada pada kuning telur (Larsson et al. 1993).

Dalam aplikasinya, baik untuk pengobatan maupun pencegahan penyakit tetanus pada individu terinfeksi, antibodi dalam telur ayam dapat diberikan secara oral, yaitu dengan memakan telur yang mengandung antibodi. Untuk dapat diberikan secara oral antibodi dalam telur harus melewati beberapa tahapan yang dapat menurunkan aktivitas antibodi antitetanus seperti denaturasi akibat pemanasan saat telur direbus, pH asam lambung yang rendah (asam) dan pH usus yang basa. Antibodi juga melewati aktivitas enzim pencernaan seperti pepsin (asam lambung) dan tripsin (enzim dalam usus) (Carlender 2000). Sejauh ini belum diketahui sejauh mana penurunan aktivitas IgY antitetanus akibat pemanasan, pH asam lambung dan pengaruh enzim proteolitik belum diketahui.

## METODE PENELITIAN

### Imunisasi Ayam dengan Toksoid Tetanus

Dalam penelitian ini digunakan 8 ekor ayam *strain* Isabrown umur 15 minggu untuk produksi antiserum. Pada minggu pertama, ayam diimunisasi dengan toksoid tetanus dosis 100 *limes flocculation* (Lf) yang diemulsikan dalam *Freund's adjuvant complete* dan diberikan secara intramuscular. Pada minggu kedua dan ketiga berturut-turut digunakan dosis *Freund's adjuvant incomplete*. Imunisasi

ulang dilakukan tiap empat minggu dengan dosis 300Lf yang diemulsikan dalam *Freund's adjuvant incomplete* (Wibawan et al. 2003). Sampel darah diambil 4 minggu setelah injeksi toksoid terakhir, serum dipisahkan, dan selanjutnya disimpan pada - 20°C sampai tahap berikutnya. Sebagai pembanding dipakai IgG antitetanus kuda yang tersedia secara komersial (PT. Biofarma Bandung). Adanya antibodi antitetanus dalam serum ayam dan kuda diuji dengan metode *agar gel precipitation test* (AGPT).

### Pemurnian dan Titrasi IgY dan IgG

Isolasi IgY dilakukan dengan presipitasi ammonium sulfat dan dialisis. IgY kemudian dimurnikan dengan metode Kromatografi Filtrasi Gel dan kandungan proteinnya ditentukan dengan dengan metode Bradford (Bergmeyer et al. 1984) Penentuan berat molekul protein IgY dilakukan dengan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Laemmli 1976). Titerasi IgY dan IgG dilakukan dengan uji *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) sesuai dengan metode yang dijabarkan oleh Supar dkk (2001). Plat mikro ELISA dilapisi dengan toksoid tetanus yang diencerkan dalam *buffer carbonat-bicarbonat* ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ ) selama semalam pada suhu 4°C. Setiap sumuran plat mikro kemudian diblok dengan *bovine serum albumin* selama 1 jam pada suhu 37°C dan ke dalam setiap sumuran kemudian ditambahkan berbagai pengenceran IgY atau IgG. *Conjugate* yang dipakai adalah *rabbit anti-chicken horseradish peroxidase conjugate A 9046* sedangkan untuk IgG digunakan *conjugate anti-horse* (SIGMA A. 6917). *Conjugate anti-chicken* diencerkan 1:250 dengan menggunakan larutan PBS yang mengandung *Tween 20* (PBST) dan untuk *conjugate* IgG diencerkan 1:10.000 dengan (PBST). Cara pengerjaan mengikuti prosedur yang ditulis oleh Supar et al (2001). Sebanyak 50 µl toksoid (4 IU/ml) yang telah diencerkan dalam *buffer carbonat-bicarbonat*, pH 9,6 dimasukkan ke dalam tiap lubang cawan ELISA, cawan ditutup, dibungkus dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Keesokan harinya cawan dicuci dengan PBST pH 7,2 sebanyak 4 kali. Sampel IgY diencerkan dalam PBST sehingga didapat konsentrasi 1/200, sebanyak 50 µl sampel dimasukkan ke dalam tiap lubang cawan secara duplikat pada baris

A<sub>1-10</sub>, diencerkan *in situ* dengan seri faktor pengenceran ½ dari seri baris A sampai H. Untuk kontrol IgY atau IgG dimasukkan pada

lubang A<sub>11-12</sub> hanya diencerkan sampai baris G<sub>11-12</sub>. Setelah diencerkan diinkubasikan selama satu jam pada 37°C. Setelah inkubasi dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST seperti sebelumnya, setelah dicuci ditambah 0,05% *bovine serum albumin* sebanyak 50 µl per lubang sebagai *blocking reagent* dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi dicuci sebanyak 4 kali dengan PBST selanjutnya sebanyak 50 µl *enzyme conjugate* dimasukkan ke dalam tiap lubang, kemudian diinkubasikan kembali dalam suhu 37°C selama 1 jam. 37°C. Cawan dicuci dengan PBST sebanyak 4 kali, kemudian sebanyak 100 µl substrat (ABTS dalam buffer sitrat pH 4,2 yang mengandung 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dimasukkan ke dalam tiap lubang cawan ELISA dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Reaksi ELISA berupa perubahan warna pada cawan ELISA dibaca dengan alat pembaca ELISA (*Multiscan Plus Plate Reader*) dengan panjang gelombang 414 nm. Data pembacaan berupa *optikal density* (OD) tersebut dikonversikan ke dalam ELISA unit (EU) berdasarkan pada hasil pembacaan sampel serum kontrol positif tanpa perlakuan yang diencerkan pada lubang mikroplate ELISA A<sub>11,12</sub> sampai pada G<sub>11,12</sub> berturut-turut tertinggi 1024,512,256,128,64,32,16 EU. Hasil pembacaan OD dari tiap perlakuan dihitung nilai rata-ratanya, dari hasil tersebut dibandingkan dengan grafik hasil pembacaan kontrol positif untuk mempermudah interpretasi hasil terjadinya perubahan reaksi ELISA. Data-data pengaruh perlakuan setelah dikonversi menjadi ELISA Unit disusun dalam tabel dan dalam gambar atau grafik. Pengaruh perlakuan akhir atau koreksi dihitung dari Nilai pengaruh Elisa sampel kontrol tanpa perlakuan (EU) dikurangi dengan Nilai Elisa sampel perlakuan.

#### Penentuan Pengaruh pH terhadap Aktivitas IgY dan IgG

IgY murni (12 IU), IgY *crude* (pengenceran 1/200) dan IgG (pengenceran 1/800) diencerkan dalam PBS pada pH 2, 3, 7, 9, dan 10 dengan cara penambahan HCl atau NaOH sampai dicapai pH yang dikehendaki. Setelah pH yang dikehendaki tercapai, suspensi IgY dan IgG diinkubasikan selama selama 4 jam pada 37°C dan setelah itu pH suspensi IgY dan IgG dikembalikan ke pH 7. Aktifitas IgY dan IgG setelah perlakuan diuji dengan metode ELISA (Supar *et al.* 2001)

#### Penentuan Pengaruh Suhu terhadap Aktifitas IgY dan IgG

IgY murni (12 IU), IgY *crude* (pengenceran 1/200) dan IgG (pengenceran 1/800) diencerkan dengan PBS dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 15 menit pada suhu 50°C, 60°C, 70°C, 80°C dan 100°C. Setelah 15 menit, sampel diambil dan langsung dicelupkan kedalam *icebath* untuk menghentikan reaksinya. Sampel diuji aktifitasnya dengan metode ELISA (Supar *et al.* 2001).

#### Penentuan Pengaruh Enzim proteolitik terhadap Aktivitas IgY dan IgG

IgY murni (12 IU), IgY *crude* (pengenceran 1/200) dan IgG (pengenceran 1/800) diencerkan dengan PBS diberi perlakuan enzim pepsin dengan dosis 15 µg/ml pada pH 2 pada 37°C selama 15 menit, 30 menit, 45 menit, 50 menit dan 60 menit. Setelah inkubasi pH sampel dinetralkan dengan 5 µl NaOH 30%. IgY dan IgG dosis yang sama juga diberi perlakuan dengan enzim tripsin dosis 15 µl/ml pada pH 8 pada suhu 37°C selama 60 menit, 50 menit, 45 menit, 30 menit dan 15 menit. Setelah inkubasi masing-masing sampel dinetralkan dengan menambahkan 2 µl HCL 25% sehingga pH menjadi 7 kemudian aktifitasnya diuji secara ELISA (Supar *et al.* 2001).

#### Parameter dan Analisis Data

Aktivitas IgY dan IgG antitetanus setelah perlakuan pH, suhu dan enzim ditentukan dengan uji ELISA. Titer IgY dikonversikan menjadi ELISA Unit (EU). Pengaruh berbagai perlakuan terhadap aktivitas IgY dan IgG antitetanus dianalisis dengan uji sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Steel dan Torrie 1980)

### HASIL DAN PEMBAHASAN

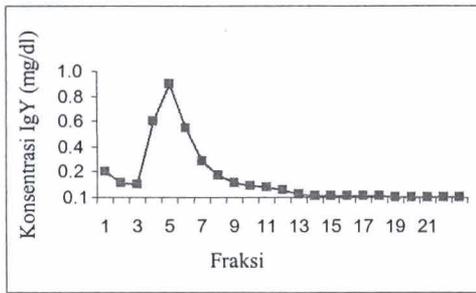
Aplikasi antibodi terhadap agen penyakit bersama makanan atau obat-obatan secara oral mula-mula dihadapkan pada kemungkinan denaturasi akibat pemanasan pada saat preparasi antibodi sebelum digunakan, pH asam lambung dan degradasi enzim pencernaan seperti pepsin dan tripsin (Carlender 2002)



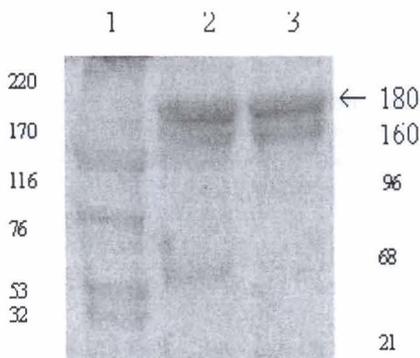
A  
Gambar 1. Reaksi IgY (A) dan IgG (B) terhadap toksoid tetanus

**Keterangan**

- A = Reaksi IgY serum Ayam terhadap toksoid tetanus
- B = Reaksi IgG serum Kuda terhadap toksoid tetanus
- Ag = Antigen (toksoid)
- Ab = Antibodi



Gambar 2. Kromatogram hasil filtrasi Gel IgY



Gambar 3. Profil IgY murni yang dianalisis dengan SDS-PAGE. Protein Marker (1), IgY murni Fraksi 5 (2 dan 3).

**Reaktivitas IgY dan IgG dengan Toksoid Tetanus**

Reaktivitas IgY serum ayam dan IgG dengan toksoid tetanus dalam AGPT dapat dilihat pada Gambar 1. IgY ayam dan IgG kuda antitetanus tampak bereaksi secara khas dengan antigen

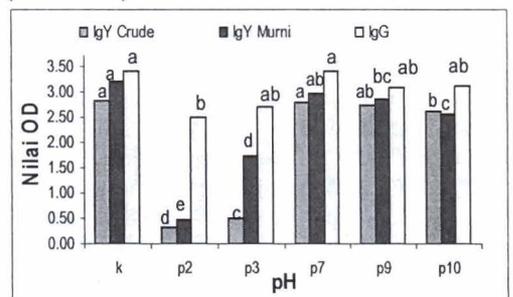
toksoid tetanus yang ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi (Mary 1994). Garis presipitasi merupakan reaksi sekunder sebagai akibat dari interaksi primer antara antibodi dan antigen (Roit dan Delves 2001).

**Karakteristik IgY Antitetanus**

Kromatogram hasil pengujian IgY ayam yang telah dimurnikan ditampilkan pada Gambar 2. Profil pita protein setelah pemurnian menunjukkan adanya 5 pita protein (tengah dan kanan). Pita protein tertinggi menunjukkan berat molekul sekitar 180 kDa yang diduga sebagai protein IgY, sedangkan pita protein lainnya berberat molekul 160, 96, 68 kDa dan 21 kDa diduga merupakan pecahan dari IgY berupa rantai berat dan. rantai ringan

**Aktivitas IgY dan IgG setelah Perlakuan pH**

Aktivitas IgY *crude*, IgY murni dan IgG sangat nyata ( $P < 0.01$ ) dipengaruhi oleh pH (Gambar 4).

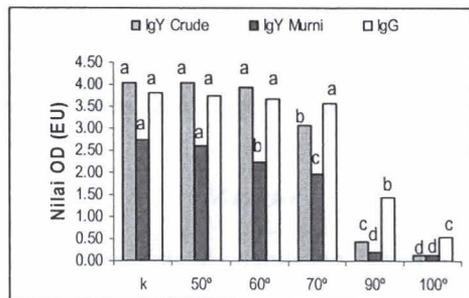


Gambar 4. Pola aktifitas IgY *Crude*, IgY murni dan IgG setelah perlakuan pH. Diagram batang dengan motif sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0.05 .

Aktivitas IgY *crude* tampak menurun sebesar 89% pada pH 2, sebesar 82% pada pH 3 dan 7.6% pada pH 10. Pada pH 7 aktivitas IgY *crude* tidak berbeda nyata dengan kontrol. Namun, aktivitas IgY murni menurun pada semua perlakuan pH jika dibandingkan dengan kontrol dengan persentase penurunan aktivitas pH 2 (85%), pH 3 (46%), pH 9 (12%) dan pH 10 (9.6%). Sementara itu, aktivitas IgG juga menurun pada pH 2 sebesar 34% jika dibandingkan dengan kontrol, tetapi pada perlakuan pH lainnya penurunan aktivitasnya tidak berbeda nyata. Tampak jelas bahwa IgG lebih tahan terhadap pengaruh pH jika dibandingkan dengan IgY. Shimizu *et al.* (1993) dan Hatta *et al.* (1992) menyatakan bahwa stabilitas IgY pada pH 2-3 lebih rendah jika dibandingkan dengan IgG. Tampak pula bahwa, pada pH asam, IgY lebih cepat rusak jika dibandingkan pada pH basa dan hal ini sangat berkaitan dengan struktur protein IgY yang memang lebih sensitif terhadap pH asam jika dibandingkan dengan pH basa (Hatta *et al.* 1993). Diduga lemahnya ikatan disulfida secara struktural, dan kurangnya *fleksibilitas* pada *regio hinge* secara keseluruhan mempengaruhi stabilitas molekul IgY (Narat 2003).

**Aktivitas IgY Crude, IgY Murni dan IgG setelah Perlakuan Suhu**

Aktivitas IgY *crude*, IgY murni dan IgG sangat nyata ( $P < 0.01$ ) dipengaruhi oleh suhu (Gambar 5).



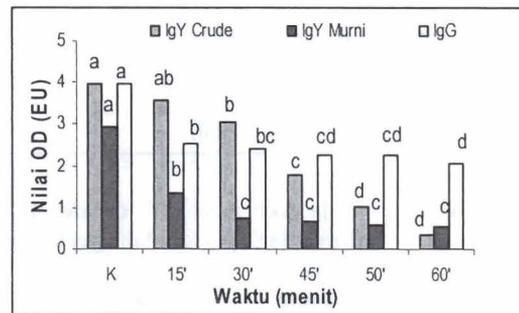
Gambar 5. Pola aktifitas IgY *Crude*, IgY Murni dan IgG setelah perlakuan suhu. Diagram batang dengan motif sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Pada suhu 50°C dan 60°C aktifitas IgY *crude* dan IgG tidak berbeda nyata dengan kontrol. Namun, aktivitas IgY *crude* menurun secara nyata pada suhu 70°C (82%), 90°C (89%), dan 100°C 96(%) jika dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas IgY murni juga menurun pada semua perlakuan suhu jika dibandingkan dengan kontrol kecuali suhu 50°C,

dengan persentase penurunan pada suhu 60°C (18.5%), suhu 70°C (29%), suhu 90°C (93%) dan suhu 100°C (95%). Aktivitas IgG juga menurun secara nyata pada perlakuan 90°C (62%) dan sangat nyata pada suhu 100°C (86%) dibandingkan kontrol. Namun, pada perlakuan 50°C, 60°C dan 70°C aktivitas IgG sama dengan kontrol. Menurunnya aktivitas IgY pada suhu di atas 60°C sangat mungkin disebabkan oleh terdenaturasinya molekul IgY. Hatta *et al.*(1992) menyatakan bahwa IgY mulai terdenaturasi pada suhu 73.9°C. Pemanasan protein dapat memutus ikatan nonkovalen sehingga molekulnya akan terdenaturasi (Whitaker, 1994).

**Aktivitas IgY Crude, IgY Murni dan IgG setelah Perlakuan Enzim Proteolitik**

Aktivitas IgY *crude*, IgY murni dan IgG sangat nyata menurun setelah perlakuan dengan enzim pepsin (Gambar 6). Aktivitas IgY *crude* setelah perlakuan pepsin selama 15 menit tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol. Namun, setelah inkubasi dengan pepsin selama 30, 45, 50 dan 60 menit aktivitas ketiga jenis imunoglobulin tersebut sangat nyata lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol dan berturut-turut penurunan aktivitasnya adalah 23%, 55%, 74% dan 91%. Hal yang serupa terjadi pada IgY murni, yaitu inkubasi dengan pepsin selama 15 menit secara nyata menurunkan aktivitasnya (55%), sedangkan perlakuan inkubasi lainnya penurunan aktivitasnya menjadi sangat nyata dengan persentase penurunan aktivitasnya yaitu 30 menit (75%), 45 menit (77%), 50 menit (79%) dan 60 menit (81%).



Gambar 6. Pola aktifitas IgY *Crude*, IgY Murni dan IgG setelah perlakuan pepsin. Diagram batang dengan motif sama yang diikuti oleh huruf yang sama Menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 0.05

- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T, Ebina T. 1992. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus Ig Y and behaviour against proteolytic enzymes. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 7(7):1077-1081.
- Hatta. 1993. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 270-274
- Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, Lindahl T. 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution A Review. *Poultry Science.* 72: 1807-1812
- Mary HF. 1994. Why Ig Y? Chicken polyclonal antibody, An appealing alternative. *Promega Notes Magazine.* Number 46, 1994, p.11. Promega.
- Narat M. 2003. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* 41(3):259-267.
- Prabhakar SMD, Vinod DM, Grover MD, 2002. Tetanus, current treatment option in infectious diseases rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 270-274
- Shimizu *et al.* 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 270-274
- Sunwoo HH, Lee EN, Menninen K, Suresh MR, Sim JS. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (Ig Y) on *Escherichia coli* O 157:H7. *J. Food Science.* 67(4) 1486-1494
- Supar *et al.* 2001. Pengembangan vaksin kolera unggas. I. Proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada ayam terhadap uji tantang galur homolog dan heterolog. *J. Ilmu Ternak dan Vet.* 6 (1) : 59-67.
- Otani H, Matsumoto K, Saeki A, Hosono A. 1991. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lbensm. Wiss.U. Technol* 24: 152-158
- Whitaker JR. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2nd ed. p.499-503. *Food science and technology.* New York. Marcel Dekker.
- Wibawan IWT, Djannatun T, Halimah LS. 2003. Pengujian Teknik Koagulasasi tidak Langsung untuk Deteksi Penyakit Unggas. *Hibah Bersaing XI* 2003-2004