

ISSN : 1411-8327

Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

Vol. 8, No. 2, Juni 2007

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

B2
B3

HIALURONIDASE STREPTOCOCCUS GROUP B

REAKTIVITAS ANTIBODI MONOKLONAL ANTIKAPSID
DENGAN PROTEIN REKOMBINAN VIRUS JEMBRANA

IMUNOGLOBULIN-Y ANTITETANUS

PROFIL KINETIK SULFAMETAZIN PADA ANJING

LEUCOCYTOZONOSIS PADA BROILER DAN ITIK

PROFIL LIPOPROTEIN DAN KOLESTEROL
PASCA PEMBERIAN KHITOSAN

GLUTAMIN PERCEPAT PEMULIHAN SEL LIMFOSIT

BISA ULAR SEBAGAI IMUNOMODULATOR



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

Potensi Netralisasi dari Imunoglobulin Y Antitetanus yang Diisolasi dari Telur Ayam

(THE NETRALIZATION POTENCY OF ANTI-TETANUS IMMUNOGLOBULIN Y ISOLATED FROM CHICKEN EGGS)

I Nyoman Suartha^{1*)}, I Wayan Teguh Wibawan²⁾,
Retno Damayanti Soejoedono²⁾, Bibiana W. Lay³⁾

¹⁾ Laboratorium Penyakit Dalam dan Diagnosis Klinik Veteriner FKH UNUD
Jl PB Sudirman Denpasar, fax (361) 701 808 email : suarthafkhunud@yahoo.com

²⁾ Laboratorium Imunologi FKH IPB

³⁾ Laboratorium Bakteriologi FKH IPB, Jl Agathis Darmaga Bogor

ABSTRAK

Tulisan ini memaparkan potensi netralisasi dari Imunoglobulin Y antitetanus asal kuning telur. Imunoglobulin Y (IgY) di dalam kuning telur mempunyai prospek untuk menggantikan serum antitetanus yang diproduksi pada kuda. Telur dikoleksi dari ayam yang telah diimunisasi dengan toksoid tetanus. Uji Potensi netralisasi IgY antitetanus ditentukan dengan metode *Spearman-Karber*. Rataan tertinggi titer IgY antitetanus pada kuning telur adalah 80.16 ± 33.55 IU/ml dan terendah adalah 1.69 ± 0.63 IU/ml. Konsentrasi protein (IgY) setelah purifikasi adalah sebesar 1.644 ± 0.424 mg/ml. Berdasarkan perhitungan *Spearman-Karber* diperoleh nilai potensi IgY antitetanus sebesar 35 IU/ml. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ayam mampu membentuk antibodi antitetanus dengan titer yang tinggi dan dengan potensi netralisasi sebesar 35 IU/ml.

Kata kunci : imunoglobulin Y, chickens, antitetanus, serum, potensi

ABSTRACT

The purpose of study was to explore the neutralization potency of anti-tetanus IgY derived from eggs yolk as a possible substitute for anti-tetanus serum (ATS) raised in horses. The eggs were collected from chickens which have previously been immunized with tetanus toxoid. Neutralization potency of anti tetanus IgY was determined by *Spearman-Karber* method. The highest mean titer of anti-tetanus IgY in egg yolk was 80.16 ± 33.55 IU/ml and the lowest was 1.69 ± 0.63 IU/ml. The concentration of purified IgY was 1.644 ± 0.424 mg/ml. The anti-tetanus potency of the IgY was 35 IU/ml. The result clearly shows that chicken eggs are potential to be used as the source of anti-tetanus IgY.

Key Words : immunoglobulin Y, chicken, anti-tetanus, serum, potency. neutralization

PENDAHULUAN

Kekhawatiran akan kejadian tetanus sampai saat ini pada manusia masih mendapat perhatian yang serius, khususnya penggunaan serum antitetanus (*anti-tetanus serum/ATS*) yang baru dilakukan setelah terjadi proses perlukaan. Hal yang sama juga terjadi pada hewan, terutama pada kawasan kebun binatang atau kawasan wisata yang menyediakan binatang sebagai obyek wisata (Suartha *et al.* 2002). Serum anti-tetanus berfungsi untuk menetralkan toksin yang diproduksi oleh kuman tetanus. Penggunaan serum anti-tetanus secara terus-menerus dianjurkan bagi orang yang mudah terserang

tetanus dari luka, seperti orang dengan sejarah imunisasi tidak lengkap atau status imunisasinya tidak jelas (Porter *et al.* 1992).

Produksi serum anti-tetanus sampai saat ini masih dilakukan pada kuda. Masalah yang sering muncul pada penggunaan ATS yang diproduksi pada kuda adalah adanya reaksi silang dengan faktor *rheumatoid*, timbulnya reaksi anafilaktik (alergi), atau munculnya reaksi *serum sickness*. Selain itu, produksi ATS pada kuda dapat menyebabkan cekaman (*stress*) pada kuda, terutama ketika diimunisasi dalam penyiapan antibodi. Penyuntikan toksoid secara berulang pada kuda dapat menyebabkan rendahnya

respon antibodi terhadap toksoid. Di samping itu, imunisasi dengan toksoid dapat menyebabkan terjadinya amiloidosis pada kuda dan endapan amiloid sering dijumpai pada organ limpa, limfoglandula dan organ limfoid lainnya. Hal itu telah mendorong penggunaan imunoglobulin antitetanus dari sumber lain, seperti dari telur ayam. Penggunaan ayam untuk produksi antibodi dapat meniadakan atau mengurangi penggunaan mamalia sebagai hewan laboratorium. Meniadakan adalah tindakan untuk menghilangkan langkah yang menyakitkan saat pengambilan darah, yang dalam hal ini digantikan dengan ekstraksi antibodi dari kuning telur. Pengurangan yang dimaksud adalah mengurangi jumlah hewan yang digunakan, sebab ayam menghasilkan antibodi yang lebih efisien jika dibandingkan dengan hewan mamalia

Sampai saat ini, imunoglobulin Y (IgY) ayam belum dimanfaatkan secara optimal untuk tujuan terapi atau pencegahan penyakit, khususnya untuk pemberian kekebalan secara pasif pada penderita penyakit tetanus. Umumnya, para peneliti masih lebih menyukai penggunaan imunoglobulin asal mamalia (Svendsen *et al.* 1995). Hal ini disebabkan oleh sedikitnya ahli yang mengetahui bahwa ayam merupakan sumber antibodi yang sangat baik. Dukungan oleh para ahli terhambat oleh sikap tradisional yang masih menganggap imunoglobulin mamalia paling baik, dan terbatasnya informasi tentang imunoglobulin dari unggas (Schade dan Hlinak 1996).

IgY yang diisolasi dari telur ayam sangat berpotensi untuk dipakai dalam pengobatan dan pencegahan beberapa penyakit, seperti pada infeksi virus Marek (Kermani-Arab *et al.* 2001), *Salmonella enteridis* dan *typhimurium* (Babu *et al.* 2003), dan *Helicobacter pylori* (Shin *et al.* 2004). Kelebihan IgY dari IgG mamalia dalam pencegahan atau pengobatan penyakit adalah IgY tidak bereaksi dengan reseptor Fc yang dimiliki oleh mikroba, memiliki aktivitas dan daya netralisasi lebih tinggi dibandingkan IgG mamalia (Davis dan Reeves 2002). Selain itu, imunoglobulin Y unggas mengenal lebih banyak epitop protein mamalia jika dibandingkan dengan imunoglobulin dari

mamalia (Schade *et al.* 1996). Laporan penelitian di atas memberikan inspirasi untuk mempelajari potensi netralisasi IgY spesifik terhadap toksin tetanus, yang nantinya diharapkan dapat digunakan untuk menggantikan produksi serum antitetanus kuda.

METODE PENELITIAN

Isolasi IgY Antitetanus dari Telur Ayam

Lima ekor ayam jenis *Isa Brown* betina dewasa yang siap untuk bertelur, diimunisasi setiap minggu dengan toksoid tetanus, dengan dosis bertingkat (15, 100, 200, 300 Lf). Penyuntikan pertama dilakukan secara intravena tanpa adjuvant, penyuntikan kedua dengan toksoid yang diemulsikan dalam *freund* adjuvan komplit, dan penyuntikan selanjutnya dilakukan dengan toksoid yang diemulsikan dalam *freund* adjuvan tidak komplit. Penyuntikan kedua dan seterusnya dilakukan secara intramuskular (Suartha *et al.* 2006). Telur dikoleksi dari ayam yang telah diimunisasi selama titer IgY antitetanus masih terdeteksi dengan uji *agar gel precipitation*. Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur, dan dicuci dengan akuades tanpa ion. Kuning telur diletakkan di atas kertas saring untuk menghilangkan putih telur, dan IgY kemudian diekstraksi dengan PEG (Polyethylene Glikol) dan kloroform.

Kuning telur yang telah dipisahkan dari bagian putih telur diangkat dengan pinset dan cairan kuning telur ditampung pada tabung 50 ml. Sebanyak 25 ml sodium phosphat buffer (100 mM, pH 7,6) ditambahkan ke dalam cairan kuning telur dan campuran selanjutnya diaduk secara perlahan. Selanjutnya, sebanyak 20 ml kloroform ditambahkan ke dalam campuran sambil diaduk sampai terlihat bentukan semisolid pada campuran. Campuran tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 g selama 30 menit, supernatan diambil, dan ditambahkan PEG 6000 sampai konsentrasi akhirnya mencapai 12% (w/v). Campuran ini kembali disentrifus dengan kecepatan 15700 g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensikan dengan 2 ml phosphat buffer yang mengandung 0,1% Na azide, dan simpan pada suhu - 20°C

sampai digunakan untuk uji selanjutnya (Camenisch *et al.* 1999).

Purifikasi dilakukan dengan *fast protein liquid chromatography* (FPLC) menggunakan alat *Hi-trap IgY* (Amersham Bioscience). Pertama, matriks dalam kolom dicuci dengan buffer K_2SO_4 0.5 M dalam larutan NaH_2PO_4 20 mM pH 7.5. Sampel IgY hasil ekstraksi diencerkan dengan buffer K_2SO_4 0.5 M dan dimasukkan ke dalam kolom *Hi Trap IgY Purification Hp 5 ml*. Binding buffer (K_2SO_4 0.5 M dalam larutan NaH_2PO_4 20 mM pH 7.5) dialirkan ke dalam kolom agar terbentuk ikatan yang optimal antara matriks dalam kolom dan IgY. Setelah dicuci dengan binding buffer, IgY dalam matriks dielusi dengan larutan NaH_2PO_4 20 mM pH 7.5 yang dipantau dengan monitor. Eluen dengan konsentrasi tertinggi diambil, dipekatkan dan didialisis selama 24 jam dalam larutan PBS pH 8. Titer IgY anti-tetanus ditentukan dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Uji Agar Gel Presipitation

Uji ini dilakukan pada media semisolid yang mengandung 1% agarose (Serva, Jerman), 4% PEG 6000 (Merck, Jerman) dalam PBS pH 7.2 (Merck). Campuran tersebut dituang pada air mendidih sampai jernih. Sebanyak 10 ml, agar cair tersebut dituang di atas petridis dan dibiarkan sampai mengeras. Setelah mengeras, gel dilubangi dan ke dalam lubang dimasukkan antigen (lubang tengah) dan antiserum dilubangi sekitarnya. Gel kemudian diletakkan di tempat yang lembab dan diamati adanya garis presipitasi setelah disimpan selama 24 jam.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Titer IgY antitetanus dalam kuning telur ditentukan dengan teknik *Double antigen enzyme linked immunosorbent assay* (DAELISA). Dalam hal ini plat mikro polisterin (Nunc, Denmark) dilapisi dengan 100 uL antigen toksoid tetanus konsentrasi 0,1 Lf/ml dalam 0,1 M $NaHCO_3$, pH 9,5. Plat mikro kemudian diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C atau selama 24 jam pada suhu 4°C. Plat mikro kemudian dicuci sebanyak tiga kali dengan 0,15 M NaCl, 0,02 M $NaHPO_4$, 0,05 % Tween 80, pH 7,2 (PBS-T). Plat mikro kemudian diblok

dengan 125 uL *Bovine serum albumin* 0,5% dalam 0,1 M $NaHCO_3$, pH 7,2 selama 1 jam pada suhu 37°C di atas *Shaker* (digoyang-goyangkan). Pemblokkan dilakukan untuk mencegah adanya ikatan antara antibodi dan tempat dalam sumur plat mikro yang belum ditutupi oleh antigen. Kemudian plat mikro dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 uL sampel IgY antitetanus yang diencerkan dalam PBS-T pH 7,2 yang mengandung 0,5% BSA ditambahkan ke dalam setiap sumuran plat mikro dan setiap sampel dibuat tripikat (diulang 3 kali). Sebagai kontrol positif dipakai serum referen. Plat mikro selanjutnya diinkubasikan selama dua jam pada suhu kamar di atas shaker (digoyang-goyangkan). Setelah itu plat mikro dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 ul toksoid tetanus dilabel biotin (pengenceran 1/1000) dimasukkan ke dalam sumuran plat mikro dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruangan di atas shaker. Sebanyak 100 uL HRP-streptavidin (Gibco) (pengenceran 1/3000) pada semua sumuran plat mikro. Plat mikro diinkubasikan lagi selama satu jam pada suhu ruangan dan adanya reaksi antigen-antibodi divisualisasikan dengan penambahan 100 uL substrat TMB (tetramethylbenzidine, Sigma T2885) dalam etanol peroksidase. Reaksi itu dihentikan setelah 10 menit, dengan menambahkan 100 uL 2M H_2SO_4 dan plat mikro dibaca dengan spectraMax panjang gelombang 450nm (Kristiansen *et al.* 1997; Azhari *et al.*, 1999).

Uji Potensi Netralisasi dari IgY

Potensi netralisasi dari IgY asal kuning telur ditentukan dengan mengukur daya proteksinya pada mencit untuk mencegah gejala tetanus. Daya proteksi dari IgY anti tetanus dibandingkan dengan ATS standar dari efek dosis parolitik (Lp/10) toksin tetanus. Mencit dengan berat badan 17 g sampai 22 g digunakan dalam penelitian ini. Toksin tetanus yang dipakai adalah toksin tetanus standar dari WHO. Sediaan antitoksin tetanus standar diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis sehingga kandungan antitoksin tetanus standar dalam larutan adalah 1 IU/ml. Sediaan sampel uji (IgY antitetanus) diencerkan dengan NaCl fisiologis sampai

konsentrasinya mencapai sekitar 1 IU/ml. Toksin tetanus standar diencerkan dengan PBS sampai konsentrasinya mencapai 0.4 IU/ml.

Sampel IgY dan serum anti-tetanus standar diencerkan secara seri berkelipatan 2 dalam tabung sehingga volume akhirnya mencapai 2 ml dalam setiap pengenceran. Ke dalam masing-masing pengenceran kemudian ditambahkan 2 ml larutan toksin sehingga konsentrasi toksinnya menjadi 0.4 IU/ml. Setelah divortek secukupnya, campuran dibiarkan pada posisi tegak dalam suhu ruang dan terlindungi dari sinar selama 60 menit. Campuran dari setiap pengenceran IgY dan sampel anti-tetanus standar disuntikan ke dalam 6 ekor mencit dengan dosis 0,5 ml per mencit. Jumlah mencit yang hidup dan yang mati dicatat selama 5 hari pengamatan. Potensi netralisasinya ditentukan dengan menghitung dosis protektif (protective dose/PD) 50 sesuai dengan metode Spearman-karber dengan rumus berikut.

$$M = \sum_{k(i)}^{k(i)+1} [p(i) + p(i+1)] \frac{(x(i)+x(i+1))}{2}$$

- k = konsentrasi toksin
- x = Log₁₀ dari konsentrasi toksin
- p(i) = r(i) / n(i)
- r(i) = Jumlah mencit yang hidup setiap pengenceran toksin

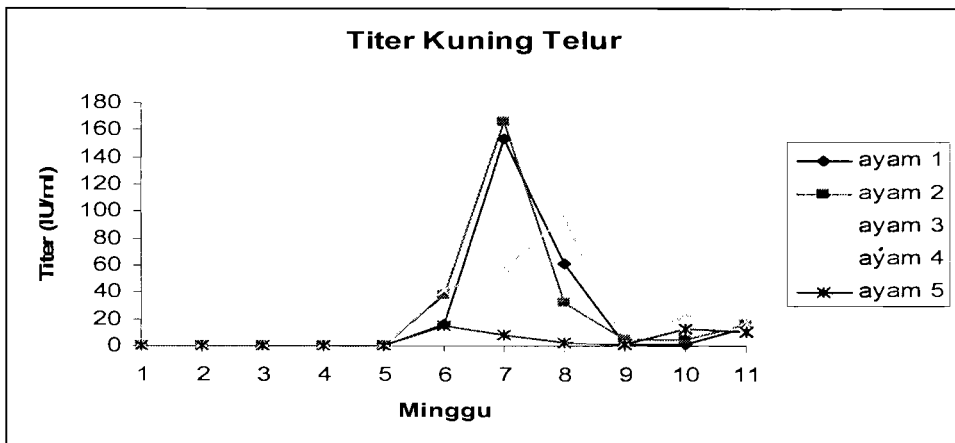
- n(i) = Jumlah semua mencit setiap pengenceran toksin
- M = rata-rata log pengenceran toksin
- PD50 = antilog dari M

Pengujian dinyatakan valid apabila memenuhi syarat : (1) log atau interval dosis tetap, dibuat sangat rapat dan tetap; (2) ada respon penuh dari 0% sampai 100%, yakni dari 0% mati (respon negatif) sampai 100% mati (respon positif); (3) distribusi respon simetris, maksudnya dari satu set percobaan ada yang mati seluruhnya dan ada yang hidup seluruhnya dengan distribusi yang merata. Bila uji valid maka potensi IgY antitetanus dihitung dengan kalkulasi statistik sebagai berikut
 Pot ATS Uji = $\frac{PD50 \text{ ATS Standar} \times \text{Faktor Pengenceran ATS Uji} \times \text{Pot ATS Std}}{(IU/ml) \times PD50 \text{ ATS Uji}}$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer IgY Antitetanus yang Diisolasi dari Telur Ayam

Titer antibodi antitetanus pada telur mencapai puncaknya (sebesar 165.65 IU/ml) pada minggu ketujuh setelah immunisasi pertama. Rataan total titer IgY spesifik antitetanus pada telur adalah 28.229 ± 7.624 IU/ml. Rataan titer IgY tertinggi pada telur dari kelima ayam adalah 80.16 ± 33.55 IU/ml dan terendah 1.69 ± 0.63 IU/ml (Gambar 1).



Gambar 1 Titer IgY antitetanus pada kuning telur ayam yang diukur dengan uji ELISA. Sumbu horizontal : minggu pengamatan, sumbu vertikal : titer antibodi. Antibodi terdeteksi mulai minggu kelima pada semua ayam dan mencapai puncaknya pada minggu ketujuh dan mulai menghilang pada minggu kesembilan

Titer IgY antitetanus dalam telur pada minggu kesembilan (sebesar 1.015 IU/ml) sangat nyata lebih rendah dibandingkan minggu sebelumnya dan terjadi peningkatan pada minggu ke sepuluh (sebesar 12.512 IU/ml) setelah imunisasi ulang pada minggu kesembilan. Pada pengujian selanjutnya, sampel yang memiliki titer tinggi dikumpulkan, sedangkan sampel dengan titer rendah disingkirkan. Dari hasil pemeriksaan, terdeteksi bahwa titer IgY tertinggi pada telur adalah 165.65 IU/ml. IgY pada telur tidak mengalami degradasi oleh enzim yang ada di kuning telur seperti lisosim, dan peptidase, karena ada granulo-granul komponen lipoproteinsakarida pada kuning telur yang melindungi IgY tersebut (Schmidt *et al.* 1989). Pada serum imunoglobulin mengalami degradasi sesuai dengan waktu paruhnya. Waktu paruh dari IgY adalah 36 jam (Carlendar 2002).

Karakteristik IgY yang Diekstraksi dan Dipurifikasi dari Kuning Telur

Ekstraksi IgY dari kuning telur bertujuan untuk memisahkan protein dari lemak telur. Metode PEG-Kloroform dipilih karena sangat sederhana, cepat, dan sangat efisien dengan kehomogenan IgY yang diperoleh lebih dari 90%. Metode PEG-Kloroform tidak memerlukan banyak zat kimia, tahapan prosesnya sederhana, alat yang diperlukan hanya sentrifuse dan stirer, dan dalam proses pengerjaan membutuhkan waktu inkubasi yang singkat. Di samping itu kloroform juga tidak berefek terhadap aktivitas antibodi (Polson 1990).

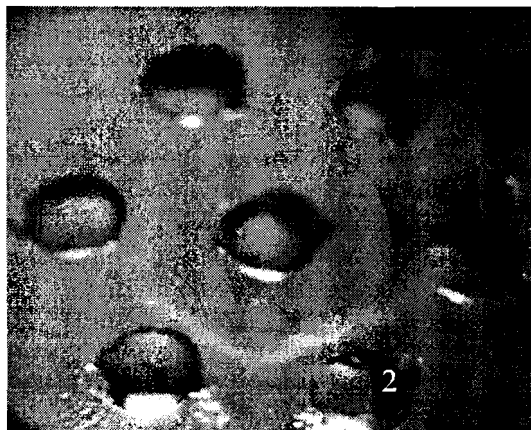
Tabel 1 Konsentrasi protein hasilpurifikasi

No Pengukuran	Purifikasi FPLC (mg/ml)
1	1.017
2	1.993
3	1.993
4	2.221
5	2.134
6	1.155
7	1.483
8	1.682
9	1.339
10	1.422
Rataan	1.644

Persamaan regresi untuk pengukuran FPLC : $Y = 0.5772X - 0.0319$, $r = 0.987$ (Y= Nilai Absorbsi

pada panjang gelombang 565nm, X= Konsentrasi protein, r = koefisien regresi)

Hasil ekstraksi selanjutnya didialisis dalam larutan PBS pH 8 selama 24 jam pada suhu 4 °C, dan hasil ekstraksi IgY dimurnikan sehingga diperoleh IgY yang murni. Pemurnian dilakukan dengan teknik kromatografi afinitas. Fraksi yang ditampung dan digunakan untuk uji selanjutnya adalah fraksi dengan konsentrasi tertinggi (puncak 4), untuk memastikan bahwa fraksi diambil mengandung IgY dengan konsentrasi tertinggi dilakukan uji Agar Gel Presipitasi (AGP) untuk mengetahui spesifitasnya terhadap toksoid tetanus (Gambar 2) dan dilanjutkan dengan analisis SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul dari protein yang diisolasi



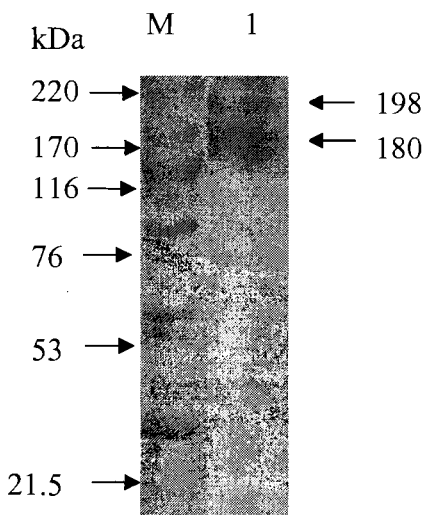
Gambar 2 Hasil uji agar gel presipitasi IgY setelah pemurnian dengan FPLC. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi antara lubang yang diisi antigen dengan lubang yang diisi antibodi. Lubang 1. adalah lubang yang diisi dengan antigen toksoid tetanus; Lubang 2 adalah lubang yang diisi dengan antibodi (IgY antitetanus). Tanda panah menunjukkan garis presipitasi yang terbentuk

Hasil uji AGP menunjukkan bahwa IgY dari kuning telur bereaksi secara khas dengan toksoid tetanus yang ditandai dengan terbentuknya garis presipitasi antara lubang yang berisi antigen toksoid tetanus dan lubang yang berisi antibodi (Gambar 2). Terbentuknya garis putih tersebut adalah akibat dari adanya ikatan antara antigen toksoid dan antibodi (IgY antitetanus). Satu molekul antibodi akan

berikatan dengan dua determinan antigen, dengan proporsi yang seimbang maka terbentuklah garis presipitasi yang berwarna putih pada media agar (Tizzard, 1982).

Dalam analisis SDS-PAGE terlacak pita protein dengan berat molekul 180 kDa dan 198 kDa. Kedua jenis pita protein tersebut tampaknya merupakan pita protein khas IgY ayam. Tidak adanya pita protein yang lain menandakan bahwa tidak ada cemaran dari protein lain. Hal ini menandakan bahwa purifikasi dengan FPLC telah mendapatkan sampel protein yang lebih murni. Hasil ini tidak berbeda dengan hasil peneliti lain bahwa berat molekul dari IgY ayam berkisar antara 160 kDa dan 200 kDa (Zhang 2003). Dalam analisis SDS-PAGE kadang-kadang juga ditemukan dua pita protein yaitu dengan berat molekul 70 kDa untuk IgY rantai berat dan 21 kDa untuk IgY rantai ringan (Hatta *et al.* 1993).

Hasil purifikasi itu kemudian ditentukan kandungan proteinnya menggunakan spektrofotometri dengan metode *Bradford*. Rataan konsentrasi protein hasil purifikasi dengan FPLC adalah 1.644 ± 0.424 mg/ml. Hasil purifikasi itu dipekatan kembali sampai diperoleh konsentrasi protein 5.314 mg/ml, yang akan dipakai sebagai stok untuk uji-
uji berikutnya.



Gambar 3 Hasil SDS-PAGE IgY antitetanus setelah pemurnian FPLC. M : marker , 1 adalah sumur tempat dilalukan IgY ayam murni. Pita yang muncul pada sumur 1 menunjukkan berat molekul dari IgY ayam.

Potensi Netralisasi IgY

Potensi IgY dalam menetralkan toksin tetanus ditentukan dengan metode *Spearman-Karber*. Dalam metode ini, kemampuan IgY untuk melindungi mencit dari toksin tetanus dilihat dari kemampuan mencit untuk tetap hidup dan tidak menunjukkan gejala sakit khas tetanus, seperti kaki pincang, dan punggung bengkak sampai hari kelima setelah penyuntikan bahan uji.

Potensi netralisasi dari ATS yang digunakan sebagai bahan baku produksi (komersial) adalah yang nilai PD50 sama atau lebih besar dari ATS standar, yakni 1500 IU/ml. Serum antitetanus standar untuk setiap pengujian adalah serum standar referensi internasional yang dikeluarkan oleh WHO. Produk ATS dikalibrasi dari 1 IU/ml untuk mencit menjadi 1500 IU/ml untuk manusia (Nasution *et al.* 1987).

Berdasarkan perhitungan *Spearman-Karber* diperoleh nilai potensi IgY anti tetanus sebesar 35 IU/ml. Potensi ini 50% lebih rendah dari titer yang didapat pada penghitungan hasil ekstraksi. Hal ini mungkin disebabkan oleh faktor fisik selama proses ekstraksi sampai ke proses purifikasi. Pada proses ini dilakukan pemekatan dan pengenceran pada tiap tahap purifikasi. Selama proses itu terjadi perubahan suhu, perbedaan waktu penyimpanan, dan tidak adanya stabiliser (penyangga) selama proses penyimpanan. Oleh karena itu, faktor-faktor tersebut harus dipikirkan untuk penelitian selanjutnya. Untuk dapat digunakan sebagai bahan baku untuk produksi maka potensi netralisasi dari IgY ayam ini perlu ditingkatkan lagi sampai sama atau lebih tinggi dari ATS standar.

Telur yang diekstraksi lebih baik dalam jumlah banyak sekaligus. Hal ini untuk mengurangi resiko terhanyutnya IgY dan mengurangi faktor fisik. Perlu juga dipertimbangkan teknik imunisasi yang tepat sehingga diperoleh titer yang tinggi pada serum, yang sekaligus berimplikasi dengan tingginya titer pada telur sebelum proses purifikasi dilakukan sehingga degradasi titer tidak tinggi.

SIMPULAN

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa Ayam mampu memproduksi immunoglobulin Y antitetanus, dengan kandungan titer yang berpotensi untuk menetralisasi toksin tetanus sebesar 35 IU/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan teima kasih kepada DIRJEN DIKTI atas bantuan dana penelitian melalui proyek penelitian Hibah Bersaing XII, kepada Bapak drh R. Roso Soejoedono, MPH. DEA. atas koreksi dan masukannya terhadap tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

Azhari, A.Thinh, N.D. and Vandenberg, J.1999. Optimization and Interlaboratory Comparison of Two Double Antigen Immunoassays for The Determination of Diphtheria Anti-toxin in Animal Sera. *RIVM*.

Babu U *et al.* 2003. Effects of live attenuated and killed salmonella vaccine on t-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immun And Immunopathol* 91:39-44.

British Pharmacopoeia. 2002. British Pharmacopoeia. Volume I. (CD Room). United kingdom.The Stationery Off. Ltd. Carlander, D. 2002. Avian IgY antibody. in vitro and in vivo. Dissertations. Cana da: Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala.

Ester. 2004. Isolasi IgY dari kuning telur ayam arab (*Gallus galus*) terhadap canine parvovirus serta aplikasinya untuk perangkat pemeriksaan dengan ELISA. (Skripsi). Bogor . PS Kimia. FMIPA. IPB

Hames, B.D. and Rickwood, D. 1987. Gel electrophoresis of protein. Oxford Washing-ton DC. IRL Press.

Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., and Yamamoto, T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 450-454

Kermāni-Arab, V., Moll, T., Cho, B.R., Davis, W.C., and Lu, Y.S.. 2001. Effects of Ig Y anti bodi on the development of marek's disease. *Avian Dis* 20: 32 - 41.

Kristiansen, M., Aggebeckm, H., and Heron, I. 1997. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera. *APMIS* 105: 843-853

Kuby, J. 1997. Immunology. Ed ke-3. New York W.H. Freeman and Co.

Liddell, E. and Weeks, I. 1995. Antibody Technology. BIOS Bioscience Publisher Limited. UK.

Nasution, M.S.. 1987. Hal ihwal imunisasi dan aplikasinya. Perum Biofarma Gorawastu. Bandung.

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., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, H., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., Rogemortel, M. van Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H. and Straughan, D.1996. The Production of avian (egg yolk) antibodies : Ig Y. *Alternatives to Laboratorium Animal* 24 : 925 - 934

Scmidt, P., Hafner, A., Reubel, G.H., Wanke, R., Franke, F., Losch, U. and , Dahme. E. 1989. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken egg for immunochemistry. *J. Vet. Med.* B36: 661-668.

Shin, J.H., Roe, I.H. and Kim, H.G. 2004. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of *H. pylori* urease. *J Med Microbiol* 53 : 31-34.

Suartha, I.N. Watiniasih, N.L. and Fuentes, A. 2002. Kesembuhan luka monyet ekor pan jang di obyek wisata wanarawana Padang Tegal Ubud. *J Vet* 3(2) : 50-54.

Suartha, I.N., Wibawan, I.W.T. and Darmono, I.B.P.. 2006. Produksi Immunoglobulin Y Spesifik Antitetanus Pada Ayam. *J. Vet.* Vol 7 (1)..

- Suartha, I.N., Wibawan, I W.T. and Batan, I. W.. 2005. Studi Tentang Penggunaan Telur Unggas Sebagai “Pabrik Bahan Biologis” Produksi Antibodi Spesifik UntukImunoterapi Dan Immunodiagnostik . Hibah Bersaing XII/2 Tahun Anggaran 2005.
- Svendsen, L., Crowley, A., Ostergaard, L.H., Stodulski, G. and Hau, J.. 1995. **Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk.** *Lab Anim Sci* 45:89–93.
- Tizzard., I. 1982. *an introduction to veterinary immunology.* Toronto: W.B. Saunders Company.
- Zhang, W. 2003. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. DDTVol 8. Elsevier Sciences Ltd