

PRODUKSI ANTIBODI KUNING TELUR (IgY) ANTI *STREPTOCOCCUS MUTANS* SEBAGAI ANTI KARIES GIGI

Okti Nadia Poetri* dan Retno D. Soejoedono*

ABSTRACT

PRODUCTION OF CHICKEN EGG YOLK ANTIBODIES (IgY) ANTI *STREPTOCOCCUS MUTANS* AGAINST DENTAL CARIES

The aim of this study was to explore IgY anti *Streptococcus mutans* production and the ability of IgY anti *Streptococcus mutans* blocking adhesion process. The eggs was collected from Single Comb Brown Leghorn which have been immunized by *S. mutans*. Agar gel precipitation test was done to detect IgY anti *S. mutans* in serum and egg. Egg which contain IgY anti *S. mutans* was collected. IgY anti *S. mutans* extracted from egg yolk by means PEG-Amonium sulfat and purified using fast protein liquid chromatography. The purity of IgY anti *S. mutans* was determined by UV spectrophotometer. Biological activities of IgY anti *S. mutans* to inhibit adhesion process was learned by anti adhesion test. We use two dose of IgY, which is 100 µg and 500 µg. IgY anti *S. mutans* formed in serum five weeks after the first immunization while it formed in egg nine weeks after the first immunization. IgY anti *S. mutans* still present in serum and egg until twelve weeks from the first immunization. IgY anti *S. mutans* could decrease the amount of bacteria which attach the epithelial cell surface. The amount of sticky bacteria on epithelial cell (without IgY) are 40 cell bacteria/epithelial cell. After blocked by IgY anti *S. mutans* the amount of bacteria turn into 30 cell bacteria/epithelial cell (for dose of 100 µg IgY) and 28 cell bacteria/epithelial cell (for dose of 500 µg IgY). This research concluded that hens were capable producing IgY anti *S. mutans* in egg yolk and it can be used to solve dental caries problem which caused by *S. mutans*.

Key words: Yolk immunoglobulin (IgY), *Streptococcus mutans*, egg yolk, adhesion.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari cara memproduksi IgY anti *Streptococcus mutans* dari telur dan melihat kemampuannya dalam menghambat proses adhesi pada sel epitel pipi. IgY spesifik dikoleksi dari telur ayam *Single Comb Brown Leghorn* yang telah diimunisasi dengan antigen utuh *S. mutans*. Ayam yang serum dan telurnya positif pada uji AGP, telurnya dikoleksi untuk diekstraksi IgY dengan metode PEG-amonium sulfat kemudian dipurifikasi dengan *fast protein liquid chromatography*. IgY yang telah dimurnikan konsentrasinya dengan spektrofotometer UV. Uji hambat adhesi dilakukan dengan dua dosis IgY anti *S. mutans* yaitu 100 µg dan 500 µg. IgY anti *S. mutans* telah terbentuk dalam serum pada minggu kelima, sedangkan dalam telur pada minggu kesembilan setelah imunisasi pertama. IgY anti *S. mutans* dengan dosis 100 µg dan 500 µg mampu menurunkan jumlah bakteri yang melekat pada sel pipi. Adhesi *S. mutans* pada sel epitel pipi berjumlah 40 sel bakteri/sel epitel pipi, sedangkan setelah di hambat oleh IgY anti *S. mutans* dosis 100 µg menjadi 30 sel bakteri/sel epitel pipi dan dosis 500 µg menjadi 28 sel bakteri/sel epitel pipi. Kesimpulan dari

penelitian ini adalah ayam mampu memproduksi IgY anti *S. mutans* di dalam telur dan adanya peluang penggunaan IgY anti *S. mutans* dalam mengatasi masalah karies gigi akibat serangan *S. mutans*.

Kata kunci: Imunoglobulin Y (IgY), *Streptococcus mutans*, kuning telur, adhesi

PENDAHULUAN

Masyarakat pada umumnya hanya mengetahui telur ayam sebagai salah satu sumber protein hewani pelengkap gizi pada makanan, dan sebagian menggunakan dalam campuran jamu untuk menambah tenaga dan kebugaran. Namun sebenarnya ada potensi lain dari telur ayam untuk dapat digunakan sebagai sumber antibodi (imunoglobulin) terhadap penyakit. Imunoglobulin ayam yang terbentuk dalam darah sebagai akibat paparan antigen mudah ditransfer ke dalam kuning telur dan dikenal dengan nama IgY (*Yolk Immunoglobulin*).

Penggunaan IgY spesifik, bermanfaat bagi pengobatan atau terapi serta dapat dikembangkan

* Departemen Ilmu-ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH IPB, Kampus IPB Darmaga, Bogor. Telp. 0251-629466

untuk tujuan imunodiagnostik seperti pembuatan konjugat untuk Western Blot, ELISA, dan reaksi imunopresipitasi. Di Indonesia sendiri telah dilakukan beberapa penelitian mengenai Ig Y diantaranya Ig Y sebagai anti tetanus (Suartha 2006), sebagai anti adhesin pada pembentukan biofilm (Chismirina 2006), sebagai anti EPEC (Rawendra 2005; Mustopa 2004).

Karakter penting yang dimiliki oleh IgY yang tidak dimiliki oleh antibodi mamalia antara lain : IgY lebih resisten terhadap pengaruh suhu dan pH (Szabo *et al.* 1998), IgY tidak berikatan dengan protein A dan G (Akerstrom *et al.* 1985), tidak berikatan dengan faktor *rheumatoid* dalam darah (Larsson & Sjoquist 1990), tidak mengaktifkan faktor komplemen mamalia (Larsson *et al.* 1993) sehingga tidak merangsang timbulnya efek samping, tidak berikatan dengan reseptor Fc pada permukaan sel (Schmidt *et al.* 1993), dan kemampuan mengikat antibodi sekunder 3 hingga 5 kali lebih kuat (Horton *et al.* 1984).

Karies gigi merupakan penyebab utama keropos pada gigi remaja. Karies gigi (*kavitas*) adalah daerah yang membusuk di dalam gigi, yang terjadi akibat suatu proses yang secara bertahap melarutkan *email* (permukaan gigi sebelah luar yang keras) dan terus berkembang ke bagian dalam gigi. Kasus karies gigi secara konsisten berkaitan dengan *Streptococcus mutans* karena bakteri ini merupakan penyebab utama pembentukan plak gigi pada manusia dan hewan. Karies dapat diobati dengan cara : mengubah kondisi mikroflora dengan menggunakan chlorhexidine dan flouride, mengurangi konsumsi gula dan sukrosa, mengurangi jumlah makan, serta meningkatkan *salivary flow*, dan diharapkan di masa depan pengobatan karies dapat menggunakan antibodi spesifik *S. mutans* (Mount & Hume 2006).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi "*Yolk Immunoglobulin*" IgY anti *S. mutans* di dalam telur ayam dan mengetahui peran IgY spesifik *S. mutans* sebagai anti adhesi pada sel epitel pipi sebagai acuan pencegahan kejadian karies gigi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan penelitian antara lain hewan coba ayam petelur umur *Single Comb Brown Leghorn* 24 minggu sebanyak 4 ekor, isolat utuh bakteri *S. mutans* (diperoleh dari seorang pasien karies gigi) dan telah dikarakterisasi sebagai bakteri *S. mutans* tipe d (Chismirina 2006), dan sel epitel pipi (diperoleh dari sel epitel pipi peneliti), brain heart infusion (BHI) (Gibco), *Freud's* adjuvan, agarose (Sigma), PEG 6000 (Merck), Na azide (Merck), *phenol red*, amonium sulfat (Merck), K_2SO_4 (Merck), NaH_2PO_4 (Merck), bovine

serum albumin (BSA) (Sigma), kolom *Hi Trap™* IgY (*Amersham pharmacia biotech*, pakan ayam komersial, spoit 1 ml, spoit 3 ml, kapas, isopropanol, alkohol 70 %, akuades, mili-Q, PBS, pewarna Giemsa. Alat yang digunakan adalah kandang ayam lengkap dengan tempat makan dan minum, *microtube*, sentrifus, inkubator, tabung, penangas air, kaca objek, pipet Mohr 10 ml, perlengkapan AGPT (*Agar Gel Precipitation Test*), hemositometer, mikroskop, *magnetic stirer*, vortex, spektrofotometer UV, dan *AKTA™ explorer 10S* (*Amersham pharmacia biotech*).

Metode Penelitian

Produksi antibodi *S. Mutan* pada ayam

Produksi antibodi menggunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Brown Leghorn* betina berumur 24 minggu yang siap bertelur. Ayam diimunisasi dengan 0,5 ml (10^9 CFU) suspensi *S. mutans* secara intravena (Carlender 2002) selama tiga hari berturut-turut. Kemudian dilanjutkan dengan menyuntik 1 ml (10^9 CFU) suspensi bakteri *S. mutan* dalam *Freund adjuvant complete* pada minggu II, serta 1 ml (10^9 CFU) suspensi bakteri *S. mutan* dalam *Freund adjuvant incomplete* minggu III dan IV secara intramuskular (Wibawan & Laemmler 1992). Satu minggu kemudian dilakukan koleksi serum dan di-periksa keberadaan antibodinya. Identifikasi ulang serum dan kuning telur menggunakan uji agar gel presipitasi (AGP).

Ekstraksi IgY dari Kuning Telur Ayam

Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur, kemudian diletakkan di atas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur dilubangi dengan cara diangkat dengan pinset, cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam milli-Q pH 4 dengan perbandingan 1 : 4. Setelah homogen ditambahkan lagi milli-Q pH 2 hingga pH suspensi 5.0 sampai 5.2 dan di simpan pada suhu 4 °C minimal 12 jam. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 3125 g pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil dan diperoleh *Water Soluble Fractination* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7.5. Kemudian ekstraksi dilanjutkan PEG 6000 dan amonium sulfat (Polson *et al.* 1980). Purifikasi dilakukan dengan *fast protein liquid chromatography* menggunakan alat *Akta Explorer 10S* (Amersham). Konsentrasi protein dihitung dengan spektrofotometer UV. Hasil purifikasi IgY dipekatkan dengan PEG 6000 kemudian didialisis dalam larutan PBS pH 8 selama 24 jam dengan tujuan menarik sisa-sisa garam yang mungkin tersisa.

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan protein dari lemak telur. Metode yang dipilih adalah pemisahan dengan menggunakan PEG-amonium sulfat (Polson *et al.* 1980). PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi, serta mengendapkan IgY (Harris *dalam* Mustopa 2004). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan (Harlow & Lane 1988).

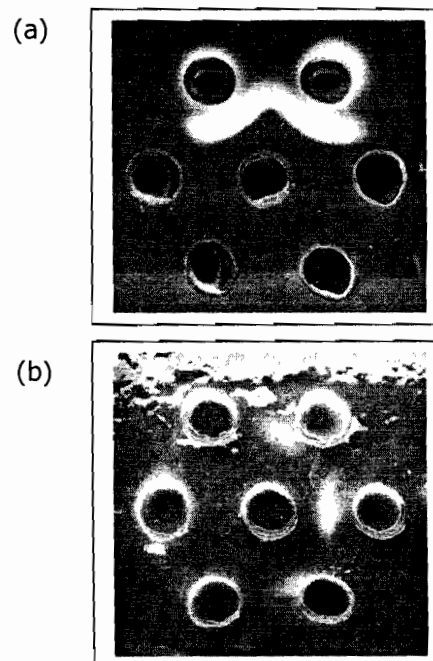
Aktifitas biologis IgY sebagai anti adhesi in vitro

Aktifitas biologis IgY spesifik anti *S. mutans* dalam perannya sebagai anti adhesin ditentukan dengan menggunakan uji anti adhesi (Wibawan *et al.* 1999). Sebelumnya ditentukan juga kemampuan adhesi bakteri *S. mutans* pada sel epitel pipi. Kemampuan adhesi dilakukan dengan cara : bakteri diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 1 jam dengan sel epitel dengan perbandingan sel epitel pipi 10⁵ sel/ml : bakteri 10⁷ CFU/ml. Uji anti adhesi menggunakan prosedur yang sama dengan uji adhesi, namun sebelum bakteri di infeksi ke dalam biakan sel epitel, bakteri diinkubasi dengan IgY anti *S. mutans* pada suhu 37 °C selama 1 jam. Dosis IgY yang digunakan adalah 100 µg dan 500 µg. Penentuan nilai adhesi adalah rataan jumlah bakteri yang melekat pada 20 sel epitel pipi yang teramati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

IgY spesifik terhadap *S. mutans* pada serum ayam dan telur dideteksi dengan menggunakan uji agar gel presipitasi (AGP). Keberadaan IgY spesifik *S. mutans* ditandai dengan pembentukan garis presipitasi pada agar gel (Gambar 1a & 1b). IgY mulai terdeteksi minggu kelima dan tidak terdeteksi lagi pada minggu ketujuh setelah imunisasi pertama. Sementara IgY didalam telur belum terdeteksi sampai minggu ketujuh setelah imunisasi pertama (Tabel 1). Setelah dilakukan pengulangan imunisasi (booster), satu minggu kemudian IgY didalam serum terdeteksi lagi. Sedangkan IgY di dalam telur mulai terdeteksi dua minggu setelah booster. IgY didalam serum dan telur masih terdeteksi sampai dengan minggu ke-12 setelah imunisasi pertama.

Bellanti (1993) menyatakan bahwa injeksi dosis pertama akan menghasilkan antibodi spesifik didalam serum, pemaparan pertama ini membangkitkan respon primer. Injeksi dengan sel-sel bakteri akan memunculkan reaksi antibodi sepuluh sampai empat belas hari pasca injeksi. Pembentukan antibodi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu: imunogenesitas, kualitas, bentuk kelarutan stimulan, spesies hewan yang di injeksi, rute imunisasi, dan sensitifitas *assay*.



Gambar 1. Garis presipitasi pada uji AGB kuning telur (a) dan uji AGB (b)

Tabel 1 Hasil uji AGP pada serum dan telur ayam

Minggu	Serum				Telur			
	1	2	3	4	1	2	3	4
I*	-	-	-	-	***	***	***	***
II*	-	-	-	-	***	***	***	***
III*	-	-	-	-	***	***	***	***
IV*	-	-	-	-	***	***	***	***
V	+	+	+	+	***	***	***	***
VI	+	+	+	+	-	-	-	-
VII**	-	-	-	+	-	-	-	-
VIII	+	+	+	+	-	-	-	-
IX	+	+	+	+	+	+	+	+
X	+	+	+	+	+	+	+	+
XI	+	+	+	+	+	+	+	+
XII	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan

* Waktu imunisasi

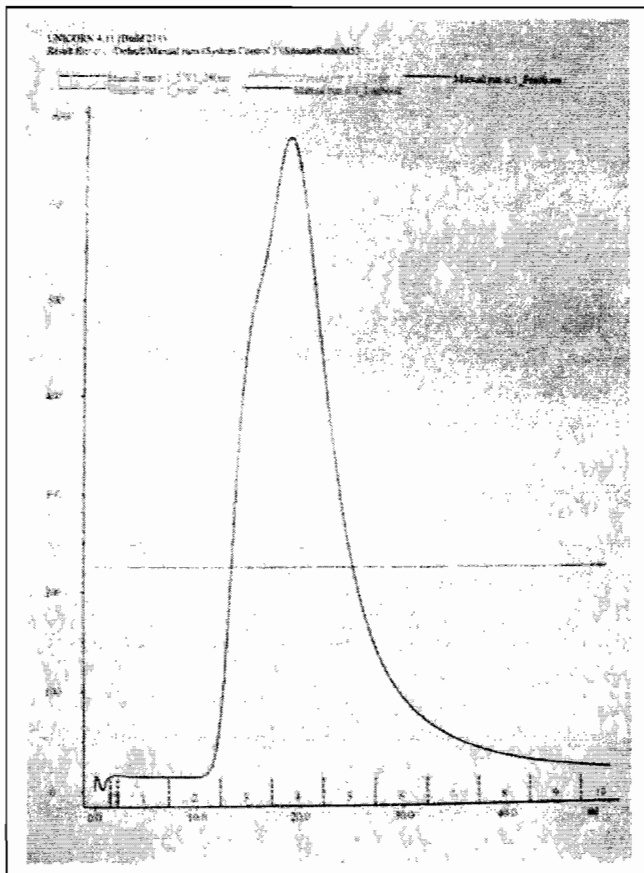
** Imunisasi ulang

*** Belum dilakukan koleksi telur

+ Terdeteksi garis presipitasi pada uji AGP

- Tidak terdeteksi garis presipitasi pada uji AGP

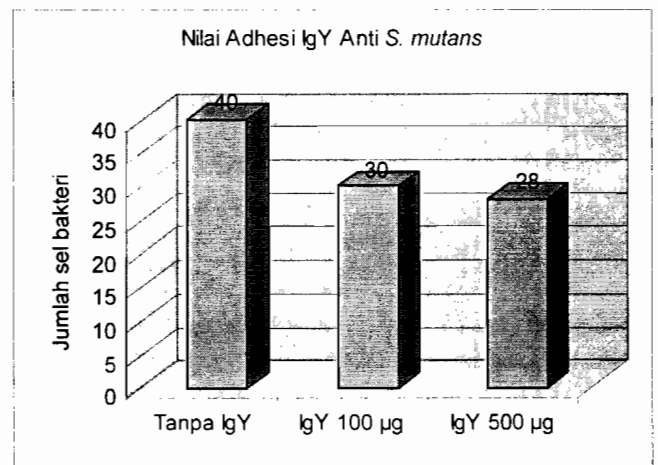
IgY anti *S. mutans* diekstraksi dari kuning telur ayam yang menunjukkan reaksi positif pada uji AGP. Hasil ekstraksi yang telah dipurifikasi memiliki konsentrasi sebesar 3,1 mg/ml (fraksi 3), 4,3 mg/ml (fraksi 4), dan 4,46 mg/ml (fraksi 5). Kromatogram hasil FPLC IgY anti *S. mutans* dapat dilihat pada Gambar 2.



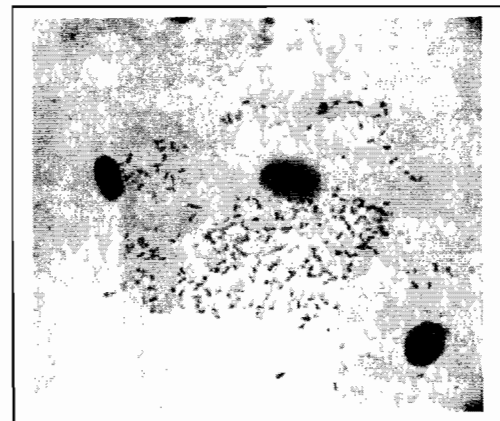
Gambar 2. Kromatogram hasil FPLC Ig Y anti S. mutans

Hasil uji untuk aktifitas biologis adalah sebagai berikut : nilai adhesi kontrol adalah 40 sel bakteri/ sel epitel pipi, sementara nilai adhesi IgY 100 µg adalah 30 sel bakteri/sel epitel pipi dan IgY 500 µg adalah 28 sel bakteri/sel epitel pipi (Gambar 3). Ada tiga faktor yang mendukung perlekatan bakteri terhadap sel inang yaitu tropisme sel, spesifitas spesies dan spesifitas genetika. Selain itu terdapat faktor non spesifik seperti ikatan kimia yang terbentuk antara komponen permukaan bakteri dan sel inang yang spontan secara termodinamika mempengaruhi proses perlekatan tersebut (Beachey dalam Mustopa 2004). Proses adhesi ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa IgY mampu berikatan dengan antigen permukaan *S. mutans* sehingga dapat menurunkan jumlah bakteri yang melekat pada sel walaupun angka penurunannya tidak terlalu besar. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian Chismirina (2006) yang menyebutkan IgY *water soluble fraction* kuning telur beku anti *S. mutans* dengan dosis 40 mg dan 80 mg dapat menurunkan jumlah pembentukan biofilm (*dental plaque*) secara invitro.



Gambar 3. Nilai adhesi Ig Y anti *S. mutans*



Gambar 4. Proses adhesi *S. mutans* pada sel epitel pipi

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ayam mampu memproduksi IgY anti *S. mutans* pada serum dan kuning telur. Kemampuan IgY dalam menurunkan jumlah perlekatan bakteri *S. mutans* menunjukkan adanya peluang tentang penggunaan IgY dalam mengatasi masalah karies gigi akibat serangan *S. mutans*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jadwal imunisasi dan dosis antigen guna memperoleh jumlah IgY anti *S. mutans* yang lebih banyak serta penelitian untuk mengetahui dosis penggunaan IgY yang efektif dalam menghambat proses adhesi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2006. Streptococcus mutans. <http://www.google.com>.
- Akerstrom B, Brodin Th, Reis K, Borg L. 1985. Protein G : a Powerful Tool for Binding and Detection of Monoclonal and Polyclonal Antibodies. J. Immunol. 135 : 2589-2592.
- Bellanti JA. 1993. Imunologi III. Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Carlender D. 2002. Avian Immunoglobulin Y Antibody In Vitro and In Vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Chismirina S. 2006. Efek Immunoglobulin Y (IgY) sebagai Anti Adhesin pada Pembentukan Biofilm oleh *Streptococcus mutans*. Tesis. Program Pasca Sarjana Departemen Biologi Oral. FKG-UI. Jakarta.
- Gronroos L. 2000. Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and In Dentition. Dissertation. Faculty of Medicine of University of Helsinki. Helsinki.
- Harlow Ed & Lane D. 1988. Antibodies : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Horton JJ, Holde CA, Ward PJ, MacDonald DM, Sanderson AR. 1984. Exploitation of Phylogenetic Distance in Cell Surface Immune Labelling: Studies with beta2 microglobulin. J. Invest. Dermatol.
- Larsson A, and J. Sjoquist, 1990. Chicken IgY: Utilizing the Evolutionary Difference. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.
- Larsson A, RM Balow, TL Lindahl, and PO Forsberg. 1993. Chicken Antibodies : Taking Advantage of Evolution a Review. Poultry Science.
- Mayer G. 2005. Immunology : Immunoglobulin-Structure and Function. Microbiology and Immunology online. University of South Carolina. <http://www.med.sc.edu:85/mayer/IgStruct2000.htm>.
- Mount G & Hume R. 2006. Dental Caries. <http://www.UCLA.edu.htm>.
- Mustopa Z. 2004. Peran Immunoglobulin Y (IgY) sebagai Anti Adhesi dan Opsonin untuk Pencegahan serangan *Eschericia coli* Enteropatogenik (EPEC) K1.1. Tesis. Program Pasca Sarjana. FKH-IPB. Bogor.
- Polson A, Von WM, Van RM. 1980. Isolation of Viral IgY Antibodies from Yolks of Immunized Hens. Immunol. Commun. 9 (5) : 475-493.
- Rawendra R. 2005. Prospek Pengembangan Immunoglobulin Y (IgY) Kering Beku sebagai *Nutraceutical Food* Anti Enteropathogenic *Eschericia coli* (EPEC). Disertasi. Program Pasca Sarjana. FKH- IPB. Bogor.
- Schimdt P, MH Erhard, D Schams, A Hafner, S Folger, U Losch. 1993. Chicken Egg Antibodies for Immunohistochemical Labelling of Growth-Hormone and Prolactin in Bovine Pituitary Gland. J. histochem. And Cytochem.
- Suartha IN. 2006. Karakteristik Immunoglobulin Y Antitetanus di Isolasi dari Telur Ayam sebagai Pengganti Antitetanus Serum Kuda. Disertasi. Program Pasca Sarjana. FKH- IPB. Bogor.
- Szabo CS, Bardos L, Losonczy S, Karchesz K. 1998. Isolation of Antibody From Chicken and Quail Eggs. http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo_0509/index.html.
- Wibawan IWT, Laemmler Ch. 1992. Relationship between group B Streptococcal serotypes and cell surface hidrophobicity. J. Vet. Med. 39 : 376-382.
- Wibawan IWT, FH Pasaribu, IH Utama, Ch. Laemmler. 1999. The role of hyaluronic acid capsular material of *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus in mediating adherence to He La cells and in resisting phagocytosis. Research in Veterinary Science.