

# FORMULASI SUSU BERKHASIAH ANTI FLU BURUNG DAN ANTI DIARE; PRODUKSI IMUNOGLOBULIN Y DALAM BERBAGAI BENTUK

## (THE BENEFIT OF MILK FORMULATION TO PREVENT BIRD FLU AND DIARRHEA; PRODUCTION OF IMMUNOGLOBULIN Y ANTI-BIRD FLU AND ANTI-DIARRHEA IN VARIOUS FORMS)

Rahmat Hidayat<sup>1)</sup>, Fachriyan Hasmi Pasaribu<sup>1)</sup>

### ABSTRACT

The ultimate goal of fresh milk formulations are efficacious against-bird flu and diarrhea (against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*). Outputs generated in this first year of immunoglobulin Y anti-bird flu and anti-diarrhea in various forms of *spray dry yolk*, *dry freeze egg yolks*, and pure extracts. Ig Y that collected is located in the egg yolks and tested positive for H5N1 virus, *E. coli* and *S. enteritidis*. Production of Ig Y begins with the treatment in the form of vaccination in laying hens 4 (four) times during the 4 (four) weeks. The vaccines were used in the form of H5N1 in the first and third week, while *E. coli* and *S. enteritidis* used every week. Serum and yolk was collected and checked for the presence of anti-Ig Y was the third agent since the first week after the last vaccination. Inspection method for *E. coli* and *S. Enteritidis* is the order *Presipitation Gel Test* (AGPT) while the H5N1 method *Haemagglutination Inhibition* (HI). The results give a positive result against all three antigens, but in a different week. This situation is common given the immunity of each chicken is different depending on race, age and environment.

**Keywords :** Milk formulation, immunoglobulin Y, bird flu, diarrhea.

### ABSTRAK

Tujuan akhir penelitian adalah formulasi susu segar yang berkhasiat anti flu burung dan anti diare (anti terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis*). Luaran yang dihasilkan dalam tahun pertama ini berupa imunoglobulin Y anti flu burung dan anti diare dalam berbagai bentuk yaitu *spray dry* kuning telur, *freeze dry* kuning telur, dan ekstrak murni. Ig Y yang dikoleksi adalah yang berada dalam kuning telur dan teruji positif terhadap virus H5N1, *E. coli* dan *S. enteritidis*. Produksi Ig Y diawali dengan perlakuan pada ayam petelur berupa vaksinasi sebanyak 4 (empat) kali selama 4 (empat) minggu. Vaksin yang digunakan berupa H5N1 pada minggu pertama dan ketiga, sedangkan *E. coli* dan *S. enteritidis* digunakan setiap minggu. Serum dan kuning telur dikoleksi dan diperiksa keberadaan Ig Y anti ketiga agen tersebut sejak minggu pertama pasca vaksinasi terakhir. Metode pemeriksaan untuk *E. coli* dan *S. enteritidis* adalah *Agar Gel Presipitation Test* (AGPT) sedangkan H5N1 metode *Haemagglutination Inhibition* (HI). Hasil yang diperoleh memberikan hasil positif terhadap ketiga antigen namun pada minggu yang berbeda. Keadaan ini biasa terjadi mengingat kondisi kekebalan masing-masing ayam berbeda tergantung ras, umur dan lingkungan.

**Kata kunci :** Formulasi susu, imunoglobulin Y, flu burung, diare.

### PENDAHULUAN

Susu dan telur ayam diketahui sebagai sumber protein hewani yang sangat bermanfaat. Susu biasanya dikenal sebagai minuman penguat tulang dan gigi karena kandungan kalsium yang dimilikinya. Tetapi, sebenarnya ada banyak kandungan nutrisi yang ada, misalnya fosfor, zinc, vitamin A, vitamin D,

vitamin B<sub>12</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, asam amino dan asam pantotenat. Kandungan nutrisi ini bermanfaat untuk menunjang kesehatan tubuh, diantaranya : i) Mencegah osteoporosis dan menjaga tulang tetap kuat. Bagi anak-anak, susu berfungsi untuk pertumbuhan tulang yang membuat anak menjadi bertambah tinggi, ii) Menurunkan tekanan darah, iii) Mencegah kerusakan gigi dan menjaga kesehatan mulut. Susu mampu mengurangi keasaman mulut, merangsang air liur, mengurangi plak dan mencegah gigi berlubang, iv) Menetralkan racun seperti logam atau timah yang mungkin terkandung dalam

<sup>1)</sup>Dep. Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor  
Penulis korespondensi : rhidayat@ipb.ac.id

makanan, v) Mencegah terjadinya kanker kolon atau kanker usus, vi) Mencegah diabetes tipe 2, vii) Mempercantik kulit, membuatnya lebih bersinar, viii) Membantu agar lebih cepat tidur. Hal ini karena kandungan susu akan merangsang hormon melatonin yang akan membuat tubuh mengantuk.

Peningkatan manfaat susu dimungkinkan dengan penambahan zat-zat tertentu, misalnya madu, coklat dan DHA. Berangkat dari fakta tersebut, kami mencoba mengembangkan manfaat susu dalam imunisasi pasif, yaitu penambahan imunoglobulin Y (Ig Y) anti flu burung dan anti diare. Ig Y tersebut diproduksi dari telur ayam yang telah mendapatkan perlakuan sebelumnya. Perlu diketahui ada sisi lain potensi telur ayam yang belum banyak diungkapkan kepada masyarakat, yakni tentang peluang penggunaan telur ayam sebagai industri biologis yang dapat digunakan untuk memproduksi zat kebal (antibodi) terhadap berbagai macam penyakit baik untuk hewan maupun manusia (Anonim, 2004).

Kuning telur disiapkan oleh induk ayam bagi keturunannya, bukan saja untuk persediaan makanannya selama pengeraman dan sesaat setelah lahir, tetapi juga dilengkapi dengan antibodi yang cukup banyak (IgY), merupakan curahan IgY darah ke kuning telur, yang sangat berguna bagi anak ayam untuk mempertahankan diri dari serangan penyakit. Hal ini dikenal dengan *maternal antibody*. Formulasi IgY yang spesifik, sebagai anti terhadap penyakit tertentu dalam kuning telur dapat diatur sesuai dengan keinginan kita. Dalam rancangan penelitian ini akan diproduksi susu formula berkhasiat anti flu burung dan anti diare, yakni anti *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis*.

Beberapa keuntungan teknologi IgY ini dibandingkan dengan penggunaan kelinci atau mamalia lain sebagai produsen antibodi yaitu: 1) biaya pemeliharaan ayam relatif tidak mahal, 2) koleksi telur tidak menyakiti hewan dibandingkan dengan pengambilan darah (*animal welfare*, berkaitan dengan *animal protection regulation*), 3) diperlukannya antigen dalam jumlah yang sangat sedikit untuk mendapatkan titer IgY yang tinggi dari kuning telur ayam yang telah divaksinasi (Gassmann *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1993), 4) sebutir telur berisi sama dengan antibodi yang dihasilkan dalam sekali pemanenan darah kelinci, sehingga telur sebagai pabrik antibodi dapat dikatakan sebagai proses pemanenan yang sangat sederhana, 5) tidak menunjukkan reaksi silang dengan komponen jaringan mamalia, karena jarak filogenik antara unggas dan mamalia sangat jauh, 6) telur dapat disimpan dengan mudah dalam jangka waktu yang relatif lama menghasilkan respon imun yang lebih spesifik, dan tidak memiliki efek samping, karena tidak bereaksi dengan Ig G mamalia dan reseptor (Mary Haak, 1994; Akita dan Nakai, 1993).

## BAHAN DAN METODE

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilakukan sejak bulan Agustus 2005 sampai dengan Mei 2006.

### Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa isolat bakteri, SAA (*Starch ampicillin agar*), *Blood Agar*, BHI (*Brain Heart Infusion*), NaCl fisiologis, PBS (*Phospat Buffer Saline*), NA (*Nutrient Agar*), TSB (*Tryptose Soy Broth*), TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), dan TSA (*Tryptic Soy Agar*). Hewan coba, yaitu ayam ras *Single Comb Brown Leghorn* siap bertelur (umur sekitar 3 bulan). Alat-alat yang digunakan antara lain adalah akuarium, *aerator*, *oven*, *autoclave*, cawan *Petri*, kantong steril, sentrifuse, tabung *Eppendorf*, tabung reaksi, *Öse*, bunsen, gelas ukur, *dispossibel syringe*, *water bath*, pipet, kertas saring, *Vortex*, inkubator, *refrigerator*.

## BAHAN DAN METODE

### Produksi IgY anti Flu Burung dan Anti Diare

Produksi IgY anti flu burung dan anti diare dalam telur ayam dilakukan dengan menyuntik 1 ml suspensi vaksin ( $10^9$  HA) dan 1 ml suspensi antigen in-aktif EPEC dan *S. enteritidis* ( $@ 10^9$  c.f.u) secara intra muskular dan diulang 2 minggu setelah penyuntikan pertama terhadap 25 ekor ayam betina dewasa (tipe *large size hens*) berumur 30 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 (Soejoedono dan Wibawan, 2005).

### Pembuatan vaksin bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis*

Kultur bakteri diremajakan pada media *nutrient agar/blood agar*, lalu diinkubasi  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Kultur bakteri diinokulasi ke media BHI broth, inkubasi  $37^{\circ}\text{C}$  24 jam dan sentrifuge 5000 rpm selama 15 menit, lalu supernatan dibuang. Pellet disuspensikan dengan NaCl fisiologis (dicuci) lalu disentrifuge 5000 rpm 15 menit (pellet dicuci dengan NaCl fisiologis sebanyak 2 kali). Pellet disuspensikan

setara dengan Mc. Farlan II ( $6.0 \times 10^8$  cfu/ml) lalu suspensi bakteri diinaktivasi pada waterbath suhu  $60^\circ\text{C}$  selama 90 menit. Vaksin dikontrol dengan cara : strik/gores ke media *nutrient agar/blood agar* lalu inkubasi  $37^\circ\text{C}$  24 jam. Bakteri tidak tumbuh pada media artinya siap untuk vaksinasi, dan jika bakteri tumbuh pada media artinya ulangi inaktivasi.

**Pembuatan antigen bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella enteritidis***

Kultur bakteri diremajakan pada media *nutrient agar/blood agar*, lalu diinkubasi  $37^\circ\text{C}$  24 jam. Kultur bakteri diinokulasi ke media BHI broth 100 ml, lalu diinkubasi  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam dan disentrifuge 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, pellet disuspensikan dengan NaCl fisiologis (dicuci), lalu disentrifuge 5000 rpm 15 menit. Pellet dicuci dengan NaCl fisiologis sebanyak 2 kali. Pellet di suspensikan dengan PBS sebanyak 5 ml disetarakan dengan Mc. Farlan II ( $6.0 \times 10^8$  cfu/ml). Suspensi bakteri diinaktivasi pada waterbath suhu  $52^\circ\text{C}$  selama 120 menit, supernatan dibuang, lalu pellet ditambahkan 0.35 ml HCl 0.2 N, phenol red 5 tetes, NaOH sedikit-sedikit sampai berwarna merah, disentrifuge 5000 rpm 15 menit lalu supernatan sebagai antigen dan disimpan di freezer.

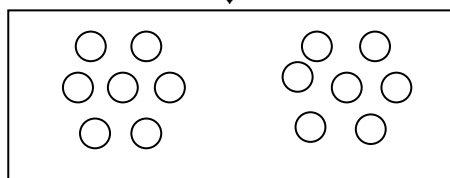
**Pemeriksaan IgY**

Pemeriksaan kandungan antibodi spesifik dalam telur dan serum darah dilakukan dengan teknik AGPT dan HI. Hal ini dilakukan untuk melihat masa panen telur yang memenuhi spesifikasi khasiat, berkaitan dengan kandungan IgY dalam kuning telur, serta penentuan waktu *booster* berikutnya (Wibawan *et al.*, 2002).

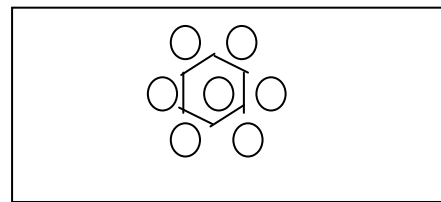
**AGPT (Agar Gel Presipitation Test)**

Agarose 1 % + Na Azide 0.001 gram/ml, di larutkan dalam 1/2 bagian PBS 1x dan 1/2 bagian Aquabidest

- ↓
- Di rebus hingga larutan menjadi bening
- ↓
- Di tuangkan di atas objek glass sebanyak 4 ml
- ↓
- Tunggu sampai mengeras
- ↓



- Cetak dengan alat *gel puncher*
- ↓
- Isi sumur dengan antigen (tengah), antibody (luar), masing-masing sumur sebanyak 25 µl
- ↓
- Simpan pada tempat/kotak yang di beri tissue basah (Aquadest steril)
- ↓
- Inkubasi dalam suhu ruang  $25-35^\circ\text{C}$  selama 24-48 jam
- ↓
- Hasil positif apabila ada garis presipitasi antara antibody dan antigen

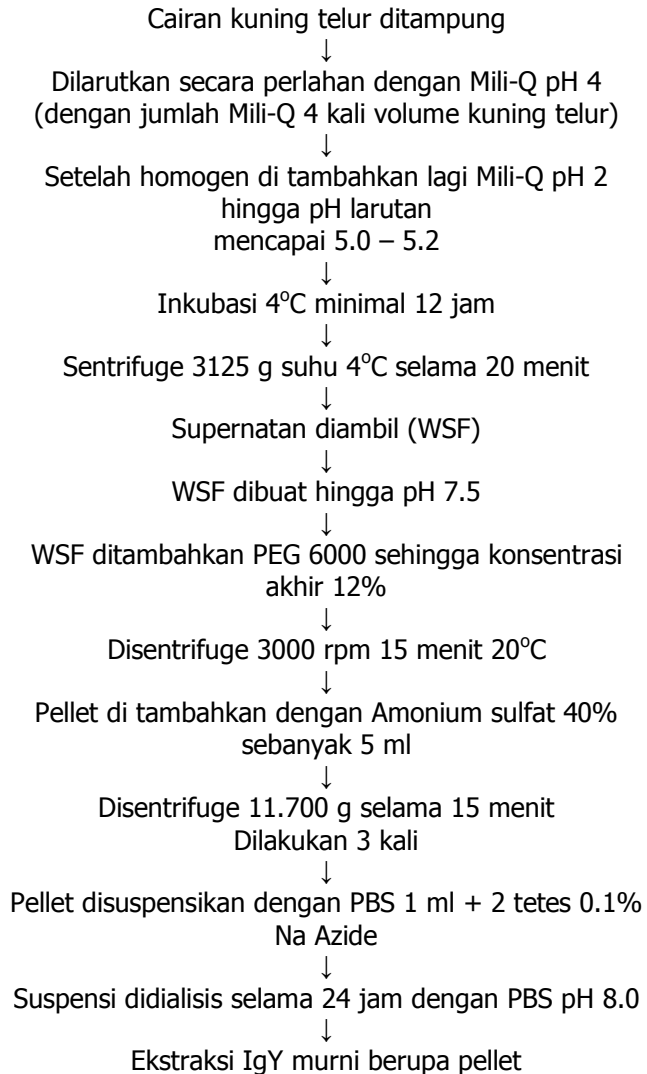


**HI (Haemagglutination Inhibition)**

- Isi masing-masing sumur dengan NaCl fisiologis sebanyak 25 µl
- ↓
- Tambahkan 25 µl sampel (serum ayam/kuning telur) pada sumur pertama
- ↓
- Homogenkan dan lakukan pengenceran
- ↓
- Tambahkan virus standar 4 HAU
- ↓
- Kocok secara perlahan
- ↓
- Inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit
- ↓
- Tambahkan RBC 1 % pada setiap sumur
- ↓
- Inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit
- ↓
- Baca hasil setelah ada yang teraglutinasi (mengendap)

**WSF (Water Soluble Fraction)**

- Telur positif IgY, dipecahkan, di pisahkan putih dengan kuningnya, kuningnya diletakkan di atas kertas saring
- ↓
- Kuningnya disayat dengan pinset
- ↓



## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan keberadaan Ig Y dilakukan setiap minggu pasca vaksinasi terakhir (8 Oktober 2010) baik dalam serum maupun kuning telur.

Reaksi positif di serum didapatkan antara minggu pertama sampai dengan kedua setelah penyuntikan terakhir. Perbedaan kemunculan hasil positif ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya faktor genetik. Dua individu atau lebih sifat genetik berbeda menunjukkan respons imun yang berbeda terhadap antigen yang sama (Kresno 1996). Faktor lainnya, dapat disebabkan karena kondisi ayam (sakit, kelelahan, stress) sehingga menunjukkan respons imun yang berbeda (Tizard, 1988).



Gambar 1. Hasil Uji AGPT positif ditandai dengan garis putih presipitasi

Reaksi negatif uji AGPT serum ayam dapat terjadi karena konsentrasi antibodi dalam serum sedikit atau tidak ada. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh kondisi hewan sehingga terjadi penurunan produksi antibodi dalam tubuh ayam. Perbedaan reaksi negatif pada setiap ayam dapat disebabkan oleh perbedaan konsentrasi antibodi dan kondisi tubuh dari masing-masing ayam. Menurut Tizard (1988), konsentrasi antibodi lebih sedikit dibanding antigen pada AGPT menyebabkan setiap antibodi diikat sepasang molekul antigen, ikatan silang tidak terjadi, kompleks antigen-antibodi kecil dan larut, sehingga tidak terbentuk presipitasi.

Pengumpulan telur dilakukan setelah satu minggu serum menunjukkan reaksi positif. Ig-Y dari kuning telur diisolasi dengan metode purifikasi sederhana. Keberadaan antibodi dalam kuning telur ayam dilakukan dengan metode *Agar gel Precipitation Test* (AGPT). Reaksi positif dari AGPT menunjukkan adanya antibodi dalam kuning telur. Reaksi positif kuning telur ayam mulai terdeteksi antara minggu ketiga dan keempat pasca serum menunjukkan reaksi positif atau minggu keempat dan kelima setelah vaksinasi terakhir. Hasil pengujian kuning telur dengan teknik HI bernilai positif antara minggu pertama dan kedua pasca hasil positif serum.

Keberadaan antibodi dalam kuning telur merupakan hasil transfer dari serum. Antibodi atau imunoglobulin yang terbentuk dalam darah ayam sebagai akibat paparan *Aeromonas hydrophila* akan ditransfer ke dalam kuning telur sebagai bahan kekebalan bagi anak. Transfer Ig-Y pada keturunannya melalui dua tahap, yaitu pertama Ig-Y ditransfer dari serum menuju kuning telur dengan proses yang analog dengan proses transfer antibodi melalui plasenta pada mamalia. Kedua, transfer Ig-Y

dari kantung embrio kepada embrio yang sedang berkembang. Konsentrasi Ig-Y dalam kuning telur konstan selama pematangan oosit pada telur.



Gambar 2. Sediaan Ig Y dalam kuning telur yang di freeze dry dan spray dry

## KESIMPULAN

Vaksinasi yang dilakukan dapat menginduksi produksi antibodi anti *E. coli*, *S. enteritidis*, dan H5N1 di dalam serum dan kuning telur. Perbedaan kemunculan hasil positif ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya faktor genetik dan umur ayam. Dua individu atau lebih sifat genetik berbeda menunjukkan respons imun yang berbeda terhadap antigen yang sama.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah mendukung kegiatan penelitian ini, khususnya DP2M DIKTI yang telah mendanai seluruhnya. Selain itu juga kepada LPPM IPB, anggota peneliti, dan teknisi yang membantu.

## DAFTAR PUSTAKA

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/ind ex.htm](http://www.hhmi.org/grant/lectures/1999/ind ex.htm). [oktober 2002].

- 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
- Hatta, H. K. Tsuda, M. Ozeki, M. Kim, T. Yamamoto, S. Otake, M. Hirasawa, J. Katz J. N.K. Childers, and 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 Res.* 31(4):268-74,
- Hidayat, R. 2006. Studi Protektivitas Immunoglobulin Y (Ig-Y) ANTI *Aeromonas hydrophila* pada ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) dan Gurame (*Osphronemus gouramy* L.). Tesis. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Hidayat, R. 2009. Prospek telur ayam berkhasiat imunoterapi terhadap infeksi *Enterobacter sakazakii* pada Balita. Panduan Seminar LPPM IPB. Bogor.
- Indrawati, A., dan R. Hidayat. 2009. Telur Ayam 3 *in one* Anti Flu Burung dan Anti Diare : Produksi, Efikasi dan Aplikasinya. Makalah Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB Tahun 2009.
- Kresno, S.B. 1996. Diagnosa dan Prosedur Laboratorium: Jakarta
- Li-Chan E.C.Y. 2000. Application of egg immunogloblins in immunoaffinity chromatography. In: *Egg Nutrition and Biotechnology*. Sim JS, S Nakai & W Guenter (Eds). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Pasaribu, FH. 2009. Penggunaan pelet yang mengandung immunoglobulin Y (Ig Y) anti Koi Herpes Virus (KHV) dalam upaya pengendalian wabah penyakit KHV pada ikan Mas (*Cyprinus carpio carpio*) dan Koi (*Cyprinus carpio koi*). Makalah Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB Tahun 2009.
- Schade, R., P. Henklein, and A. Hlinak. 1997. Egg yolk Antibody: state of the Art And Advantageous use in the life sciences. In: *Animal Alternatives, Welfare And Ethics* (Zutphen, L. F. M., And Balls, M., eds) pp. 973–981, Elsevier, Amsterdam.
- Schmidt, P., A. Hafner, G.H. Reubel, R. Wanke, V. Franke, U. Losch and E. Dahme. 1989. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunochemistry. *J. Vet. Med.* B 36:661-668.
- Shin, W.R., I.S. Choi, J.M. Kim, W. Hur and H.S. Yoo. 2002. Effective methods for the products of IgY using immunogens of *Bordetella*

- bronchoseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumonia*. *J. Vet. Sci.* 3(1):47-57
- Skrabanja, A.T.P., ALJ De Meere and van Den Oetelaar (1994). Lyophilization of biotechnology products. *PDA J. of Pharmaceutical Science and Technology.* 78:311-317.
- Smith, D J., William F. King, dan Ronald 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, May 2001, p. 3135-3142, Vol. 69, No. 5.
- Soejoedono, R.D. dan I.W.T. Wibawan. 2005. Pemanfaatan telur ayam sebagai pabrik biologis: Produksi IgY anti plaque dan diare dengan titik berat pada anti S. mutan dan *Salmonella enteritidis*. Laporan RUT XII.
- Sunwoo, H.H., E.N. Lee, K. Menninen, M.R. Suresh and J.S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherchia coli* O157:H7. *Journal of Food Science.* 67(4):1486-1494.
- Sugita-Konishi, Y., K .Shibata, S.S .Yun, Y. Hara-Kudo, K. Yamaguchi dan S. Kumagai. 1996. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various bacteria. *Biosci, Biotech, Biochem.* 60(5):886-888.
- Tizzard. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University: Surabaya
- Wibawan, I.W.T., 1993. Untersuchungen an Typenantigenen von Streptokokken der serologischen Gruppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren. Dissertation, Justus Liebig Universitaet Giessen, Deutschland.
- Wibawan, I.W.T., RS Soejoedono, S. Murtini dan IGK Mahardika. 2008. Prospek pemanfaatan telur ayam berkhasiat anti virus avian influenza dalam usaha pengendalian infeksi virus flu burung dengan pendekatan pengebalan pasif. Laporan RUI KNRT.