

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas vaksin IgY terhadap terhadap *P.gingivalis* dari kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap kadar MMP-8 pada tikus wistar. IgY diambil dari kuning telur ayam *Single Comb Leghorn* berusia 24 minggu yang diimunisasi dengan *P. gingivalis* secara subkutan pada sayap ayam sehingga didapatkan IgY yang spesifik terhadap *P. gingivalis* pada kuning telurnya. Menurut Nakai *et al.*, produktivitas antibodi Ig Y dari kuning telur ayam 18 kali lebih besar daripada yang berasal dari kelinci. Pemilihan ayam didasarkan pada jenis ayam dan usia ayam, semua jenis ayam betina dapat menghasilkan IgY (Kovacs *et al*, 2012). IgY kemudian diaplikasikan pada sampel. Sampel yang digunakan sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

Immunoglobulin Y (IgY) dari kuning telur ayam dapat dipurifikasi melalui metode *Hight Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Protein antibodi IgY dipisahkan melalui tahapan pengendapan dengan ammonium sulfat, dialisis, pengendapan dengan *polyethylinglycol* (PEG), dan akhirnya dilakukan ke dalam kolom FPLC. IgY yang dihasilkan melalui metode HPLC menunjukkan hasil yang lebih murni dibandingkan dengan metode lainnya.

Hasil purifikasi IgY kemudian dianalisis apakah benar terdapat IgY dari hasil purifikasinya dengan menggunakan uji SDS-PAGE, yaitu dilihat dari berat molekulnya. Hasil visualisasi berat molekul IgY melalui SDS-PAGE disajikan pada Gambar 5.1 dan Gambar 5.2. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pully D pada tahun 2011, IgY memiliki berat molekul sebesar 180 kDa dan

memiliki dua rantai protein yakni HC dan LC. HC terdapat pada kisaran angka 60-80 kDa serta LC terdapat pada kisaran angka 20-30 kDa. Pada hasil purifikasi IgY, HC terdapat pada kisaran angka 62-70 kDa serta LC pada kisaran 22-29 kDa. Apabila dibandingkan kedua hasil SDS-PAGE ini menunjukkan kemiripan, sehingga dapat dikatakan hasil uji SDS-PAGE pada IgY penelitian ini berhasil dan hasilnya mendekati teori. Sehingga dapat disimpulkan terdapat IgY pada protein kuning telur yang telah diisolasi.

Metode selanjutnya adalah melakukan uji *Western Blot* yang bertujuan untuk menguji apakah antibodi IgY yang didapatkan dari kuning telur ayam merupakan antibodi yang spesifik terhadap OMP dari *P.gingivalis*. *Immunoblotting (Western Blotting)* digunakan antibodi IgY dan sebagai antigen adalah OMP bakteri *P.gingivalis*.

Hasil SDS-PAGE pada literatur (Franca M, 2007), menunjukkan bahwa profil pita protein OMP mempunyai berat molekul sekitar 40 kDa. Hasil pengujian *Western Blotting* (Gambar 5.4) menunjukkan adanya pita protein yang muncul dengan berat molekul sekitar 40 kDa pada membran. Pita protein ini menunjukkan adanya ikatan antigen OMP *P.gingivalis* dengan antibodi IgY pada membran NC. Adanya kemiripan berat molekul yang ditunjukkan melalui teknik *Western Blot* dan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein yang dimaksud sama yaitu protein yang diyakini sebagai OMP *P.gingivalis*. Hal ini dibuktikan dengan munculnya satu pita protein pada sampel perlakuan dengan berat molekul sekitar 40 kDa sebagai konfirmasi bahwa isolat protein hasil isolasi OMP *P.gingivalis* merupakan antigen yang mampu dikenali secara spesifik oleh antibodi IgY. Pernyataan tersebut telah sesuai dengan pernyataan

Sasaki *et al.* tahun 2009 yang menyatakan bahwa OMP *P.gingivalis* merupakan protein dengan berat molekul sekitar 40 kDa.

Vaksinasi adalah pemberian vaksin ke dalam tubuh individu untuk memberikan kekebalan terhadap suatu penyakit. Pemberian vaksin pada prinsipnya dapat mencegah terjadinya infeksi. Vaksinasi dapat menggunakan vaksin aktif maupun vaksin pasif.

Kekebalan atau sistem imun yang terbentuk dapat terjadi secara pasif dan aktif. Penelitian ini menggunakan prinsip imunitas pasif. Antibodi yang diberikan berasal dari luar tubuh (dari hewan). Berbeda dengan imunitas aktif, dimana yang diberikan adalah antigen yang dilemahkan virulensinya. Antibodi yang dipindahkan secara pasif memberikan perlindungan yang cepat dan segera, tetapi karena cepat dikatabolisis, perlindungan ini makin berkurang. Imunisasi ulang atau keterpaparan pada agen infeksi akan membentuk kekebalan sekunder. Imunitas aktif merupakan perlindungan yang tidak terbentuk dengan segera (sekitar 1-2 minggu), namun sekali terbentuk akan berlangsung lama (Tizard, 2007).

Pemberian vaksin IgY pada tikus menggunakan *syringe* berukuran 30 gauge. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa injeksi vaksin maupun bakteri pada tikus dilakukan pada gigi insisif tikus, namun tikus hanya memiliki gigi insisivus dan gigi lain yang bentuknya serupa dan tidak memiliki kemiripan dengan gigi manusia. Oleh karena itu, IgY diinjeksikan pada sulkus gingiva pada gigi insisivus tikus. Vaksin diberikan selama satu kali. Onset vaksin IgY adalah beberapa jam dan IgY dapat memberikan proteksi selama beberapa minggu hingga 3 sampai 4 bulan (Kovacs *et al.*, 2012).

Keesokan harinya hewan coba diinjeksikan dengan antigen yaitu OMP *P. gingivalis*. Injeksi dilakukan sebanyak 0,2 ml selama 3 hari sekali dalam 2 minggu (Ermawati T, 2013). Pada saat penelitian, didapatkan 1 ekor tikus mengalami pembengkakan 1 jam setelah injeksi vaksin IgY hal ini dapat disebabkan karena sistem imun tikus yang lemah, belum diabsorbsinya vaksin, atau kurang tepat saat meletakkan jarum ke sulkus gingiva tikus. Bentuk sediaan vaksin yang diaplikasikan berupa cairan IgY yang telah dicampur dengan PBS kemudian diaplikasikan secara injeksi intrasulkus. Sediaan obat berupa cairan memiliki kerugian karena mudah larut dalam saliva dan retensi dalam poket periodontal yang kurang baik (Kailash dan Singh, 2014). Sediaan vaksin IgY dalam bentuk cairan mudah larut dalam saliva dan mempengaruhi efek kerja dari vaksin IgY. Pada akhir penelitian sampel 30 ekor tikus tetap hidup dan tidak ada yang mati, tikus didekaputasi dan diambil serum darah dari jantungnya sebanyak 3 cc untuk kemudian dilakukan pengukuran kadar MMP-8 dalam serum darah tikus.

Pada penelitian ini vaksin IgY langsung diinjeksikan pada tikus setelah dibuat. Namun, Vaksin IgY juga dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu sebelum diinjeksikan. Lamanya penyimpanan vaksin dan serum darah tikus perlu dapat mempengaruhi keakuratan hasil penelitian. Penyimpanan vaksin IgY di dalam *ice box* pada saat akan dilakukan perlakuan ke tikus memungkinkan dapat mempengaruhi kandungan maupun efektivitas dari vaksin terhadap bakteri *P. gingivalis*, sehingga menyebabkan efektivitas konsentrasi pada beberapa perlakuan memiliki hasil yang kurang optimal. Pemantauan suhu penyimpanan vaksin sangat penting dalam menetapkan apakah vaksin masih layak digunakan atau tidak, atau rentan dan mudah rusak. Suhu yang baik untuk menjaga kualitas vaksin adalah $2^{\circ} - 8^{\circ}$ C dan faktor lain yang dapat mempengaruhi rusaknya

vaksin yakni melampaui masa kadaluarsa, kualitas penyimpanan vaksin dan cara membawa vaksin dari suatu tempat ke tempat yang lain. Rantai dingin (*cool chain*) adalah suatu prosedur yang digunakan untuk menjaga vaksin pada suhu tertentu sampai disuntikkan atau diteteskan pada sasaran (Pracoyo *et al.*, 2013). Aktivitas IgY dapat dipertahankan cukup lama pada suhu 37 °C. Aktivitas IgY masih baik sampai jangka waktu 6 bulan dan bahkan dapat dipertahankan selama 10 tahun pada penyimpanan suhu 4 °C (Michael *et al.*, 2010). Selain itu, kualitas serum darah tikus sebagai sampel penelitian juga harus diperhatikan, Serum darah tikus dapat disimpan selama 1 bulan dalam suhu 4 °C, selain itu dapat juga disimpan selama 1 tahun jika disimpan dalam 25-50% gliserol, dan jika disimpan selama beberapa tahun pada suhu -20 °C hingga -80°C.

Pengukuran kadar MMP-8 pada penelitian ini menggunakan ELISA Kit MMP-8 *Rat*. Beberapa prosedur membutuhkan ketelitian yang tinggi seperti teknik pengambilan serum darah. Teknik pengambilan serum darah yang tidak benar dapat mempengaruhi keakuratan hasil uji ELISA Kit. Sampel yang telah digunakan berkali-kali pun juga dapat mempengaruhi konsentrasi yang akan diteliti karena ada resiko terpapar kontaminan.

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar MMP-8 pada kelompok kontrol negatif (K-) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) dengan pemberian OMP bakteri *P. gingivalis* saja tanpa pemberian vaksin IgY menunjukkan kadar yang lebih tinggi dan perbedaannya sangat tinggi. Dimana hal ini diduga bahwa *P. gingivalis* mengeluarkan produk virulensi di daerah yang diinjeksikan bakteri tanpa pemberian IgY sebagai vaksin dan imunoterapi, sehingga pada saat diakhir penelitian terlihat kadar MMP-8 mengalami

peningkatan yang sangat tinggi dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol lainnya.

Kelompok perlakuan (P1, P2, P3) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan data yang tidak signifikan. Artinya data tersebut tidak berbeda (sama). Namun, berdasarkan hasil uji kadar MMP-8, IgY mampu menurunkan kadar MMP-8 dilihat dari gambar 5.5 yaitu menurunnya kurva kadar MMP-8 pada kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Pemberian IgY dengan dosis 15 $\mu\text{g/ml}$ sudah mampu untuk menurunkan kadar MMP-8 secara drastis jika dibandingkan dengan kadar MMP-8 pada kelompok kontrol positif (K+), namun kadar MMP-8 tersebut masih jauh jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-). Artinya, dosis IgY sebesar 15 $\mu\text{g/ml}$ belum efektif untuk menurunkan kadar MMP-8 untuk kembali ke kondisi semula atau kondisi sehat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian vaksin IgY dapat menurunkan kadar MMP-8 pada hewan coba. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin ini telah bekerja. Dari ketiga kelompok perlakuan, vaksin dengan dosis 45 $\mu\text{g/ml}$ merupakan dosis yang paling efektif untuk mencegah periodontitis yang ditandai dengan kadar MMP-8 yang lebih rendah dari kelompok perlakuan lain. Hal ini dikarenakan IgY bekerja dengan mengikat zat antigenik bakteri (LPS, OMP, atau flagella) kemudian menghambat adhesi mikroba ke permukaan sel, menekan kolonisasi mikroba pada sulkus gingiva dengan mencegah penyebaran sel ke sel, menggumpalkan bakteri dengan membuat mikroba tidak bergerak dan mati, menghambat aktivitas enzim, netralisasi aktivitas toksin (Rahman *et al*, 2013) sehingga kadar MMP-8 sebagai mediator proinflamasi berkurang.

Uji korelasi person menunjukkan hasil R square = 0,35, hal ini menunjukkan bahwa vaksin IgY dapat menurunkan kadar MMP-8 sebesar 35%.

Sisanya dapat disebabkan oleh faktor lain seperti factor fisiologis, psikologis, dan pola makan yang dapat berpengaruh pada kondisi saat dilakukannya penelitian. Uji korelasi ini menunjukkan hubungan antara dua variabel atau lebih dan merupakan angka yang menunjukkan arah dan juga kuatnya hubungan antar dua variabel atau lebih. Hubungan dua variabel pada penelitian ini menunjukkan angka negatif, artinya jika dosis dinaikkan, maka kadar dari variabel yang diteliti menurun. Penelitian ini ditunjukkan dengan peningkatan dosis IgY diikuti dengan kadar MMP-8 yang menurun.

Kelemahan dari penelitian ini adalah belum diketahui secara pasti efektivitasnya bila digunakan pada manusia dan belum mengetahui secara pasti apakah tikus benar-benar dalam kondisi periodontitis, gingivitis ataupun trauma karena penyakit periodontal merupakan penyakit multifaktorial dengan faktor host, bakteri, dan waktu yang saling mempengaruhi terjadinya inflamasi periodontal. Peneliti berpedoman pada jurnal penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa tikus model periodontitis dapat dilakukan selama 2 minggu, maka dari itu kelemahan lainnya yakni mengenai waktu perlakuan yang terlalu singkat karena pada awal penelitian diharapkan tikus mengalami periodontitis, namun beberapa sumber menyebutkan bahwa kondisi periodontitis akan berlangsung cukup lama dalam hitungan bulan.

Penelitian selanjutnya diharapkan penelitian ini dikembangkan dengan menggunakan vaksin maupun ekstrak lainnya untuk mencegah peningkatan kadar MMP-8. Sebaiknya juga dilakukan pemeriksaan klinis untuk melihat secara klinis bahwa kondisi tikus telah mengalami periodontitis, yaitu dengan dilakukan *probing* menggunakan probe, pemeriksaan kerusakan tulang dan resesi *gingiva*.

