

**SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI PROTEIN ANTIGENIK STADIUM SKIZON  
*Leucocytozoon sp.* YANG DIISOLASI DARI AYAM BURAS**



Oleh :

**MARGARET WIJAYANTI**  
NIM 060213070

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**

**IDENTIFIKASI PROTEIN ANTIGENIK STADIUM SKIZON  
*Leucocytozoon sp.* YANG DIISOLASI DARI AYAM BURAS**

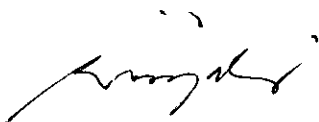
Skripsi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

**MARGARET WIJAYANTI**  
**NIM 060213070**

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



**(Rimayanti, drh., M.Kes.)**  
Pembimbing Pertama



**(Nunuk Dyah R.L., drh., M.S.)**  
Pembimbing Kedua

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Identifikasi Protein Antigenik Stadium Skizon *Leucocytozoon sp.* Yang Diisolasi Dari Ayam Buras**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 13 Agustus 2006

Margaret Wijayanti  
NIM. 060213070

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 25 Agustus 2006

### KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Hj. Endang Suprihati, drh., M.S.  
Sekretaris : Dr. Suwarno, drh., M.Si.  
Anggota : Kuncoro Puguh Santoso, drh., M.Kes.  
Pembimbing I : Rimayanti, drh., M.Kes.  
Pembimbing II : Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., M.S.

Telah diuji pada

Tanggal : 8 September 2006

### KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Hj. Endang Suprihati, drh., M.S.

Anggota : Dr. Suwarno, drh., M.Si.

Kuncoro Puguh Santoso, drh., M.Kes.

Rimayanti, drh., M.Kes.

Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., M.S.

Surabaya, 13 September 2006

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, drh., M.S.

NIP. 130687297

## **THE IDENTIFICATION SCHIZONT ANTIGENIC PROTEIN OF *Leucocytozoon sp.* ISOLATED FROM LOCAL CHICKEN**

Margaret Wijayanti

### **ABSTRACT**

The aim of this research is to identify the molecular weight of schizont antigenic protein of *Leucocytozoon sp.* It should be noted that the schizont antigenic protein that was being observed in this research was isolated from local chicken. In order to reach the aim, first, the schizont of *Leucocytozoon sp.* was isolated from pancreas of local chicken. Furthermore, this schizont protein of *Leucocytozoon sp.* in the pancreas was isolated by sonication technique. After that, the sample was injected to two rabbits to produce polyclonal antibody and then, the antibody titer was measured by ELISA method. Finally, the schizont antigenic protein of *Leucocytozoon sp.* was identified by *immunoblotting (Western blot)*. In conclusion the result showed that schizont of *Leucocytozoon sp.* has four antigenic protein fractions. They were 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, and 35,48 kDa.

**Key words :** schizont of *Leucocytozoon sp.*, local chicken

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian yang dibiayai proyek DUE-LIKE Batch III ini dapat diselesaikan dengan baik.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi atas pemberian dana DUE-LIKE Batch III di Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Ismudiono, drh., M.S. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Rimayanti, drh., M.Kes. selaku pembimbing pertama dan Nunuk Dyah Retno L., drh., M.S. selaku pembimbing kedua atas bimbingan dan dukungannya dalam penulisan skripsi ini. Ririen Ngesti Wahyuti, drh., M.Kes. dan Mufasirin, drh., M.Si. atas bantuan yang diberikan selama penelitian.

Hj. Endang Suprihati, drh., M.S. selaku ketua penguji atas bimbingan yang diberikan selama penelitian dan kritik serta sarannya. Dr. Suwarno, drh., M.Si. selaku sekretaris penguji dan Kuncocro Puguh S., drh., M.Kes. selaku anggota penguji yang telah berkenan menguji dan memberikan kritik serta saran demi kesempurnaan skripsi ini.

Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. selaku Koordinator Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Direktur Tropical Disease Centre Universitas Airlangga beserta seluruh staf atas fasilitas yang diberikan selama penelitian.

Ayah, ibu, dan kakak-kakak penulis yang memberikan semangat, dukungan, dan doa. Teman-teman satu penelitian, teman-teman angkatan 2002 serta semua pihak yang membantu dalam penelitian yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu atas dukungan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran sangat penulis harapkan demi perbaikan karya tulis ini. Penulis berharap karya tulis ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Juni 2006

Penulis



## DAFTAR ISI

|   | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN PERNYATAAN .....  | ii      |
| HALAMAN IDENTITAS .....   | iii     |
| ABSTRACT .....  | v       |
| UCAPAN TERIMA KASIH .....   | vi      |
| DAFTAR ISI .....  | viii    |
| DAFTAR TABEL .....  | x       |
| DAFTAR GAMBAR .....   | xi      |
| DAFTAR LAMPIRAN .....   | xii     |
| SINGKATAN .....   | xiii    |
| <br>  |         |
| BAB 1 PENDAHULUAN .....   | 1       |
| 1.1 Latar Belakang Penelitian .....   | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....   | 3       |
| 1.3 Landasan Teori .....  | 4       |
| 1.4 Tujuan Penelitian .....   | 5       |
| 1.5 Manfaat Penelitian .....  | 5       |
| <br>  |         |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....  | 6       |
| 2.1 <i>Leucocytozoon sp.</i> .....  | 6       |
| 2.1.1 Taksonomi .....   | 6       |
| 2.1.2 Etiologi .....  | 6       |
| 2.1.3 Siklus Hidup .....  | 7       |
| 2.1.4 Patogenitas .....   | 8       |
| 2.1.5 Diagnosis .....   | 9       |
| 2.1.6 Pengendalian .....  | 11      |
| 2.2 Respons Imun terhadap Infeksi Protozoa .....  | 12      |
| 2.3 Antigen Parasit .....   | 14      |
| 2.4 Antibodi Parasit .....  | 15      |
| <br>  |         |
| BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN .....  | 16      |
| 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....   | 16      |
| 3.2 Materi Penelitian .....   | 16      |
| 3.2.1 Unit Analisis .....   | 16      |
| 3.2.2 Bahan dan Alat Penelitian .....   | 16      |
| 3.3 Metode Penelitian .....   | 17      |
| 3.3.1 Isolasi Stadium Skizon <i>Leucocytozoon sp.</i> .....                               | 17      |
| 3.3.2 Isolasi Protein <i>Whole Skizon Leucocytozoon sp.</i> .....                         | 18      |
| 3.3.3 SDS-PAGE ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ) ..... | 18      |
| 3.3.4 Produksi Antibodi Poliklonal dari Protein Skizon <i>Leucocytozoon sp.</i> .....     | 20      |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.5 <i>Immunoblotting (Western blot)</i> .....  | 21 |
| 3.4 Analisis Data .....   | 22 |
| 3.5 Kerangka Alur Penelitian .....  | 23 |
| <b>BAB 4 HASIL PENELITIAN</b> .....   | 24 |
| 4.1 Hasil Pengukuran Titer Antibodi Menggunakan ELISA ...   | 24 |
| 4.2 Hasil <i>Immunoblotting</i> Protein <i>Whole Stadium</i> Skizon<br><i>Leucocytozoon sp.</i> ..... | 25 |
| <b>BAB 5 PEMBAHASAN</b> .....   | 26 |
| <b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....   | 29 |
| 6.1 Kesimpulan .....  | 29 |
| 6.2 Saran .....   | 29 |
| <b>RINGKASAN</b> .....  | 30 |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....   | 32 |
| <b>LAMPIRAN</b> .....   | 35 |

## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| 4.1 Nilai OD hasil pengujian antibodi poliklonal terhadap antigen skizon <i>Leucocytozoon sp.</i> dengan <i>indirect</i> ELISA ..... | 24      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Skema siklus hidup <i>Leucocytozoon sp.</i> .....                         | 8       |
| 3.1 Kerangka alur penelitian .....  | 23      |
| 4.1 Hasil <i>immunoblotting</i> protein skizon <i>Leucocytozoon sp.</i> ..... | 25      |

## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran                           | Halaman |
|------------------------------------|---------|
| 1. Perhitungan berat molekul ..... | 35      |

## SINGKATAN

|              |  |
|--------------|--|
| Th           | : <i>T helper</i>  |
| MHC          | : <i>Major Histocompatibility Complex</i>                          |
| IFN $\gamma$ | : <i>Interferon gamma</i>  |
| Tc           | : <i>T cytotoxic</i>   |
| CD           | : <i>Cluster of Differentiation</i>                                |
| Fab          | : <i>Fragment Antigen Binding</i>                                  |
| Fc           | : <i>Fragment crystallisable</i>                                   |
| ELISA        | : <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>                         |
| AGPT         | : <i>Agar Gel Precipitation Test</i>                               |
| SDS PAGE     | : <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |

**BAB I**  
**PENDAHULUAN**

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Indonesia merupakan negara agraris sehingga mayoritas penduduk Indonesia memiliki mata pencaharian di sektor pertanian termasuk di dalamnya peternakan, perkebunan, dan pertanian itu sendiri. Indonesia juga merupakan salah satu negara dengan penduduk terbesar di dunia. Jumlah penduduk yang besar menyebabkan kebutuhan masyarakat yang besar pula di berbagai bidang termasuk bidang pangan baik hewani maupun nabati. Pembangunan di sektor pertanian khususnya peternakan diperlukan untuk meningkatkan taraf ekonomi masyarakat dan memenuhi permintaan masyarakat akan kebutuhan pangan terutama pangan hewani.

Laju pembangunan di bidang peternakan dipengaruhi pula oleh beberapa faktor penghambat. Salah satu faktor yang perlu diperhatikan adalah adanya penyakit ternak. Penyebab penyakit ternak bisa berasal dari bakteri, jamur, parasit, dan virus. Penyakit parasiter yang disebabkan oleh protozoa merupakan salah satu penyakit yang sering menyerang ternak dan menyebabkan kerugian bagi peternak.

Leucocytozoonosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa darah genus *Leucocytozoon* yang banyak menyerang unggas termasuk ayam. Species *Leucocytozoon* yang menyerang ayam di Asia Tenggara adalah *Leucocytozoon caulleryi*. *Leucocytozoon sabrazesi* juga dapat menyerang ayam di



Asia Tenggara termasuk Indonesia, tetapi jarang ditemukan (Levine, 1995). Sejak tahun 1912 leucocytozoonosis pada ayam telah dikenal di Sumatera oleh E.von Prowazek dan kini penyakit ini telah tersebar luas di Indonesia (Akoso, 2001). Infovet (2002) melaporkan bahwa kejadian leucocytozoonosis di Indonesia menunjukkan peningkatan yang cukup tinggi memasuki bulan Mei 2001 dan dari data yang dihimpun kejadian kasus ini sampai bulan Juni 2001 sudah mencapai angka 5% dari total kasus penyakit unggas yang berhasil ditemukan di lapangan dan dilakukan diagnosa. Hal yang serupa juga dilaporkan oleh Saragih (2006). Hasil penelitian Saragih (2006) menunjukkan tingginya angka kejadian leucocytozoonosis pada bulan Juli sampai Agustus 2005 di beberapa pasar tradisional di Surabaya yaitu sebesar 42%. Selain angka kejadian yang tinggi, menurut Springer seperti dikutip Nurwulandari (1996), leucocytozoonosis dapat menimbulkan kerugian ekonomi berupa kematian dan terhambatnya pertumbuhan pada ayam muda serta penurunan bahkan penghentian produksi telur pada ayam dewasa.

Leucocytozoonosis dapat didiagnosis dengan melakukan pengamatan gejala klinis, pemeriksaan pasca mati, pemeriksaan darah, pemeriksaan preparat sentuh organ, dan pemeriksaan gerusan organ. Diagnosis melalui pengamatan gejala klinis secara tepat sulit dilakukan karena gejala klinis yang ditunjukkan mirip dengan gejala klinis penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium sp.* Selain itu, ayam sering menunjukkan gejala klinis yang berat dan kematian pada saat terjadi proses skizogoni sebelum terjadi proses gametogoni. Parasit sulit dideteksi pada proses skizogoni di jaringan sehingga sering ayam mati sebelum

terdiagnosis dengan jelas (Soulsby, 1982). Diagnosis konvensional seperti ini tidak akurat sehingga perlu dikembangkan suatu metode diagnosis yang spesifik dan dapat mendeteksi leucocytozoonosis secara dini pada ayam. Metode diagnosis yang dapat digunakan adalah diagnosis secara serologis seperti ELISA dan AGPT. Penelitian tentang *Leucocytozoon sp.* secara molekuler telah dilakukan oleh Gotanda *et al.*(2002) yang mendapatkan berat molekul protein skizon *Leucocytozoon caulleryi* berkisar antara 10-270 kDa dan penelitian Isobe *et al.*(1998) yang mendapatkan berat molekul protein skizon yang bereaksi dengan serum ayam yang terinfeksi *Leucocytozoon caulleryi* yaitu 36 kDa, 58 kDa, 71 kDa, 81 kDa, 112 kDa, dan 123 kDa. Diharapkan dengan adanya diagnosis yang tepat, pengendalian leucocytozoonosis dapat dilakukan dengan cepat dan tepat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* sebagai bahan diagnostik terhadap adanya infeksi *Leucocytozoon sp.* pada ayam. Diharapkan dengan cara diagnosis tersebut hasilnya akan lebih cepat dan spesifik dibandingkan dengan pengamatan gejala klinis, pengamatan pasca mati, pemeriksaan darah, pemeriksaan preparat sentuh organ, dan pemeriksaan gerusan organ.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berapa berat molekul protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang diisolasi dari ayam buras?

### 1.3 Landasan Teori

Leucocytozoonosis adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh protozoa darah genus *Leucocytozoon*. Urquhart *et al.*(1987) melaporkan bahwa diagnosis protozoa darah termasuk *Leucocytozoon sp.* tergantung pengenalan dan pembedaan protozoa darah pada pemeriksaan hapusan darah. Masalah yang timbul berkaitan dengan leucocytozoonosis adalah ayam sering menunjukkan gejala klinis yang berat bahkan kematian pada saat terjadi proses skizogoni dari parasit, sebelum terjadi proses gametogoni dimana dalam stadium ini parasit berada dalam darah. Pada proses skizogoni di jaringan, parasit sulit dideteksi sehingga ayam sering mati sebelum terdiagnosa dengan jelas (Soulsby, 1982).

Gotanda *et al.*(2002) melaporkan berat molekul protein skizon dengan metode SDS-PAGE berkisar antara 10 sampai 270 kDa. Isobe *et al.*(1998) mendapatkan beberapa protein skizon bereaksi dengan serum ayam yang terinfeksi *Leucocytozoon caulleryi*. Protein tersebut memiliki berat molekul sebagai berikut : 36 kDa, 58 kDa, 71 kDa, 81 kDa, 97 kDa, 112 kDa, dan 123 kDa. Berdasarkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi dapat dikembangkan kit diagnostik yang diharapkan mampu mendeteksi leucocytozoonosis secara dini dan akurat seperti yang dilakukan Ito *and* Gotanda (2005) yang melakukan penelitian menggunakan antigen skizon *Leucocytozoon caulleryi* yang dilapiskan pada media latex untuk mendeteksi antibodi ayam yang terinfeksi leucocytozoonosis. Hasilnya ditemukan metode yang mudah, cepat, dan sensitif untuk mendeteksi antibodi *Leucocytooon caulleryi*.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan berat molekul protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang diisolasi dari ayam buras.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi ilmiah tentang protein antigenik dari stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang diisolasi dari ayam buras.
2. Diharapkan mampu membantu pengembangan diagnosis yang akurat untuk leucocytozoonosis yang selama ini masih dilakukan secara konvensional.

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Leucocytozoon sp.*

##### 2.1.1 Taksonomi

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| Phylum   | : Apicomplexa              |
| Class    | : Sporozoa                 |
| Subclass | : Coccidia                 |
| Ordo     | : Eucoccidiida             |
| Subordo  | : Haemosporina             |
| Family   | : Haemoproteidae           |
| Genus    | : <i>Leucocytozoon</i>     |
| Species  | : <i>Leucocytozoon sp.</i> |

(Sumber : Levine seperti dikutip Heryanto dkk.,  
2003)

##### 2.1.2 Etiologi

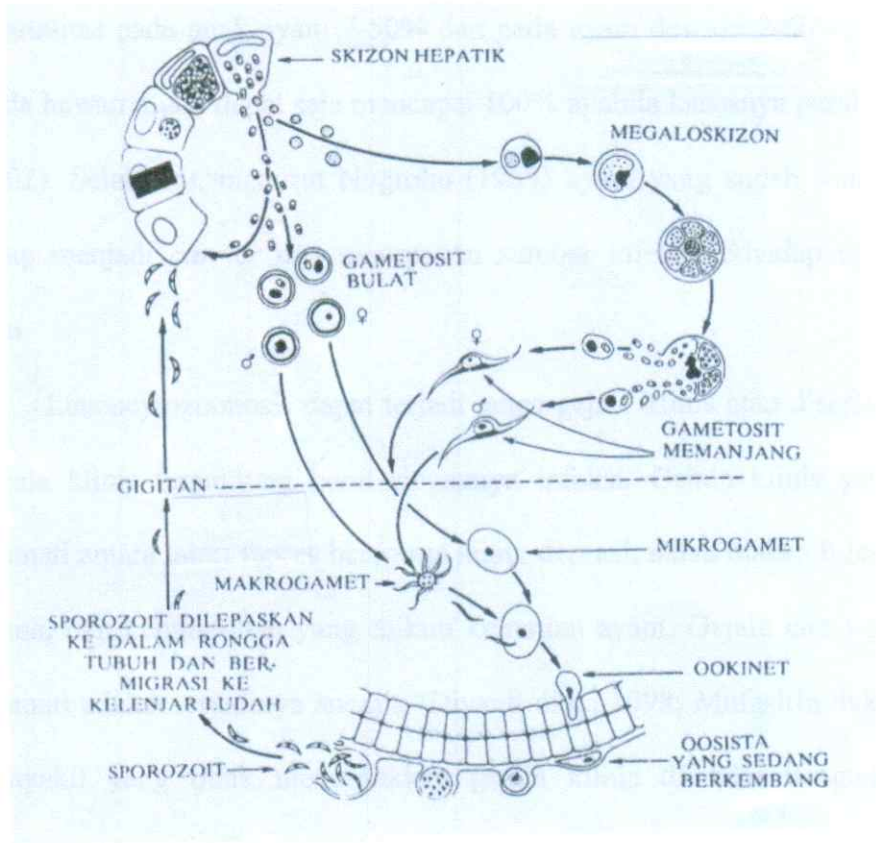
*Leucocytozoonosis* yang disebut juga *malaria like* unggas pada ayam disebabkan oleh *Leucocytozoon caulleryi* dan *Leucocytozoon sabrazezi*. *Leucocytozoon caulleryi* memiliki gamet masak berbentuk bulat dengan ukuran 15,5x15 $\mu$ m dan terletak di dalam sel darah merah dan sel darah putih yang membesar sehingga berdiameter sekitar 20 $\mu$ m. Skizon terutama terdapat dalam ginjal, hati, dan paru-paru serta dapat membentuk megaloskizon yang

berdiameter 26-300 $\mu$ m. Penularannya melalui gigitan vektor *Culicoides sp.* *Leucocytozoon sabraezesi* memiliki gamet masak berbentuk memanjang sekitar 22-24x4-7 $\mu$ m dan terdapat di dalam sel darah merah atau sel darah putih yang membesar sekitar 67x6 $\mu$ m. Vektornya diduga adalah *Simulium sp.* (Levine, 1994; Levine, 1995).

### 2.1.3 Siklus Hidup

Induk semang (ayam) tertular leucocytozoonosis karena gigitan vektor yang mengandung sporozoit. Sporozoit masuk ke dalam sel endotel pembuluh darah ayam dan mengalami proses skizogoni menghasilkan skizon dalam jaringan ginjal, hati, paru-paru, dll. Skizon dapat membentuk megaloskizon. Merozoit dihasilkan di dalam skizon. Merozoit yang terbebas akan menginfeksi sel baru dan berkembang secara skizogoni atau sebagian merozoit masuk ke dalam eritrosit atau leukosit. Merozoit berkembang menjadi gametosit di dalam eritrosit atau leukosit dan apabila eritrosit atau leukosit ini pecah, parasit dapat hidup dalam plasma darah. Selanjutnya, darah yang mengandung gametosit dihisap oleh vektor (Wahyuti, 2003).

Dikatakan oleh Mufasirin dkk. (2000), dalam tubuh nyamuk gametosit mengalami fertilisasi membentuk zigot. Zigot hasil fertilisasi gametosit menjadi ookinet dan menembus sel endotel usus vektor dan membentuk ookista yang mengandung sporozoit. Sporozoit yang terdapat di dalamnya akan terbebas dan menuju kelenjar ludah vektor apabila ookista pecah. Vektor yang terinfeksi akan menularkan penyakit ke induk semang baru.



Gambar 2.1. Skema siklus hidup *Leucocytozoon sp.* (Noble and Noble, 1982)

#### 2.1.4 Patogenitas

*Leucocytozoonosis* dapat menyerang semua ayam. Menurut Manuel seperti dikutip Johnson and Copeman (1983) ayam muda lebih peka terhadap infeksi *Leucocytozoon sp.* daripada ayam dewasa. Hal ini didukung oleh Morii dan Kitaoka seperti dikutip Heryanto dkk. (2003) yang melaporkan bahwa ayam-ayam di bawah umur 7 hari memiliki kepekaan yang sangat tinggi terhadap *leucocytozoonosis*. Kepekaan ini secara bertahap akan menurun sejalan dengan bertambahnya umur. *Leucocytozoonosis* menyebabkan angka kesakitan sebesar 0-40% pada anak ayam dan pada ayam dewasa 7-40%.



nafsu makan, lemah, muntah darah, faeces hijau, anemia, dan kelumpuhan yang diikuti kematian ayam. Diagnosis leucocytozoonosis secara tepat berdasarkan pengamatan gejala klinis sulit dilakukan karena kemiripan gejala klinis yang timbul dengan gejala klinis penyakit unggas lainnya seperti ILT, malaria unggas, dan gumboro. Selain itu, leucocytozoonosis tidak selalu disertai gejala klinis tetapi dapat berjalan tanpa disertai gejala klinis (Diyanti dkk., 1998).

Diagnosis leucocytozoonosis juga dapat dilakukan dengan mengamati perubahan pasca mati. Perubahan pasca mati yang dapat ditemukan adalah adanya ptechiae atau echimose pada berbagai jaringan dan organ tubuh (otot dada, otot paha, pankreas, ginjal, bursa fabricius, dll), adanya gumpalan darah dalam rongga perut dan saluran pernafasan, dan membengkaknya hati dan limpa (Nugroho, 1989).

Cara diagnosis yang lain melalui preparat ulas darah dan preparat sentuh organ. Diagnosis penyakit melalui preparat ulas darah dan preparat sentuh organ didasarkan atas penemuan stadium merozoit dan gametosit. Stadium gametosit dapat ditemukan dalam darah perifer 14 hari setelah infeksi. Makrogametosit dengan pewarnaan Giemsa berwarna biru gelap dengan inti kompak dan dapat terlihat vakuola, sedangkan mikrogametosit bentuknya lebih kecil dengan sitoplasma tercat lebih terang, inti diffuse, dan tercat merah muda (Mufasirin dkk., 2000).

Pemeriksaan histopatologi juga dapat digunakan sebagai salah satu cara untuk mendiagnosis leucocytozoonosis. Menurut Ressay seperti dikutip

Nurwulandari (1996) pada pemeriksaan histopatologi dapat ditemukan stadium skizon dan megaloskizon melalui gerusan berbagai organ seperti pankreas, timus, ginjal, paru-paru, dll.

Menurut Isobe *et al.*(1998) diagnosis secara serologis juga dapat dipakai untuk mendiagnosis leucocytozoonosis. Metode diagnosis secara serologis yang dipakai adalah AGPT (*Agar Gel Precipitation Test*) dan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

#### 2.1.6 Pengendalian

Pencegahan penyakit dapat dilakukan dengan menjaga sanitasi kandang dan peralatan peternakan (membersihkan, mencuci, menyemprot kandang dan peralatan peternakan dengan desinfektan), mencegah hewan liar dan hewan peliharaan lain masuk ke lingkungan kandang serta menjaga agar orang yang tidak berkepentingan tidak sering keluar masuk kandang. Tindakan pencegahan lain yang dapat dilakukan adalah manajemen peternakan (jumlah ayam dalam kandang, ventilasi kandang, dll) dengan baik sehingga ayam tidak mudah stres, melaksanakan sistem *all in all out*, dan mengusahakan pengendalian vektor (Diyanti dkk., 1998). Salah satu pengendalian vektor yang dapat dilakukan adalah penggunaan abate celatom 2% untuk mengontrol larva *Simulium sp.* (Springer, 1991). Menurut Smith seperti dikutip Wahyuti (2003) pengendalian vektor juga dapat dilakukan dengan cara membakar semak-semak yang merupakan tempat peristirahatan vektor, menggunakan *light trap* atau insektisida, dan menghindari kontak

dengan vektor dengan memakai jaring yang lebih halus dari kelambu yang telah dicelup dengan repellent.

Penyakit dapat diobati dengan 1 ppm pyrimethamine, 50 ppm sulfonamide, 125 ppm clodol. Obat-obat tersebut tidak efektif untuk stadium skizon akhir dan gamet. Pemberian 30-40 ppm sulfamonomethoxine pada makanan selama 29 hari dimulai 2 hari sebelum terinfeksi sporozoit dapat mencegah penyakit (Mufasirin dkk., 2000; Levine, 1995). Diyanti dkk. (1998) menambahkan vitamin dapat diberikan juga sebagai terapi suportif setelah pemberian obat selesai.

## **2.2 Respons Imun terhadap Infeksi Protozoa**

Saat induk semang terinfeksi oleh agen penyakit (protozoa), tubuh induk semang akan mengadakan reaksi untuk mengenali apakah agen penyakit tersebut merupakan *self* antigen atau *non self* antigen dan apabila tubuh mengenali agen penyakit tersebut sebagai *non self* antigen, akan timbul respon-respon imun untuk mengeliminasi agen penyakit tersebut (Kresno, 2001).

Respon imun tubuh terhadap infeksi protozoa terdiri dari 2 macam yaitu respon imun alami dan respon imun daptan. Respon imun alami merupakan respon imun tubuh yang terdepan dalam menghadapi benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Respon alami terhadap protozoa adalah dengan fagositosis, tetapi kebanyakan protozoa dapat bertahan dan bereplikasi di dalam makrofag (Abbas and Lichtman, 2003).

Respon imun dapatan merupakan respon imun yang didapat dari paparan agen-agen penyakit. Imunitas yang dimediasi oleh sel yaitu pengaktifan makrofag oleh sel Th1 melalui sitokin dibutuhkan untuk mengeliminasi protozoa yang mampu bertahan dalam makrofag. Makrofag yang terinfeksi menampilkan MHC II pada permukaan selnya. Sel CD4+ Th1 spesifik mengenal peptide protozoa yang berhubungan dengan MHC II dan melepaskan IFN $\gamma$  yang mengaktifkan makrofag sehingga makrofag yang terinfeksi dapat memfagositosis protozoa yang ada di dalamnya (Roitt,2003). Selain dalam makrofag, protozoa juga dapat bereplikasi di dalam berbagai macam sel induk semang dan melisiskan sel itu sehingga menstimulasi respon antibodi spesifik dan sel Tc. Antibodi berperan dalam mencegah invasi sel dan mengopsonisasi protozoa sehingga mudah difagositosis, sedangkan sel Tc lebih berperan dalam imunitas terhadap parasit intraseluler dengan cara membunuh langsung sel yang terinfeksi protozoa maupun dengan mensekresi sitokin yang dapat mengaktifasi sel tersebut menghasilkan nitric oxide dan sel lain untuk membunuh parasit. Menurut Abbas *and* Lichtman (2003), protozoa dapat luput dari pengawasan sistem imun karena dua hal yaitu protozoa tinggal di dalam sel induk semang dan mempunyai variasi antigenik dengan merubah antigen permukaan mereka selama siklus hidup dalam induk semang vertebrata misal : stadium sporozoit *Leucocytozoon sp.* yang antigennya berbeda dari merozoit. Saat sistem imun merespon infeksi sporozoit, protozoa tersebut telah berdiferensiasi dan memiliki antigen baru yang bukan merupakan target sistem imun untuk dieliminasi.

### 2.3 Antigen Parasit

Istilah antigen mempunyai dua arti yaitu untuk menyatakan suatu molekul yang merangsang timbulnya respon imun yang disebut juga imunogen dan untuk menyatakan suatu molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi yang disebut juga hapten (Roitt, 2003). Hapten pada umumnya berupa bahan kimia dengan berat molekul rendah yang akan bereaksi dengan antibodi yang sudah ada dan hanya menjadi imunogenik bila diikat oleh makromolekul yang disebut *carrier* (Baratawidjaja, 1996). Bagian antigen yang diikat oleh antibodi disebut determinan atau epitop. Jumlah epitop pada satu molekul berbeda dengan jumlah epitop pada antigen lain (Roitt *et al.*, 1998).

Protozoa memiliki ukuran lebih besar dari bakteri dan virus sehingga banyak mengandung antigen baik dalam jumlah maupun jenisnya. Beberapa diantaranya spesifik untuk stadium tertentu (Roitt, 2003). Protozoa merupakan parasit intraseluler yang antigennya dapat dijumpai pada saat invasi dan banyak ditemukan pada permukaan sel yang terinfeksi (Rantam, 2003).

Makromolekul dibutuhkan sebagai *carrier* apabila berat molekul terlalu kecil sehingga *carrier*-hapten menjadi bersifat imunogen. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk imunisasi yang pada umumnya dalam prosedur imunisasi, protein antigen dicampur dengan ajuvan untuk meningkatkan konsentrasi sirkulasi antibodi (Roitt, 2003).

## 2.4 Antibodi Parasit

Antibodi adalah protein serum terlarut yang dihasilkan karena adanya rangsangan antigen yang akan beredar di seluruh jaringan dan sirkulasi darah. Antibodi dihasilkan oleh sel limfosit B yang diaktivasi oleh sel Th-CD4 dalam mekanisme imun dan selanjutnya akan diproduksi oleh sel plasma (Roitt *et al.*, 1998).

Molekul antibodi terdiri dari dua rantai berat yang identik dan dua rantai ringan yang identik dan keempatnya bergabung melalui ikatan disulfide antar rantai. Molekul antibodi akan terpotong menjadi fragmen Fab yang identik yang merupakan antigen *binding site* dan satu fragmen Fc yang tidak mempunyai kemampuan mengikat antigen oleh enzim papain (Baratawidjaja, 1996).

Lima macam imunoglobulin yang dapat ditemukan dalam tubuh yaitu IgG, IgM, IgA, IgD, dan IgE. IgG dan IgM dilaporkan mengalami peningkatan pada infeksi malaria (Roitt, 2003). Hasil penelitian Nakata *et al.* (2003) menunjukkan bahwa IgG berperan dalam meningkatkan aktivitas fagositosis pada ayam yang terinfeksi leucocytozoonosis.

Antibodi dapat dikoleksi dari serum hewan yang mempunyai titer tinggi atau produksi serum dengan cara membuat infeksi buatan apabila diperlukan untuk imunodiagnosis (Rantam, 2003).

**BAB III**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB 3

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan dimulai pada bulan Juli sampai dengan Desember 2005 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, *Tropical Disease Center* UNAIR.

#### 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Unit Analisis

Unit analisis penelitian ini adalah *whole extract* stadium skizon *Leucocytozoon sp.* dari organ pankreas.

##### 3.2.2 Bahan dan Alat Penelitian

Jenis bahan dan alat yang diperlukan untuk penelitian adalah sebagai berikut :

###### a. Elektroforesis dengan SDS-PAGE 12%

Alat yang digunakan adalah peralatan untuk elektroforesis lengkap dengan *power supply*, mikropipet, pipet tip, *eppendorf*, *waterbath*, dan peralatan gelas lainnya. Bahan-bahan yang digunakan antara lain acrylamide, bis acrylamide, Tris HCl pH 8,8, Tris HCl pH 6,8, SDS 0,5%, TEMED,



amonium persulfat 10%, aquades, *electrophoresis buffer*, *Laemmli buffer*, Commasie brilliant blue R-250, metanol 50%, metanol 20%, asam asetat 10%, dan sampel protein.

#### **b. Immunoblotting (Western blot)**

Peralatan yang diperlukan adalah peralatan untuk *immunoblotting*, mikropipet, pipet tip, dan peralatan gelas lainnya. Bahan-bahan yang diperlukan adalah gel hasil elektroforesis tanpa diwarnai dan dicuci, transfer *buffer*, kertas *Whatmann*, membran nitroselulose, creamer 4%, antibodi primer (serum kelinci yang telah diimunisasi dengan protein stadium skizon *Leucocytozoon sp.*), konjugat (IgG anti kelinci berlabel alkalin phosphatase), dan substrat *Western Blue Ready*.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Isolasi Stadium Skizon *Leucocytozoon sp.***

Ayam yang diduga terinfeksi *Leucocytozoon sp.* diambil darahnya lalu diperiksa dengan pewarnaan Giemsa untuk menemukan gametosit. Ayam yang darahnya positif terdapat gametosit diseksi dan organ-organ visceral seperti hepar, paru-paru, ren, limpa, dan pankreas diambil serta dibuat gerusan organ satu per satu kemudian diperiksa di bawah mikroskop untuk melihat ada atau tidaknya stadium skizon *Leucocytozoon sp.* Organ yang mengandung skizon tersebut dicuci dengan PBS sebanyak 3-5 kali hingga bersih kemudian diinkubasikan dalam PBS sebanyak 10 ml pada cawan petri dengan suhu 37°C selama semalam. Organ-organ tersebut siap untuk diisolasi proteinnya. Setelah

dilakukan SDS-PAGE, pita protein yang timbul dari organ pankreas perbedaannya lebih terlihat jelas sehingga hanya organ pankreas yang digunakan sebagai sampel protein SDS-PAGE.

### **3.3.2 Isolasi Protein *Whole Stadium Skizon Leucocytozoon sp.***

Organ pankreas yang mengandung skizon digerus kemudian disonikasi pada 30kHz selama 30 detik diulang sebanyak 5 kali dengan interval diam antar sonikasi selama 1 menit. Larutan hasil sonikasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil dan siap digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci. Sampel protein untuk SDS-PAGE didialisis semalam sebelum digunakan dan konsentrasinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Konsentrasi protein *whole stadium skizon Leucocytozoon sp.* yang didapatkan adalah 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **3.3.3 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gels Electrophoresis*)**

#### **a. Mencetak *running gel* 12%**

Bahan-bahan *running gel* 12% dicampur sampai homogen (acrylamide 2,5 ml, Tris HCl pH 8,8 1,2 ml, SDS 0,5% 1,2 ml, aquades 1,1 ml, TEMED 50 $\mu$ l, APS 10% 30 $\mu$ l) kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam gelas plate sampai kira-kira 1 cm dari atas. Butanol ditambahkan di atasnya sampai penuh dan dibiarkan selama 25 menit pada suhu kamar agar *running*

*gel* padat. Setelah *gel* padat, butanol dibuang dan dibersihkan dengan kertas filter.

#### **b. Mencetak *stacking gel* 12%**

Caranya sama seperti cara mencetak *running gel*. Bahan-bahan *stacking gel* 12% dicampur hingga homogen (acrylamide 0,66 ml, Tris HCl pH 6,8 0,8 ml, SDS 0,5% 0,8 ml, aquades 0,8 ml, TEMED 4 $\mu$ l, APS 10% 20 $\mu$ l) kemudian campuran tersebut dimasukkan di atas *running gel* hingga penuh. *Comb* dimasukkan dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 15-25 menit sampai *stacking gel* menjadi padat. Langkah terakhir yaitu melepaskan dan membersihkan *comb* serta mencuci *stacking gel* dengan *electrophoresis buffer*.

#### **c. Persiapan sampel**

Sampel sebanyak 15 $\mu$ l dicampur dengan *Laemmli buffer* dengan perbandingan 2:1 lalu dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah dilubangi tutupnya dengan jarum  $\frac{1}{2}$  tusukan. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit.

#### **d. Elektroforesis**

Tahap ini dimulai dengan memasang gelas plate pada alat elektroforesis lalu dituangi *electrophoresis buffer*. Sampel dan marker yang telah dibuat dimasukkan ke dalam lubang *comb* dan apabila terdapat gelembung udara dihilangkan dengan jarum. Marker yang digunakan adalah protein dengan berat molekul 14,4-200 kDa. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 125 V

dan kuat arus 40 mA. Proses ini dihentikan setelah warna biru turun seluruhnya.

Gel hasil elektroforesis dilepaskan pelan-pelan dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi larutan pewarna commasie blue (commasie brilliant blue R-250 0,25 g, methanol 50% 40 ml, asam asetat 10% 10 ml) sampai timbul pita-pita proteinnya. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam campuran metanol 20% sebanyak 200 ml, asam asetat 10% 100 ml, dan aquades sebanyak 700 ml sambil digoyang sampai gel menjadi jernih. Gel tersebut dapat disimpan dalam larutan gliserol 10%.

#### **3.3.4 Produksi Antibodi Poliklonal dari Protein Skizon *Leucocytozoon sp.***

Kelinci yang digunakan adalah kelinci jantan dewasa sehat. Kelinci ini disuntik protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan dosis 200 $\mu$ g dan ajuvan komplit secara subkutan dengan perbandingan 1:1 (500 $\mu$ l:500 $\mu$ l). Setelah 2 minggu, dilakukan *booster* dengan dosis sama tetapi menggunakan ajuvan inkomplit dan *booster* berikutnya dilakukan 1 minggu setelah *booster* sebelumnya dengan ajuvan inkomplit. *Booster* dilakukan terus hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama, dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Setelah terjadi peningkatan titer antibodi (post imunisasi VI), dilakukan pemanenan serum melalui vena auricularis.

### 3.3.5 Immunoblotting (Western blot)

Gel hasil elektroforesis protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan SDS-PAGE dilakukan *immunoblotting (Western blot)* menggunakan antibodi poliklonal dari stadium skizon *Leucocytozoon sp.*

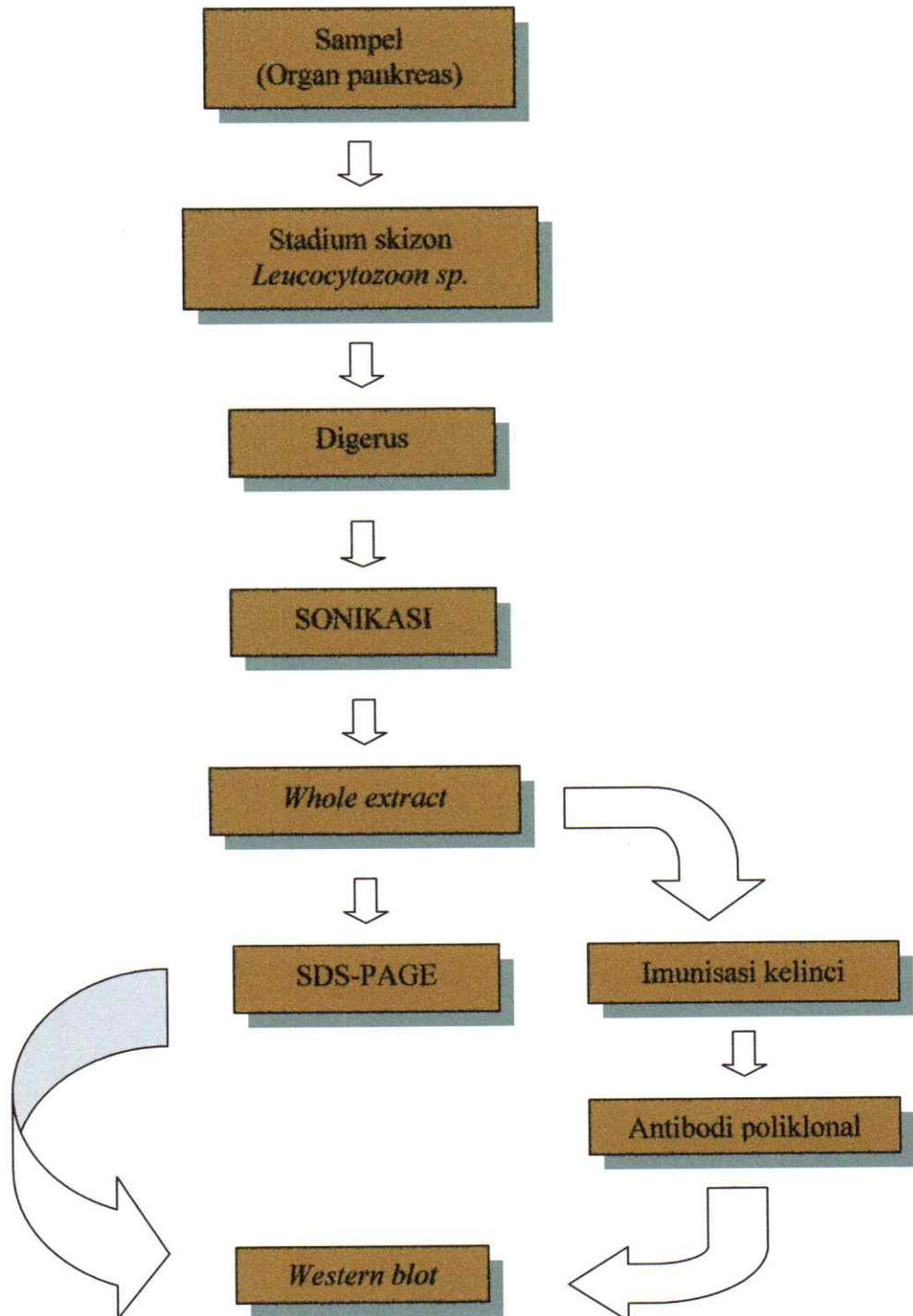
Kertas *Whatmann* dan membran nitroselulose yang akan digunakan dipotong sebesar gel kemudian direndam transfer *buffer*. Kertas *Whatmann* yang sudah dibasahi dengan transfer *buffer* diletakkan pada blotter sebanyak 4 lapis kemudian membran nitroselulose diletakkan di atas lapisan terakhir dan dihindarkan dari adanya rongga udara. Gel hasil elektroforesis diletakkan di atas membran dan dihindarkan dari adanya rongga udara kemudian di atas gel diletakkan kertas *Whatmann* yang sudah dibasahi transfer *buffer* sebanyak 4 lapis. Seluruh lapisan dibasahi dengan transfer *buffer*. Blotter ditutup kuat-kuat dan dijalankan pada 100 V dengan kuat arus 40 mA selama 1 jam. Setelah selesai, membran nitroselulose diambil pelan-pelan dan dimasukkan ke dalam TBS lalu dipindahkan ke cawan petri baru. Tahap selanjutnya membran *blocking* dengan creamer 4% dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali masing-masing selama 10 menit di atas *shaker*. Membran nitroselulose direndam dalam larutan berisi antibodi primer (serum kelinci yang diimunisasi protein *whole* skizon *Leucocytozoon sp.*) dengan *buffer* inkubasi (1:5) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Membran nitroselulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali masing-masing selama 10 menit dengan *shaker*. Tahap berikutnya membran

nitrosellulose direndam dengan antibodi sekunder (IgG anti kelinci berlabel alkalin phosphatase) dalam *buffer* inkubasi dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Selanjutnya, membran nitrosellulose dicuci dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali masing-masing selama 10 menit dengan *shaker* dan sekali tanpa Tween. Membran divisualisasikan dengan pewarnaan *Western Blue Ready* sampai terlihat pita proteinnya. Reaksi dihentikan dengan memindahkan membran nitrosellulose ke dalam aquades kemudian membran nitrosellulose dikeringkan pada suhu kamar dan hasil siap dianalisis.

### 3.4 Analisis Data

Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing pita (Rantam, 2003). Nilai Rf dianalisis dengan regresi kubik menggunakan SPSS 11.5.

### 3.5 Kerangka Alur Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Alur Penelitian

**BAB IV**  
**HASIL PENELITIAN**



## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Hasil Pengukuran Titer Antibodi Menggunakan ELISA

Protein *whole* stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang didapatkan digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci. Peningkatan titer antibodi yang terjadi dapat diketahui dengan menggunakan metode ELISA. Hasil pengukuran titer antibodi selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Nilai OD hasil pengujian antibodi poliklonal terhadap antigen skizon *Leucocytozoon sp.* dengan *indirect* ELISA

| X \ Y   | PBS   | Kontrol | I     | II    | III   | IV    | V     | VI    |
|---------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PBS     | 0,035 | 0,056   | 0,028 | 0,030 | 0,032 | 0,032 | 0,041 | 0,062 |
| 1 : 5   | 0,045 | 0,878   | 1,147 | 1,356 | 1,356 | 1,591 | 2,113 | 2,131 |
| 1 : 10  | 0,057 | 0,465   | 0,470 | 0,572 | 0,549 | 0,772 | 1,117 | 1,290 |
| 1 : 20  | 0,030 | 0,232   | 0,276 | 0,328 | 0,294 | 0,582 | 0,655 | 0,555 |
| 1 : 40  | 0,029 | 0,153   | 0,193 | 0,212 | 0,194 | 0,273 | 0,432 | 0,405 |
| 1 : 80  | 0,028 | 0,124   | 0,139 | 0,131 | 0,116 | 0,167 | 0,225 | 0,262 |
| 1 : 160 | 0,023 | 0,101   | 0,113 | 0,096 | 0,116 | 0,148 | 0,166 | 0,193 |

Keterangan : X : post imunisasi Y : pengenceran

I : post imunisasi I

IV : post imunisasi IV

II : post imunisasi II

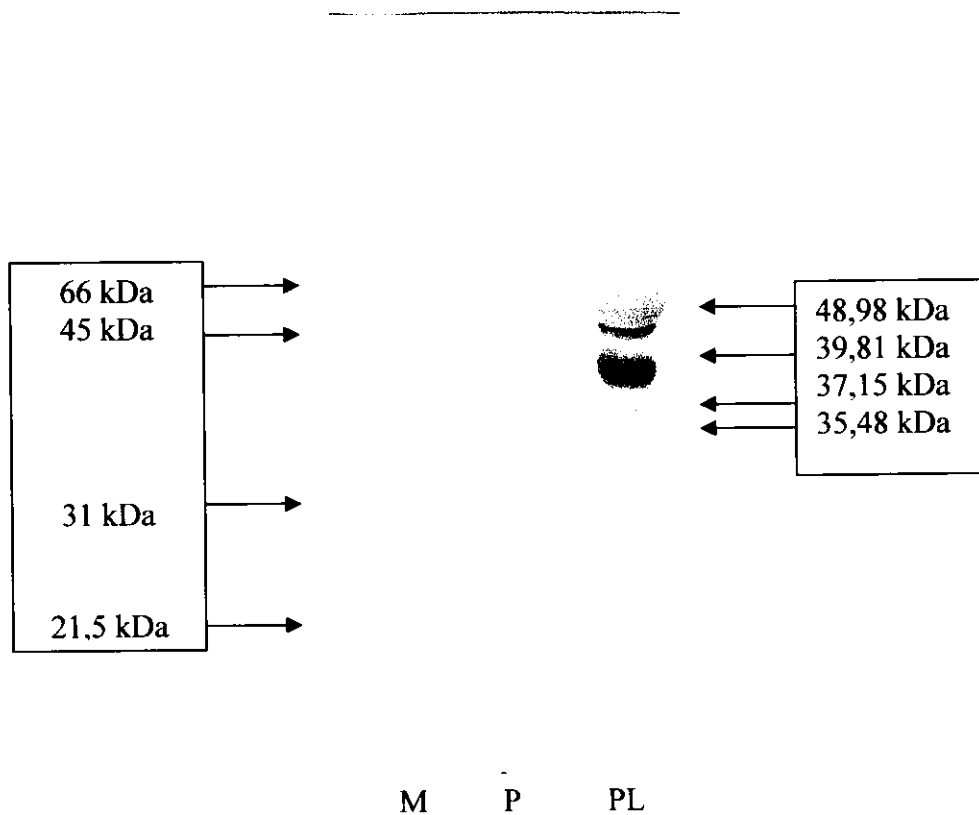
V : post imunisasi V

III : post imunisasi III

VI : post imunisasi VI

#### 4.2 Hasil *Immunoblotting* Protein *Whole Stadium Skizon Leucocytozoon sp.*

Hasil fraksinasi protein *whole Leucocytozoon sp.* dengan metode SDS-PAGE didapatkan 6 fraksi protein yaitu 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, 35,48 kDa, 30,2 kDa, dan 23,99 kDa. Dari 6 fraksi protein tersebut didapatkan 4 pita protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* antigenik yaitu 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, dan 35,48 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Hasil *immunoblotting* protein skizon *Leucocytozoon sp.*

- Keterangan :
- kolom M : marker
  - kolom P : protein pankreas
  - kolom PL : protein skizon *Leucocytozoon sp.*

**BAB V**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 5

### PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan stadium skizon *Leucocytozoon sp.* karena stadium skizon merupakan stadium yang pertama kali dibentuk di dalam tubuh induk semang (ayam), dapat menyebabkan gejala klinis yang berat bahkan kematian, dan stadium ini sulit dideteksi di jaringan. Diharapkan dengan melakukan penelitian ini, didapatkan protein skizon *Leucocytozoon sp.* yang dapat digunakan untuk kit diagnostik dalam mendiagnosis leucocytozoonosis secara akurat dan dini. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari organ pankreas. Pada awal penelitian digunakan beberapa organ yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp.* seperti hepar, ren, paru-paru, pankreas, dan limpa tetapi setelah dilakukan SDS-PAGE ternyata perbedaan pita protein yang dihasilkan organ pankreas lebih terlihat jelas.

Penelitian ini menggunakan teknik ELISA dan SDS-PAGE. Teknik ELISA digunakan untuk mengetahui peningkatan titer antibodi pada kelinci dengan memakai indikator enzim (Kresno, 2001). Model ELISA yang digunakan dalam penelitian ini adalah *indirect* ELISA. Prinsip *indirect* ELISA adalah melapiskan antigen pada *mikroplate* dan direaksikan dengan antibodi. Selanjutnya, ditambahkan antibodi sekunder berlabel enzim dan akhirnya menambahkan substrat (Rantam, 2003).

Teknik SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui berat molekul protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan protein marker selain itu pemisahan protein dengan metode SDS-PAGE juga dapat digunakan untuk menentukan kadar relatif dari protein dalam sampel berdasarkan intensitas warna (Smith, 1995). Tebal tipisnya pita protein merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen dan jumlah sampel yang dimasukkan ke dalam sumuran. Semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi proteinnya. Demikian pula jika sampel yang dimasukkan ke dalam sumuran semakin banyak, akan semakin tebal pita protein yang dihasilkan.

Prinsip dasar metode SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel dalam hal ini yang digunakan adalah *polyacrilamide*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu.

Gel hasil elektroforesis protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan SDS-PAGE kemudian dilakukan *immunoblotting* dengan metode *Western blot*. *Western blot* digunakan untuk mengidentifikasi kadar relatif dan berat molekul suatu protein spesifik dalam suatu campuran berbagai jenis protein. Metode ini menggabungkan selektivitas elektroforesis gel dengan spesifisitas immunoassay sehingga setiap jenis protein dapat dideteksi dan dianalisis menggunakan antibodi yang sesuai (Kresno, 2001). Pertama kali protein dianalisis dengan teknik SDS-

PAGE dan didapatkan protein dengan berat molekul berbeda yang terpisah pada gel. Setelah itu, protein pada gel ditransfer ke membran nitroselulose dengan proses kapiler (blotting) sehingga membran tersebut mendapatkan replika dari susunan makromolekul seperti yang terdapat pada gel. Protein yang diikat pada membran dapat mempertahankan antigenitasnya dan dengan mudah direaksikan dengan antibodi. Posisi protein antigen pada membran dapat dideteksi dengan cara mereaksikannya dengan antibodi spesifik berlabel enzim yang menghasilkan sinyal chemiluminesen maka bercak chemiluminesen pada film yang menunjukkan posisi ikatan antigen-antibodi yang dicari merupakan ukuran berat molekul dan kadar antigen (Abbas *and* Lichtman, 2000).

Hasil *immunoblotting* yang menunjukkan protein antigen skizon *Leucocytozoon sp.* menampilkan 4 macam pita protein masing-masing dengan berat molekul 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, dan 35,48 kDa. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang diperoleh Isobe *et al.*(1998) yaitu berkisar antara 25-300 kDa. Pita protein dengan berat molekul 48,98 kDa dan 39,81 kDa yang tercatat lebih tebal dibandingkan 2 protein lainnya mempunyai reaktivitas yang tinggi sehingga dapat dikatakan bahwa kedua protein tersebut mempunyai sensitivitas yang tinggi sebagai bahan antigen diagnostik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Isobe *et al.*(1994) yang mendapatkan bahwa hampir semua pita protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan berat molekul antara 25-300 kDa bereaksi dengan serum ayam yang terinfeksi leucocytozoonosis tetapi yang paling bereaksi kuat adalah pita protein dengan berat molekul 44 kDa, 58 kDa, 67 kDa, dan 180 kDa.



**BAB VI**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari identifikasi protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang diisolasi dari ayam buras, didapatkan 4 fraksi protein yang antigenik dengan berat molekul yaitu 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, dan 35,48 kDa.

#### 6.2 Saran

Dari hasil penelitian dapat diberikan saran sebagai berikut :

1. Penggunaan protein skizon *Leucocytozoon sp.* yang antigenik dengan berat molekul 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, dan 35,48 kDa untuk produksi antibodi poliklonal spesifik yang dapat digunakan untuk membuat kit diagnostik.
2. Pemisahan protein yang imunogenik dari protein skizon *Leucocytozoon sp.* yang antigenik sehingga protein yang imunogenik tersebut mungkin dapat digunakan sebagai vaksin.



## RINGKASAN

Leucocytozoonosis merupakan salah satu penyakit protozoa darah yang disebabkan oleh genus *Leucocytozoon*. Penyakit ini kini telah tersebar luas di Indonesia dan dapat menimbulkan kerugian ekonomi berupa kematian, terhambatnya pertumbuhan pada ayam muda, dan penurunan bahkan penghentian produksi telur.

Selama ini diagnosis leucocytozoonosis dilakukan melalui pemeriksaan hapusan darah untuk melihat adanya stadium gamet dan pemeriksaan gerusan organ untuk mengetahui adanya stadium skizon *Leucocytozoon sp.* Cara diagnosis seperti ini kurang akurat dan sering terlambat. Oleh karena itu, diagnosis secara serologis perlu dikembangkan untuk menegakkan diagnosis secara cepat dan akurat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan berat molekul protein antigenik stadium skizon *Leucocytozoon sp.* yang diisolasi dari ayam buras yang nantinya dapat digunakan sebagai penelitian lanjutan biologi molekuler untuk membuat bahan diagnostik.

Stadium skizon *Leucocytozoon sp.* diisolasi dari organ pankreas ayam buras yang terinfeksi leucocytozoonosis kemudian protein skizon *Leucocytozoon sp.* diisolasi dengan teknik sonikasi. Sebagian protein hasil sonikasi digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci dan titer antibodi ditentukan melalui uji ELISA. Sebagian protein hasil sonikasi lainnya dapat digunakan sebagai sampel SDS-PAGE. Selanjutnya, dilakukan *immunoblotting* untuk mendeteksi fraksi protein antigenik yang dinyatakan dengan berat molekul.

Hasil penelitian menunjukkan 4 fraksi protein yang antigenik dengan berat molekul sebagai berikut : 48,98 kDa, 39,81 kDa, 37,15 kDa, dan 35,48 kDa. Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan penggunaan protein antigenik dengan berat molekul seperti telah disebutkan di atas untuk produksi antibodi poliklonal yang dapat digunakan untuk membuat kit diagnostik dan perlunya dilakukan pemisahan protein yang bersifat imunogenik dari protein yang antigenik sehingga protein yang imunogenik tersebut mungkin dapat digunakan sebagai vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas,A.K. and A.H.Lichtman. 2003. *Cellular and Immunology*. 5<sup>th</sup> ed. Saunders. Philadelphia.
- Akoso,B.T. 2001. Kesehatan Unggas. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 110-112.
- Baratawidjaja,K.G. 1996. Imunologi Dasar. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Diyanti,R.,J.Jahja, dan T.Suryani. 1998. Penyakit-Penyakit Penting pada Ayam. Medion. Bandung. 76-78.
- Gotanda,T.,M..Doi,Y.Eiguchi,Y.Tanaka,S.Kobayashi and Y.Fujisaki. 2002. *Characterization of Monoclonal Antibodies Against the Second – Generation Schizonts of Leucocytozoon Caulleryi*. J.Vet Med Sci. 64(3):281-283.
- Heryanto,A.,I.Suryanto dan R.Situmeang. 2003. Leucocytozoonosis. Buletin Veterinaria Farma. 3(1) : 15-23.
- Infovet. 2002. Yang Muda, Yang Stres, Yang Terserang Leucocytozoonosis. Infovet. Jakarta. 238-243.
- Isobe,T.,S.Shimizu,S.Yoshihara and K.Suzuki. 1994. Analysis of Schizont Antigen of *Leucocytozoon caulleryi* by SDS-PAGE and western blot. Res Vet Sci. 56(1) : 123-125.
- Isobe,T.,S.Shimizu,S.Yoshihara and K.Suzuki. 1998. Immunoblot Analysis of Humoral Immune Responses to *Leucocytozoon caulleryi* in Chickens. J.Parasitol. 84(1) : 62-66.
- Ito,A. and T.Gotanda. 2005. *A Rapid Assay for Detecting Antibody Against Leucocytozoonosis in Chickens with a Latex Agglutination Test Using Recombinant R7 Antigen*. Avian Pathol. 34(1):15-19.
- Johnson,S.J. and D.B.Copeman. 1983. *Avian Protozoal Infections*. In : R.S.F Campbell (Ed.). Veterinary Epidemiology. Australian Universities International Development Program. Canberra. 211-213.
- Kresno,S.B. 2001. Imunologi:Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

- Levine, N.D. 1994. *Parasitologi Veteriner*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Levine, N.D. 1995. *Protozoologi Veteriner*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mufasirin, N.D.R., Lastuti, E., Suprihati, dan L.T. Suwanti. 2000. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Protozoa*. Laboratorium Entomologi dan Protozoologi FKH UNAIR. Surabaya. 36-41.
- Nakata, K., S. Watarai, H. Kodama, T. Gotanda, A. Ito and K. Kume. 2003. *Cellular Immune Responses in Chickens Induced by Recombinant R7 Leucocytozoon caulleryi Vaccine*. *J. Parasitol.* 89(2): 419-422.
- Noble, E.R. and G.A. Noble. 1982. *Parasitology The Biology of Animal Parasites*. 5<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Nugroho, E. 1989. *Penyakit Ayam di Indonesia*. Jilid II. Eka Offset. Semarang. 39-43.
- Nurwulandari, E. 1996. *Leukositozoonosis pada Ayam*. *Poultry Indonesia*. 194 : 12-13.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Roitt, I. 2003. *Imunologi : Essential Immunology*. Penerbit Widya Medika. Jakarta.
- Roitt, I., J. Brostoff and D. Male. 1998. *Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Mosby. London.
- Saragih, V.R.U. 2006. *Angka Kejadian Leucocytozoonosis yang Dijual pada Bulan Juli-Agustus 2005 di Beberapa Pasar Tradisional di Surabaya*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Soulsby, E.J.L. 1982. *Helminths, Arthropods, and Protozoa of Domesticated Animals*. The English Language Book Society and Bailliere-Tindall. London. 702-705.
- Smith, J.A. 1995. *Analysis of Proteins*. In : Ausubel, F.M. (Ed.). *Short Protocols in Molecular Biology*. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley and Sons Inc. Canada.
- Springer, W.T. 1991. *Other Blood and Tissue Protozoa*. In : B.W. Calnek (Ed.). *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press. Iowa.
- Urquhart, G.M., J. Armour, J.L. Duncan, A.M. Dunn, and F.W. Jennings. 1987. *Veterinary Parasitology*. Longman Scientific and Technical. Essex.

Wahyuti, R.N. 2003. Potensi Lalat *Culicoides* terhadap Prevalensi Leucocytozoonosis pada Ayam. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.



# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Perhitungan Berat Molekul

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Dependent Variable.. LOGBM

Method.. LINEAR

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R           ,96600  
 R Square             ,93315  
 Adjusted R Square   ,92201  
 Standard Error       ,10874

## Analysis of Variance :

|            | DF | Sum of Squares | Mean Square |
|------------|----|----------------|-------------|
| Regression | 1  | ,99029577      | ,99029577   |
| Residuals  | 6  | ,07094144      | ,01182357   |

F = 83,75605

Signif F = ,0001

-----Variables in the Equation-----

| Variable   | B         | SE B    | Beta     | T      | Sig T |
|------------|-----------|---------|----------|--------|-------|
| RF         | -1,162145 | ,126985 | -,965998 | -9,152 | ,0001 |
| (Constant) | 2,192402  | ,063802 |          | 34,363 | ,0000 |

Dependent Variable.. LOGBM

Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R           ,99695  
 R Square             ,99391



Adjusted R Square ,98934  
Standard Error ,04020

Analysis of Variance :

|            | DF | Sum of Squares | Mean Square |
|------------|----|----------------|-------------|
| Regression | 3  | 1,0547735      | ,35159117   |
| Residuals  | 4  | ,0064637       | ,00161592   |

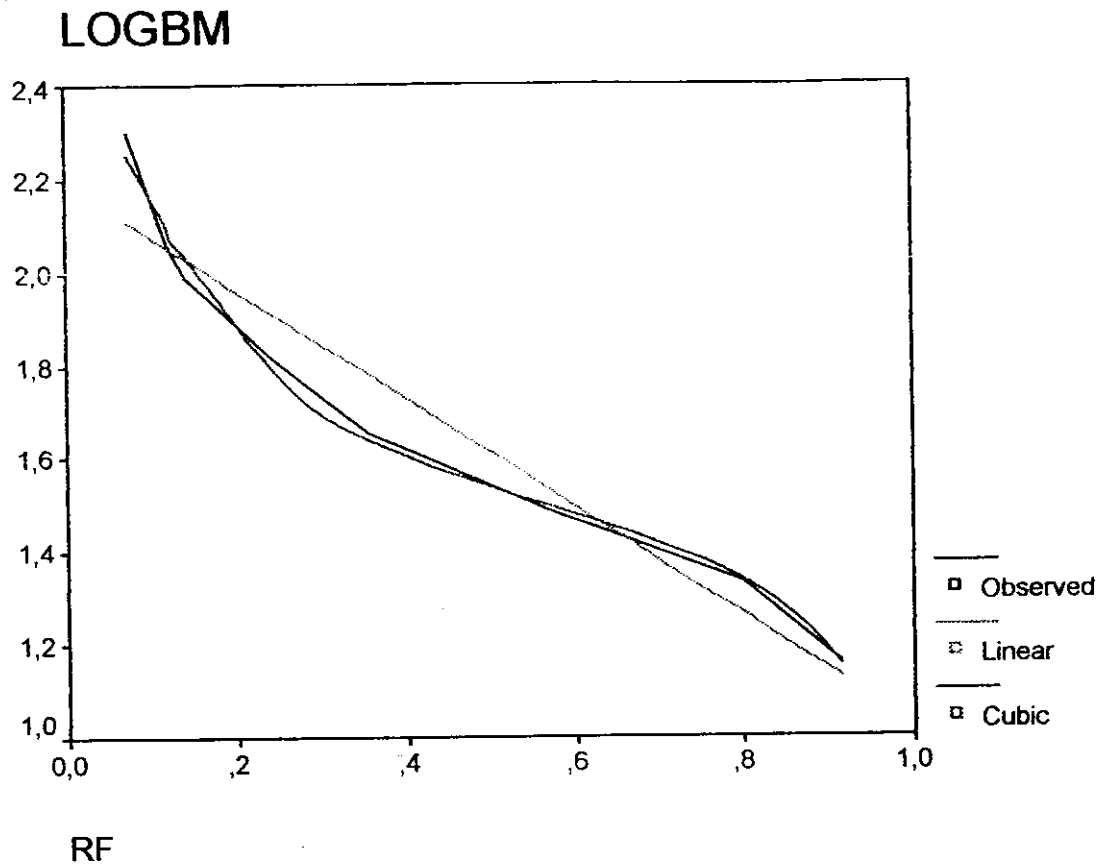
F = 217,57908

Signif F = ,0001

-----Variables in the Equation-----

| Variable   | B         | SE B     | Beta      | T      | Sig T |
|------------|-----------|----------|-----------|--------|-------|
| RF         | -4,704929 | ,640820  | -3,910831 | -7,342 | ,0018 |
| RF**2      | 7,497103  | 1,561933 | 6,182757  | 4,800  | ,0086 |
| RF**3      | -4,405864 | 1,062352 | -3,295110 | -4,147 | ,0143 |
| (Constant) | 2,558364  | ,065358  |           | 39,144 | ,0000 |

The following new variables are being created :



$$Y = 2,558364 - 4,704929 (x) + 7,497203 (x^2) - 4,405864 (x^3)$$

| Jarak (mm) | Rf (x) | Y (log BM) | BM    |
|------------|--------|------------|-------|
| 136,00     | ,76    | 1,38       | 23,99 |
| 108,00     | ,61    | 1,48       | 30,20 |
| 83,00      | ,47    | 1,55       | 35,48 |
| 76,00      | ,43    | 1,57       | 37,15 |
| 69,00      | ,39    | 1,60       | 39,81 |
| 55,00      | ,31    | 1,69       | 48,98 |