

**LAPORAN PENELITIAN
PROGRAM PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 1997/1998**



**KARAKTERISASI DAN ISOLASI ANTIGEN 20-21 kDa
dari SPOROSIT E. tenella SEBAGAI ANTIGEN
PEMERIKSAAN KOKSIDOSIS**

Peneliti :

Drh. Dadik Raharjo

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar
Kontrak Nomor : 35/PPIP/DPPM/97/PPIP/1997 tgl. 10 Juni 1997
Ditbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdikbud

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Maret 1998**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. Puslit dan Pembangunan Regional | 4. Puslit Lingkungan Hidup | 8. Puslit Kependudukan dan Pembangunan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 5. Puslit dan Pengembangan Gizi | 9. Puslit Bioenergi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 6. Puslit/Studi Wanita | 10. Puslit/Studi Kesehatan Reproduksi |
| | 7. Puslit Olahraga | |

Jl. Darmawangsa Dalam No. 2 Telp. (031) 5342322 Fax. (031) 5342322 Surabaya 60286

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN ILMU PENGETAHUAN DASAR

1. a. Judul Penelitian : Karakterisasi dan Isolasi Antigen 20-21 kDa dari Sporosoit E. tenella Sebagai Antigen Pemeriksaan Koksidirosis
b. Macam Penelitian : (X) Dasar () Terapan () Pengembangan
c. Kategori : I/II/III
2. Kepala Proyek Penelitian : Dadik Raharjo, drh.
a. Nama Lengkap dan Gelar : Dadik Raharjo, drh.
b. Jenis Kelamin : L/P
c. Pangkat/Gol. dan NIP. : Penata Muda Tk.I/III b/ 131837002
d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
e. Fakultas/Jurusan : Tropical Disease Centre
f. Univ./Inst./Akademi/ST *) : Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Imunologi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Tropical Disease Centre - Unair.
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan :
a. Nama Instansi : --
b. Alamat : --
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan
7. Biaya yang diperlukan : Rp 14.500.000,-
8. Seminar Hasil Penelitian
a. Dilaksanakan Tanggal : 22 April 1998
b. Hasil Penilaian : (---) Baik Sekali (V) Baik
() Sedang () Kurang

Surabaya, 2 April 1998

Mengetahui
Ketua TDC

Ketua Peneliti,

Dr. Yves Priyatna D., M.Sc.

Dadik Raharjo, drh.

359 278

NIP. 131 837 002

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372

KARAKTERISASI dan ISOLASI ANTIGEN 20-21 kDa
dari SPOROSIT *E. tenella* SEBAGAI
ANTIGEN PEMERIKSAAN KOKSIDIOSIS

(Dadik Raharjo*, Eddy Bagus Wasito* dan M.H. Effendi**)

RINGKASAN

Koksidiosis merupakan penyakit parasiter yang tersebar luas dan menyebabkan angka sakit dan kematian sampai 80 %.

Penanganan koksidiosis meliputi perbaikan manajemen, pengobatan berdasar diagnosis yang tepat dan untuk masa depan dapat dilakukan vaksinasi.

Protein dengan berat molekul 20-21 kDa yang diisolasi dari ookista *E. tenella* yang telah disporulasikan diharapkan mempunyai potensi sebagai imunogen sehingga dapat digunakan sebagai antigen untuk pemeriksaan dengan cara ELISA maupun sebagai kandidat vaksin.

Karakterisasi dan deteksi protein 20-21 kDa dilakukan dengan melalui tahapan : pengumpulan ookista dan mensporulasikannya, pemecahan protein menjadi fraksi-fraksi, pemisahan fraksi protein dengan sentrifugasi dan kromatografi serta deteksi berat molekul protein dengan elektroforesis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi protein 20-21 kDa terdapat sebagai filtrat dari larutan protein ookista *E. tenella* yang disporulasikan dan disentrifugasikan 17.000 rpm.

*. Tropical Disease Centre-Universitas Airlangga.

** . Lab. Epidemiologi, Zoonosa dan Kesehatan Lingkungan
FKH - UNAIR.

(L.P. Tropical Disease Centre Universitas Airlangga;
35/PFIPD/DPPM/97/PFIPD/1997, 10 Juni 1997)

CHARACTERIZATION and ISOLATION ANTIGEN
20-21 kDa from *e.tenella* SPOROZOID for
COCCIDIOSIS ANTIGEN

(Dadik Raharjo* . Eddy Bagus Wasito** dan M.H. Effendi**)

SUMMARY

Coccidiosis is parasitic disease which occur world wide and it has morbidity and mortality rate up to 80%.

Handling of Coccidiosis include improving management, treatment based on accuracy of diagnostic and vaccination for the future.

Molecular weight of 20-21 kDa protein was isolated from oocyst of *E. tenella* which have been sporulated, it was hoped have potential as immunogen and it can be used as antigen for detection by ELISA or as a vaccin candidat.

Characterization and detection of 20-21 kDa protein was done by this stage : oocyst collection, sporulation, protein disruption , protein separation used centrifugation and kromatographi than detection molecular weigh by electrophoresis.

The result of this study showed that 20-21 kDa of protein fragment was evident in filtrat of oocyst protein of *E. tenella* which had been sporulated and centrifugated at 17.000 rpm.

-
- *. Tropical Disease Centre-Universitas Airlangga.
**. Lab. Epidemiologi, Zoonosa dan Kesehatan Lingkungan
FKH - UNAIR.

(Rest. Inst. Tropical Disease Centre Unair;
35/PFIPD/DPPM/97/PFIPD/1997, June, 10 1997)

KATA PENGANTAR

Koksidiosis merupakan penyakit yang tersebar luas dan menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar pada ayam yang dipelihara secara intensif.

Penanganan koksidiosis dilakukan dengan pengobatan dan pencegahan melalui sanitasi yang baik maupun meningkatkan kekebalan hewan.

Penelitian ini berupaya untuk mendapatkan fraksi protein yang mempunyai daya imunogen yang baik sehingga dapat digunakan sebagai antigen.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof.dr. Soedarto, DTMH. Ph.D., sebagai Rektor Unair.
2. Prof.Dr. Noor Cholies Zaini., Ketua Lembaga Penelitian.
3. Prof.Dr.dr.Yoes Prijatna Dachlan,M.Sc. Ketua TDC-Unair.
4. Semua pihak yang telah membantu sampai selesainya penelitian ini.

Saran dan kritik penulis harapkan demi perbaikan laporan ini

Surabaya, 9 February 1997

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Ringkasan Penelitian	iii
Kata Pengantar	v
Daftar Isi	vi
I. Pendahuluan	1
II. Tinjauan Pustaka	4
III. Tujuan dan Manfaat Penelitian	9
IV. Metode Penelitian	10
V. Hasil dan Pembahasan	14
VI. Kesimpulan dan Saran	19
Daftar Pustaka	20

1. PENDAHULUAN

Latar Belakang.

Koksidiosis pada ayam merupakan penyakit parasiter yang disebabkan oleh koksidia dan *Eimeria tenella* merupakan spesies penyebab koksidiosis yang ditemukan pada seka ayam dan merupakan koksidia ayam paling patogen dan bertanggung jawab atas kerugian yang hebat.

USDA (1965) telah menaksir bahwa kerugian tahunan karena koksidiosis ini sebesar \$ 35 juta di Amerika Serikat karena kematian dan penyakit saja belum termasuk ongkos pencampuran obat dalam pakan unggas dan berbagai ongkos pekerja dan ongkos lainnya yang diperlukan karena berjangkitnya penyakit.

Penyakit ini dapat mengakibatkan kematian dan angka sakit sampai 80% jika tidak diobati dan dapat menyebabkan penurunan berat badan, penghambatan masa bertelur, penurunan produksi telur dan tidak efisiennya penggunaan pakan (Anonimus, 1981).

Penularan penyakit ini terjadi karena termakannya ookista yang telah bersporulasi. Pencegahannya tidak bisa dilakukan dengan hanya mengatur cara beternak saja meskipun pada lingkungan alamiah mungkin bisa terbentuk

kekebalan yang lebih baik jika terjadi infeksi berulang-ulang dengan dosis yang kecil dibanding dengan infeksi dengan dosis besar yang terjadi hanya satu kali saja (Anonimus, 1986).

Di Indonesia pemeliharaan ayam ras mayoritas dilakukan dalam kandang dengan kepadatan yang cukup tinggi karena tuntutan efektifitas pemakaian kandang, kondisi ini akan menyebabkan mudahnya terjadi koksidiosis akibat terdapatnya dosis infeksi yang tinggi dalam sistem pemeliharaan ayam yang dikandangkan.

Diagnosis penyakit dilakukan dengan melihat gejala klinik berupa penurunan nafsu makan, peningkatan nafsu minum, tinja berwarna hijau, menemukan ookista pada pemeriksaan mikroskopik feses ayam dan melihat gambaran patologik terhadap ada dan tidaknya perlukaan pada usus buntu serta secara serologis.

Pengobatan tidak efektif untuk kasus koksidiosis yang telah menampakkan gejala, semua obat berperan sebagai pencegah dan harus diberikan pada waktu ayam terbuka kena serangan atau segera setelah terpapar. Karena waktu pemaparan itu bersifat kontinu, maka obat-obatan harus diberikan secara terus-menerus pada hospes yang tidak imun.

Pemakaian obat koksidiostatik untuk unggas telah begitu umum dengan cara dicampurkan dalam makanan sehingga sukar untuk memperoleh pakan unggas komersial yang tidak berisi satu atau obat yang lain.

Pemberantasan penyakit koksidiosis dilakukan dengan beberapa cara yang dapat dikerjakan secara simultan, diantaranya dengan mengatur cara beternak yang baik, pengenalan penyakit dan meningkatkan kekebalan hewan dengan cara almah maupun buatan.

Isolasi fraksi protein dari *E. tenella* dengan berat molekul 20 - 21 kDa diharapkan dapat menjadi bahan imunogen yang kuat sehingga dapat diharapkan sebagai kandidat untuk pembuatan vaksin guna meningkatkan kekebalan hewan dan juga bisa digunakan sebagai antigen untuk pemeriksaan koksidiosis secara serologi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Penyakit parasit terus-menerus menimbulkan morbiditas, mortalitas dan kerugian ekonomi dalam skala yang besar pada manusia dan hewan peliharaan di negara-negara industri dan negara berkembang

Koksidiosis pada seekor paling sering ditemukan pada anak ayam umur 4 minggu dan pada ayam lebih tua umumnya mampu mengembangkan imunitas sebagai hasil keterbukaan terhadap serangan.

Diferensiasi spesies dapat dilakukan dengan mengamati ciri-ciri struktural dan biologik. Stadia endogen dan eksogen siklus hidupnya dapat berbeda secara struktural, tetapi karena stadia endogen belum banyak diketahui, maka struktur ookista adalah yang paling umum dipakai untuk identifikasi.

Bellanti (1993), menyatakan bahwa perkembangan imunologi dalam bidang parasitologi relatif lebih lambat dibanding agen penyakit yang lain karena kesukaran membiakkan secara *in vitro* dan kerumitan daur perkembangannya menyebabkan rangsangan antigen multifasik pada hospes serta terjadi bermacam-macam respons imun baik jenis fungsional (misalnya perlindungan) maupun jenis non fungsional.

Faktor-faktor imunologik yang tampak bersama dengan infeksi parasit diantaranya (1) pelepasan sejumlah

lah besar antigen selama infeksi berlangsung, (2) tetap adanya antigen di beberapa jaringan dan dalam sirkulasi, (3) perubahan dan penghancuran jaringan hospes, (4) adanya komponen antigenik bersama antara hospes dan parasit, (5) kronisitas infeksi.

. Infeksi protozoa menimbulkan respon imun yang berbeda dengan infeksi parasit golongan metazoa lainnya karena infeksi protozoa tidak menimbulkan respons hipersensitivitas tipe cepat pada kulit dan eosinifilia bukan merupakan tanda-tanda umum.

• Penggunaan strain yang dilemahkan untuk imunisasi pada penyakit parasit ternyata kurang memberikan hasil yang memuaskan dibanding penggunaan yang sama dalam bidang bakteriologi dan virologi.

Eimeria tenella mempunyai siklus hidup dimulai dari terdapatnya ookista yang dikeluarkan bersama tinja, ookista ini berisi satu sel sporon dan dengan adanya oksigen akan mengalami proses sporogoni sehingga terbentuk sporosoit dalam ookista yang menjadi infeksius.

Sporosoit merupakan bahan yang infeksius dan akan masuk ke sel-sel epitel, baik secara langsung maupun melalui sel-sel darah putih kemudian setiap sporosoit membulat dan menjadi meront generasi pertama dan selanjutnya membentuk ookista yang akan dikeluarkan bersama tinja untuk menginfeksi ayam lainnya.

Secara alamiah hewan-hewan yang sembuh dari koksidiosis, membentuk suatu imunitas terhadap spesies yang

menginfeksi. Akan tetapi, imunitas ini jarang yang absolut dan hewan-hewan dewasa yang jadi sembuh sering kali terinfeksi-ulang secara secara terus menerus sehingga dibawah kondisi stres imunitas mereka dapat berkurang dan hewan tersebut dapat menderita penyakit itu lagi.

Vaksinasi terhadap penyakit koksidiosis menunjukkan perkembangan yang cukup besar dalam pencegahan penyakit maupun pengurangan kerugian yang ditimbulkan, meskipun mekanisme kekebalan pada hewan belum dapat dijelaskan secara pasti (Ovington, et al. 1995).

Breed (1996), menyatakan bahwa terjadi peningkatan CD 8 pada leukosit pada hari ke 9 sampai ke 10 setelah infeksi primer dari *Eimeria* yang dapat merangsang terjadinya imunitas terhadap infeksi *Eimeria*.

Percobaan vaksinasi yang dilakukan pada ayam muda menggunakan vaksin hidup yang diattenuasikan dan berisi 7 macam strain *Eimeria* ganas ternyata menunjukkan respon kekebalan yang bagus dengan mengukur terjadinya penurunan ookista pada kotoran, lesi usus pasca mati dan secara klinik dapat terlihat kejadian koksidiosis secara jelas lebih rendah pada kelompok perlakuan dari pada kelompok kontrol (Shirley et al. 1995).

Penggunaan ookoista sebanyak 10^6 untuk imunisasi pada ayam *white leghorn* umur 2 minggu dari koksidia patogen pada kalkun yaitu *E. adenoides* atau *E. meleagrimitis* melindungi ayam secara tidak mutlak terhadap

infeksi berderajat sedang terhadap ookista *E. tenella* atau *E. acervulina* tetapi tidak mampu terhadap *E. necatrix*. Pengukuran terhadap rata-rata berat badan ayam tidak terdapat perbedaan yang nyata pada kelompok perlakuan dan kontrol tetapi pada ayam yang diimunisasi pertambahan berat badan lebih tinggi, rasio konversi makanan lebih efisien (Augustine et al., 1991).

Karim et al. (1996). Penggunaan imunisasi pasif pada ayam ternyata mampu menurunkan jumlah ookista pada tinja dibandingkan pada kelompok ayam yang tidak mendapat imunisasi.

Kendala dalam memproduksi vaksin hidup yang diatenuasikan adalah tersedianya ookista dalam jumlah cukup besar dan memerlukan biaya yang mahal sehingga diperlukan identifikasi bahan-bahan yang mempunyai kemampuan dalam menghasilkan respon imun yang baik jika diberikan pada hewan guna dihasilkan vaksin mati yang ekonomis untuk digunakan secara luas (Sasai et al. 1996).

Substansi yang mampu merangsang pembentukan reaksi sisten kekebalan disebut dengan *immunogen* dan dikatakan sebagai bahan yang *immunogenic* sedangkan bahan yang mampu dikenali oleh imunoglobulin atau reseptor sel T, dan dapat bertindak sebagai sasaran dari respon imun disebut *antigen* dan dikatakan bahan bersifat *antigenic*.

Sporosoit *Eimeria tenella* merupakan fase yang mampu menginfeksi sel epitel usus dan hanya fraksi protein tertentu saja dari sporosoit *Eimeria tenella*

yang mampu menghasilkan respon imun yang cukup baik jika protein tersebut diberikan pada hewan.

Sasai et al. 1996., menyatakan bahwa fraksi protein dari sporosoit *Eimeria tenella* dengan berat molekul 20-21 kDa yang secara invitro mampu menghambat invasi sporosoit kedalam sel inang dan dapat diharapkan mampu membangkitkan respon imun yang cukup jika diberikan secara invivo.

Invasi sporosoit ke CD 8 dari sel T secara invitro dapat dihambat dengan adanya respon imun akibat pemberian fraksi protein dengan berat molekul 20-21 kDa dari ookista yang telah bersporulasi (Martin et al. 1995).

Antigen yang telah dimurnikan terutama peptida yang mempunyai *immunogenic* selain dapat digunakan untuk vaksinasi juga dapat digunakan dalam pemeriksaan antibodi yang diharapkan dapat memberikan hasil pemeriksaan lebih akurat dan mampu untuk memeriksa sampel dalam jumlah yang besar.

Pemisahan fraksi protein yang diinginkan ini dapat dilakukan dengan cara sentrifugasi, kromatografi maupun dengan cara elektroforesis maupun kombinasi dari ketiga cara tersebut.

Harlow E and D. Lane., 1988. Menyatakan bahwa dari fraksi protein yang dipisahkan dengan cara elektroforesis dapat dipotong pada band yang diinginkan kemudian dilarutkan pada buffer untuk disuntikkan pada hewan coba digunakan sebagai imunogen.

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

a. Tujuan Penelitian.

Mendeteksi adanya antigen dari *Eimeria tenella* dengan berat molekul 20-21 K Da dan memurnikannya agar dapat digunakan sebagai antigen untuk pemeriksaan terhadap antibodi yang terdapat pada serum ayam.

b. Manfaat Penelitian.

Dapat menyediakan antigen yang telah murni guna pemeriksaan antibodi dari ayam dengan teknik ELISA.

IV. METODE PENELITIAN

A. Bahan.

Bahan penelitian adalah ookista *Eimeria tenella* yang telah disporulasikan dengan larutan Kalium bicromat dengan kadar 2% dan penelitian ini dilakukan dilakukan mulai bulan September 1997 sampai Februari 1998 di Laboratorium Tropical Disease Centre - Universitas Airlangga.

B. Metode.

1. Isolasi Ookista *Eimeria tenella*.

Ookista *Eimeria tenella* didapat dari kerokan mucosa sekum dan dipisahkan dengan cara gabungan sedimentasi dan pengapungan. Ookista yang didapat kemudian disporulasikan dalam larutan 2% kalium dicromat selama 3 hari. Ookista yang telah bersporulasi kemudian diinokulasikan pada ayam pedaging muda untuk memperbanyak jumlah ookista kemudian disporulasikan lagi dan selanjutnya disimpan pada suhu -20 C.

2. Pemecahan Protein.

Ookista yang telah bersporulasi dilarutkan dalam larutan buffer phospat untuk kemudian dipecahkan dengan ultra sonicator agar didapatkan fraksi-fraksi protein dengan berat molekul yang berbeda (Harlow and Lane, 1988).

3. Pemisahan molekul-molekul protein.

Pemisahan molekul protein ini dilakukan dalam 2 tahap yaitu:

- a. Pemisahan dengan sentrifuge yaitu dimaksudkan agar terjadi pemisahan molekul protein dengan berat molekul besar dan kecil agar pada pemisahan dengan kolom kromatografi molekul protein dengan berat sangat besar sudah terpisah. Larutan protein disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. endapan yang terjadi dibuang karena terdiri dari molekul dengan berat molekul besar yang terdiri dari bahan-bahan yang tidak terpecahkan secara sempurna dan kemudian dilanjutkan dengan kecepatan 18.000 rpm selama 30. filtrat dan endapan yang terbentuk disimpan pada suhu -80 C untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut (Boyer, 1993)
- b. pemisahan dengan kolom kromatografi cairan dimaksudkan agar molekul protein dapat terpisah dalam berat molekul yang mempunyai kisaran kecil. Kolom kromatografi yang digunakan adalah buatan Simadzu Corpora-

tion dengan tipe pompa cairan LC-10AS. Detektor UV tipe SPD-10A yang mempunyai panjang gelombang 190nm sampai 600 nm. kolom analisa menggunakan Sl. m pack PREP-SIL dan Guard column tipe Shim-pack (LC G-SIL(8) Buffer yang digunakan sebagai fase bergerak adalah 0.15M fosfat buffer salin dengan pH 7,2 (Boyer, 1993..Ausubel et al, 1996).

4. Pengukuran Kadar Protein.

Pengukuran kadar protein dimaksudkan untuk mengetahui kadar larutan protein guna kepentingan penggunaan lebih lanjut. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan metode bradford. Pembuatan larutan baku menggunakan standard 11 Bovine serum albumin (Biorad) dengan reagen dye reagent concentrate (Biorad). Larutan standart berkadar awal 1,3 mg/ml, kemudian dibuat pengenceran menjadi 650 ug/ml dan 325 ug/ml. 100 ul larutan baku ditambah dengan 5 ml reagen dan dibaca dengan sphektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm untuk pembuatan kurva baku dan sampel protein dikerjakan dengan cara yang sama. Kadar protein sampel didapat dengan menghitung berdasarkan kurva baku yang didapat. (Ausubel et al, 1996).

5. Deteksi Berat Molekul dengan SDS-PAGE.

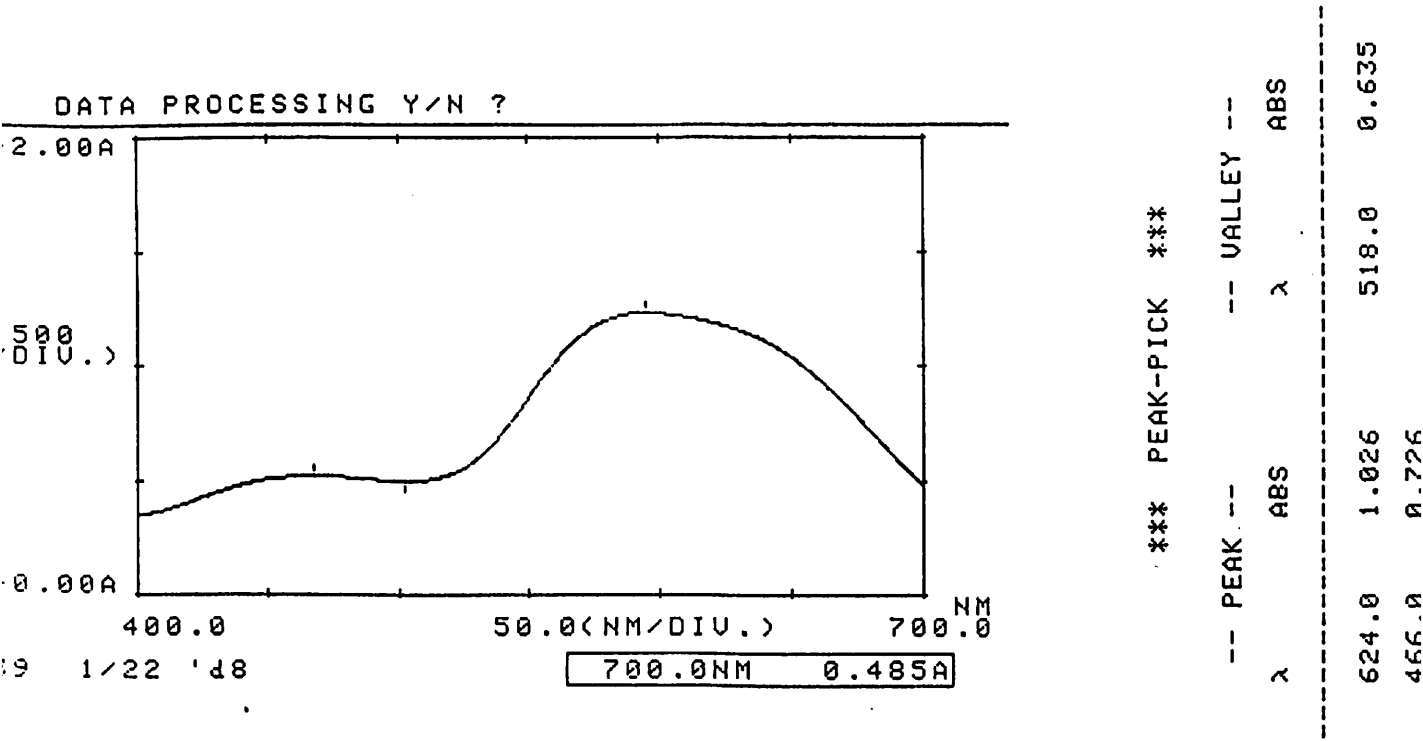
Protein yang diselimuti SDS yang diberikar muatan elektris akan terpisah hanya berdasarkan ukuran berat dan bentuk molekul. *Running gel* dibuat dari 15% acrylamide. *stacking gel* menggunakan 5% acrylamide dan alat SDS PAGE (Biorad).

Marker yang digunakan adalah bovine serum albumin, 66 kDa., Pepsin dari mukosa usus porcine, 34.700 Da dan Beta lactoglobulin dari air susu sapi, 18.400 Da.

Pengecatan gel menggunakan Coomasie Brilliant Blue dan destaining menggunakan larutan methanol-asam asetat. Dokumentasi dilakukan dengan pengeringan gel dan dilakukan pengambilan gambar dengan fotografi.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian panjang gelombang optimal dengan menggunakan larutan baku bovine serum albumin didapatkan puncaknya pada 594,5 nm. ini sesuai dengan panjang gelombang yang digunakan untuk pemeriksaan protein dengan metode Bradford (Ausubel et al, 1996).



Hasil pengukuran kadar protein dengan spektrofotometer adalah :

PHOTOMETRIC		SET SAMPLE, PRESS START KEY	
λ	595.0		
No.	A1		
1	0.0000		
2	0.0000		
3	0.0000		
4	0.0000		
5	0.4000		
6	0.4000		
7	0.4000		
8	0.4000		

10:23 1/22 '88

595.0NM 0.474A

keterangan :

1. Zero spektrofotometer.
2. Kadar protein larutan baku = 1.300 ug/ml
3. Kadar protein larutan baku = 650 ug/ml
4. Kadar protein larutan baku = 325 ug/ml
- 5 - 8. Kadar protein sampel.

Kadar protein sampel adalah sekitar 300 u/ml dan ini perlu dipekatkan sampai volumenya tinggal 1/3 nya agar konsentrasi protein kurang lebih 1 mg/ml. Pemekatan protein dilakukan dengan bantuan freeze dry agar protein tidak rusak.

Hasil pemisahan dengan liquid chromatographi adalah :

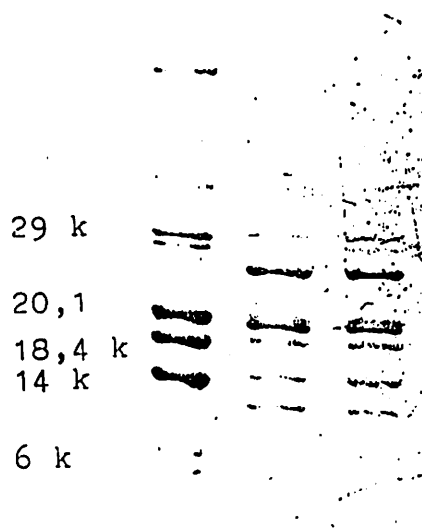
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.183	8476			17.892	
2	2.692	16540	V		34.9132	
3	3.24	15954	V		33.677	
4	3.87	6404	V		13.5178	
TOTAL		47374			100	

CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 6
 FILE METHOD 0 41

PRINT

Kadar pertama merupakan adanya fraksi protein yang terpisah dengan kadar adalah : secara berurutan dari berat molekul kecil menuju ke besar adalah 17.9%, 34.9%, 33.7% dan 13.5% setelah kita periksa dengan elektroforesis maka kadar ketiga berkorelasi dengan 20-21 kDa.

Hasil pemeriksaan dengan elektroforesis :



Pemurnian dengan kromatografi kembali setelah diukur dengan liquid chromatographi menghasilkan peningkatan kemurnian sampai 99.5%.

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.067	354			0.0224	
2	0.15	984	V		0.0624	
3	0.475	6577	V		0.4169	
4	1.183	1569354	V		99.4824	
5	6.008	251			0.0159	
TOTAL		1577519			100	

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan.

1. Fraksi protein 20-21 kDa dapat diisolasi dari oocista yang bersporulasi.

B. Saran

1. Fraksi protein yang dimurnikan perlu diuji coba dalam fungsinya sebagai zat yang imunogen.
2. Perlu membuat serum positif dan negatif terhadap koksidiosis agar bisa dilakukan uji pemeriksaan serologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1981. Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan . Departemen Pertanian. Jakarta.
- Anonimus. 1986. The Merck Veterinary Manual. 6th Ed. A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and Control for the Veterinarian Merck & Co, Inc. Rahway. N.J. U.S.A.
- Ausubel F.M., R. Brent., R.E. Kingston., D.D. Moore., J.G. Seidman., J.A Smith., K. Struhl. 1996. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Augustine P.C., H.D. Danforth., J.R. Barta. 1991. Development Immunity Against *Eimeria tenella* and *E. acervulina* in White Leghorn Chickens Inoculated Repeatedly with High Doses of Turkey Coccidia. Avian Disease 35 : 535-541.
- Bellanti J.A. 1993. Immunologi III. Terjemahan A.S. Wahab dan N. Soeripto. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Breed D.G., J. Dorrestein., A.N. Vermeulen. 1996. Immunity to *Eimeria tenella* in Chickens : Phenotypical and Functional Changes in Peripheral Blood T-Cell Subset. Avian Disease. Jan-Mar. 40 (1): 37-48.
- Boyer R.F. 1993. Modern Experimental Biochemistry. 2nd. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. New York.
- Harlow E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hudson L. and F.C. Hay. 1991. Practical Immunology. Blackwell Scientific Publication. London.
- Karim M.J., S.C. Basak., A.J. Tress. 1996. Characterization and Immunoprotective Properties of a Monoclonal Antibody Against the Major Oocyst Wall Protein of *Eimeria tenella*. Infect-Immun. Apr:64(4):1227-32.
- Ovington K.S., L.M. Alleva., E.A. Kerr., 1995. Cytokine and Immunological Control of *Eimeria* spp. Int.J.Parasitol. Nov. 25(11): 1331-51.
- Roitt I.M. 1991. Essential Immunology. 7th Ed. Blackwell Scientific Publication. London.

- Sasai K., H.S. Lillehoj., H.Matsuda., W.P. Wergin., 1996. Characterization of a Chickens Monoclonal Antibody that Recognizes the Apical Complex of Eimeria Acervulina Sporozoites and Partially Inhibits Sporozoite Invasion of CD 8+ T Lymphocytes in Vitro. J.Parasitol. Feb:82(1) : 82-7.
- Shirley M.W., A.C. Bushell., J.E. Bushell., V. McDonald., B.Roberts. 1995. A Live Attenuated Vaccine for the Control of Avian Coccidiosis : Trial in Broiler Breeders and Replacement Layer Flocks in the United Kingdom. Vet.Rec. Oct. 137(18): 453-7.