

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2010**



**Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Membran Sporozoite  
*Eimeria tenella* Sebagai Dasar Rekombinan untuk Produksi Material Vaksin  
Subunit Koksidiosis Pada Ayam**

**Muchammad Yunus, Ph.D., M.Kes., Drh  
Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., drh**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010, sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor: 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010**

**Universitas Airlangga  
Oktober 2010**

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2010**



**Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Membran Sporozoite  
*Eimeria tenella* Sebagai Dasar Rekombinan untuk Produksi Material Vaksin  
Subunit Koksidiosis Pada Ayam**

**Muchammad Yunus, Ph.D., M.Kes., Drh  
Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., drh**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010, sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor: 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010**

**Universitas Airlangga  
Oktober 2010**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan/Riset : **Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Membran Sporozoite *Eimeria tenella* Sebagai Dasar Rekombinan untuk Produksi Material Vaksin Subunit Koksidiosis Pada Ayam**

## 2. Ketua Peneliti

a. Nama lengkap : Muchammad Yunus  
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
 c. NIP : 196612291993031001  
 d. Pangkat/Golongan : Penata Tk.I/IIId  
 e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 f. Bidang Keahlian : Immunologi Parasit  
 g. Fakultas/Jurusan/Puslit : Kedokteran Hewan/Ilmu Penyakit dan VPH/Unair  
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

## Tim Peneliti

No.	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Muchammad Yunus, Drh., M.Kes., Ph.D.	Imunologi Parasit	FKH	Unair
2.	Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., Drh	Biologi Molekuler	FKH	Unair

## 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun  
 b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-  
 c. Biaya yang disetujui tahun pertama : Rp. 32.500.000,-  
 (Tiga Puluh Dua Juta Lima Ratus Ribu Rupiah)

Surabaya, 15 Oktober 2010  
 Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.  
 NIP. 130 687 305

Muchammad Yunus, drh., M.Kes., Ph.D  
 NIP. 196612291993031001

Mengetahui  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
 Universitas Airlangga

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.  
 NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

Pada dekade belakangan ini, pengendalian penyakit infeksius pada manusia dan hewan sebagian besar bertumpu pada penggunaan antibiotik dan bahan kimia lain. Sebaliknya industri peternakan sekarang dihadapkan pada pembatasan penggunaan antibiotik dan bahan kimia untuk produk-produk asal hewan. Akibat yang terjadi dari pembatasan ini bagi industri perunggasan adalah penurunan produktifitas akibat peningkatan kasus infeksi oleh beberapa patogen tertentu.

Untuk mengatasi kondisi tersebut penggunaan vaksin dalam pengendalian penyakit infeksius lebih memberikan harapan dalam menghindari ketergantungan terhadap pemakaian antibiotic dan bahan kimia lain disamping itu penggunaan vaksin lebih alami, aman, efektif dan efisien dalam meningkatkan resistensi dan menghambat perkembangan agen infeksi. Salah satu bahan vaksin yang sedang dieksplorasi dan mempunyai prospek yang baik adalah vaksin rekombinan yang dapat dikembangkan, dimanipulasi, diproduksi secara artificial dan massal serta dapat diaplikasikan.

Koksidiosis pada ayam disebabkan oleh protozoa intraseluler yang terdiri tujuh spesies *Eimeria*. Parasit ini menginfeksi dan berkembang dalam sel epitel lapisan mukosa intestine atau sekum. Perkembangan parasit menyebabkan kerusakan epitel intestine, diare, malabsorpsi nutrisi penurunan berat badan dan mortalitas yang menimbulkan kerugian ekonomis yang serius. Di sisi lain stadium sporozoite merupakan material antigen yang sangat poten dalam menginduksi kekebalan induk semang dan dapat digunakan sebagai bahan vaksin

Sporozoit yang terkandung dalam stadium ookista adalah salah satu stadium perkembangan parasit yang dapat digunakan untuk material vaksin. Protein membrane sporozoit *E. tenella* dengan teknologi yang berkembang saat ini dapat dikembangkan dan diproduksi melalui teknik rekombinan. Melalui teknik rekombinan, material vaksin dapat diproduksi dan dikontrol kualitasnya secara lebih baik. Sebagai bagian dari program proaktif dalam pengembangan vaksin, penggunaan stadium sporozoit dapat digunakan dan diterapkan untuk meningkatkan resistensi ayam terhadap penyakit atau infeksi baik dalam farm komersial layer atau broiler.

Selanjutnya dari uraian dan informasi diatas, protein membran sporozoit *E. tenella* recombinant dapat diproduksi melalui *expression system* (vector atau plasmid dan sel host) dapat digunakan dan diterapkan untuk meningkatkan performan dan kualitas unggas dalam rangka mendukung keberlangsungan dan produktifitas industri unggas dengan meninggalkan ketergantungan terhadap penggunaan antibiotik yang dapat menimbulkan resistensi agen infeksi dan residu pada produk asal unggas yang berdampak yang serius terhadap kesehatan konsumen dan penolakan produk ekspor kita oleh negara-negara tujuan ekspor yang memberlakukan standar yang ketat terhadap residu antibiotik yang terkandung dalam produk asal hewan. Disamping itu protein membrane sporozoit *E. tenella* recombinant dapat digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi *Eimeria* melalui pembentukan antibodi

Upaya mewujudkan prinsip tersebut perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi protein membrane sporozoit *E. tenella*. Sebagai tahap pertama dari penelitian ini melakukan isolasi dan karakterisasi protein membrane sporozoit *E. tenella* melalui teknik ekstraksi protein membrane sporozoit *E. tenella* dengan metode SDS-PAGE dan Dot Blot.



## SUMMARY

Over the past few decades control of infectious disease in humans and animals has largely relied on the use antibiotics and another chemical agents. Vaccines aim the offer long term immunity and protection againts a particular pathogen following a small number of immunisations. In contrast, broad spectrum protection provided by antimicrobials (as in-feed antibiotics and chemicals) requires their continual usage even in the absence of apparent disease. Antibiotics, in addition to being an antimicrobial, also have growth promoting activity which makes them even more attractive. Unfortunately, the extensive use of antibiotics and chemicals over a long period of time has resulted in the emergence of pathogens that have become resistant to such treatments. The World Health Organisation has now recommended restrictions in the type of antimicrobials used in food production animals and has recommended the development and use of alternative, environmentally-friendly methods to control disease. Some countries have already implemented such restrictions and based on their experiences, it is anticipated that without appropriate substitutes for prophylactic antibiotics, particular microorganisms may emerge as significant health problems. Faced with these restrictions and potential problem is needed the efforts for using biological agent which can be synthesized chicken cell itself naturally, safe, effective and efficient in increasing resistants and to obstruct development of infection agent. One of vaccine materials has being explorated and it has good prospected is recombinant vaccine of protein membrane of sporozoite that can be developed, manipulated artificial producible and applicable. Avian coccidiosis is caused by intracellular protozoan of seven *Eimeria* species. Those parasites infect and develop in epithelial cell of layer of intestine mucosa or cecum. The development of parasite cause damage of intestine epitelial, diarrhea, malabsorption of nutrition, body weight decrease and mortality to result in seriously economical loss. While sporozoite is antigen material potentially to induct immunity of host and it can be used as vaccine material. Protein membrane of sporozoite of *E. tenella* through recently technology can be developed and produced by recombinant technique. By recombinant technique, vaccine material can be produced and controlled its quality. As the part of proactive program in developing vaccine, the use of sporozoite can be used to increase chicken resistance on disease and/or infection on comercial layer or broiler. Then protein membrane sporozoit *E. tenella* recombinant can be produced by expression system (vector or plasmid and host cell) used to increase performance and poultry quality to support sustainability and productivity poultry industry. The effort realices that principal was performed isolation and characterization of protein membrane of sporozoite of *E. tenella*. The first step of this research was isolation and characterization of protein membrane of sporozoite of *E. tenella* by extraction of protein membrane of sporozoite *E. tenella* through SDS-PAGE and Dot Blot.

## PRAKATA

Puji syukur kami ucapkan kehadirat Allah swt bahwa penelitian yang berjudul: *Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Membran Sporozoite Eimeria tenella* Sebagai Dasar Rekombinan untuk Produksi Material Vaksin Subunit Koksidiosis Pada Ayam tahap pertama (tahun 2010) ini telah selesai, maka dengan ini kami berharap hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan teori bagi pengembangan penelitian lain yang berkaitan.

Pada kesempatan ini, kami sampaikan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, antara lain:

1. Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia cq Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi.
2. Prof. Dr. H. Fasich Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya
3. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
4. Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh., selaku Dekan FKH Unair
5. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini hingga selesai

Kami menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran kami harapkan untuk kesempurnaan hasil penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi dunia peternakan dan perkembangan ilmu dan teknologi.

Oktober, 2010

Peneliti

## DAFTAR ISI

	halaman
BAB I PENDAHULUAN I	
1.1. Latar Belakang Permasalahan.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1. Imunitas Terhadap Koksidiosis .....	4
2.2. Patogenesis dan Gejala Klinis Koksidiosis .....	7
2.3. Vaksinasi Melawan Koksidiosis.....	9
2.4. Killed atau Subunit Vaksin.....	11
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	13
3.1. Tujuan Penelitian .....	13
3.2. Manfaat Penelitian .....	13
BAB IV METODE PENELITIAN.....	14
4.1. Model Penelitian .....	14
4.2. Rancangan Penelitian .....	18
4.3. Sampel Penelitian .....	18
4.4. Variabel Penelitian .....	18
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	21
5.1. Pasase dan Isolasi Isolate <i>E. tenella</i> Sebagai Inokulan Aktif .....	21
5.2. Konsentrasi Protein Membran Sporozoit <i>E. tenella</i> melalui indirect ELISA .....	24
5.3. Identifikasi Protein Membran Sporozoit dengan SDS-PAGE .....	27
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	30
6.1 Kesimpulan .....	30
6.2 Saran .....	30
DAFTAR PUSTAKA .....	31
LAMPIRAN .....	34

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Nilai Optical Density (OD) dan kadar protein membran sporozoit *E. tenella*....24

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Isolasi ookista <i>E. tenella</i> dari feses ayam yang diinfeksi .....	21
Gambar 2. Hasil isolasi dari sampel feses berupa ookista <i>Eimeria tenella</i> yang belum bersporulasi .....	21
Gambar 3. Proses sporulasi unsporulated oocysts menjadi sporulated ookista yang mengandung sporozoite untuk isolasi membran protein (A-C), isolate sporulated <i>E. tenella</i> yang diperoleh (D) .....	21
Gambar 4. Pola produksi ookista per hari pada ayam yang diinfeksi <i>E. tenella</i> .....	22
Gambar 5. Perbandingan Optical Density (OD) 450 nm protein membran sporozoit <i>E. tenella</i> dengan konsentrasi antara 500 ookista/ $\mu$ l dan 1000 ookista/ $\mu$ l stock isolat yang didapat .....	25
Gambar 6. Perbandingan konsentrasi protein membran sporozoit <i>E. tenella</i> dengan konsentrasi antara 500 ookista/ $\mu$ l dan 1000 ookista/ $\mu$ l stock isolat yang didapat .....	26
Gambar 7. Berat molekul protein membran sporozoit <i>E. tenella</i> (SDS-PAGE). M: marker, (Sesuai dengan penelitian Song, <i>et al.</i> , 2007, berat molekul membran sporozoit sekitar 17-18 kDa) .....	28
Gambar 8. Immunoblotting untuk karakterisasi protein membran sporozoit <i>E. tenella</i> dengan teknik Dot Blot. A, protein membran sporozoit <i>E. necatrix</i> ; B, protein membran sporozoit <i>E. tenella</i> .....	28



## DAFTAR LAMPIRAN

Laboratorium .....	34
Peralatan Utama yang Tersedia .....	34
Administrasi dan Keuangan .....	35
Realisasi Sumber Daya Manusia .....	35
Anggaran Biaya .....	35

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 . Latar Belakang Permasalahan

Masalah terbesar yang sering dihadapi hampir semua industri peternakan adalah penurunan produktifitas yang diakibatkan penyakit. Dua mekanisme utama yang harus dilakukan dalam mengontrol penyakit adalah penggunaan vaksin dan antimikroba. Vaksinasi memberikan kekebalan dalam rentangan waktu tertentu dan melindungi dari infeksi agen patogen dengan sejumlah kecil imunisasi. Sebaliknya proteksi berspektrum luas diberikan oleh antimikroba (sebagai antibiotik dalam pakan dan *chemical agen*) yang memerlukan penggunaan yang terus menerus meskipun tidak ada infeksi. Antibiotik disamping sebagai antimikroba juga berfungsi sebagai growth promoter. Penggunaan antibiotik secara ekstensif dalam waktu lama akan menimbulkan resistensi pada agen infeksi dan residu pada produk asal hewan seperti telur, daging dan susu yang berdampak serius terhadap kesehatan konsumen dan penolakan produk ekspor kita oleh negara-negara tujuan ekspor yang memberlakukan standar yang ketat terhadap residu antibiotik yang terkandung dalam produk asal hewan.

WHO saat ini merekomendasikan pembatasan penggunaan antimikroba dalam pakan untuk produksi, pengembangan ternak dan penggunaan dalam mengendalikan penyakit. Berdasarkan pengalaman mereka, beberapa negara telah menerapkan pembatasan tersebut. Pembatasan penggunaan antibiotik perlu diantisipasi tanpa mengganti dengan antibiotik lain untuk tujuan pencegahan dan pengobatan terhadap infeksi mikroorganisme. Akibat yang terjadi dari pembatasan ini bagi industri perunggasan di

negara-negara berkembang seperti Indonesia adalah penurunan produktifitas akibat peningkatan kasus infeksi oleh beberapa patogen tertentu.

Fakta yang ada pada industri perunggasan, control terhadap koksidiosis sebagian besar berhubungan dengan penggunaan secara rutin anti koksidiosis (koksidostat). Disamping adanya resistensi parasit yang ditimbulkan akibat penggunaan koksidostat yang terus menerus, juga menyebabkan strategi manajemen industri perunggasan menjadi lebih kompleks dan mahal.

Untuk mengatasi kondisi tersebut pilihan untuk melakukan pendekatan penggunaan vaksin dalam mengontrol penyakit yang lebih intensif dan terencana sangat diperlukan. Penggunaan vaksin dalam mengontrol koksidiosis (infeksi *Eimeria*) telah dikembangkan dengan menggunakan stadium ookista dari *Eimeria*. Pengembangan vaksin menggunakan stadium ookista untuk mengontrol koksidiosis selama ini kurang berhasil dikarenakan secara umum imunogenitasnya yang kurang dibandingkan stadium yang lain seperti stadium sporozoite (Yun *et al.*, 2000). Hal ini memberikan harapan baru untuk mengeksplorasi dan mengobservasi stadium sporozoite sebagai kandidat material vaksin yang lebih baik dan prospektif. Pada dasarnya stadium ookista terdiri dari sporozoit yang terdapat di dalamnya. Dengan kata lain, eksplorasi dan pengembangan stadium ookista pada hakekatnya adalah eksplorasi dan pengembangan sporozoit yang terdapat di dalamnya sebagai candidate material vaksin untuk pengendalian koksidiosis pada ayam.

Pesatnya perkembangan teknologi mendorong adanya penggunaan salah satu bahan biologic yang dapat dikembangkan, dimanipulasi, diproduksi secara artificial dan massal serta dapat diaplikasikan dilapangan. Penggunaan material vaksin dari rekombinan dapat lebih mudah diterapkan dengan adanya cloning sejumlah gen peyandi dan adanya metode

yang diaplikasikan secara komersial. Upaya mewujudkan prinsip tersebut perlu dilakukan karakterisasi salah satu stadium dari siklus hidup *E. tenella* yang menginfeksi ayam yang dikenal sebagai stadium sporozoit dimana sporozoite terdapat di dalam ookista. Dalam mendukung upaya peningkatan kualitas dan produktifitas ayam pada industri perunggasan perlu dilakukan terobosan untuk memanfaatkan fungsi dan peranan stadium sporozoit dalam menginduksi kekebalan yang dapat meningkatkan performan ayam melalui peningkatan resistensi dan hambatan perkembangan terhadap infeksi *Eimeria* sp. dengan melakukan produksi secara artificial melalui ekspresi gen penyandi untuk rekombinan yang lebih efisien dan produktif kemudian menerapkan protein membrane sporozoit *E. tenella* rekombinan yang tidak hanya dalam skala penelitian tetapi juga memiliki visi untuk dapat dilakukan dan diterapkan secara komersial dan berkelanjutan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Imunitas Terhadap Koksidiosis

Pertahanan tubuh manusia dan hewan terhadap suatu agen infeksi patogen terjadi dalam tiga fase, yaitu pengenalan (*recognition*), tanggapan (*response*) dan reaksi (*reaction*). Dalam fase pengenalan, komponen agen infeksi dikenal sebagai bahan asing, pada fase tanggapan, terjadi perubahan tertentu dalam sistem kekebalan, yang mana tubuh hewan atau manusia sanggup membunuh agen infeksi secara efektif, dan fase reaksi terjadi pertempuran yang aktual antara tubuh hewan dengan agen infeksi (Girard, *et al.*, 1997). Dalam kaitan dengan pertahanan tubuh hewan dan manusia dikenal dua sistem kekebalan, yaitu sistem kekebalan non spesifik dan sistem kekebalan spesifik (Long, 1990).

Sistem kekebalan non spesifik melindungi hewan dan manusia terhadap serangan infeksi yang bersifat umum, sedangkan sistem kekebalan spesifik melindungi hewan dan manusia terhadap agen infeksi tertentu atau bersifat khusus, karena agen infeksi tersebut pernah kontak sebelumnya. Beberapa faktor yang sering mempengaruhi mekanisme tanggap kebal seperti faktor genetik, umur, lingkungan, anatomis, fisiologis dan mikrobial (Tizard, 2000). Pada akhir-akhir ini faktor genetik dalam imunologi sering dikaitkan dengan MHC, karena MHC ini sangat menentukan kesanggupan individu memberi tanggap kebal dan kesanggupan menampilkan antigen histokompatibilitas pada permukaan sel. Faktor umur dikaitkan dengan status hipofungsi tanggap kebal pada umur yang sangat muda dan umur yang sangat tua. Hal ini merupakan hasil dari perkembangan sistem kekebalan spesifik yang kurang sempurna dan defisiensi sistem



kekebalan non spesifik. Faktor metabolik, hormon tertentu mempunyai pengaruh terhadap tanggap kebal. Pada kasus hipoadrenal dan hipotiroid menunjukkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi. Hormon steroid dapat menghambat pengaruh fagositosis dan proses peradangan dan juga mempengaruhi kekebalan humoral dan kekebalan seluler. Faktor lingkungan dan nutrisi, berpengaruh pada umur awal dan dihubungkan dengan kegagalan perkembangan tanggap kebal, khususnya kekebalan yang diperankan oleh sel (*cell mediated immunity*). Faktor anatomis, seperti diketahui bahwa kulit dan selaput lendir sebagai garis pertahanan non spesifik untuk mencegah masuknya agen infeksi patogen ke dalam tubuh. Dikatakan kulit yang utuh merupakan barier yang lebih efektif dibandingkan dengan selaput lendir. Agen infeksi tertentu, seperti Mikobakterium tuberkulosis dapat langsung menyebar melalui selaput lendir gastrointestinal. Faktor mikrobial, flora normal dalam tubuh dapat meningkatkan ketahanan tubuh hewan dan manusia dengan cara menekan perkembangan mikroorganisme lain dengan mendukung pembentukan antibodi alamiah dan dengan cara kompetitif dengan mikroorganisme tersebut. Pengobatan dengan antibiotik spektrum luas mengakibatkan kerusakan keseimbangan ekologi flora normal. Faktor fisiologi tubuh ikut berperan dalam meningkatkan kekebalan tubuh seperti : adanya getah lambung, getaran silia pada saluran nafas, aliran kencing, asam laktat pada kulit, enzim lysosim, substansi yang bersifat bakteriosida dalam darah, dan sistem komplemen. Koksidirosis sering terjadi terutama pada unggas muda, tetapi juga dapat terjadi pada ayam tua yang rentan. Semua burung, hewan dan manusia dapat terinfeksi koksidirosis. Infeksi antar spesies (induk semang) tidak terjadi, sebab koksidirosis adalah khusus untuk spesies

tertentu. Burung-burung muda lebih rentan, sebab biasanya ada kekurang dewasaan fisik dan tidak adanya imunitas.

Ayam yang sembuh mempunyai sedikit imunitas, tetapi umur imunitas ini pendek, kecuali kalau ayam yang selalu berhubungan dengan koksidia. Imunitas terhadap koksidiosis bersifat lokal yang ditunjukkan adanya antibodi pada mukosa sekum (Girard dkk., 1997). Imunitas ini khusus untuk spesies tertentu: artinya imunitas terhadap satu spesies koksidia tidak melindungi terhadap serangan koksidia spesies lain.

Rose (1996) mengatakan bahwa derajat patogenitas masing-masing spesies *Eimeria* pada induk semang bervariasi. Pada ayam percobaan, imunitas dapat terjadi pada semua spesies dari *Eimeria*, walaupun demikian hal ini juga dipengaruhi oleh perbedaan antar spesies. *Eimeria tenella* yang sangat imunogenik hanya dengan satu kali infeksi dan dalam jumlah yang kecil (50-100 ookista) ke dalam tubuh induk semang sudah mampu membentuk kekebalan. Sekurang-kurangnya ada 3 jenis kekebalan terhadap *Eimeria tenella*, ayam mungkin kebal secara total terhadap parasit, dimana parasit tidak mampu berkembangbiak di dalam tubuh induk semang. Ayam mungkin kebal pada derajat tertentu dimana ookista mampu menyelesaikan siklus hidup, tetapi tidak terjadi lesi di usus dan ayam mungkin tidak menunjukkan gejala klinis dari penyakit ini tetapi terjadi lesi-lesi (Long, 1990). Berdasarkan percobaan yang dilakukan Pierson dkk., (1997) menunjukkan bahwa burung yang diinokulasi dengan 400 ookista infeksi *Eimeria tenella* kemudian ditantang dengan 8000 ookista infeksi memberikan perbedaan pada nilai perlukaan sekum dan resistensi bila dibanding dengan kontrol. Kemudian untuk nilai ketahanan terhadap infeksi koksidiosis diukur berdasarkan penambahan berat badan, nilai

perluasan sekum, tingkat produksi ookista per gram feses pada 7 hari pasca infeksi (Long, 1990; Ruff, 1991).

## 2.2. Patogenesis dan Gejala Klinis Koksidiosis

*Eimeria tenella* adalah koksidia yang sangat patogen terutama pada ayam yang berumur 3-4 minggu. Gejala klinis yang tampak tergantung dari kondisi tubuh induk semang dan jumlah ookista yang menginfeksi, bila infeksi bersifat ringan, tidak tampak adanya gejala klinis, akan tetapi bila infeksi berat menyebabkan perdarahan yang berat sampai terjadi kematian pada hari kelima atau kedelapan (Soulsby, 1986). Faktor lain yang penting dalam mempengaruhi jalan penyakit adalah kelangsungan hidup dan ketahanan ookista di luar tubuh induk semang.

Ayam yang berumur 1-2 minggu lebih tahan karena ekskistasi ookista berkurang disebabkan gerakan lambung otot (*gizzard*) lemah dan sistem pencernaan enzimatik belum bekerja secara maksimal, sehingga pemecahan dinding ookista kurang sempurna, sedangkan ayam yang berumur antara 2-4 minggu sudah mulai peka terhadap serangan koksidiosis (Soulsby, 1986).

Long (1990) membagi gejala klinis koksidiosis menjadi tiga stadium, yaitu keadaan akut, sub akut dan kronis yang masing-masing mempunyai ciri yang khas. Pada keadaan akut, hewan segera mengalami kematian setelah terjadi perdarahan encer berupa darah segar yang keluar dengan feses. Keadaan tersebut didahului oleh periode depresi yang sangat pendek dimana mukosa konjungtiva terlihat pucat. Sub akut ditandai diare pada penderita yang berwarna kecoklatan dan disertai adanya bintik-bintik darah, kondisi hewan sangat lemah dan nafsu makan menurun. Apabila ayam terhindar dari kematian setelah melewati keadaan sub akut dan akut, maka akan terbentuk kekebalan dalam

tubuhnya. Keadaan kronis ditandai dengan nafsu makan yang menurun, pertumbuhan terhambat dan anemia.

Levine (1985) menyatakan bahwa gejala penyakit yang berupa berak darah mulai tampak ketika skizon generasi kedua membesar dan mengeluarkan merozoit generasi kedua. Skizon generasi kedua yang berukuran sangat besar pecah menyebabkan kerusakan sel-sel epitel sekum dan perdarahan yang meluas pada lumen sekum. Gambaran patologi yang terlihat pertama adalah ada pembesaran sekum. Perubahan tersebut tampak pada hari ke tiga yaitu setelah terbentuknya skizon generasi pertama dan mulai terbentuknya skizon generasi kedua. Tanda patologi anatomi yang mencolok yaitu terdapat perdarahan sampai timbulnya perkejuan yang mengeras pada sekum (Idris dkk, 1996). Perubahan patologi pada sekum meningkat sejalan dengan perkembangan biakan *Eimeria* pada tahap akhir dari siklus aseksual. Levine (1985) menyatakan bahwa pada hari keempat pasca infeksi terjadi perdarahan pada selaput mukosa sekum. Secara histopatologis tunika propria terjadi infiltrasi eosinofil dan pembendungan (kongesti). Hal ini juga dikatakan oleh Idris dkk., (1996) bahwa gambaran patologi anatomi yang khas adalah pembengkakan kantong sekum dan berisi gumpalan darah yang kadang bercampur eksudat dengan disertai lesi-lesi pada mukosa usus, sedang pada pemeriksaan histopatologi menunjukkan degenerasi epitel sekum yang mengandung parasit, oedema pada sub mukosa, infiltrasi eosinofil, limfosit, monosit dan plasma sel pada mukosa dan sub mukosa. Pada lapisan muskularis terlihat nekrosis fokal di sekitar pembuluh darah.

Hari keempat sekum mengalami peradangan lebih dari 80 persen dan pembesaran tiga kali dari normal dan pada hari kelima sebagian besar mukosa dan lapisan muskularis mengalami kerusakan. Merozoit, darah dan jaringan yang rusak terlepas dalam lumen

sekum. Volume sekum akan terus bertambah sampai hari keenam. Hari ketujuh setelah infeksi isi sekum bersifat fibrin dan bahan nekrosis terbentuk. Mula-mula bahan ini melekat erat pada lapisan mukosa sekum, tetapi kemudian segera melepas dan terletak bebas di dalam lumen sekum (Soulsby, 1986). Selanjutnya hewan tampak lesu, nafsu makan menurun sampai hilang sama sekali, hewan tampak kurus, sayap terkulai, bulu kusut dan dikotori oleh darah terutama di daerah kloaka. Perdarahan yang paling berat terjadi pada hari kelima sampai tujuh pasca infeksi. Perdarahan tersebut dapat terjadi luar biasa, sehingga dapat menyebabkan kematian. Bila setelah hari kedelapan hewan masih hidup, maka selanjutnya akan memperoleh kesembuhan dan kekebalan (Long, 1990).

Dinding sekum menebal, sel-sel epitel rusak diikuti terlepasnya merozoit, darah dan jaringan yang rusak ke dalam lumen sekum. Tingkat infeksi bervariasi tergantung breed, umur dan makanan dari ayam serta keganasan ookista yang diinfeksi (Soulsby, 1986).

### **2.3. Vaksinasi melawan koksidiosis**

Vaksinasi menggunakan dosis rendah organisme infeksius telah digunakan secara luas di industri perunggasan untuk melawan koksidiosis, penyakit parasitik yang memberikan dampak ekonomi yang besar pada industri perunggasan di berbagai belahan dunia. Koksidiosis pada ayam disebabkan oleh parasit protozoa obligat intraseluler dari spesies *Eimeria*, yang mengalami sejumlah siklus aseksual untuk produksi merozoit pada sel epitel intestin (3-4 siklus merogonik) sebelum memasuki stadium perkembangan seksual dan memproduksi ookista infeksius. Oleh karena infeksi bersifat self-limiting, dan vaksinasi dengan dosis kecil ookista, sementara mempunyai sedikit dampak patologi, menginduksi solid proteksi melawan *homologous challenge*. Akhir-akhir ini



perkembangan live vaksin yang mengandung ookista yang diseleksi dari infeksi yang terjadi secara alam “ *precocious* “ strain *Eimeria* menghasilkan siklus merogenik lebih rendah dan lebih aman digunakan. Walaupun ada banyak masalah dengan vaksin jenis ini, termasuk kebutuhan adminitrasi untuk mencegah infeksi unggas yang peka oleh ookista produk vaksin dan spesies dan strain spesifik imunitas, vaksin live koksidia telah berhasil digunakan selama 50 tahun lebih dan diproduksi sebagai produk komersial oleh banyak perusahaan kesehatan hewan (Meeusen *et al.*, 2007).

Vaksinasi dapat digunakan untuk pengendalian koksidiosis terhadap infeksi *Eimeria* di alam. Vaksinasi pada induk semang merangsang *protective immunity* yang berkembang cepat. Organisme hidup yang *virulent*, strain hidup yang dilemahkan (Jenkins *et al.*, 1991; Shirley, 1989), derivative parasit non infeksi (Rose, 1987), dan rekayasa genetik vaksin subunit (Bhogal *et al.*, 1992; Danforth *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 1991) semua telah digunakan untuk imunisasi. Pada umumnya, vaksin non infeksi seperti organisme mati, ekstrak stadium perkembangan parasit yang berbeda, supernatan kultur jaringan dan cairan embrionik yang terinfeksi diberikan melalui rute yang berbeda dengan atau tanpa *adjuvants* adalah tidak seefektif dan tidak merangsang *protective immunity* dalam waktu yang lama seperti vaksin hidup (Rose, 1987; Murray, 1986). Walaupun killed vaksin mengandung deretan luas imunogen parasit menginduksi kekebalan humoral, mereka biasanya kekurangan komponen penting yang berhubungan dengan stadium perkembangan intraseluler yang perlu untuk mengaktifkan *cell mediated immunity*. Vaksin subunit terdiri struktur atau komponen metabolik parasit tetapi secara normal tidak mampu menimbulkan spektrum yang luas dari sel T dan B host respon imun seperti yang terjadi pada infeksi dan vaksin hidup. Apabila vaksin subunit menjadi efisien

dalam menginduksi *protective immunity*, ia harus mengandung epitop sel T dan sel B (Good *et al.*, 1988). Kemanjuran vaksin rekombinan koksidia dimasa yang akan datang akan tergantung pada identifikasi antigen yang tampak pada stadium siklus hidup yang berbeda dan penggunaan vektor dan sistem penghantaran untuk menimbulkan respon imun intestin. Selanjutnya keberadaan variasi genetik di antara strain *Eimeria* yang ada di lapangan menjamin evaluasi tipe antigen parasit yang digunakan dalam vaksin rekombinan subunit.

#### **2.4. Killed atau subunit vaccine**

Meeusen *et al.*, (2007) menyatakan beberapa vaksin inaktif mengandung *crude whole organisms*. Akhir-akhir ini vaksin inaktif mengandung struktur antigenik terbatas yang telah terdaftar dan kebanyakan targetnya adalah pangsa pasar hewan. Pada umumnya vaksin ini tidak seefektif *live vaccine* tetapi dapat memperbaiki penyakit atau penularan dengan berbagai tingkatan. Vaksin ini juga merupakan bentuk dasar untuk pengembangan vaksin rekombinan. *Killed subunit vaccine* telah dikembangkan untuk melawan koksidiosis pada ayam oleh ABIC Veterinary Products, Israel, terutama untuk penggunaan pada industri ayam pedaging (Wallach, 1997; Wallach *et al.*, 1995). Target vaksin ini bukan stadium merozoit seperti kebanyakan yang terjadi pada *live vaccine*, tetapi targetnya agak ketahap akhir dari stadium seksual yaitu stadium macrogametocyte yang berkembang ke bentuk ookista, stadium infeksi yang menularkan penyakit. Prinsip dasar strategi vaksin ini adalah akan tetap mengijinkan kekebalan melawan stadium aseksual yang dihasilkan oleh infeksi alam dengan jalan mereduksi ookista dan penularan parasit. Keunggulan dari pendekatan ini adalah ayam petelur, agak ke anak ayam yang diimunisasi, transfer imunoglobulin protektif ke dalam kuning telur dan kemudian

menetas. Pertimbangan bahwa masing-masing ayam petelur bertelur lebih dari 100 butir dalam masa hidupnya, pertimbangan ini menurunkan jumlah vaksinasi dan penanganan hewan. Sebaliknya terhadap spesies dan spesifisitas strain *live vaccine*, vaksin gametocyte terlihat memberikan proteksi partial ke tiga besar spesies *Eimeria*. Kerugian besar dari vaksin ini adalah mahal dalam produksinya, terdiri dari afinitas purifikasi antigen gametocyte bawaan derivat dari ayam yang terinfeksi, dan tetap secara terbuka persiapannya komplek (Belli *et al.*, 2002). Tiga komponen besar afinitas purifikasi antigen gametocyte bawaan belakangan telah diklon dan dikarakterisasi dengan maksud identifikasi komponen protektif dan pengembangan vaksin rekombinan (Belli *et al.*, 2004). Ia tinggal dan menjadi terlihat apabila translasi vaksin bawaan ke vaksin rekombinan akan berhasil, seperti ini telah menjadi penghalang besar sejumlah besar area perkembangan parasit (Newton and Meeusen, 2003).

### **BAB III**

#### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

##### **3.1. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian pada tahun pertama (Th. 2010) adalah :

1. Mengetahui profil fraksi protein imembrane sporozoit *E. tenella* dari ookista yang dipasasekan ayam yang terinfeksi dan mengalami sporulasi menjadi ookista infeksiif.
2. Memperoleh data karakterisasi fraksi protein membrane sprozoit *E. tenella* hasil isolasi dari ookista infeksiif (bersporulasi).

##### **3.2. Manfaat Penelitian**

1. Sebagai dasar pengetahuan ilmiah bahwa fraksi protein membrane sporozoit dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari ookista yang dipasasekan ayam yang terinfeksi dan mengalami sporulasi menjadi ookista infeksiif.
2. Sebagai dasar rekombinan untuk memproduksi material vaksin subunit koksidiosis pada ayam untuk meningkatkan performan dan produktifitas ayam

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Model Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi laboratorium secara eksperimental dilakukan untuk menguji hipotesis melalui beberapa tahapan penelitian.

#### **Isolasi dan karakterisasi protein membran sporozoit *E. tenella* dari stadium ookista.**

- Identifikasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan SDS-PAGE.
- Karakterisasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan Dot Blot
- Pengukuran konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan ELISA

#### **Pasase dan isolasi isolate *E. tenella* sebagai inokulan aktif.**

Stock isolate *E. tenella* dipasasekan pada ayam untuk mendapat isolate *E. tenella* yang aktif. Ayam pedaging CP 707 umur 3 minggu diinfeksi dengan stock isolate *E. tenella* dengan dosis  $4 \times 10^3$  ookista. Tujuh sampai dua belas hari setelah infeksi dilakukan pemanenan ookista melalui kultur feses ayam yang terinfeksi.

#### **Sporulasi isolate *E. tenella* yang belum bersporulasi**

Suspensi ookista belum bersporulasi yang dipanen dari ayam yang diinfeksi *E. tenella* diberi  $K_2Cr_2O_7$  2,5 % dengan perbandingan 1:5 dan dimasukkan dalam incubator dengan suhu  $\pm 26^\circ C$  selama 2-3 hari. Setelah dilihat dibawah mikroskop hampir semua ookista menjadi infektif kemudian dicuci dengan distilled water sampai 3-4 kali untuk membersihkan suspensi dari  $K_2Cr_2O_7$  2,5 %.

**Isolasi sporozoit dari ookista bersporulasi dengan metode grinding menggunakan glass bead.**



Suspensi ookista bersporulasi dimasukkan dalam tabung sentrifuse ditambah beberapa butir glass bead kemudian divortex atau sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 - 10 menit, hasil kemudian dilihat di bawah mikroskop dan banyak dijumpai bentukan seperti buah pisang. Hasil yang didapat disentrifuse ulang dengan protocol yang sama dan dilusi.

#### **Isolasi protein membrane sporozoite *E. tenella* dari mineral dan garam yang lain.**

Protein yang diduga terdapat di dalam supernatan hasil ilusi diisolasi dengan penambahan amonium jenuh sama banyak dan dicampur serta diinkubasi dalam suhu 4°C selama semalam, kemudian dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit, 4°C. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan PBS tiga sampai lima kali sampai bersih dengan cara disentrifugasi dengan cara yang sama seperti di atas. Pelet yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 1-2 ml. Untuk mendapatkan protein murni didialisis semalam sehingga didapatkan protein yang bebas dari garam-garam lain. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer pada OD<sub>590</sub>.

#### **Karakterisasi protein membran sporozoite *E. tenella* menggunakan metode SDS-PAGE.**

**Persiapan gel.** Plate gel dibuat dengan merangkai dua plate kaca dengan jarak antar plate  $\pm$  1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sample (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

*Separating gel* dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfate* (APS) dan N,N,N,N.-tetramethylethylendiamina (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam plate dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan

stacking gel dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

**Injeksi sample.** Sampel yang berisi 12,5 µl supernatan protein membrane sporozoit dan 12,5 µl *running sample buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 µl untuk tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik dengan arus listrik sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda ± 0,5 cm dari batas bawah *plate gel*.

**Perlakuan setelah running.** Gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 ml asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan massa molekul relative protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan menghitung *Retardation Factor* (Rf) dari masing-masing pita dengan menggunakan rumus (Sumitro, 1996) sebagai berikut

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relative sampel.

**Metode isolasi protein membran dengan Elektroelusi (Aulanni'am, 2005)**

*Gel* SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selovan dan direndam dengan 0,05 M *phosphate buffer* (PB) sebanyak 1-2 ml. Kemudian dimasukkan dalam *chamber* elektroelusi yang mengandung *phosphate buffer* 0,01 M. Selanjutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 40 0C (dalam refrigerator), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama semalam.

Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara melakukan potongan *gel acrylamide* dan diwarnai dengan staining *commasie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan destaining, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selovan dikeluarkan, kemudian dipresipitaskan dan dipurifikasi untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

**Metode karakterisasi protein membran sporozoit dengan immunoblotting (Dot Blot) (Aulanni'am, 2005)**

Kertas nitroselulosa dipotong dengan lebar panjang  $\pm$  5 cm dan lebar 3 cm dan digunakan sebagai matrik padat. Rendam kertas nitroselulosa dalam TBS selama 15 menit dan keringkan selama 5 menit. Sebanyak 1-2  $\mu$ g antigen per ml ditetaskan pada kertas nitroselulosa dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit dengan kondisi lembab. Kertas kemudian diblok dengan buffer blocking dalam 5% skim. Cuci 2-3 kali masing-masing selama 5 menit dengan TBS-T dan dikeringkan. Berikutnya ditambahkan antibodi anti protein membran dari mouse (Ab primer) pada pengenceran 1:100 dan inkubasi 1-2 jam pada suhu kamar. Pencucian sebanyak 3 kali dengan TBS-T masing-masing selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan antibodi sekunder (1:1000) dan

diinkubasi selama 1-2 jam. Berikutnya dilakukan pencucian 3 kali dengan TBS tanpa Tween masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan substrate di shaking selama 30-60 menit kemudian cuci dengan air untuk menghentikan reaksi.

#### 4.2. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan diusahakan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium. Hasil pengamatan pada penelitian ini secara kuantitatif berupa nilai OD dan konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan ELISA, dianalisis secara statistik dengan *t test*. Analisis data profil dan karakter protein membran sporozoit *E. tenella* menggunakan analisis deskriptif.

#### 4.3. Sampel Penelitian

Ookista infeksi isolat *E. tenella* dipasasekan dan dikulture secara berkala untuk menjaga anfigenitas dan virulensinya. Ayam pedaging dari PT Multibreeder Adirama Indonesia, Farm Unit 4, Desa Songsong, Kecamatan Singosari, Kabupaten Malang, ISA.

#### 4.4. Variabel Penelitian

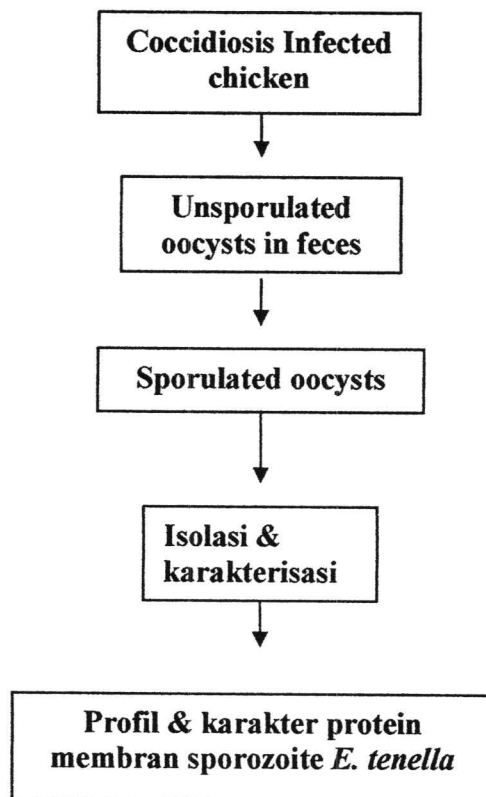
##### Klasifikasi variabel

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

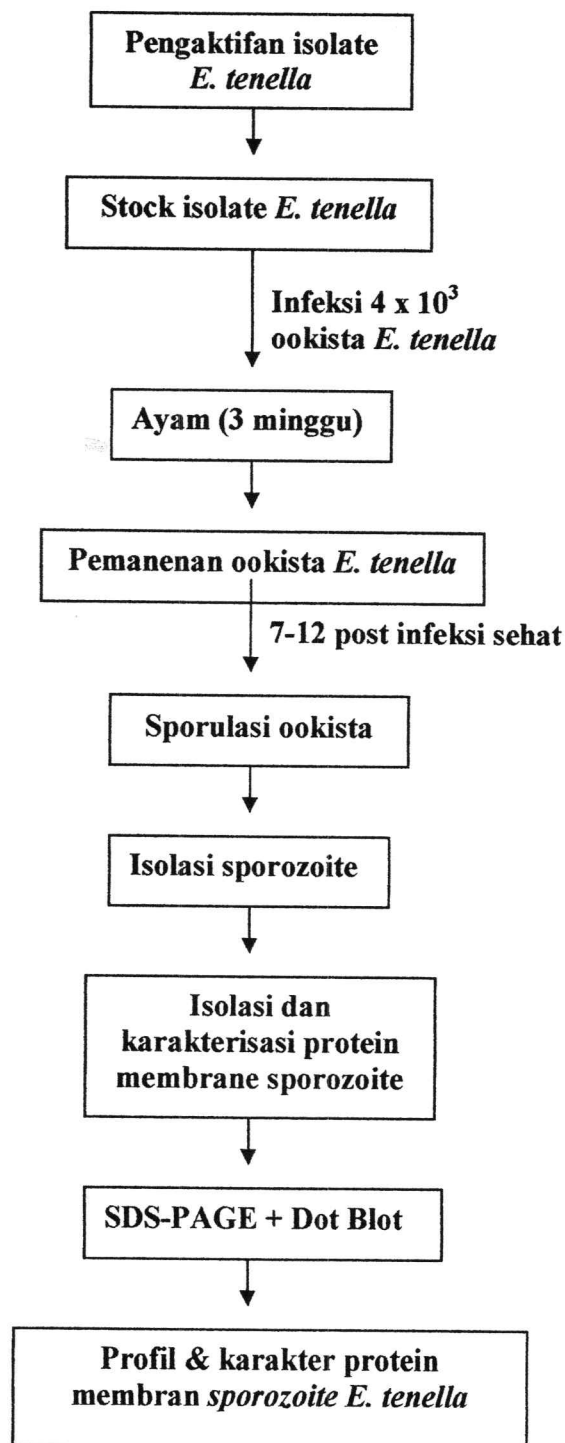
1. Variabel bebas (independent variable) yaitu dosis sporozoit dari ookista *E. tenella*
2. Variabel tergantung (dependent variable) yaitu profil, konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella*, ekspresi protein membran sporozoit *E. tenella*
3. Variabel kendali meliputi isolat *E. tenella*, strain ayam pedaging dan instrumen (apparatus) yang digunakan.

**Isolasi dan Karakterisasi Ekspresi Gen Penyandi Protein Membran Sporozoit *Eimeria tenella* Sebagai Dasar Rekombinan untuk Produksi Material Vaksin Subunit Koksidiosis Pada Ayam**

**Kerangka Konseptual Penelitian**



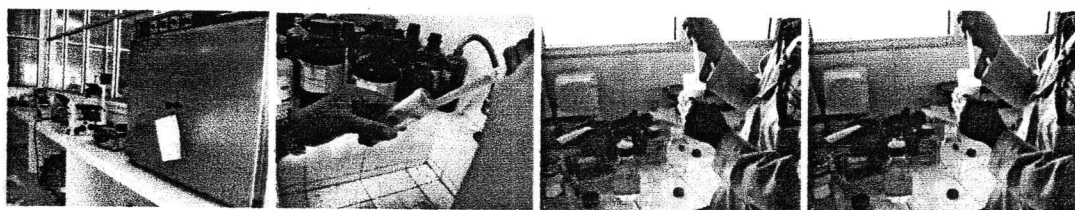
**Kerangka operasional penelitian tahap pertama (Tahun I, 2010)**



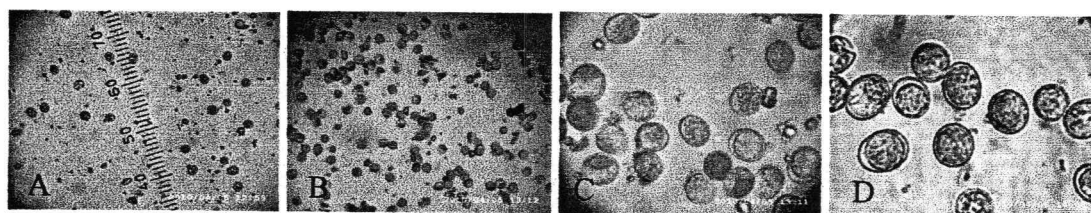
## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

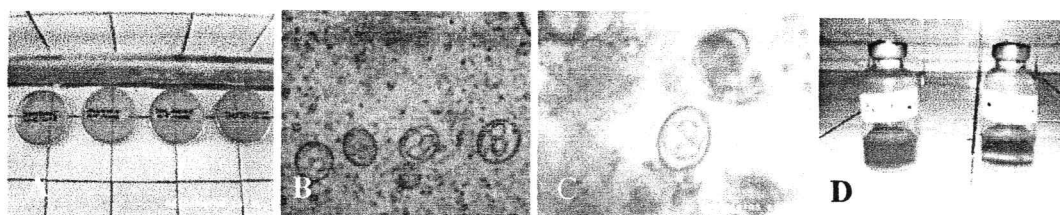
#### 5.1. Pasase dan isolasi isolate *E. tenella* sebagai inokulan aktif.



Gambar 1. Isolasi ookista *E. tenella* dari feses ayam yang diinfeksi



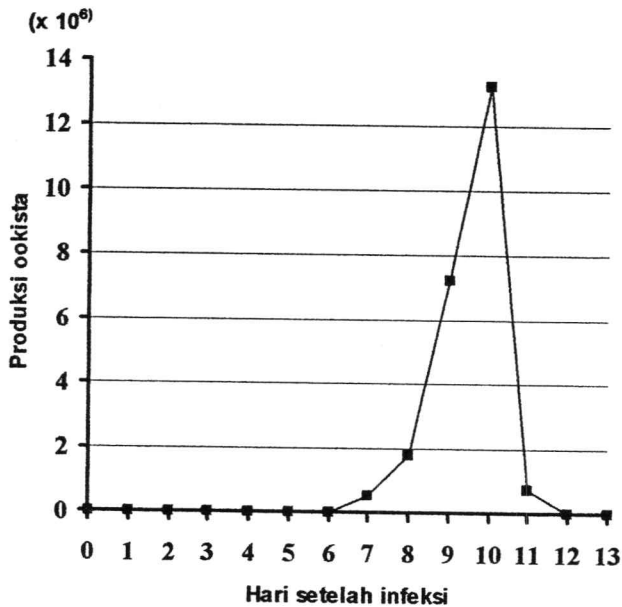
Gambar 2. Hasil isolasi dari sampel feses berupa ookista *Eimeria tenella* yang belum bersporulasi. A-B, 100x ; C-D, 400x.



Gambar 3. Proses sporulasi unsporulated oocysts menjadi sporulated ookista yang mengandung sporozoite untuk isolasi membrane protein (A-C), isolate sporulated *E. tenella* yang diperoleh (D)

Stock isolate *E. tenella* dipasasekan pada ayam untuk mendapat isolate *E. tenella* yang aktif. Ayam pedaging CP 707 umur 3 minggu diinfeksi dengan stock isolate *E.*

*tenella* dengan dosis  $4 \times 10^3$  ookista. Tujuh sampai dua belas hari setelah infeksi dilakukan pemanenan ookista melalui kultur feses ayam yang terinfeksi.



Gambar 4. Pola produksi ookista per hari pada ayam yang diinfeksi *E. tenella*. Total produksi ookista  $[27.5 \pm 0.5] \times 10^6$ /ayam dan periode paten adalah  $[12.4 \pm 0.7]$  hari dan jumlah suspensi ookista *E. tenella*  $7 \times 10^6$ /ml sebanyak 10 ml

Pola produksi ookista setiap hari dari kelompok ayam yang diinfeksi dengan *E. tenella* hampir mempunyai kesamaan dengan laporan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Stiff dan Bafundo tahun 1993. Ookista pertama kali dikeluarkan pada hari ke tujuh setelah infeksi, kemudian mencapai puncak produksi pada hari ke sepuluh dan setelah itu produksi ookista turun secara cepat dan sedikit sekali terlihat pada hari ke dua belas setelah infeksi bahkan hampir mencapai angka nol sesudahnya (Gambar, 4).

Total produksi ookista infeksi *E. tenella* pada penelitian ini adalah  $[7.5 \pm 0.5] \times 10^6$ /ayam dan periode paten adalah  $[12.4 \pm 0.7]$  hari (Gambar 4.). Gejala klinis seperti

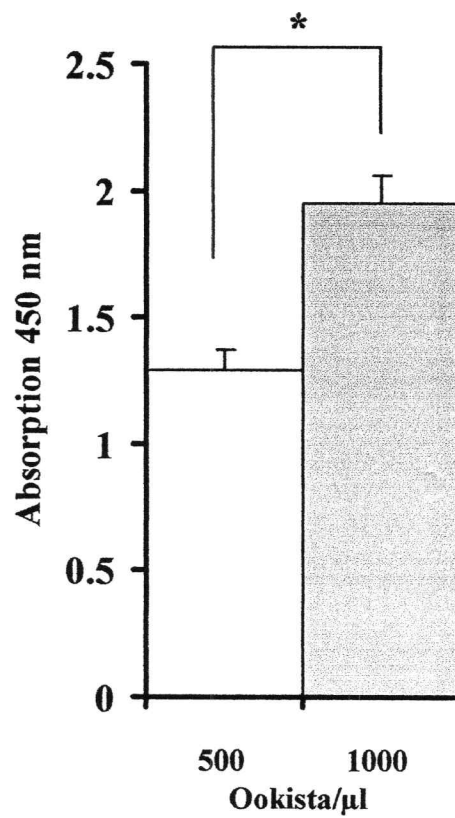


berak encer bercampur darah, agak pucat, penurunan nafsu makan terlihat dengan jelas pada kelompok ayam yang diinfeksi *E. tenella* dibandingkan dengan kelompok ayam yang tidak diinfeksi. Siklus hidup *E. tenella*, hal ini stadium endogenus berjalan dengan sempurna terjadi pada kelompok ayam yang diinfeksi sehingga pada saat memasuki fase pembentukan zigot terjadi dengan baik (Soulsby, 1986). Levine (1985) menyatakan bahwa gejala penyakit yang berupa berak darah mulai tampak ketika skizon generasi kedua membesar dan mengeluarkan merozoit generasi kedua. Skizon generasi kedua yang berukuran sangat besar pecah menyebabkan kerusakan sel-sel epitel sekum dan perdarahan yang meluas pada lumen sekum.

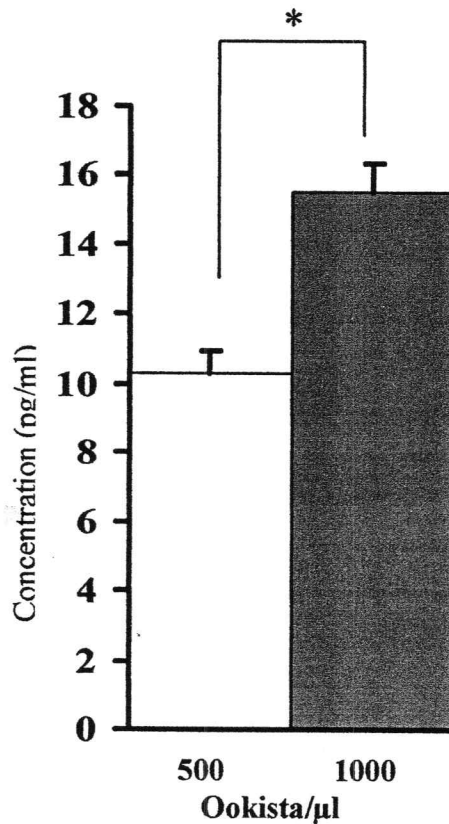
## 5.2. Konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella* melalui indirect ELISA.

Tabel 1. Nilai Optical Density (OD) dan kadar protein membran sporozoit *E. tenella*

No. Sampel	Optical Density (OD) 450 nm		Kadar (pg/ml)	
	Konsentrasi 500/ $\mu$ l	Konsentrasi 1000/ $\mu$ l	Konsentrasi 500/ $\mu$ l	Konsentrasi 1000/ $\mu$ l
1	1.355	1.833	10.81	14.62
2	1.408	1.976	11.23	15.76
3	1.33	1.878	10.64	14.98
4	1.251	1.949	9.98	15.55
5	1.268	1.989	10.12	15.87
6	1.168	1.84	9.32	14.68
7	1.335	2.004	10.65	15.99
8	1.395	1.976	11.13	15.76
9	1.223	1.811	9.76	14.45
10	1.24	2.032	9.89	16.21
11	1.28	2.08	10.22	16.59
12	1.237	1.809	9.87	14.43
13	1.28	1.945	10.21	15.52
14	1.214	1.849	9.69	14.75
15	1.371	2.087	10.94	16.65
16	1.365	1.785	10.89	14.24
17	1.433	2.116	11.43	16.88
18	1.222	1.912	9.75	15.25
19	1.198	2.076	9.56	16.56
20	1.272	2.086	10.15	16.64
X	1.29225	1.95165	10.312	15.569



**Gambar 5. Perbandingan Optical Density (OD) 450 nm protein membran sporozoit *E. tenella* dengan konsentrasi antara 500 ookista/μl dan 1000 ookista/μl stock isolat yang didapat. \*,  $p < 0.05$**



**Gambar 6. Perbandingan konsentrasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan konsentrasi antara 500 ookista/μl dan 1000 ookista/μl stock isolat yang didapat. \*,  $p < 0.05$**

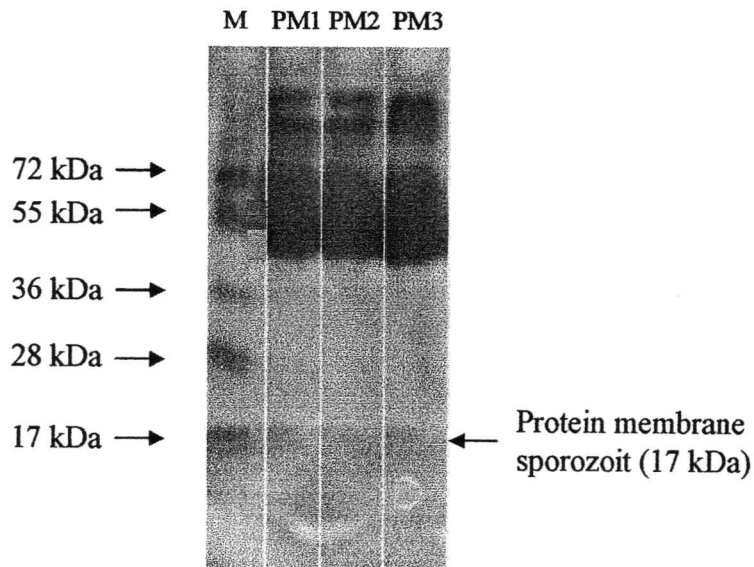
Hasil pengukuran konsentrasi protein membrane sporozoit *E. tenella* dengan teknik indirect ELISA pada konsentrasi suspensi ookista 500/μl dibandingkan dengan konsentrasi ookista 1000/μl menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) (Gb. 6), dimana konsentrasi protein membrane sporozoit *E. tenella* dari suspensi ookista 1000/μl meningkat  $\pm 46\%$  lebih tinggi dari pada konsentrasi protein membrane sporozoit *E. tenella* suspensi ookista 500/μl. Demikian juga dengan OD yang dihasilkan mempunyai tren yang sama dengan konsentrasinya (Gb. 5). Penelitian yang dilakukan oleh Martin *et al.*, (1994) menunjukkan bahwa konsentrasi protein membran sporozoit dari hasil

grinding suspensi ookista infeksi meningkat hampir 50% dari setiap kelipatan dua dari konsentrasi suspensi ookista.

Protein *E. tenella* dimana didalamnya termasuk protein membrane sporozoit adalah protein yang berperan sebagai antigen yang dapat menginduksi imun tubuh hospes segera setelah terjadi infeksi atau vaksinasi, bentuk proteksi terhadap penyakit. Aktifitas protein selama terjadi koksidiosis pada unggas nampak dominan peranannya (Choi *et al.*, 1999; Lillehoj and Choi, 1998). Protein membrane sporozoit menginduksi kekebalan melalui sel mediated immunity terhadap *Eimeria* melalui aktivasi limfosit dan peningkatan ekspresi MHC kelas II gen (Kaspers *et al.*, 1994; Lillehoj, 1989). Peningkatan respon terhadap protein antigen *E. tenella* pada mencit (Rose *et al.*, 1991) dan pada ayam (Martin *et al.*, 1994; Yun *et al.*, inpress) telah digunakan sebagai ukuran respon sel T terhadap antigen *Eimeria*.

### 5.3. Identifikasi Protein Membran Sporozoit dengan SDS-PAGE

Pada suspensi hasil elusi protein membrane sporozoit *E. tenella* dilakukan identifikasi protein membrane sporozoit dengan teknik SDS-PAGE; *Dot Blot*. Gambar 7. memperlihatkan hasil identifikasi protein dengan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue R-250*. Tampak pada preparasi protein membrane sporozoit *E. tenella* memperlihatkan adanya beberapa pita dengan variasi beberapa pita sesuai dengan marker yang sudah mempunyai standard berat molekul tertentu. Berdasarkan pengukuran berat molekul dan dikonfirmasi dengan marker maka semua sampel menunjukkan pita yang sama dengan berat molekul 17 kDa.



**Gambar 7. Berat molekul protein membran sporozoit *E. tenella* (SDS-PAGE). M: marker, (Sesuai dengan penelitian Song, *et al.*, 2007, berat molekul membran sporozoit sekitar 17-18 kDa)**

	Konsentrasi anti protein membran sporozoit	
	5 µg/ml	2,5 µg/ml
1000 pg/ml	A B	A B
500 pg/ml	A B	A B

**Gambar 8. Immunoblotting untuk karakterisasi protein membran sporozoit *E. tenella* dengan teknik Dot Blot. A, protein membran sporozoit *E. necatrix*; B, protein membran sporozoit *E. tenella*.**

Setelah dilakukan SDS-PAGE, maka untuk memastikan protein membran sporozoit *E. tenella* lebih spesifik dilanjutkan karakterisasi dengan *Dot Blot*. Hasil karakterisasi protein dengan *Dot Blot* dapat dilihat pada Gambar 8. Gambar 8 menunjukkan hasil uji

protein yang ternyata spesifik dengan antibodi monoklonal anti protein membran sporozoit *E. tenella*, kecuali kelompok A (antigen, protein *E. necatrix*).

Pada kelompok B terlihat mengekspresikan protein membrane sporozoit *E. tenella* yang dapat dikenali oleh antibodi monoklonal anti protein membrane sporozoit *E. tenella*. Pada kelompok B (protein membrane sporozoit *E. tenella*) terlihat spot yang tajam, yang menunjukkan intensitas yang lebih kuat dari pada protein membrane sporozoit *E. necatrix*. Hal ini menunjukkan bahwa protein membrane sporozoit *E. tenella* kuat afinitasnya dan spesifik terhadap anti protein membrane sporozoitnya daripada protein membrane sporozoit *E. necatrix*.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan:

1. Isolasi dan dikarakterisasi protein membrane sporozoit *E. tenella* dapat dilakukan dari pemecahan atau grinding ookista infeksi dengan berat molekul 17 kDa.
2. Intensitas dan afinitas protein membrane sporozoit *E. tenella* terhadap anti protein membran semakin terlihat tajam dengan meningkatnya konsentrasi yang antigen.

#### **6.2. Saran**

Saran yang dapat diberikan adalah diperlukan lebih banyak pembandingan protein membrane sporozoit dari *Eimeria* spesies lain pada ayam sehingga dapat diketahui ada tidaknya reaksi silang terhadap spesies *Eimeria* lain yang menyerang ayam.



## DAFTAR PUSTAKA

- Bhogal, B. S., Miller, G. A., Anderson, A. C., Jessee, E. J., Strausberg, S., McCandliss, R., Nagle, J. and Strausberg, R. L. 1992. Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31: 323 – 335.
- Cook, G. C. 1988. Small-intestinal coccidiosis: an emergent clinical problem. *J. Infect.* 16: 213 – 219.
- Danforth, H. D., Augustine, P. C., Ruff, M. D., McCandliss, R., Strausberg, R. L. and Likel, M. 1989. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poult. Sci.* 68: 1643 – 1652.
- Digby, M. R. and Lowenthal, J. W. 1995. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 15: 939-945.
- Findly, R. C., Robert, S. J. and Hayday, A. C. 1993. Dynamic response of murine gut intraepithelial T cells after infection by the coccidian parasite *Eimeria*. *Eur. J. Immunol.* 23: 2557 – 2564.
- Foreyt, W. J. 1986. Epidemiology and control of coccidian in sheep. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2: 383 – 288.
- Fry, M., Hudson, A. T., Randall, A. W. and Williams, R. B. 1984. Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa: Coccidia). *Biochem. Pharmacol.* 33: 2115 -2122.
- Good, M. F., Miller, L. H., Kumar, S., Quakyi, I. A., Keister, D., Adams, J. H., Moss, B., Berzofsky, J. A. and Carter, R. 1988. Limited immunological recognition of critical malaria vaccine candidate antigens. *Science* 242: 574 – 577.
- Hammond, D. M. 1982. Life cycles and development of coccidian. In: Hammond, D. M., Long, P. L., editors. *The coccidian*. Baltimore, Maryland: University Park Press., p. 45 – 79.
- Jakowlew, S. B., Mathias, A. and Lillehoj, H. S. 1997. Transforming growth factor-beta isoforms in the developing chicken intestine and spleen. Increase in transforming growth factor-beta-4 with coccidia infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55: 321-339.
- Jenkins, M. C., Castle, M. D. and Danforth, H. D. 1991. Protective immunization against the intestinal parasite *Eimeria acervulina* with recombinant coccidial antigen. *Poult. Sci.* 539 – 547.

- Jenkins, M. C., Augustine, P. C., Danforth, H. D. and Barta, J. R. 1991. X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s). *Infect. Immun.* 59: 4042 – 4048.
- Lillehoj, H. S. 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28: 1071-1081.
- Lillehoj, H and Choi, K. D. 1998. Recombinant chicken interferon-gamma inhibits in vivo *Eimeria tenella* development and reduces in vivo oocyst production and body weight loss following challenging infection *E. acervulina*. *Avian Dis.* 42: 307-314.
- Lin, A. W., Chang, C. C. and McCormick, C. C. 1996. Molecular cloning and expression of an avian nitric oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5' flanking region. *J. Biol. Chem.* 271: 11911-11919.
- Mayberry, L. F., Marquardt, W. C., Nash, D. J. and Plan, B. 1982. Genetic dependent transmission of *Eimeria separata* from *Rattus* to Three strains of *Mus musculus*, an abnormal host. *J. Parasitol.* 68: 1124 – 1126.
- Mathis, G. F. and McDougald, L. R. 1987. Evaluation of interspecific hybrids of the chicken, guinea fowl, and Japanese quail for innate resistance to coccidian. *Avian Dis.* 31: 740 – 745.
- McLoughlin, D. K. 1969. The influence of dexamethasone on attempts to transmit *Eimeria meleagridis* to chickens and *E. tenella* to turkeys. *J. Protozool.* 16: 145 – 148.
- Murray, M. J. 1986. Enterotoxin activity of a *Salmonella typhimurium* of equine origin in vivo in rabbits and the effect of *Salmonella* culture lysates and cholera toxin on equine colonic mucosa in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 47: 769 -773.
- Rose, M. E. 1987. Immunity to *Eimeria* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17: 333 – 343.
- Rose, M. E. and Hesketh, P. 1976. Immunity to coccidiosis: stages of the life cycle of *Eimeria maxima* which induce, and are affected by, the response of the host. *Parasitology* 73: 25 – 37.
- Rose, M. E., Wakelin, D. and Hesketh, P. 1989. Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 57: 1599-1603.
- Rose, M. E., Smith, A. L. and Wakelin, D. 1991. Gamma interferon-mediated inhibition of *Eimeria vermiformis* growth in cultured fibroblasts and epithelial cells. *Infect. Immun.* 59: 580-586.

- Shirley, M. W. 1989. Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry. *Parasite Immunol.* 11: 117 – 124.
- Smith, C. K. and Lee, D. E. 1986. Monosaccharide transport by *Eimeria tenella* sporozoites. *J. Parasitol.* 72: 163 -169.
- Steel, R. G. D. and Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Tregaskes, C. A. and Young, J. R. 1997. Cloning of chicken lymphocyte marker cDNAs from eukaryotic expression libraries. In *Immunology Methods Manual*, Vol. 4, I. Lefkovits ed. Academic Press, San Diego, p. 2295.
- Trout, J. M. and Lillehoj, H. S. 1996. T lymphocytes role during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53: 163 – 172.
- Wallach, M., Pillemer, G., Yarus, S., Halabi, A., Pugatsch, T. and Mencher, D. 1990. Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. *Infect. Immun.* 58: 557 – 562.
- Wallach, M., Smith, N. C., Petracca, M., Miller, C. M., Eckert, J. and Braun, R. 1995. *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. *Vaccine* 13: 347 – 354.
- Yun, C. H., Lillehoj, H. S. and Lillehoj, E. P. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. 24: 303 – 324.
- Yunus, M., Horii, Y., Makimura, S. And Smith, A.L. 2005. The relationship between the anticoccidial effects of clindamycin and the development of immunity in the *Eimeria praagensis*/mouse model of large intestinal coccidiosis. *J. Vet. Med. Sci.* 67 (2): 165 – 170.
- Yashiro, K., Lowenthal, J. W., O'Neill, T. E., Ebisu, S., Takagi, H. and Moore, R. 2001. High level production of chicken interferon- $\gamma$  by *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Expression Purification* (In press)
- Zhang, S., Lillehoj, H. S. and Ruff, M. D. 1995. Chicken tumour necrosis-like factor. I. In vitro production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *Poultry Sci.* 74: 1304-1310.
- Zhang, S., Lillehoj, H. S. and Ruff, M. D. 1995. In vivo role of tumour necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. 39: 859-866.

**LAMPIRAN****Laboratorium**

No.	Nama Laboratorium	Jenis pekerjaan	Kemampuan
1.	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	SDS-PAGE, Dot Blot	Memadai
2.	Lab. Virologi FKH Unair	Isolasi dan kultur protein membran Sporozoit	Memadai
3.	Lab. DHF, Institut Trop.Disease (ITD), Unair	ELISA, PCR	Memadai

**Peralatan utama yang tersedia**

No	Nama alat	Lokasi	Kegunaan	Kemampuan
1.	ELISA reader	Lab. DHF ITD	Pembacaan hasil	Memadai
2.	SDS-PAGE apparatus	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Pengamatan hasil	Memadai
3.	Dot Blot apparatus	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Histopatologi	Memadai
4.	Mikropipet	Lab. Virologi FKH	Isolasi dan kultur protein membran sporozoit	Memadai
5.	Inkubator	Lab. Virologi FKH	Inkubasi kultur	Memadai
6.	Autoclave	Lab. Virologi FKH	Sterilisasi peralatan	Memadai
7.	RT-PCR	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Sintesis RNA total dan Amplifikasi cDNA	Memadai

**Keterangan Tambahan**

Fasilitas, sarana dan prasarana untuk tempat kegiatan penelitian lengkap. Lingkungan cukup kondusif di dalam Universitas Airlangga dan Pemasok DOC ayam pedaging dari PT Charoen Pockphand sangat membantu penyediaan ayam, hal ini sudah kami alami saat membutuhkan DOC untuk penelitian tahun kemarin yang didanai dari Dana Dik, Rutin dan Dosen muda.

**Administrasi dan Keuangan****1. Realisasi Sumberdaya Manusia**

Personalia pelaksana penelitian

No.	Nama	Tugas Kegiatan	Bidang Keahlian	Pendidikan Akhir	Unit Kerja/ Lembaga
1.	Muchammad Yunus, Drh., M.Kes., Ph.D.	Peneliti Utama	Imunologi Parasit	S-3	FKH/Unair
2.	Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., Drh	Anggota Peneliti	Biologi Molekuler	S-3	FKH/Unair

**2. Anggaran Biaya**

Penerimaan dan pengeluaran Termin I (70%)

Penerimaan			Pengeluaran		
Tgl.	Uraian	Rp.	Tgl.	Uraian	Rp.
11/5 '10	Dana cair 70 % (tahap I)	22.750.000,-	15/5 '10	Sewa kandang	1.000.000,-
				Transportasi	500.000,-
			24/5 '10	Pembelian bahan	1.500.000,-
			28/5 '10	Pembelian bahan	800.000,-
				Transportasi	500.000,-
			6/6 '10	Pembelian bahan	1.500.000,-
			10/6 '10	Pembelian bahan	1.500.000,-
				Transportasi	500.000,-
			14/6 '10	Pembelian peralatan	1.300.000,-
			22/6 '10	Pembelian bahan	1.500.000,-
				Transportasi	500.000,-
			5/7 '10	Pembelian peralatan	1.000.000,-
			8/7 '10	Pembelian peralatan	1.500.000,-
				Transportasi	500.000,-
			12/7 '10	Pembelian bahan	1.500.000,-
			16/7 '10	Pembelian peralatan	1.500.000,-
			22/7 '10	Transportasi	400.000,-
			24/7	Pembelian bahan	1.400.000,-

			'10		
			28/7 '10	Pembelian bahan	2.000.000,-
			2/8 '10	Pembelian bahan	1.000.000,-
			4/8 '10	Transportasi	250.000,-
			9/8' 10	Honor Anggota Peneliti - 2 bulan (Juni-Juli '10)	300.000,-
			9/8 '10	Honor Ketua Peneliti - 2 bulan (Juni-Juli '10)	300.000,-
	<b>Total</b>	<b>22.750.000,-</b>		<b>Total</b>	<b>22.750.000,-</b>