

13.05.2006

SKRIPSI

**PROFIL PROTEIN STADIUM SKIZON *Leucocytozoon sp*
YANG DIISOLASI DARI AYAM BURAS**

KH 162/06

Rah.

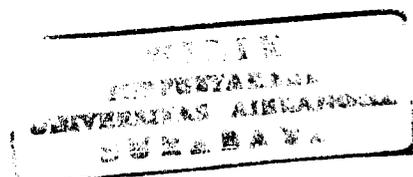
0



Oleh :

NOVITA BUDIARTI RAHAYU
SURABAYA-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



**PROFIL PROTEIN 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

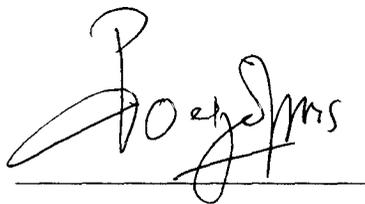
Oleh

NOVITA BUDIARTI RAHAYU

NIM 060213052

Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Poedji Hastutick, M.Si., drh.)

Pembimbing pertama



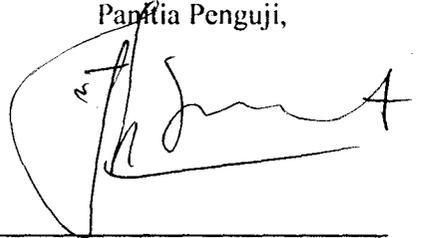
(Rochmah Kurnijasanti, M.Si., drh.)

Pembimbing kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,



Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., drh
Ketua



Endang Suprihati, M.S., drh
Sekretaris



Nove Hidajati, M.Kes., drh
Anggota



Poedji Hastuti, M.Si., drh
Anggota



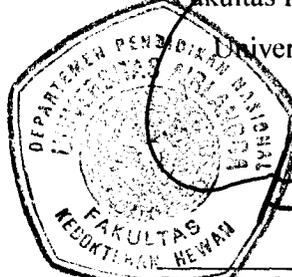
Rochmah Kurnijasanti, M.Si., drh
Anggota

Surabaya, 07 Juli 2006

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh
NIP. 130687297

PROFIL PROTEIN STADIUM SKIZON *Leucocytozoon sp* YANG DIISOLASI DARI AYAM BURAS

Novita Budiarti Rahayu

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* berdasarkan berat molekul yang dapat digunakan sebagai dasar pengembangan kit diagnostik dalam upaya pengendalian penyakit Leucocytozoonosis.

Organ pankreas, paru-paru, ginjal, hati dan limpa dari ayam buras yang terinfeksi *Leucocytozoon sp* diisolasi terlebih dahulu dan diambil sebagian kemudian disonikasi untuk dijadikan sebagai sampel. Sampel organ kemudian dihitung konsentrasi proteinnya dengan spektrofotometer. Analisis protein dari organ-organ sampel menggunakan teknik *Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein skizon pada organ pankreas terbaca paling jelas dan paling berbeda dengan kontrol dibanding organ lainnya. Selanjutnya hanya organ pankreas yang dijadikan sebagai sampel protein stadium skizon *Leucocytozoon sp*.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat tujuh pita protein *Leucocytozoon sp* pada stadium skizon yaitu pada berat molekul (BM): 23,29 kDa, 30,2 kDa, 35,48 kDa, 37,15 kDa, 39,81 kDa, 48,98 kDa dan 155,75 kDa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan rahmat dan karunia kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi berjudul “**PROFIL PROTEIN STADIUM SKIZON *Leucocytozoon sp* YANG DIISOLASI DARI AYAM BURAS**” yang diajukan untuk memenuhi syarat guna memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Keberhasilan dalam penulisan ini tidak luput dari bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Dengan kerendahan hati penulis mengucapkan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Poedji Hastutiek, M.Si., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Rochmah Kurnijasanti, M.Si., drh sebagai dosen pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis dengan perhatian dan kesabaran hingga terselesainya skripsi ini.
3. Endang Suprihati, M.S., drh, Nunuk Dyah R.L., M.S., drh dan Ririen N. Wahyuti, M.Kes., drh dalam proyek Due Like Batch III serta Mufasirin, M.Si., drh yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

4. Dr. Ir. Hj. Mustikoweni P., M.A. sebagai dosen wali dan seluruh dosen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dan membekali ilmu selama perkuliahan.
5. Mama, Papa, kakak-kakakku tercinta Mauliana Budiastuti dan Rahmanto Budisetiawan yang senantiasa memberi semangat serta harapan dan membantu penulis dalam menyelesaikan perkuliahan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
6. Teman-temanku seperjuangan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penulisan skripsi ini.

Penulis berharap bahwa penulisan ini dapat membantu memberikan manfaat bagi pembaca. Penulis menyadari bahwa penulisan ini jauh dari sempurna karena keterbatasan kemampuan yang dimiliki penulis, maka dengan segala kerendahan hati penulis menerima kritik maupun saran guna memperbaiki isi dari skripsi ini agar menjadi lebih sempurna.

Surabaya, Juli 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Parasit <i>Leucocytozoon sp</i>	5
2.1.1 Taksonomi.....	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Siklus Hidup.....	7
2.2 Tinjauan tentang Vektor Leucocytozoonosis pada Ayam Buras...	9
2.3 Tinjauan tentang Leucocytozoonosis pada Ayam Buras	11
2.4 Tinjauan tentang Antigen Parasit.....	13
2.5 Tinjauan tentang Respon Imun terhadap Parasit.....	14

2.6 Tinjauan tentang Analisis Protein dengan SDS-PAGE	15
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	18
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2 Materi Penelitian.....	18
3.2.1 Alat Penelitian.....	18
3.2.2 Bahan Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Isolasi Organ	19
3.3.2 Pembuatan Whole Protein.....	19
3.3.3 Elektroforesis dengan SDS-PAGE.....	20
BAB 4 HASIL PENELITIAN	23
BAB 5 PEMBAHASAN.....	25
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	28
6.1 Kesimpulan	28
6.2 Saran.....	28
RINGKASAN	29
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN.....	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi <i>Leucocytozoon sp</i>	6
2.2 Siklus Hidup <i>Leucocytozoon sp</i>	9
3.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	22
4.1 Hasil fraksinasi protein stadium skizon <i>leucocytozoon sp</i>	23
4.2 Perbandingan berat molekul protein skizon <i>Leucocytozoon sp</i> dengan marker	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Protokol berat molekul SDS-PAGE.....	35
2. Perhitungan berat molekul <i>Leucocytozoon sp</i> dengan cara menggunakan regresi cubic.....	37
3. Gambar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian.....	40

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Banyaknya kejadian kematian unggas terutama ayam buras tidak hanya dikarenakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus maupun jamur, tapi juga parasit yaitu protozoa darah. Protozoa darah yang menyerang ayam adalah salah satu penyebab yang perlu diperhatikan, karena bersifat menular ke ayam lain dalam waktu singkat dan menimbulkan dampak kerugian yang cukup banyak (Munoz *et al.*, 1999).

Leucocytozoonosis adalah penyakit yang tergolong ke dalam *Malaria Like Unggas* yang disebabkan oleh protozoa darah genus *Leucocytozoon*. Penyakit ini tersebar luas khususnya di benua Asia. Wabah penyakit telah dilaporkan terjadi di India, Burma, Srilanka, Philipina, Singapura, Taiwan, Malaysia, Korea, Jepang, dan Amerika Serikat. Di Thailand penyakit ini dikenal dengan nama "*Bangkok Haemorrhagic Disease*" (Ressang, 1984). Sejauh ini dikenal 65 spesies *Leucocytozoon*, mayoritas dari spesies-spesies tersebut dikenal hanya berdasarkan pewarnaan gametosit dari darah perifer, sehingga menyulitkan identifikasi yang lebih pasti. Di Indonesia spesies yang menyerang ayam buras pada umumnya adalah *Leucocytozoon sabrazezi* dan *Leucocytozoon caulleryi*. Di antara spesies tersebut, *L. caulleryi* yang mempunyai daerah penyebaran yang lebih luas serta menimbulkan dampak kerugian yang lebih besar (Heryanto dkk., 2003).



Penyakit Leucocytozoonosis menyebar ke seluruh Indonesia diantaranya di pulau Sumatra, Jawa, Sulawesi, Maluku dan Bali (Mufasirin dkk., 2000). Pada peternakan-peternakan ayam buras di Jawa Timur, baik peternakan maju maupun peternakan tradisional, Leucocytozoonosis menunjukkan tingkat kejadian tinggi yang mencapai 70 %.

Masalah yang timbul berkaitan dengan kasus Leucocytozoonosis adalah seringkali ayam menunjukkan gejala klinis yang berat bahkan kematian pada saat terjadi proses skizogoni. Pada proses skizogoni di jaringan, parasit sulit dideteksi sehingga seringkali ayam mati sebelum terdiagnosis dengan jelas (Soulsby, 1986).

Selama ini diagnosis penyakit Leucocytozoonosis didasarkan pada gejala klinis, perubahan pasca kematian, ulas darah dan gerusan organ. Metode diagnosis yang dapat menjawab permasalahan tersebut adalah dengan memproduksi antibodi poliklonal dari parasit sebagai kit diagnostik untuk mendeteksi adanya *Leucocytozoon sp* dalam tubuh induk semang.

Penelitian terhadap profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* berdasarkan berat molekulnya perlu dilakukan untuk sebagai dasar pengembangan kit diagnostik dalam upaya pengendalian penyakit Leucocytozoonosis. Hal ini sangat membantu memperkecil kerugian pada peternakan-peternakan unggas terutama peternakan ayam yang diakibatkan oleh penyakit ini.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* yang diisolasi dari ayam buras di Surabaya yang dinyatakan dengan berat molekul?

1.3 Landasan Teori

Protein secara fisikokimiawi dapat dikelompokkan berdasarkan kelarutannya dalam larutan garam kuat, muatan elektrostatik, berat molekul dan struktur antigeniknya. Protein memiliki empat macam struktur yakni struktur primer, sekunder, tersier dan kuarterner. Penentuan protein berdasarkan berat molekul dapat ditemukan pada struktur kuarterner dan dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) yang dapat memutuskan ikatan-ikatan protein sehingga memecahkan struktur protein kecuali struktur primernya (Tizard, 1982; Murray dkk., 2003).

Antigen parasit dapat dikoleksi dari beberapa bagian parasit, beberapa diantaranya bersifat immunospesifik sehingga dapat digunakan untuk membedakan infeksi parasit lainnya dan menghindari adanya reaksi silang. Antigen tersebut sangat berkaitan dengan sistem imun induk semang. Identifikasi tipe atau strain dari parasit harus mempunyai perangkat antigen yang spesifik terhadap antibodi yang ditimbulkan. Isolasi dan karakteristik protein diperlukan untuk memenuhi kebutuhan tersebut (Tizard, 1982).

Onaga *et al.* (1999) mengatakan bahwa stadium yang memiliki efek patogen dari parasit dan merupakan bentuk infeksi laten terhadap induk semang merupakan bentuk stadium skizon.

Isobe *et al.* (1998) mengatakan bahwa analisis protein untuk mengetahui berat molekul dari stadium skizon *Leucocytozoonosis* dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) serta imunoblotting dimana protein dengan berat molekul 25-300 kDa dapat terdeteksi dengan cara ini.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* yang diisolasi dari ayam buras di Surabaya berdasarkan berat molekul.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* yang diisolasi dari ayam buras yang selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar pengembangan kit diagnostik dalam upaya pengendalian penyakit *Leucocytozoonosis*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Parasit *Leucocytozoon sp*

2.1.1 Taksonomi

Menurut Soulsby (1986), klasifikasi *Leucocytozoon sp* adalah:

Sub Kingdom	: Protozoa
Filum	: Apicomplexa
Kelas	: Sporozoea
Ordo	: Eucoccididae
Sub Ordo	: Haemosporina
Famili	: Plasmodidae
Genus	: <i>Leucocytozoon</i>
Spesies	: <i>Leucocytozoon sp</i>

2.1.2 Morfologi

Leucocytozoon adalah protozoa darah yang menyerang unggas, terutama ayam, burung, kalkun, angsa dan bebek. Bentuk gamet berada dalam eritrosit dan leukosit tergantung dari spesiesnya. Bentuk skizon berada dalam sel parenkim hepar, paru-paru, ginjal dan organ yang lain (Suwanti dkk., 1999).

Menurut Levine (1995), makrogamet-makrogamet dan mikrogamet-mikrogamet berada dalam leukosit-leukosit sedangkan beberapa spesies berada dalam eritrosit-eritrosit. Pada pemeriksaan hapusan darah dengan pewarnaan

Giemsa, gametosit bulat *Leucocytozoon sp* mempunyai diameter 10-14 μm dan gametosit panjang mempunyai diameter 13-20 μm di dalam sitoplasma sel darah.

Skizon berbentuk bulat dalam berbagai ukuran dapat ditemukan dalam berbagai jaringan dan organ tubuh, seperti otot dada, otot paha, thimus, pankreas, paru-paru, hati, ginjal dan otak. Bila skizon pecah, tampak merozoit keluar dari dalam skizon tersebut (Ressang, 1984). Gambar *Leucocytozoon sp* stadium skizon dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. *Leucocytozoon sp* stadium skizon pada organ pankreas ayam (Koleksi foto protozoa Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga).

2.1.3 Siklus Hidup

Penularan terjadi karena gigitan vektor lalat *Culicoides* dan lalat *Simulium*. *Leucocytozoon sp* stadium gametosit yang terdapat dalam darah ayam buras akan terhisap oleh lalat pada saat vektor tersebut menggigit ayam tersebut. Dalam tubuh vektor, makrogamet dan mikrogamet *Leucocytozoon sp* mengalami fertilisasi dan membentuk zigot (stadium seksual) yang berkembang menjadi ookinet. Ookinet yang terbentuk segera menembus usus dan membentuk ookista yang mengandung sporozoit pada dinding usus. Ookista kemudian pecah dan mengeluarkan sporozoit (Dejon and Muzzall, 2000).

Sporozoit yang keluar dari ookista segera menuju ke kelenjar ludah vektor dan menjadi infeksius. Sporozoit ditularkan ke unggas yang lain melalui gigitan kemudian masuk ke sel endotel pembuluh darah unggas tersebut (Dejon and Muzzall, 2000). Sporozoit tersebut kemudian mulai proses skizogoni di dalam sel parenkima hati. Apabila skizon hepatik masak, maka skizon tersebut akan membebaskan merozoit-merozoit (Noble and Noble, 1973).

Merozoit yang memasuki eritrosit dan eritroblas kemudian berkembang menjadi gametosit bulat, sedangkan merozoit yang dibawa oleh aliran darah dan memasuki berbagai organ kemudian berkembang menjadi megaloskizon. Megaloskizon dari *Leucocytozoon sp* dibungkus oleh membran dan terdiri dari skizon-skizon dimana setiap skizon mengandung merozoit granular (Carlton, 1996).

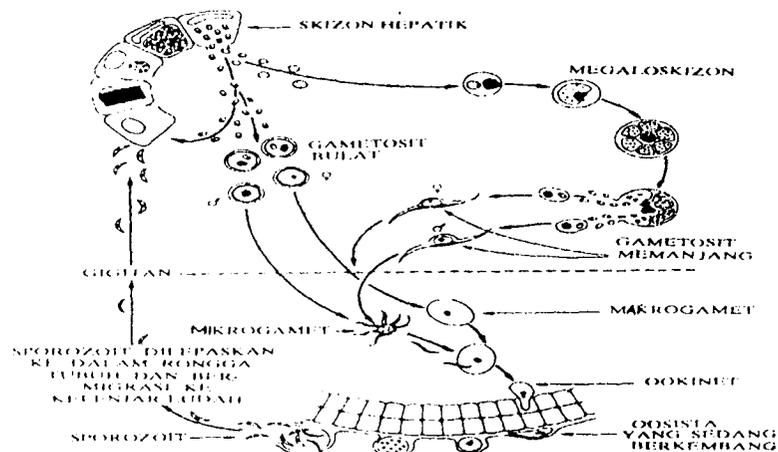
Apabila skizon pecah, merozoit yang keluar hanya berkembang di dalam leukosit, terutama di limfosit atau monosit. Inti merozoit memanjang dan terpilin

kemudian masak menjadi gametosit panjang. Gametosit bulat dan gametosit panjang jika dihisap vektor, maka proses selanjutnya didalam tubuh vektor dan vektor akan menularkan penyakit ke induk semang yang baru. (Noble and Noble, 1973).

Menurut Wahyuti (2003), kejadian Leucocytozoonosis tidak berhubungan dengan jumlah lalat *Culicoides* dan lalat *Simulium* yang berhasil ditangkap di dalam dan sekitar kandang, akan tetapi sangat dipengaruhi oleh jumlah lalat yang mengandung sporozoit dalam tubuhnya. Kozo *et al.*(1982) berpendapat bahwa hanya sporozoit infeksi yang dapat menimbulkan infeksi, dimana seekor ayam yang diinokulasi dengan 1.000 sporozoit pada umur 3,5 bulan menunjukkan beberapa perubahan berupa adanya gametosit dalam darah serta peningkatan titer antigen dan antibodi.

Merozoit dan gametosit berturut-turut tampak pada hari ke 16-22 dan hari ke 21-24 setelah inokulasi sporozoit. Setelah itu, selama periode percobaan tidak lagi ditemukan adanya gametosit. Ayam mati setelah 203 hari pasca inokulasi sporozoit dan ditemukan 3 skizon pada jaringan hati dan limpa. Adanya skizon tersebut memberi petunjuk kuat bahwa skizon merupakan sumber epizootik selama periode laten pada induk semang reservoir, sehingga penyakit bisa berjangkit kembali (Kozo *et al.*, 1982). Siklus hidup *Leucocytozoon sp* dapat dilihat pada Gambar 2.2.

PADA AYAM BURAS



PADA *CULICOIDES*

Gambar 2.2. Siklus hidup *Leucocytozoon sp* (Noble and Noble, 1973).

2.2 Tinjauan tentang Vektor *Leucocytozoonosis* pada Ayam Buras

Vektor penyakit *Leucocytozoonosis* pada ayam buras adalah lalat *Culicoides* dan lalat *Simulium*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hastutiek dkk. (2000), bahwa pada peternakan ayam di daerah Prambon dan Tanggulangin Sidoarjo baik pada musim kemarau maupun musim hujan lalat yang ditemukan adalah lalat *Culicoides arakawae*, *C. guttifer*, *C. huffi*, *C. humeralis*, *C. palpifer* dan *C. oxystoma*. Selama penelitian tersebut, diantara 6 spesies yang ditemukan, *C. arakawae* dan *C. guttifer* adalah lalat yang paling banyak tertangkap. Soekardono (1987) juga telah membuktikan bahwa di Indonesia *L. caulleryi* ditularkan oleh *Culicoides arakawae* dan bukan oleh *Simulium* yang tercatat menularkan *L. simondi*, *L. smithi*, *L. bonasae* dan *L. sabrazezi*.

Menurut Soulsby (1986), klasifikasi *Culicoides* adalah:

Kelas : Insecta

Ordo : Diptera

Sub Ordo : Nematocera

Famili : Ceratopogonidae

Genus : *Culicoides*

Culicoides adalah lalat penghisap darah yang memiliki ukuran tubuh yang amat kecil, yaitu 1-3 mm sehingga lalat ini dapat menembus kelambu. Lalat ini memiliki antena yang panjangnya lebih dari enam segmen dan sayapnya berbintik-bintik. (Hastutiek dkk., 2000; Wahyuti, 2003).

Lalat ini mempunyai siklus hidup lengkap, mulai dari telur, larva, pupa sampai dewasa. Selama 1-3 hari telur akan menetas dan keluar larva yang berwarna merah dan menyukai tempat yang berlumpur. Larva kemudian berkembang menjadi pupa. Pupa berbentuk panjang dengan kepala bulat dan abdomen terdiri dari 8 segmen. Setelah 3 hari, pupa kemudian berubah menjadi dewasa.

Lingkungan yang memenuhi persyaratan bagi kelangsungan hidup *Culicoides* adalah daerah dekat sungai, selokan, parit berair yang tidak deras alirannya, dekat rawa, kolam, sawah dan tempat berair lainnya yang airnya tidak mengalir atau mengalir dengan tenang. Semua tempat ini berdekatan dengan pohon-pohon atau semak-semak yang rimbun sehingga lingkungannya menjadi gelap (Hastutiek dkk., 2000).

Soekardono (1987) telah menemukan sebanyak tujuh spesies *Culicoides* pada peternakan ayam di Jawa Timur, yaitu *C. arakawae*, *C. bifasciatus*, *C. javae*, *C. micropunctatus*, *C. guttifer*, *C. suboreintalis* dan *C. puntigerus*. *C. arakawae* merupakan jenis lalat yang paling banyak tertangkap dan selalu ada pada setiap penangkapan dan telah membuktikan bahwa *C. arakawae* di Indonesia ternyata menjadi vektor biologis dari penyakit Leucocytozoonosis pada peternakan ayam di Bali, Jawa, Sumatra dan Sulawesi.

Pengendalian *Culicoides* cukup sulit, karena ukuran tubuhnya yang sangat kecil sehingga mudah terbawa oleh angin. Selain itu, seekor lalat mempunyai kemampuan untuk menghasilkan beribu-ribu sporozoit, sehingga lalat ini mempunyai potensi yang besar dalam menyebarkan penyakit Leucocytozoonosis (Wahyuti. 2003).

2.3 Tinjauan tentang Leucocytozoonosis pada Ayam Buras

Menurut Gunawan dkk. (1984) yang dikutip Hastutiek dkk. (2000), ayam buras (*Gallus domesticus*) merupakan karier dan sumber penularan Leucocytozoonosis pada ayam ras. Ayam buras di Bali dan Jawa Barat memiliki potensi yang sangat besar untuk menjadi reservoir dan ayam-ayam ini sering berkeliaran di sekitar peternakan-peternakan ayam ras. Besarnya pengaruh ditemukannya *Culicoides* dimana-mana, maka keberadaan ayam buras di sekitar kandang ayam ras dapat melancarkan terjadinya penularan *Leucocytozoon sp* dari ayam buras ke ayam ras.

Leucocytozoonosis sering ditemukan pada daerah yang mempunyai ekologi cocok untuk kehidupan lalat *Culicoides* dan lalat *Simulium*, yaitu di daerah Jawa, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Bali dan Nusa Tenggara. Kejadian Leucocytozoonosis cenderung bersifat musiman yang berhubungan erat dengan peningkatan populasi vektor, terutama pada pergantian musim hujan ke musim panas atau sebaliknya (Tabbu, 2002).

Kejadian Leucocytozoonosis pada ayam buras di Indonesia disebabkan oleh *L. caulleryi* dan *L. sabrazezi*, namun yang paling banyak ditemukan adalah *L. caulleryi*. Kematian akibat *L. caulleryi* pada anak-anak ayam di suatu peternakan ayam di Bogor mencapai 80 %, sedangkan pada peternakan di Bali kematian pada ayam berumur kira-kira 2 bulan mencapai 10 % (Soekardono, 1987).

Kelainan-kelainan utama Leucocytozoonosis adalah splenomegali (pembesaran limpa), hipertrofi dan degenerasi hati. Adanya anemia, leukositosis dan pembekuan darah yang jelek pada pemeriksaan darah ayam yang terinfeksi. Spot putih juga ditemukan pada otot jantung, hati dan ginjal (Levine, 1995). Otot daging lembek, pucat dan terjadi perdarahan titik yang merata. Perdarahan kecil juga ditemukan pada lapisan luar usus (Akoso, 2002).

Ayam dewasa yang mengalami infeksi berat bersifat akut dengan gejala klinis antara lain: lesu, kehilangan keseimbangan, pernapasan cepat, anemia, berak berwarna hijau, depresi, nafsu makan menurun, batuk darah, paralisa, jengger dan pial pucat dan kematian terjadi karena anemia hebat, kerusakan hati dan otak atau kegagalan pernapasan. Pada kejadian kronis, ayam terganggu pertumbuhannya dan terjadi penurunan produksi telur (Mufasirin dkk., 2000).



Derajat keparahan penyakit bervariasi pada berbagai kejadian penyakit pada suatu peternakan sehubungan dengan jumlah *Leucocytozoon sp* yang menyerang tubuh ayam. Ayam yang dapat bertahan hidup akan mengalami infeksi kronik dan selanjutnya dapat terjadi gangguan pertumbuhan dan penurunan produksi (Tabbu, 2002).

2.4 Tinjauan tentang Antigen Parasit

Secara umum pengertian antigen adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (nonself) oleh sistem imun tubuh. Antigen adalah benda asing yang diukur berdasarkan keberhasilan dalam mengikat antibodi, agar bersifat antigenik molekul harus besar, kaku dan kimiawi kompleks, walaupun molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen tetapi molekul besar jauh lebih baik. Mengenai kerumitannya, makromolekul dengan struktur yang kompleks seperti protein merupakan antigen yang jauh lebih baik daripada polimer besar sederhana dengan subunit berulang yang identik, misalnya: lemak, karbohidrat dan asam nukleat maupun polimer satu asam amino (Tizard, 1982).

Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan struktur dari protein tersebut. Hampir semua protein yang mempunyai BM lebih besar dari 10.000 Dalton adalah imunogenik (Bellanti, 1993).

Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat diperinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit maupun populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit terdiri dari: 1) eksoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi

berupa metabolit; 2) somatik antigen terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; dan 6) cairan kista larva cacing pita (Tizard, 1982).

Antigen *Leucocytozoon sp* dapat digunakan untuk melindungi ayam secara penuh dari infeksi ulangan parasit tersebut. Antigen *Leucocytozoon sp* dapat diperoleh dari stadium sporozoit, skizon dan gametosit (Isobe, 1998).

2.5 Tinjauan tentang Respon Imun terhadap Parasit

Imunitas merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler. Sebagai bahan pemicu respon imun tersebut dikenal dengan antigen dan sebagai jawaban reaksi imun dikenal dengan antibodi (Rantam, 2003).

Antibodi adalah protein immunoglobulin (Ig) yang disekresi oleh sel B yang teraktifasi oleh antigen. Berat molekul antibodi berkisar 150.000 Da sampai 950.000 Da. Semua molekul antibodi terdiri dari dua untaian peptida pendek yang dikenal dengan *light chain* dan untaian peptida panjang yang disebut *heavy chain*. Keduanya berikatan kovalen dengan ikatan disulfida (Rantam, 2003).

Leucocytozoon sp dapat merangsang respon imun humoral dan respon imun seluler. Secara umum, antibodi membantu mengontrol jumlah parasit yang terdapat secara bebas dalam aliran darah dan cairan jaringan, sedangkan respon imun seluler diarahkan terhadap parasit yang berada dalam sel tubuh induk semang (Tizard, 1982).

Pada saat stadium skizon *Leucocytozoon sp* menginfeksi organ induk semang, antibodi yang diproduksi adalah Ig E dan Ig G. Antibodi tersebut bersama-sama dengan komplemen dan sel sitotoksik mencapai organ yang terinfeksi dan menghilangkan parasit tersebut. Sedangkan pada saat *Leucocytozoon sp* menyerang sel tubuh induk semang, respon imun yang berperan adalah sel T yang dihasilkan oleh limfosit (Tizard, 1982).

Ito *et al.* (2003) telah mengembangkan vaksin sub unit rekombinan yang berasal dari skizon generasi kedua dari *Leucocytozoon sp*, kemudian induksi respon imun selulernya diuji pada ayam. Respon imun ayam yang telah divaksin menunjukkan aktifitas fagositosis yang sangat tinggi melawan vaksin sub unit rekombinan tersebut daripada ayam kontrol atau ayam yang tidak divaksin. Hal ini menunjukkan bahwa respon imun seluler spesifik yang diinduksi oleh vaksin sub unit rekombinan yang mengandung protein skizon generasi kedua dari *Leucocytozoon sp* mampu menekan perkembangan parasit dalam tubuh induk semang.

2.6 Tinjauan tentang Analisis Protein dengan SDS-PAGE

Elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul. Salah satu metode elektroforesis adalah SDS-PAGE. *Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang amfoterik mengandung kedua grup karboksil negatif dan grup amino positif (Rantam, 2003).

Keuntungan menggunakan PAGE adalah bersifat transparan sehingga dapat di *scan* baik memakai sinar tampak atau sinar ultraviolet. Selain itu ukuran pori-pori PAGE dapat diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik (Sutiman dkk., 1989).

Selama PAGE protein dipisahkan seperti migrasi melalui matrik tiga dimensi dengan elektrik, maka matrik mempunyai fungsi yaitu memisahkan protein sesuai dengan ukuran, bentuk dan muatan listrik dan hal ini memerlukan pH *buffer* yang sesuai (Rantam, 2003).

Poliakrilamid adalah matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul 500-250.000 Dalton. Pori-pori pada PAGE dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrylamid* dengan *bis-acrylamid*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total persentasi *acrylamid* atau peningkatan derajat persentasi konsentrasi campuran *bis-acrylamide*. Pembuatan atau pemilihan total konsentrasi yang tepat akan menentukan pula ukuran yang tepat terhadap ukuran protein yang diinginkan. Semakin tinggi total persentasi akan menghalangi pergerakan protein ke dalam gel, begitu juga terlalu rendah total persentasi akan mengakibatkan pergerakan protein terlalu cepat bergerak melalui gel yang mengakibatkan didapatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang dihasilkan. Awal terjadinya polimerasi biasanya disempurnakan oleh ammonium persulfat (APS) dengan membentuk radikal bebas dan dikatalisis oleh N, N, N, N-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Rantam, 2003).

Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dengan deterjen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Deterjen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit, oleh karena itu protein SDS-komplek migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya (Rantam, 2003).

Ada dua sistem pada SDS yaitu kontinyu (Weber dan Osborn) dan diskontinyu (*Laemmli*). Pada sistem kontinyu menggunakan densitas satu gel, satu buffer dan satu pH dimana campuran protein dilapiskan pada bagian atas (*bands* pada bagian atas dari *separating gel*) sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi pada sampel. Pada sistem diskontinyu menggunakan densitas gel, buffer dan pH yang berbeda sehingga protein migrasi dengan cepat melarut parut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Pada penelitian kali ini menggunakan sistem diskontinyu (Rantam, 2003; Sutiman dkk., 1989).

Stacking gel mengandung poliakrilamid yang lebih rendah dan pH yang berbeda dengan *separating gel*, karena pada *stacking gel* molekul-molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik sedangkan molekul-molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang berdekatan sehingga membentuk suatu garis berupa pita atau *band* yang tipis (Sutiman dkk., 1989).

Manfaat dari penggunaan SDS-PAGE adalah melapisi polipeptida dengan muatan negatif sehingga semua elektroforesis bergerak menuju anoda dan menutupi muatan alami dari sub unit sehingga semua terelektroforesis menurut berat molekulnya dan bukan berdasarkan muatan asalnya (Robert, 2003).

BAB 3

MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan, dimulai pada bulan Juli sampai dengan bulan Agustus 2005 di laboratorium Entomologi dan Protozoologi, laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan laboratorium Dengue Fever Tropical Disease Center Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan adalah sebagai berikut: gunting, skalpel, cawan petri, pinset, sentrifuse, tabung sentrifuse, gelas ukur, gloves, mortir, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung eppendorf, mikropipet, pipet hisap, *Shaker*, *Spectrofotometer*, *Ice Box*, Bio Rad dan Sonikator.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan dasar penelitian ini adalah empat ekor ayam buras yang didapat dari Pasar Wonokromo Surabaya diambil satu ekor yang terinfeksi *Leucocytozoon sp* dan satu ekor sebagai kontrol negatif. Bahan kimia yang digunakan adalah: Phosphat Buffer Saline (PBS), akrilamid 30%, Tris HCL pH 8,8, SDS 5%, aquadest, Temed, APS 10%, Tris HCl pH 6,8, gliserin, SDS 10%, bromfenolblue

0,5%, merkaptoetanol 5%, Tris aminomethan, glisin, methanol 50%, asam asetat 10%, butanol, gliserol 10%, Commasie Brilliant Blue R-250.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Isolasi organ yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp*

Organ pankreas, paru-paru, hati, limpa dan ginjal ayam buras diambil terlebih dahulu. Organ-organ tersebut masing-masing diambil sebagian kemudian digerus dan disonikasi. Hasil sonikasi organ-organ tersebut digunakan sebagai sampel SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein dari organ pankreas terlihat paling jelas dan paling berbeda dengan pita protein kontrol dibanding dengan organ lainnya, maka dari itu sampel protein skizon *Leucocytozoon sp* yang diisolasi adalah protein skizon dari organ pankreas. Sampel protein kontrol yang diisolasi adalah protein dari organ pankreas kontrol.

3.3.2 Pembuatan *whole extract* dari jaringan yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp*

Hasil gerusan organ pankreas kemudian disonikasi pada 30.000 Hz selama 30 detik kemudian istirahat 1 menit dengan tujuan agar tidak terjadi denaturasi protein dan diulang sebanyak 5 kali. Hasil sonikasi kemudian ditambah PBS 1-2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebagai sampel, kemudian diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan *Optical Density* (OD) 540. Sampel protein harus didialisis terlebih dahulu selama semalam supaya bebas dari garam-

garam lain. Selanjutnya sampel siap digunakan untuk pemisahan protein dengan SDS-PAGE.

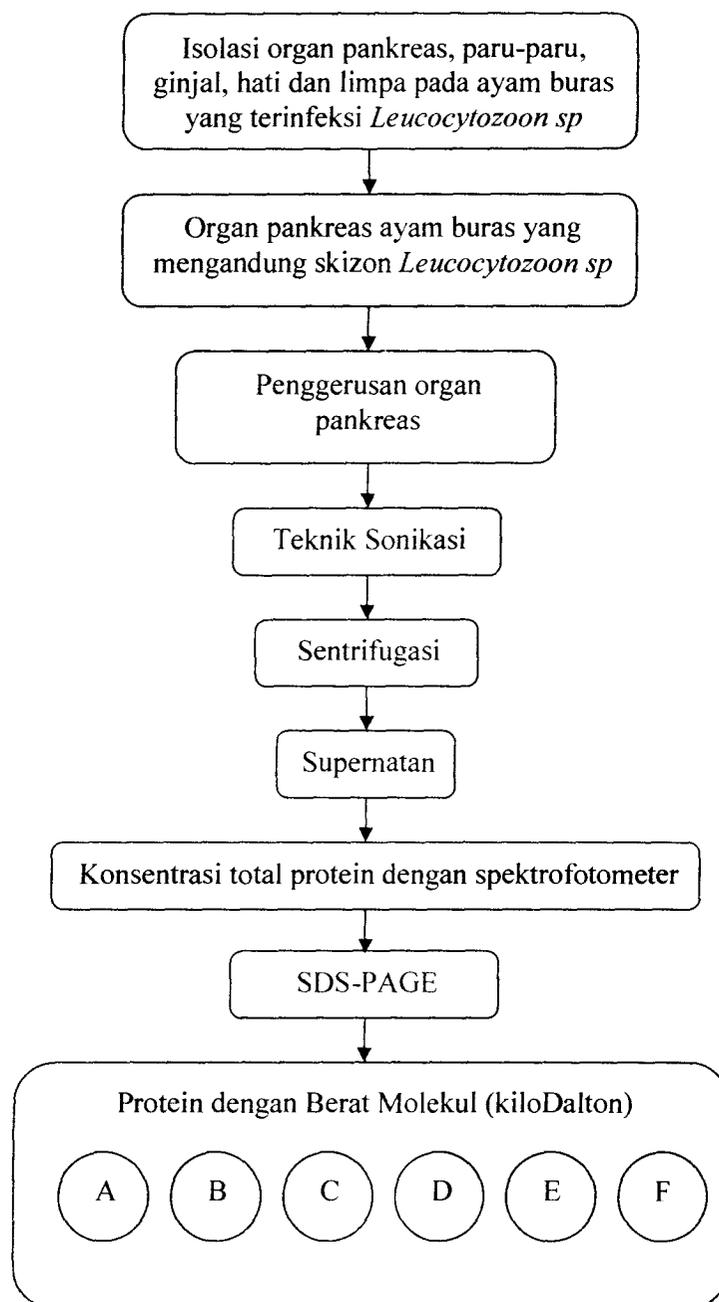
3.3.3 Elektroforesis protein dengan SDS-PAGE

Running gel 12% dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca. Setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan *stacking gel* 12% yang telah dipersiapkan. *Running gel* 12% dibuat dengan mencampurkan 2,5 ml akrilamid 30%; 1,2 ml Tris HCL pH 8,8; 1,2 ml SDS 5%; 50 µl Temed; 30 µl APS 10% dan 1,1 ml aquadest dalam gelas ukur lalu dimasukkan ke dinding kaca sampai 1 cm dari atas kemudian ditambahkan butanol diatasnya sampai penuh dan diinkubasi selama 25 menit. Butanol dibuang jika masa inkubasi selesai.

Stacking gel 5% dibuat dengan mencampurkan 30% akrilamid 0,66 ml; 0,8 Tris HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 5%; 0,8 ml aquadest; 0,4 µl Temed; 20 µl APS. *Stacking gel* yang dibuat dimasukkan diatas cetakan *Running gel* hingga penuh kemudian *comb* dimasukkan dan dicuci dengan *Electrophoresis Buffer* kemudian diinkubasi selama 25 menit. Sebanyak 10 µl sampel protein *Leucocytozoon sp* yang ditambahkan *Laemmli buffers* (1 ml Tris HCl pH 6,8; gliserin 0,8 ml; 1,6 SDS 10%; 0,4 ml bromfenolblue; 50 µl merkaptotanol 5%; 3,8 ml aquadest) dengan perbandingan 2:1 kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan dilakukan perebusan pada 100 °C selama 5 menit. Setelah masa inkubasi selesai, *comb* dilepaskan dan dicuci dengan *Electrophoresis Buffers* (30,29 g Tris aminomethan; 144,1 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest). Cetakan tadi dimasukkan ke dalam Bio Rad dan dituangkan dengan *Electrophoresis Buffer*.

Marker yang digunakan adalah marker protein dengan berat molekul pada kisaran 14.400-200.00 Dalton. Sampel protein skizon *Leucoctozoon sp* dan sampel kontrol dimasukkan ke dalam lubang *comb*. Setelah itu listrik dihidupkan dengan kekuatan 125 V dan 40 mA kemudian ditunggu hingga sampel turun seluruhnya. Saat sampel turun seluruhnya, listrik dimatikan dan gel dilepas pelan-pelan untuk dimasukkan cawan petri.

Gel diwarnai dengan merendam gel dalam larutan pewarna Commasie Blue yang dibuat dari 0,025 g Commasie Brilliant Blue R-250, 40 ml methanol 50%, 10 ml asam asetat 10% dan aquadest ad 100 ml kemudian digoyang diatas *shaker* selama 10-30 menit. Apabila pita-pita protein sudah terlihat maka reaksi dihentikan, larutan Commasie Blue dibuang. Selanjutnya gel direndam dengan larutan asam asetat 10% selama 24 jam kemudian dibuang. Hasil gel yang telah tampak pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10%, dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker (Axelsen. 1983 yang sudah dimodifikasi). Adapun kerangka operasional penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Berat molekul protein stadium skizon dari *Leucocytozoon sp* dapat diketahui dengan menggunakan teknik SDS-PAGE. Konsentrasi protein dihitung dengan spektrofotometer dan didapatkan konsentrasi protein dari organ pankreas yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp* yaitu 0,4 µg/µl.

Adapun hasil analisis protein stadium skizon dari organ pankreas yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp* didapatkan tujuh pita protein yaitu 23,99 kDa, 30,2 kDa, 35,48 kDa, 37,15 kDa, 39,81 kDa, 48,98 kDa dan 155,75 kDa. Hasil fraksinasi protein dapat dilihat dari Gambar 4.1.

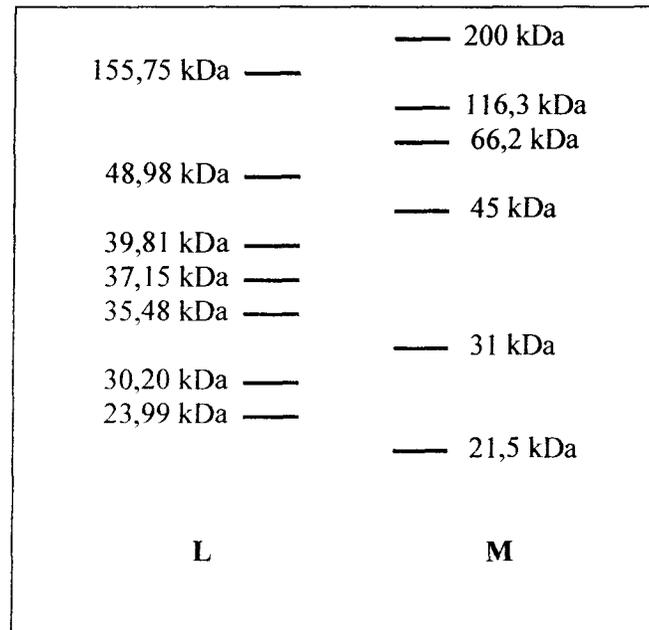


Gambar 4.1 Hasil fraksinasi protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* dengan pewarnaan Commasie Brilliant Blue R-250.

Keterangan: L = sampel protein skizon *Leucocytozoon sp* dari organ pankreas

K = sampel kontrol

M = marker jenis *Broad Range*



Gambar 4.2 Perbandingan Berat Molekul antara pita protein sampel *Leucocytozoon sp* pada organ pankreas (L) dengan Marker (M).

BAB 5

PEMBAHASAN

Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya, prinsip dasar metode ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode *electrophoresis* yang menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah *polyacrylamide* (Hamid dkk., 2001).

Perbedaan letak pita antara gel sampel protein *Leucocytozoon sp* dan gel sampel protein kontrol dibandingkan dengan marker protein. Hasil penelitian ini diperkirakan berat molekul protein berkisar antara 20.000-200.000 Dalton sehingga digunakan SDS 12% (Sutiman dkk., 1989).

Analisis protein dengan metode regresi cubic seperti yang dilakukan oleh Suwanti (1996) menunjukkan hasil preparasi protein *Leucocytozoon sp* dimana didapatkan tujuh pita protein stadium skizon yaitu 23,99 kDa, 30,2 kDa, 35,48 kDa, 37,15 kDa, 39,81 kDa, 48,98 kDa dan 155,75 kDa. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Isobe *et al.* (1998), bahwa berat molekul protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* adalah 33 kDa, 44 kDa, 58 kDa, 79 kDa, 94 kDa, dan 141 kDa. Perbedaan ini dapat disebabkan karena perbedaan isolat, perbedaan induk semang, perbedaan ras dan perbedaan organ yang terinfeksi.

Pada pita protein stadium skizon *Leucocytozoon sp*, protein dengan berat molekul 30,20 kDa memiliki dua kemungkinan. Kemungkinan pertama adalah protein dengan berat molekul 30,20 kDa adalah protein skizon *Leucocytozoon sp* dan kemungkinan yang lain adalah protein tersebut merupakan protein yang dimiliki oleh induk semang yang terinduksi oleh skizon *Leucocytozoon sp*.

Di antara ketujuh pita protein stadium skizon, protein dengan berat molekul 48,98 kDa merupakan major protein karena menunjukkan pita protein yang paling tebal. Tebal tipisnya protein merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi tersebut. Semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi protein oleh sel penyandi (Mufasirin dkk., 2001).

Tujuh pita protein yang terdeteksi memiliki daya antigenitas yang berbeda. Menurut Tizard (1982), salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat adalah besar berat molekul. Molekul yang mempunyai berat molekul besar lebih antigenik dibandingkan dengan berat molekul yang kecil walaupun antigenitasnya juga ditentukan dari kompleksitas fisikokimiawi suatu zat. Bellanti (1993) juga mengatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolit, beberapa diantaranya adalah spesifik stadium dan bersifat sementara dan yang lain tetap ada pada seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik yang berbeda.

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan SDS-PAGE tersebut adalah kemurnian isolat, kebersihan isolat, dan konsentrasi protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik, tidak terdapat pita protein yang menggelembung sehingga dapat mempermudah analisis berat molekul pada pita protein yang terbentuk. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk dalam gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang sehingga mempengaruhi analisis protein. Konsentrasi protein ekstrak mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis maupun karakterisasi protein juga kecepatan pembentukan pita protein (Kusnoto, 2003). Hal ini sesuai dengan pendapat Abbas *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa konsentrasi protein antigen yang digunakan sangat berpengaruh terhadap imunogenitasnya.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* dengan menggunakan teknik SDS-PAGE didapatkan tujuh pita protein yaitu 23,29 kDa, 30,2 kDa, 35,48 kDa, 37,15 kDa, 39,81 kDa, 48,98 kDa dan 155,75 kDa.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dari ketujuh pita protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* tersebut yang bersifat antigenik dengan menggunakan teknik immunoblotting sebagai dasar pengembangan kit diagnostik dalam upaya pengendalian penyakit Leucocytozoonosis.

RINGKASAN

Novita Budiarti Rahayu. Profil Protein Stadium Skizon *Leucocytozoon sp* yang Diisolasi dari Ayam Buras. Dibawah bimbingan Poedji Hastutiek, M.Si., drh. sebagai pembimbing pertama dan Rochmah Kurnijasanti, M.Si., drh. sebagai pembimbing kedua.

Leucocytozoon sp adalah protozoa darah yang sering menyerang unggas terutama ayam buras serta bersifat menular ke ayam lain dalam waktu singkat dan menimbulkan dampak kerugian yang cukup banyak. Penularan terjadi karena vektor penyakit yaitu lalat *Culicoides* dan *Simulium*. Selama ini pengendalian terhadap *Leucocytozoonosis* pada ayam buras sangat sulit dilakukan karena penyakit ini menyerang semua umur ayam dan dapat terjadi tanpa atau disertai gejala klinis. Diagnosis dari parasit ini yaitu adanya stadium gametosit didalam darah dan stadium skizon pada organ-organ dalam. Adanya skizon tersebut memberi petunjuk kuat bahwa skizon merupakan sumber epizootik selama periode laten pada induk semang. Tindakan yang dapat dilakukan adalah dengan mengembangkan vaksin yang berasal dari protein stadium skizon *Leucocytozoon sp*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* yang diisolasi dari ayam buras berdasarkan berat molekul. Pembuatan *whole extract* dari jaringan yang mengandung skizon *Leucocytozoon sp* dengan cara sonikasi dan sentrifugasi. Analisis protein dengan menggunakan teknik *Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel*

Electrophoresis (SDS-PAGE). Hasil yang diperoleh dari analisis protein stadium skizon *Leucocytozoon sp* dengan teknik SDS-PAGE adalah didapatkan tujuh fraksi protein yaitu: 23,29 kDa, 30,2 kDa, 35,48 kDa, 37,15 kDa, 39,81 kDa, 48,98 kDa dan 155,75 kDa. Tebal tipisnya pita protein merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut. Semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi protein oleh sel penyandi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H Litcman and J.S. Pober. 2000. Cellular and Mollecular Immunology 4th ed. Saunders Company. Philadelphia. 354-357.
- Akoso, B.T. 2002. Kesehatan Unggas. Kanisius. Yogyakarta. 110-112.
- Axelsen, N.H., 1983. Handbook of Immunoprecipitation M-gel Technique. Blackwell Scientific Publication. London. 148-149.
- Bellanti, J.A. 1993. Immunologi III. Gadjah Mada University Press. 86-95.
- Carlton, B.R., 1996. Blood borne parasites. In : Avian Disease Mannual 4th ed. American Associated of Avian Pathologist. University of Pennsylvania, New Bolton Center, PA. 162-165.
- Dejon, R.J. and P.M. Muzzal. 2000. Haematozoa of waterfowl from Michigan. J. Wildl Dis. Oct ; 36 (4) : 767-773.
- Diyanti, F.R, J. Yahya dan T. Suryani. 1998. Penyakit-penyakit Penting Pada Ayam. Edisi IV. Medion. Bandung. 76-78.
- Hamid, I.S., F.A. Rantam dan Y.P. Dachlan. 2001. Isentifikasi Varian Antigenik *Trypanosoma evansi* Hasil Isolasi dari Mencit Fase Akut dan Kronik. Media Kedokteran Hewan. April. Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Surabaya. 62.
- Hastutiek, P., E. Suprihati, G. Mahasri, R.N. Wahyuti dan Kismiyati. 2000. *Culicoides* di Sekitar Kandang Ayam Ras di Sidoarjo dalam hubungannya dengan Penularan Leucocytozoonosis. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Heryanto, A., Imam Suryanto dan Rosmelati Situmeang. 2003. Bulletin Veterinaria Farma : Leucocytozoonosis. Vol III. No.1. Pusvetma, Surabaya. 15-23.
- Isobe, T., S. Shimizu, S. Yoshihara and K. Suzuki. 1998. Immunoblot Analisis of Humoral Immune Respons to *L. caulleryi* in chickens. J. Parasitol. Feb ; 84 (1) : 62-66.
- Ito, K., K. Nakata, S. Watarai, H. Kodama dan T. Gotanda. 2003. Cellular Immunoresponses in Chickens Induced by Recombinant R7 *Leucocytozoon caulleryi* Vaccine. J. Parasitol. Apr ; 89 (2).

- Kozo, F., K. Zhigo, K. Tsugihiko and T. Haruhisa. 1982. Detection of schizont in Chickens Covered from Experimental Infection with *Leucocytozoon caulleryi*. *Nat. Inst. Anim. Health* 3 (22) : 144-145.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunogenik Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Levine, N.D., 1995. Protozoologi Veteriner. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mufasirin, N.D.R. Lastuti, E. Suprihati dan L.T. Suwanti. 2000. Ilmu Penyakit Protozoa. Laboratorium Entomologi dan Protozoologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mufasirin, N.D.R. Lastuti dan E.B. Aksono. 2001. Profil Protein Intestin *Haemonchus contortus* dewasa. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Munoz, E., D. Ferrer, R. Molina and R.D. Adlard. 1999. Prevalence of Haematozoa in Birds of Prey in Catalonia, North-East Spain. *Vet. Rec.* 144 (23): 632-636.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes dan V.W. Rodwell. 2003. Biokimia Harper. Alih Bahasa oleh Andry Histono. Edisi 25. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 50-51.
- Noble, E.R. and G.A. Noble. 1973. Parasitology: The Biology of animals Parasites. Philadelphia. 235-237.
- Onaga, H., T. Kitanura, M. Hujina, A. Hasegawa and S. Ueda. 1999. Protective immunity induced with the antigens fractionated by affinity chromatography from the second generation schizonts of *Leucocytozoon caulleryi*. *J.Vet Med Sci.* 58 (7) : 677-679.
- Rantam, F. A. 2003. Karakterisasi Antigen Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. 145-148.
- Ressang, A.A.1984. Patologi Khusus Veteriner. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 613-615.
- Robert, F.W. 2003. Molecular Biology 2nd ed. International Edition. Migraw-Hill. 67-68.

- Soekardono, S. 1987. *Culicoides* di Sekitar Ayam dalam Kandang-kandang di Jawa Timur. *Majalah Parasitologi Indonesia*. Vol. 1. No. 2. Perkumpulan Pemberantasan Parasit Indonesia. Jakarta. 35-41.
- Soulsby, E.J.L., 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal*. The English and Protozoa of Society and Baillire, Tindall, London. 703-705.
- Sutiman. B, Sumitro, Sr. Rahayu, Fatiyah, Sri Widyarti dan Esti. 1989. *Diktat Kuliah dan Praktikum. Kursus Teknik-teknik dasar Analisis Protein dan DNA*. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suwanti, L.T., 1996. *Identifikasi dan Produksi Antibodi Monoklonal Protein Membran Toksoplasma gondii Stadium Takizoit*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Suwanti, L.T., Nunuk D.R.L. dan Endang S. 1999. *Diktat Protozoologi Veteriner*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Tabbu, C.R. 2002. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya*. Vol.2. Kanisius. Yogyakarta. 28-34.
- Tizard, I. 1982. *An Introduction of Veterinary Immunology*. WB Saunders company. Diterjemahkan oleh Masduki Partodiredjo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. 15-50.
- Wahyuti, R.N. 2003. *Potensi lalat Culicoides terhadap prevalensi Leucocytozoonosis pada ayam*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Protokol Berat Molekul SDS-PAGE, Jarak Lebar (MARKER)

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range

Catalog Number
161-0317

Product shipped at room temperature
Store at -20 °C upon arrival.



Specifications

3

Contents	Approximately 400 µg of each protein blended to give bands of equal intensity on SDS polyacrylamide gels run according to Laemmli ¹ and stained with Coomassie Blue R-250
Storage buffer	50% glycerol, 300 mM NaCl, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 3 mM NaN ₃
Volume	200 µl concentrated solution
Storage	-20 °C
Shipping conditions	Room temperature.
Shelf life	1 year at -20 °C
Applications per vial	400 with Coomassie R-250
Recommended gel percentage*	Low range 12.5% High range 7.5% Broad range 4-20 % gradient gels

Reference

2

1. Laemmli, U. K. *Nature*, 227, 680 (1970).
2. Hames, B. D. and Hawley, D. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, Second Edition, p. 17. Oxford University Press, New York (1988).

Ordering Information

Catalog Number	Product Description
Molecular Weight Standards	
161-0303	SDS-PAGE Standards, High, 200 µl
161-0304	SDS-PAGE Standards, Low, 200 µl
161-0317	SDS-PAGE Standards, Broad, 200 µl
161-0314	Silver Stain SDS-PAGE Standards, Low, 200 µl
161-0315	Silver Stain SDS-PAGE Standards, High, 200 µl
161-0316	Biotinylated SDS-PAGE Standards, Low, 250 µl
161-0311	Biotinylated SDS-PAGE Standards, High, 250 µl
161-0318	Biotinylated SDS-PAGE Standards, Broad, 250 µl
161-0321	2-D SDS-PAGE Standards
161-0324	Polypeptide SDS-PAGE Standards, 200 µl
Prestained Standards	
161-0305	Prestained SDS-PAGE Standards, Low, 500 µl
161-0307	Prestained SDS-PAGE Standards, High, 500 µl
161-0318	Prestained SDS-PAGE Standards, Broad, 500 µl
161-0324	Kaleidoscope Prestained Standards, 500 µl
161-0325	Kaleidoscope Polypeptide Standards, 500 µl
IEF Standards	
161-0310	IEF Standards, pI range 4-4.5-9.6, 250 µl

Bio-Rad Laboratories, 200 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94537

*Note: These standards can be run on other percentage gels, but all proteins may not be visible. Lower percentage gels may cause the low molecular weight proteins to migrate with or in front of the dye front. Higher percentage gels may prevent the high molecular weight proteins from separating.

Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
β-galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
Lysosyme	14,400	X	X	
Aprotinin	6,500	X		

Protocol

Dilute standards 1:20 in SDS Reducing Sample Buffer.* Heat for 5 minutes at 95 °C. Cool and load 10 µl/well for full length gels (16-20 cm) or 5 µl/well for mini gels

* SDS Reducing Sample Buffer (prepare immediately before use)

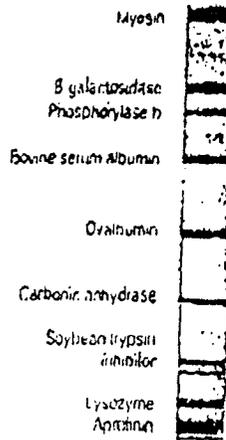
B-mercaptoethanol	2.5 µl
Stock Sample Buffer	47.5 µl
	50 µl

Stock Sample Buffer (store at room temperature)

Distilled water	4.8 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.2 ml
Glycerol	1.0 ml
10% (w/v) SDS	2.0 ml
0.1% (w/v) Bromophenol blue	0.5 ml
	9.5 ml

Use of Sample Buffer with insufficient or old B-mercaptoethanol may result in doublets at the soybean trypsin inhibitor and ovalbumin bands

5



6

Fig. 1. SDS polyacrylamide gels run in the Mini-PROTEAN® II cell according to the method of Laemmli. Broad molecular weight standards run on a 4-20% gradient gel stained with Coomassie R 250

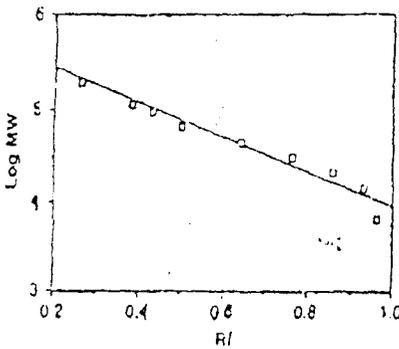


Fig. 3. Curve generated by plotting the log of the molecular weight of the broad range standards vs. the relative mobility (Rf).

$$Rf = \frac{\text{distance migrated by protein}}{\text{distance migrated by dye}}$$

This curve can be used to determine molecular weights of unknown proteins.

7

Protein References

8

Protein	Reference
Rabbit skeletal muscle myosin	Woods, L. F., Himmelfarb, S. and Harrington, W. F., <i>J. Biol. Chem.</i> , 238 , 2374 (1963).
<i>E. coli</i> β-galactosidase	Isowler, A. V. and Zahin, I., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 74 , 1507 (1977).
Rabbit muscle phosphorylase b	Tsuno, K. et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , Vol. 74 , 4762 (1977).
Bovine serum albumin (BSA)	Birnbaumer, J. R., <i>Fed. Proc.</i> , 34 , 591 (1975).
Hen egg white ovalbumin	Warner, K. C., "Egg Proteins," in: <i>The Proteins</i> , Vol. 11A , p. 415 (Neurath, H. and Bailey, K., eds.), Academic Press, New York (1954).
Bovine carbonic anhydrase	Davis, R. P., "Carbonic Anhydrase," in: <i>The Enzymes</i> , Vol. V , p. 545, Boyer, P. D., ed. Academic Press, New York (1971).
Soybean trypsin inhibitor	Wu, Y. Y. and Scheraga, H. A., <i>Biochemistry</i> , 1 , 198 (1962).
Hen egg white lysozyme	Jolles, P., <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 8 , 227 (1969).
Bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)	Kassell, B. and Laskowski, M., <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , 20 , 463 (1965).

Lampiran 2. Penghitungan Berat Molekul (BM) stadium skizon *Leucocytozoon sp* menggunakan regresi cubic.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang dipindahkan oleh protein sampel}}{\text{Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa}}$$

Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa

Jarak yang dipindahkan oleh bahan pembawa adalah =178 mm

MARKER			
Jarak pada gel (mm)	Rf	Log BM	BM (kDa)
13	0,073	2.301	200
21	0,118	2.066	116,3
25	0,140	1.988	97,4
43	0,242	1.821	66,2
63	0,354	1,653	45
101	0,567	1.491	31
142	0,798	1.332	21,5
163	0.916	1.158	14,4

Cubic

Model Summary

Multiple R	R Square	Adjusted R Square	Std Error of Estimate
0,96695	0,99391	0,98934	0,04020

The dependent variable is Log BM

ANOVA

	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1,0547735	3	0,35159117	217,57908	0,001
Residual	0,0064637	4	0,00161592		
Total	1,0612372	7			

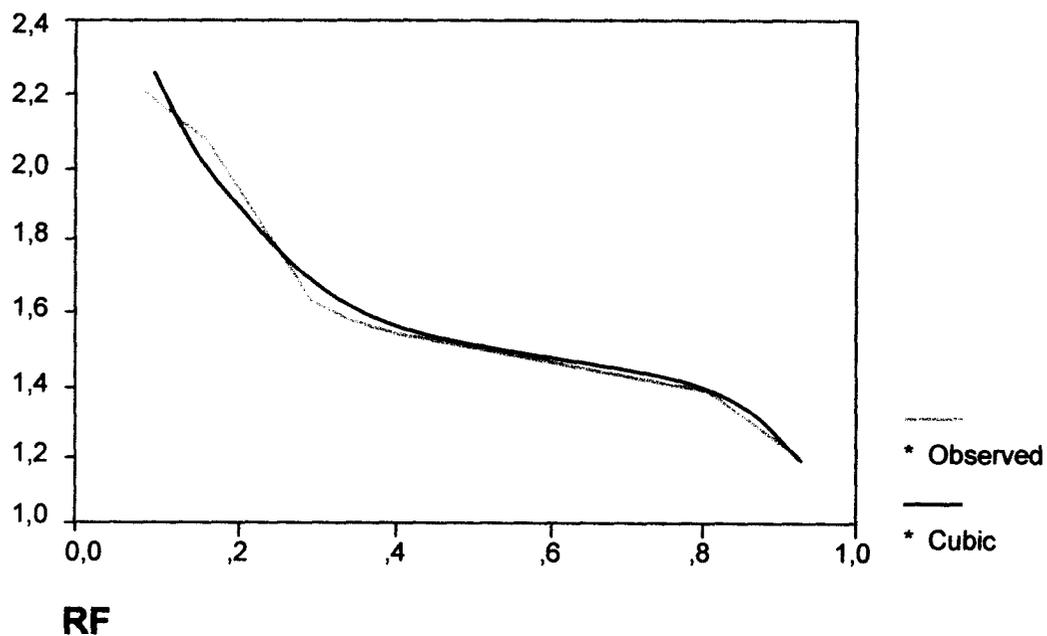
The dependent variable is Log BM

Coefficient

	Unstandardized Coefficient		Standardized Coefficient	t	Sig
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4,704929	0,640820	-3,910831	-7,342	0,0018
Rf**2	7,497103	1,561933	6,182757	4,800	0,0086
Rf**3	-4,405864	1,062352	-3,295110	-4,147	0,0143
(Constant)	2,558364	0,065358		39,144	0,0000

Curve

LOG BM



Interpretasi Hasil

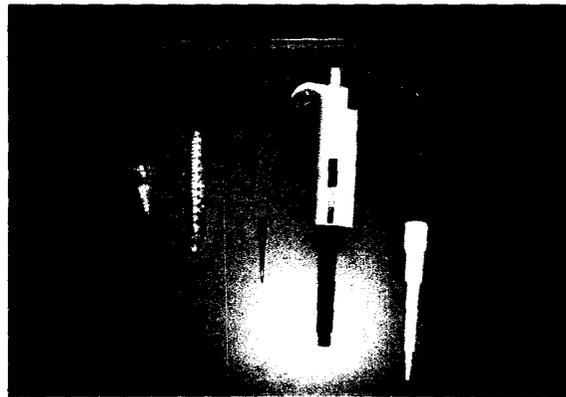
$b_0 = 2,558364$; $b_1 = -4,704929$; $b_2 = 7,497103$; $b_3 = -4,405864$; $r = -0,96695$;
 persamaan garis regresi: $Y = 2,558364 - 4,704929X + 7,497103X^2 - 4,405864X^3$

Jarak Sampel (mm)	Rf (X)	$Y = 2,558364 - 4,704929X + 7,497103X^2 - 4,405864X^3$	
sampel	sampel	Log BM	BM (kDa)
136	0,76	1,38	23,99
108	0,61	1,48	30,20
83	0,47	1,55	35,48
76	0,43	1,57	37,15
69	0,39	1,60	39,81
55	0,31	1,69	48,98
16	0,09	2,19	155,75

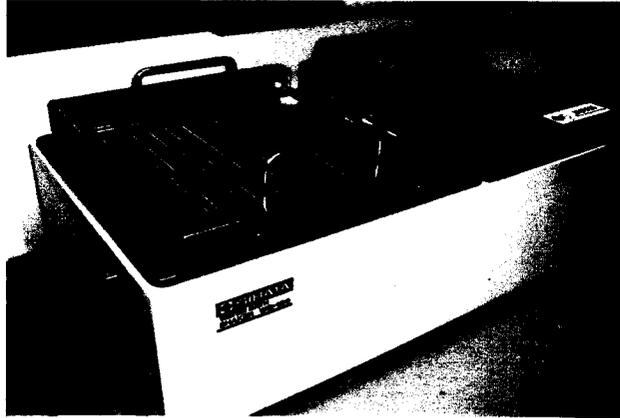
Lampiran 3. Gambar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian



Gambar 1: Sampel pankreas digunakan dalam penelitian.



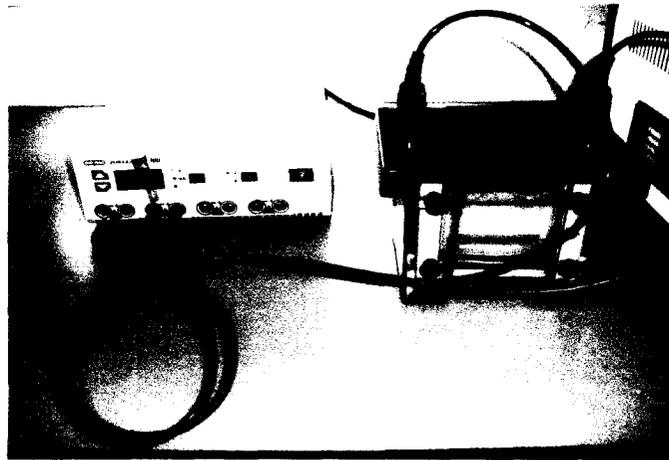
Gambar 2: Alat-alat penelitian (tabung eppendorf, tabung reksi, mikropipet, pipet hisap dan tips).



Gambar 3: Alat penggoyang (*Shaker*) yang digunakan pada pewarnaan gel



Gambar 4: Alat Sentrifuse untuk preparasi Whole Extract *Leucocytozoon sp*



Gambar 5: Alat yang digunakan untuk pemisahan protein dengan SDS-PAGE.