

**LAPORAN
HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN ANGGARAN 2011**



**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, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang
Tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian Kepada Masyarakat Mono Tahun,
dan Pengabdian Kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga
Tahun Anggaran 2011 Nomor: 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011**

**Universitas Airlangga
2011**

ABSTRACT

One of vaccine materials has being explored and it has good prospect is recombinant vaccine of protein of sporozoite membrane of *Eimeria* sp that can be developed, manipulated artificial producible and applicable. Protein of sporozoite membrane of *E. tenella* was isolated and characterized expression of gen code protein of sporozoite membrane of *E. tenella* as principle of recombinant technique. The first step of this research was to performe isolation and characterisation of protein of sporozoite membrane of *E. tenella* by extraction technique of protein of sporozoit membrane of *E. tenella* using SDS-PAGE and Dot Blot. The result of isolation of protein of sporozoite membrane of *E. tenella* was obtained optical density (OD) with indirect ELISA in concentration of oocyst suspension at 500/ μ l compared with at 1000/ μ l showed significantly difference ($p < 0.05$), which concentration of protein of sporozoite membrane *E. tenella* of oocyst suspension at 1000/ μ l was $\pm 46\%$ higher than oocyst suspension at 500/ μ l. On the result of elution of protein of sporozoite membrane of *E. tenella* identified that protein of sporozoite membrane showed several bands in variation confirmed with marker standard. Based on measurement of molecule weight and confirmed with marker all samples showed similar band at molecule weight 17 kDa. The result of characterization of protein by Dot Blot showed specific to monoclonal antibody of anti protein of sporozoite membrane of *E. tenella*. Isolation RNA total of protein of sporozoite membrane of *E. tenella* showed band of rRNA about 23S and 16S of marker band, which bands of mRNA was seen smear among bands of rRNA. Based on electrophoresis and it concentration, RNA total of result of extraction using Trizol-LS then it can be used as template for cDNA synthesis. Molecular characterisation was performed using RT-PCR and genetic analyses was done to PCR product. Nucleotide sequence of protein of sporozoite membrane isolate compared with protein of sporozoite membrane standard from Gene Bank (GeneMac version 8.0). The course of isolation of cDNA from RNA total and mRNA also the result of nucleotide sequence analyses of protein of sporozoite membrane showed fragmen lenght of 480 bp. Gene fragmen amplification of protein of sporozoite membrane of PCR product and based on the result of DNA electrophoresis using specific *primer forward* and *primer reverse* produced PCR product in fragmen lenght at 366 bp.

Key words: *Eimeria* sporozoite membrane protein, isolation and characterization, recombinant principle

ABSTRAK

Salah satu bahan vaksin yang sedang dieksplorasi dan mempunyai prospek yang baik adalah vaksin rekombinan dari protein membran sporozoit *Eimeria* sp yang dapat dikembangkan, dimanipulasi, diproduksi secara artificial dan massal serta dapat diaplikasikan. Protein membran sporozoit *E. tenella* diisolasi dan dikarakterisasi ekspresi gen penyandi protein membran sporozoite *Eimeria tenella* sebagai dasar teknik rekombinan. 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. Hasil isolasi protein membran sporozoit diperoleh nilai optical density (OD) protein membrane sporozoit *E. tenella* dengan teknik indirect ELISA pada konsentrasi suspensi ookista 500/ μ l dibandingkan dengan konsentrasi ookista 1000/ μ l menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$), dimana konsentrasi protein membrane sporozoit *E. tenella* dari suspensi ookista 1000/ μ l meningkat $\pm 46\%$ lebih tinggi dari pada konsentrasi protein membrane sporozoit *E. tenella* suspensi ookista 500/ μ l. Pada suspensi hasil elusi protein membrane sporozoit *E. tenella* diidentifikasi protein membrane sporozoit 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. Hasil karakterisasi protein dengan *Dot Blot* menunjukkan hasil uji protein yang ternyata spesifik dengan antibodi monoklonal anti protein membran sporozoit *E. tenella*. Hasil isolasi RNA total dari protein membran sporozoit *E. tenella* menunjukkan adanya pita rRNA yang terentang di antara marker 23S dan 16S, dengan pita-pita mRNA yang terlihat smear diantara pita-pita rRNA. Berdasarkan gambaran elektroforesis maupun konsentrasinya, maka RNA total hasil ekstraksi dengan Trizol-LS selanjutnya dapat dipakai sebagai template untuk sintesis cDNA. Karakterisasi molekuler dilakukan dengan teknik RT-PCR dan analisis genetik dilakukan terhadap produk PCR. Sekuen nukleotida protein membran sporozoit isolat dibandingkan dengan protein membran sporozoit standart dari Gen Bank dengan GenMac versi 8.0. Serangkaian isolasi cDNA dari total RNA dan mRNA serta hasil analisis sekuen nukleotida protein membran sporozoit menunjukkan panjang fragmen 480 bp. Amplifikasi fragmen gen protein membran sporozoit yang merupakan produk PCR dan berdasarkan hasil elektroforesis DNA menggunakan *primer forward* dan *primer reverse* spesifik menghasilkan produk PCR dengan panjang 366 bp.

Kata kunci: protein membran sporozoit *Eimeria*, isolasi dan karakterisasi, dasar rekombinan