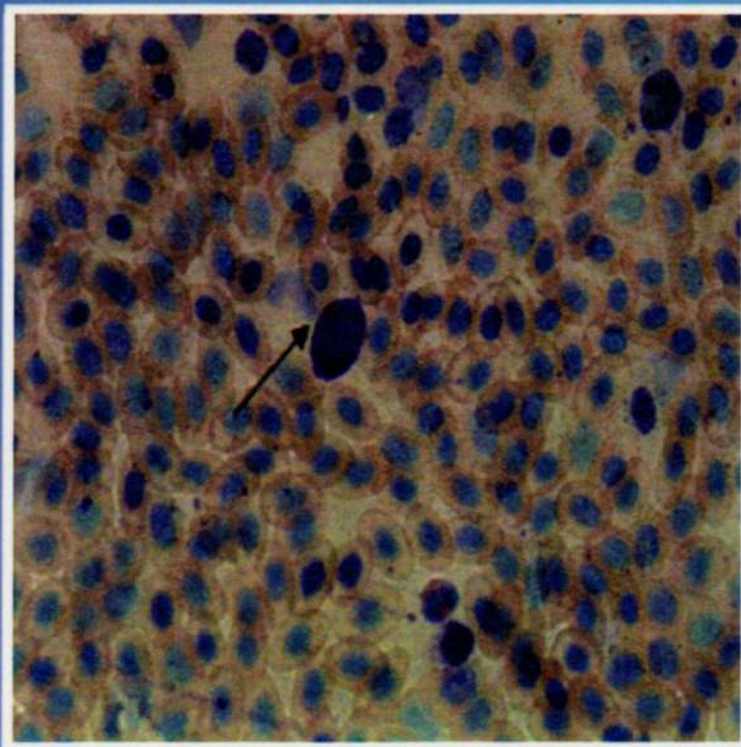


ISSN 2015-8930

MEDIA

Kedokteran Hewan

Veterinary Medicine Journal



Media Kedokteran Hewan

Vol . 29 No. 3 September 2013

Media Kedokteran Hewan memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan.
Terbit pertama kali tahun 1985 dengan frekuensi terbit tiga kali setahun pada bulan
Januari, Mei dan September.

Susunan Dewan Redaksi

Ketua penyunting :

Widjiati

Sekretaris :

Suryo Kuncorojakti

Bendahara :

M. Gandul Atik Yulianti

Iklan dan Langganan :

Hardany Primarizky

Penyunting Pelaksana :

Sri Subekti

Agus Sujarwo

Suwarno

Epy M. Luqman

Ngakan Made Rai Widjaya

Mas'ud Hariadi

Suzanita Utama

Muhammad Yunus

Mirni Lamid

Penyunting Penyelia :

Lita Rakhma Yustinasari

Berty Ferijanti

Alamat Redaksi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Tel. (031) 5992785 - 5993016; Fax (031) 5993015
E-mail : mkh_ua@yahoo.com

Rekening : Bank Mandiri a.n. Media Kedokteran Hewan FKH Unair
No Rek. 141-00-0714413-2

Kedokteran Hewan diterbitkan oleh **Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia (PDHI)**
dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

DAFTAR ISI

	Halaman
1	149-154
Prevalence of Feline Sarcoptic Infestation of Cat Skin Diseases at Airlangga University Small Animal Hospital In 2012 (Andhika Hardani Putra, dkk)	
2	155-160
Efektivitas Sodium Hipoklorit (NaOCl) sebagai Desinfektan Terhadap Virus Newcastle Disease (ND) Secara In Vitro (Lanovita Indiarni , dkk.....)	
3	161-168
Study of Bacteria Amount on Chicken Meat Sold at Traditional Market and Peddlers in Tandes District of Surabaya Using Total Plate Count Method (Freischa Dianita, dkk)	
4	169-180
Teknik Pencitraan Ultrasonografi Hati, Ginjal, Pankreas, dan Kantung Kemih pada Babi (<i>Sus scrofa domestica</i>) (Rr Soesatyoratih, dkk)	
5	181-190
Uji Aktivitas Antiangiogenesis Ekstrak Air Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) pada Membran Korioalantois Telur Ayam Berembrio yang Diinduksi bFGF (Iwan Sahrial Hamid dan Ngakan Made Rai Widjaja)	
6	191-198
Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> yang Diisolasi dari Susu Sapi Segar di Surabaya Terhadap Antibiotik B-Laktam (Arviana Zulfa, dkk.....)	
7	199-206
Sari Lidah Buaya (<i>Aloe vera</i> L) Secara Topikal Meningkatkan Jumlah Fibroblast Luka Insisi pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) (Steven Taufic Leo, dkk)	
8	207-212
Hubungan Panjang Badan, Lingkar Dada, Panjang dan Lebar Kepala, Ukuran <i>Tuber Coxae</i> , Jarak <i>Tuber Coxae</i> dengan <i>Tuber Sacrale</i> Terhadap Berat Badan Kambing Kacang Jantan (Elsa Dwi Agustina, dkk)	
9	213-222
Exploration of Antigenic Proteins of <i>Leucocytozoon caulleryi</i> As a Diagnostic Kitt of Leucocytozoonosis on Broiler Chicken (Nunuk Dyah Retno Lastuti, dkk)	
10	223-228
Seroprevalensi Influenza H5 pada Itik Pedaging Mojosari (<i>Anas Javanicus</i>) dari Dua Kecamatan di Kabupaten Jombang Provinsi Jawa Timur Tahun 2012 (Nadia Habibah R, dkk)	

**Eksplorasi Protein Antigenik *Leucocytozoon caulleryi* sebagai Kit Diagnostik
Leucocytozoonosis pada Ayam Broiler**

**Exploration of Antigenic Proteins of *Leucocytozoon caulleryi* As a Diagnostic Kitt of
Leucocytozoonosis on Broiler Chicken**

Nunuk Dyah Retno Lastuti¹, Endang Suprihati¹, Dony Chrismanto²

¹Departemen. Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

²Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya - 60115,

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

The purpose of this research to explored antigenic proteins of *Leucocytozoon caulleryi* as a diagnostic kit candidate of Leucocytozoonosis to broiler chicken. Exploration of antigenic proteins were performed by many steps: identification of gametocyte *L.caulleryi* from blood examination, isolation of *L.caulleryi* schizont from chicken organs, fractionation of whole proteins of *L.caulleryi* schizont by SDS-PAGE assay, and characterization antigenic proteins of *L.caulleryi* schizont by Western Blot assay.

The results showed that the characterization of *L.caulleryi* schizont protein have been recognized by SDS - PAGE, have molecular weight of 114.7 kDa , 109.6 kDa , 80.5 kDa , 65.0 kDa , 55.6 kDa and 36.1 kDa respectively. Some protein bands that appear thicker seen in protein with a molecular weight of 109.6 kDa , 65.0 kDa and 55.6 kDa. Characterization by Western blot obtained two protein fractions showed thick bands with molecular weight are 109.6 kDa and 65.0 kDa , whereas the other 4 protein fractions do not appear or are not reacted with antibodies (IgG) from infected chicken serum.

The conclusion of the research showed that *L.caulleryi* schizont has six protein fractions to molecular weight. They were 114.7 kDa , 109.6 kDa , 80.5 kDa , 65.0 kDa , 55.6 kDa and 36.1 kDa respectively. Among those protein fractions, 109.6 kDa and 65.0 kDa were antigenic proteins that could be developed as diagnostic kit.

Keywords: *Leucocytozoon caulleryi*, antigenic proteins, broiler chicken.

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protein antigenik sebagai material Kit Diagnostik dengan melalui berbagai tahap penelitian adalah sebagai berikut:1). Deteksi ayam ras terhadap *L.caulleryi* (pemeriksaan stadium *gametocyte* dan *schizont*); 2) Isolasi protein parasit dari organ hati dan limpa ayam ras ; 3). Penentuan kadar protein schizont *L.caulleryi*; 4). Karakterisasi *whole protein* dengan SDS-PAGE; 5) Karakterisasi protein antigenik *L.caulleryi* dengan Western Blott.

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa ayam ras di beberapa peternakan di Jawa Timur positif teridentifikasi *L.caulleryi* stadium gametocyte dan adanya schizont dalam organ hati dan limpa ayam. Hasil fraksinasi whole protein terdapat enam pita protein yang dikenali dengan SDS-PAGE yaitu: 114,7 kDa, 109,6 kDa, 80,5 kDa, 65,0 kDa, 55,6 kDa dan 36,1 kDa; beberapa pita protein tampak tebal dengan berat molekul 109,6 kDa, 65,0 kDa and 55,6 kDa. Karakterisasi dengan Western Blott diperoleh dua pita protein yang bersifat antigenik yaitu 109,6 kDa dan 65,0 kDa setelah direaksikan dengan antibodi serum positif Leucocytozoonosis.

Kesimpulan hasil penelitian menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 109,6 kDa dan 65,0 kDa merupakan protein antigenik dari schizont *L.caulleryi* pada ayam ras dan bisa dikembangkan sebagai bahan kit diagnostic untuk Leucocytozoonosis pada ayam.

Kata kunci: *Leucocytozoon caulleryi*, protein antigenik, ayam ras broiler.

Pendahuluan

Diagnosis terhadap malaria like disease atau dikenal dengan Leucocytozoonosis sampai dengan saat ini masih dilakukan secara konvensional yaitu dengan pemeriksaan ulas darah dimana pada stadium ayam yang sudah menunjukkan gejala klinis yang berat, sehingga hasil pemeriksaannya sering terlambat dan kurang efisien. Diagnosis dengan uji ELISA belum sepenuhnya digunakan karena bahan uji yang dibutuhkan masih pada tahap eksplorasi. Diagnosis terhadap Leucocytozoonosis dengan uji ELISA sangat diperlukan karena dapat mengidentifikasi penyakit lebih dini dan jumlah ayam yang diperiksa dalam jumlah banyak. Telah diketahui bahwa keberadaan parasit dalam sirkulasi darah merupakan fase lanjut dari siklus hidup parasit yang sebelumnya parasit berkembang biak dalam jaringan dan sel endotel secara schizogoni sehingga menimbulkan kerusakan jaringan. Schizont yang berada dalam jaringan merupakan stadium yang sangat imunogenik sehingga bisa digunakan sebagai kandidat antigen kit diagnostik uji ELISA untuk Leucocytozoonosis.

Leucocytozoonosis caulleryi ditularkan oleh lalat *Culicoides*, yang bisa menyerang ayam ras umur muda pada peternakan ayam di Indonesia sepanjang tahun, dan lebih sering terjadi di daerah dataran rendah dari pada dataran tinggi dengan temperature antara 26-27°C dengan kelembaban antara 82-87% (Soulsby, 1986; Ririen, 2004). Selain itu kejadian penyakit lebih sering pada ayam yang dipelihara di peternakan ayam dengan kandang system terbuka, karena lebih dimungkinkan vektor lalat menyebarkan penyakit. Indonesia dengan iklim tropis merupakan daerah endemis untuk penyebaran Leucocytozoonosis seperti yang terjadi di beberapa daerah di wilayah Jawa Timur, antara lain Lamongan, Gresik, Blitar, Kediri, Lumajang dan Pasuruan. Sedangkan kejadian yang pernah dilaporkan di Jawa Tengah meliputi Purbalingga, Klaten, Boyolali, Purwokerto, Karanganyar dan Yogyakarta. Leucocytozoonosis menyebabkan kematian pada ayam karena terjadi anemia yang hebat akibat faktor antieritrositik yang dihasilkan oleh parasit. Penurunan jumlah eritrosit dimulai bersamaan dengan munculnya parasit serta meningkatnya parasit dalam sirkulasi darah. Kerugian yang ditimbulkan bisa berupa hambatan pertumbuhan pada ayam muda, penurunan produksi telur pada ayam dewasa, peningkatan biaya produksi maupun kematian (Levine, 1995; Nakamura, 2001; Suprihati dkk, 2007). Angka kejadian pada ayam

ras berkisar antara 7-40%, sedangkan angka kematian pada anak ayam mencapai 7-50%, dan pada ayam dewasa 2-60% (Soekardono, 1986 dalam Suprihati, 2007). Kejadian leucocytozoonosis telah dilaporkan pada burung di daerah Finlandia Utara mencapai 48% selama musim kawin, sedangkan pada musim migrasi menunjukkan angka sebesar 13% (Rintamäki *et al.*, 1999; Morii., 2005).

Bahan uji yang spesifik dapat diperoleh dengan melakukan karakterisasi dan melakukan isolasi protein pada stadium tertentu dari parasit. Suprihati dkk. (2007) telah melakukan studi pendahuluan tentang spesifisitas protein schizont *Leucocytozoon* sp pada ayam domestik yang menunjukkan hasil bahwa protein dengan berat molekul (BM) 68,2, 55,2, 49,7 dan 44,7 kDa merupakan protein spesifik. Dari beberapa protein tersebut, protein dengan BM 55,2 kDa merupakan protein yang paling reaktif dengan ditandai warna band yang paling tebal. Isobe *et al.* (1998; 2000) menyatakan, bahwa terdapat perbedaan BM protein yang bereaksi dengan antibodi yang diperoleh dari serum ayam yang terinfeksi secara alam dan ayam yang diimunisasi. Serum ayam yang terinfeksi oleh *L.caulleryi* menunjukkan pita reaksi antibodi dengan protein pada BM 33, 44, 58, 79, 94, dan 141 kDa sedangkan ayam yang diimunisasi oleh schizont *L. caulleryi* menunjukkan pita reaksi dengan protein pada BM 36, 58, 71, 81, 97, 112, dan 123 kDa. Pita reaksi (*band*) dihasilkan dari ikatan antibodi atau imunoglobulin (Ig) yang merupakan molekul protein dan mampu untuk bergabung dengan determinan antigen, dalam hal ini protein *L.caulleryi* stadium schizont sebagai antigen yang mampu dikenali oleh antibodi serum ayam terinfeksi *L.caulleryi*, karena kandungan IgG sekitar 80% dalam serum

Berdasarkan masalah tersebut di atas maka perlu dikembangkan tehnik diagnosis yang dapat mendeteksi penyakit secara dini, cepat dan akurat. Untuk pengembangan tehnik diagnosis diperlukan bahan antigen yang dieksplorasi dari organ ayam yang mengandung schizont dari *L.caulleryi* dengan berbagai metode agar diperoleh protein yang bersifat antigenik spesifik. Uji ELISA merupakan metode diagnosis dengan sensitivitas yang dapat diandalkan karena dapat mendeteksi antigen atau antibodi dalam kadar yang rendah. Teknik tersebut dapat dikembangkan sesuai kebutuhan baik untuk mendeteksi antigen maupun antibodi, namun untuk meningkatkan spesifisitasnya perlu dilakukan eksplorasi bahan uji sekaligus melakukan uji sensitivitas dan spesifisitasnya baik pada hewan coba maupun hewan tersinfeksi secara alamiah.

Metode Penelitian

1. Isolasi parasit dari organ ayam yang terinfeksi

Sebelum dilakukan isolasi protein dari *L.caulleryi*, dipastikan dulu bahwa ayam dari peternakan ayam ras potong terinfeksi leucocytozoonosis berdasar gejala klinis dan pemeriksaan hapusan darah yang diwarnai dengan giemsa 10%. Pemeriksaan mikroskopis untuk mendeteksi stadium gametosit yang berkembang di dalam eritrosit. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan lanjutan dengan memeriksa beberapa organ ayam seperti : hepar, limpa dan usus untuk mendiagnosis adanya stadium schizont, dengan cara dilakukan penggerusan organ dan pemeriksaan pathologi untuk melihat perdarahan yang terjadi. Organ yang dinyatakan positif adanya schizont leucocytozoon, kemudian organ disimpan dalam freezer - 30 C.

2. Ekstraksi protein dari jaringan

Organ hepar dan limpa ayam yang positif mengandung schizont *L.caulleryi* diisolasi sebanyak 50-100 mg atau 0,05 ml pelet basah yang dikultur, kemudian ditambah 2-3 ml larutan 2-D rehydration/sample buffer. Selanjutnya sampel diletakkan di atas es dan disonikasi selama 30 detik, kemudian didinginkan pada suhu -80°C selama 5 menit, perlakuan diulang sebanyak empat kali. Sampel disentrifus menggunakan *microcentrifuge* ($16.000 \times g$) selama 20-30 menit pada suhu $18-20^{\circ}\text{C}$, kemudian dikeluarkan dari sentrifus dan supernatan dipindahkan ke tabung yang bersih, dan sampel disimpan dalam suhu -80°C .

3. Karakterisasi protein dengan SDS -PAGE

Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Susunan running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid 30%, Tris, SDS 0,8 %, Temed, APS dan aquades dalam gelas beker. Sebanyak $10 \mu\text{g}$ sample yang ditambahkan *lamely buffer* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan kedalam kolom cetakan yang terletak pada stacking gell dan dilakukan running pada chamber yang telah diisi Electrode buffer IX dengan 100 volt, 40 mA.

Setelah running, gell dimasukkan kedalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml dan aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sacker selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehyde 10 % dan aquades selama 30 menit. Setelah dicuci , gell diwarnai dengan AgNO_3 selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades 2 X masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehyde 3,7 %, sitronsouce 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan griserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

4. Immunoblotting (Western Blot)

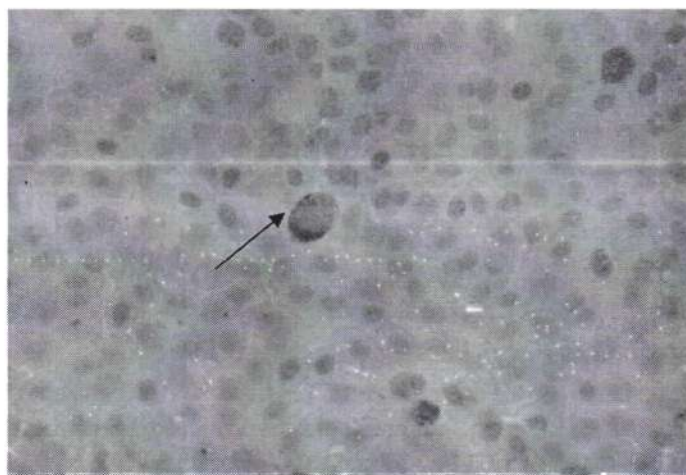
Antigen *schizont* jaringan direaksikan dengan antibody poliklonal dengan menggunakan metode *western blott*. SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulose, selanjutnya membran diblocking dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan TBS Tween 0,05% sebanyak 5 kali, masing-masing selama 10 menit, diatas shacker. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal dalam PBS (1:100) dan diinkubasikan 1 jam pada suhu ruang dengan shacker dan dilakukan pencucian dengan TBS Tween 0,05% selama 10 menit. Pencucian diulang 5 kali dengan cara yang sama.

Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan conjugat anti- chicken IgG HRP (1:1000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada suhu kamar dengan shacker dan diikuti dengan pencucian sebanyak 5 X dengan 0,05% Tween dalam TBS dan sekali tanpa Tween. Membran diwarnai dengan substrat (larutan Ammino Ethyl Carbazole) dilakukan di kamar gelap sampai terlihat pita berwarna coklat. Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambahkan aquades. Membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul yang immunogenik dilakukan dengan membandingkan pita protein yang tampak dengan standart marker yang diwarnai dengan AgNO_3 .

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil identifikasi dan isolasi

Berdasarkan hasil pemeriksaan secara laboratoris dengan metode hapusan darah dengan pewarnaan Giemsa serta perubahan patologi anatomi organ hati ayam yang menunjukkan gejala klinis Leucocytozoonosis di beberapa daerah endemis Leucocytozoon di Jawa Timur seperti Pasuruan, Lamongan, Blitar menunjukkan daerah tersebut positif terinfeksi Leucocytozoonosis. Hasil pemeriksaan hapusan darah tampak stadium gametosit *L.caulleryi* seperti yang tersebut pada gambar 1, sedangkan perubahan PA tampak dalam gambar 2 di bawah ini.



Gambar 1. Hasil pemeriksaan darah ayam yang terinfeksi *L.caulleryi*
Anak panah adalah stadium gametosit *L caulleryi*. Perbesaran 1000 x



Gambar 2. Organ hati ayam ras terinfeksi *L.caulleryi* (tanda panah)

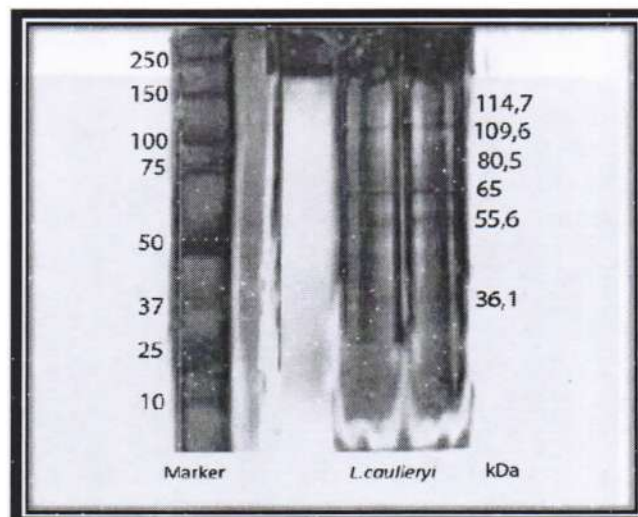
Seperti yang dijelaskan dalam hasil penelitian Suprihati (2013), bahwa kejadian Leucocytozoonosis pada ayam ras didaerah endemis meliputi Jawa Timur, Jawa Tengah dan Kalimantan Selatan, dan secara umum kejadian Leucocytozoonosis pada ayam ras terjadi pada peternakan ayam yang kurang memperhatikan sanitasi kandang dan lingkungan. Selain pemeriksaan ulas darah, menurut Suprihati (2013) bahwa hasil pemeriksaan darah dengan PCR dan sequencing menunjukkan bahwa *Leucocytozoon* yang ditemukan pada ayam ras didaerah endemis adalah hanya *L.caulleryi*, dan stadium gamet yang ditemukan berdiameter rata-rata panjang 18,233 μm , lebar 12,934 μm , dan keliling 47,613 μm .

2. Hasil karakterisasi protein *L.caulleryi* dengan SDS-PAGE

Berdasar hasil pemeriksaan dari darah ayam yang terdeteksi positif adanya gametosit (Gambar 1), serta hasil pemeriksaan mikroskopis dari gerusan organ hati dan limpa yang mengandung schizont *L.caulleryi*, kemudian dilanjutkan isolasi protein parasit yang dieksplorasi dari organ hati yang mengandung schizont serta dilakukan pemurnian untuk menghindari molekul lain yang bisa mempengaruhi hasil eksplorasi.

Hasil isolasi protein dari jaringan hati ayam diperoleh kadar total protein sebesar 15.943 mg/ml, protein tersebut digunakan untuk berbagai tahapan penelitian agar diperoleh protein antigenik. Protein terlarut (*soluble protein*) yang diisolasi dilakukan karakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE untuk mengidentifikasi jenis protein yang terkandung dalam stadium schizont *L.caulleryi* berdasarkan berat molekul.

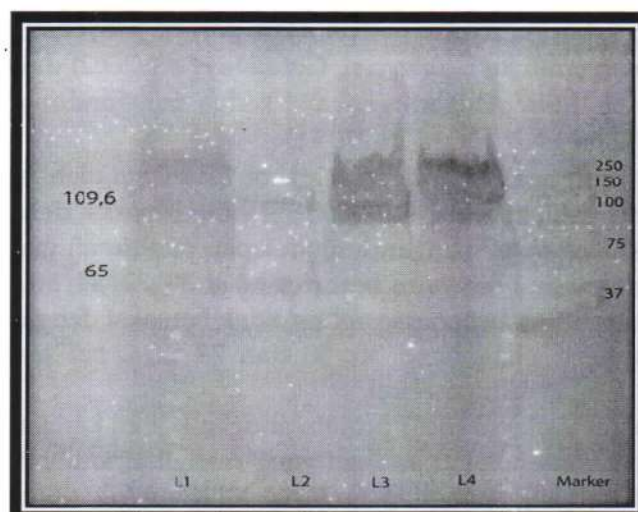
Hasil karakterisasi protein schizont *L.caulleryi* dengan elektroforesis SDS-PAGE digunakan marker 10-250 kDa, maka hasil elektroforesis didapatkan enam fraksi protein yang dikenali yaitu berturut-turut 114,7 kDa, 109,6 kDa, 80,5 kDa, 65,0 kDa, 55,6 kDa dan 36,1 kDa. Beberapa pita protein yang tampak tebal terlihat pada protein dengan berat molekul 109,6 kDa, 65,0 kDa dan 55,6 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE Protein Schizont *L.caulleryi*
Keterangan : M : Marker; L : *L.caulleryi* 1; *L.caulleryi* 2

3. Hasil karakterisasi protein *L.caulleryi* dengan Western Blot

Profil protein schizont dari organ hati yang berhasil dieksplorasi melalui elektroforesis SDS-PAGE adalah *whole protein* yang belum menunjukkan protein yang bersifat antigenik (spesifik). Untuk mengetahui apakah protein dari *L.caulleryi* bersifat antigenik, maka dilanjutkan pemeriksaan melalui eksplorasi dengan teknik Western Blot menggunakan antibodi (IgG) serum ayam yang terdeteksi positif Leucocytozoonosis yang diambil bersamaan dengan organ ayam yang menunjukkan gejala klinis leucocytozoonosis. Hasil karakterisasi dari lima sampel organ hati terhadap hasil reaksi protein schizont *L.caulleryi* dengan Western Blot didapatkan dua fraksi protein yang menunjukkan pita tebal dengan berat molekul yaitu 109,6 kDa dan 65,0 kDa, sedangkan 4 fraksi protein yang lain tidak nampak atau tidak bereaksi dengan antibodi (IgG) dari serum ayam terinfeksi. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Western Blot Protein Schizont *L.caulleryi*
Keterangan : M : Marker; L1-4 : *L.caulleryi* sampel 1-4

Jenis protein schizont *L.caulleryi* dengan berat molekul 109,6 kDa dan 65,0 kDa merupakan dua macam protein dari enam jenis protein yang dikenali melalui pemeriksaan SDS-PAGE dengan pewarnaan silver. Hal tersebut menunjukkan bahwa dua jenis protein schizont *L.caulleryi* mampu dikenali oleh antibodi serum, karena bereaksi dengan antibodi (IgG) dari serum ayam yang terdeteksi leucocytozoonosis setelah direaksikan dengan *conjugate* IgG anti-chicken yang dilabel *Horse Redish Peroxidase* (HRP).

Telah diketahui bahwa antibodi atau imunoglobulin (Ig) adalah molekul protein yang mampu untuk bergabung dengan determinan antigen, dalam hal ini protein *L.caulleryi* stadium schizont sebagai antigen yang mampu dikenali oleh antibodi serum ayam terinfeksi terinfeksi *L.caulleryi*, karena kandungan IgG sekitar 80% dalam serum. Secara fungsional antibodi IgG terdiri dari dua unit pengikat antigen dan setiap unit terdiri dari satu rantai berat dan satu

rantai ringan, selain itu antibodi bersifat bivalent yang dapat mengikat dua epitop yang identik (Alberts, 2002; Madigan, 2006). Protein antigen yang mampu dikenali oleh antibodi serum dapat dikatakan sebagai protein antigenik yang berperan dalam pathogenesis penyakit, dan bisa dikembangkan sebagai kit diagnostik untuk pengembangan teknik diagnosis secara serologis yang sensitif dan spesifik.

Hasil analisis protein *L.caulleryi* dari ayam ras dalam penelitian ini terdapat pita (*band*) protein yang sama maupun ada yang berbeda dengan peneliti terdahulu, kemungkinan hal tersebut dapat terjadi karena memang ada perbedaan protein yang bersifat antigenik dari spesies yang berbeda karena genus *Leucocytozoon* mempunyai banyak spesies antara lain *L.simondi*, *L.sabrazesi* dan *L.caulleryi*.

Seperti yang dikemukakan oleh penelitian Suprihati dkk (2007) bahwa hasil elektroforesis protein schizont *Leucocytozoon* yang diisolasi dari ayam buras (ayam domestik) ada 4 pita protein yang bersifat imunogenik yaitu 48,9; 39,8; 37,2 dan 35,5 kDa (produksi IgG hasil dari injeksi protein antigenik pada kelinci yang diimunisasi), dan protein dengan berat molekul 48,9 kDa merupakan protein yang paling imunogenik. Berdasarkan berat molekul protein dan gambaran morfologis parasit penyebab leucocytozoonosis pada ayam buras dapat mengarah ke *L. sabrazesi*. Gotanda *et al.*, (2002) dalam Suprihati dkk (2007) menyatakan bahwa stadium schizont generasi kedua mengandung sekitar 40 pita protein dengan berat molekul berkisar antara 10-270 kDa.

Berdasarkan hasil analisis antigen schizont *L.caulleryi* oleh Isobe *et al.*, (1998), bahwa berat molekul protein antigen schizont *L.caulleryi* yang bereaksi dengan antibodi serum dari ayam yang terinfeksi *L.caulleryi* mengandung delapan pita (*band*) yang dikenali dengan SDS-PAGE pewarnaan coomasie blue yaitu berturut-turut 30, 33, 44, 50, 58, 65, 78 dan 102 kDa. Namun dengan Western Blot beberapa protein tidak bereaksi dengan serum ayam terinfeksi leucocytozoonosis seperti pada band 30, 50 dan 78 kDa, hal tersebut mungkin protein mengalami reduksi dengan dithiothreitol.

Perbedaan berat molekul (BM) protein antigenik juga karena perbedaan epitop yaitu bagian spesifik dari makromolekul antigen yang mengikat antibodi, dalam hal ini epitop adalah bagian peptida yang mengikat molekul MHC untuk dikenali oleh reseptor sel T (Abbas, 2005). Perbedaan lain hasil elektroforesis dari spesies *Leucocytozoon* yang sama bisa disebabkan oleh jenis parasit dengan spesies yang sama namun berasal dari negara lain, atau perbedaan berat molekul bisa juga terjadi karena masalah teknis seperti waktu penghitungan atau pengukuran berat molekul protein (karena pengukuran menggunakan analisis regresi bisa linear, kuadratatif atau kubik), atau waktu melakukan pemurnian protein (Lastuti, 2009).

Hasil penelitian berikutnya oleh Isobe *et al.*, (1998; 2000) menyatakan, bahwa terdapat perbedaan BM protein yang bereaksi dengan antibodi yang diperoleh dari serum ayam yang terinfeksi secara alami dan ayam yang diimunisasi. Serum ayam yang terinfeksi oleh *L. caulleryi* menunjukkan pita reaksi antibodi dengan protein pada BM 33, 44, 58, 79, 94, dan 141 kDa sedangkan ayam yang diimunisasi oleh schizont *L. caulleryi* menunjukkan pita reaksi dengan protein pada BM 36, 58, 71, 81, 97, 112, dan 123 kDa. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa protein yang bersifat antigenik artinya yang mampu menimbulkan pathogenesis penyakit belum tentu bersifat imunogenik (antigen yang mampu menstimulasi respon imun) yang menghasilkan IgG sebagai antibodi humoral yang melindungi ayam dari infeksi yang sama. Antibodi merupakan komponen penting pada respons imun dan menyediakan imunitas spesifik antigen terhadap patogen ekstraseluler.

Menurut Abbas (2005), bahwa sel Th2 berperan dalam imunitas humoral yang mengaktivasi dan menstimuli proliferasi sel B untuk memproduksi imunoglobulin. Berdasar konsep bahwa sel T mengenal fragmen peptida dari protein antigen dan yang dipresentasikan oleh molekul permukaan sel yang dikode oleh gen MHC. Sel yang mempresentasikan ikatan MHC-peptida dinamakan APC, dan APC akan mempresentasikan antigen sehingga dikenali oleh naive T sel selama fase pengenalan dari respon imun untuk mengawali respon sel T menjadi T cel receptor (TCR). Ikatan MHC II, antigen (peptida) dan TCR disebut trimolekuler kompleks yang akan mengirim signal ke sel T helper, kemudian berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2. Sel Th2 akan memproduksi IL4, IL6 dan IL 10 yang berperan menginduksi sel B menghasilkan antibodi. Antibodi atau imunoglobulin (Ig) yang dihasilkan adalah molekul protein yang mampu untuk bergabung dengan determinan antigen.

Bellanti (1993) dalam Suprihati dkk (2007) menyatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolit, dan beberapa diantaranya ada yang bersifat spesifik untuk stadium tertentu serta bersifat sementara, sedangkan antigen yang lain tetap pada seluruh siklus hidup parasit dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik tetap pada seluruh siklus hidup parasit dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik yang berbeda. Menurut Rantam (2003), menyatakan bahwa limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Respon imun yang diinduksi oleh banyak epitop diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan limfosit dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespon antigen, sehingga sel mengalami proliferasi dan deferensiasi dengan spesifisitas yang berbeda.

Telah diketahui bahwa antigen adalah suatu molekul yang menstimuli produksi antibodi serta dapat dikenali oleh reseptor sel T, berkaitan dengan terminologi tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang diproduksi oleh ayam yang terinfeksi leucocytozoonosis mampu berikatan dengan epitop dari antigen dan diekspresikan dalam dua jenis protein tersebut di atas. Antibodi yang diproduksi dari ayam yang terinfeksi leucocytozoonosis adalah komponen penting dalam sistem imun yang berfungsi mencegah hewan terhadap tantangan antigen tertentu (Onaga, 1999)

Antibodi diproduksi dalam merespon antigen asing, dan antibodi spesifik (reseptor membran permukaan sel B) akan mengikat pada sisi antigen spesifik (*determinant antigen*) yang membentuk antigen-antibodi kompleks (Austyn and Wood, 1994). Ekstrak schizont generasi kedua dari *L.caulleryi* dan serum darah ayam yang mengandung antigen bisa digunakan untuk melindungi ayam dari infeksi *L.caulleryi*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antiserum terhadap schizont generasi kedua dapat mengenali protein dalam proses imunitas (Suprihati, 2007).

Leucocytozoonosis pada ayam dapat dicegah dengan vaksinasi dan imunitas humoral berperan penting dalam mengontrol penyakit. Nakata *et al.*, (2003) mempelajari dalam induksi respon imun selluler pada ayam yang divaksin, bahwa ayam yang divaksin dengan rekombinan schizont generasi kedua secara peroral menunjukkan peningkatan titer antibodi meningkat secara signifikan dibanding perlakuan pada ayam kontrol yang diinokulasi hanya dengan ajuvan.

Kesimpulan

Hasil karakterisasi *whole protein* schizont *L.caulleryi* dari organ hati ayam broiler dengan elektroforesis SDS-PAGE didapatkan enam fraksi protein dengan berat molekul berturut-turut yaitu: 114,7 kDa, 109,6 kDa, 80,5 kDa, 65,0 kDa, 55,6 kDa dan 36,1 kDa. Hasil karakterisasi protein antigenik dari stadium schizont *L.caulleryi* dengan Western Blot didapatkan dua pita protein yang dikenali oleh antibodi serum ayam terinfeksi leucocytozoonosis dengan berat molekul 109,6 kDa dan 65,0 kDa.

Daftar Pustaka

- Abbas AK and Litchman AH. 2005. Cellular and Molecular Immunology. 5th. Ed. International Edition. Elsevier Saunders Inc. Philadelphia, Pennsylvania, pp 41-105, 411-432.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. 2002. Molecular Biology of The Cell. 4th ed. Garland Science. Taylor & Francis Group, pp 1363-1405.
- Austyn JM and Wood KJ. 1994. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, pp 3-29.
- Isobe T, Shimizu S, Yoshihara S, and Suzuki K. 1998. Immunoblot Analysis of Humoral Immune responses to *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. J. Parasitol. Feb :84 (1): 62-66
- Isobe T, Shimizu S, Yoshihara S, and Yokomizo. 2000. Cyclosporin A, but not bursectomy abolishes the protective immunity of chicken against *Leucocytozoon caulleryi*. Dev. Compl. Immuno. Jun : 24 (4) : 433-441 .
- Levine ND. 1995. Protozoologi Veteriner (terjemahan). Gaajah Mada University Press. Yogyakarta
- Madigan MT and Martinko JM. 2006. Biology of Microorganisms. 11th Ed. Southern Illinois University Carbondale. Pearson Prentice Hall. Pearson Education Inc, pp 732-756.
- Morii T, Matsui T, Kobayashi F, and Tsujii T. 1999. Immunogenicity of *Leucocytozoon caulleryi* sporozoites and their reactivity with specific immune sera. Parasitol. Res ; 82 (5) : 454-458.
- Morii T and Fukuda M. 2005. Observations on first generation schizogony of *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. J.of Euk Microbiol. 39:281-287.
- Lastuti ND. 2009. Protein Antigenik Spesifik 57,3 kDa *Sarcoptes scabiei* var. *caprae* sebagai Kit Diagnostik Scabies pada Kambing dan TLR sebagai perantara respons imun. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Onaga H, Kato A, Kitanura T, Hujina M, Hasegawa A and Ueda S. 1999. Protective immunity induced with the antigens fractionated by affinity chromatography from the second generation schizont of *Leucocytozoon caulleryi*. J. Vet. Med. Sci. 58 (7) : 677-679.
- Rintamaki PT, E Huhta J, Jokimaki and D Squires Parsons. 1999. Leucocytozoonosis and Trypanosomiasis in Redstars in Finland. J of Wildlife Disease. 35(3): 603-607.
- Suprihati E, Nunuk Dyah RL, Ririen NW. 2007. Identifikasi Protein Immunogenik Schizont *Leucocytozoon* sp. untuk Pengembangan Kit Diagnostik. Media Kedokteran Hewan 23(2): 80-87.
- Suprihati E. 2013. Analisis Filogenetika Gen Cytochrom B *Leucocytozoon* spp. Pada Ayam Ras di Wilayah Endemis Indonesia. Disertasi. Universitas Airlangga Surabaya.