



**LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE-LIKE BATCH III**



JUDUL PENELITIAN

**IDENTIFIKASI DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL
SPESIFIK TERHADAP PROTEIN IMUNOGENIK
JENIS SKIZON *LEUCOCYTOZOOM SP.* UNTUK
PENGEMBANGAN KIT DIAGNOSTIK**

Oleh :

**Endang Suprihati, M.S., Drh
Nunuk Dyah R.L., M.S., Drh
Ririen Ngesti Wahyuti M.Kes., Drh**

009407141

**PROYEK DUE-LIKE BATCH III
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
DESEMBER 2005**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE
BATCH III**

Judul : Identifikasi dan Produksi Antibodi Poliklonal Spesifik terhadap Protein Imunogenik jenis Skizon *Leucocytozoon sp.* untuk Pengembangan Kit Diagnostik

Ketua Peneliti

Nama : Endang Suprihati M.S., Drh
Jenis Kelamin : Wanita
Pangkat /Golongan : Pembina / IVA
NIP : 131 291 818
Jabatan : Lektor Kepala
Fakultas : Kedokteran Hewan

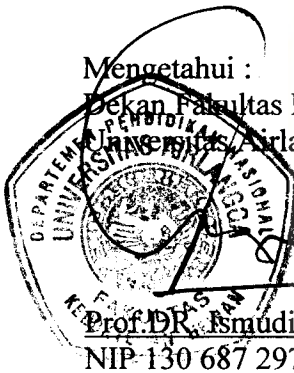
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan

Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,-

Mengetahui :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga



Prof. DR. Ismudiono, M.S., Drh
NIP-130 687 297

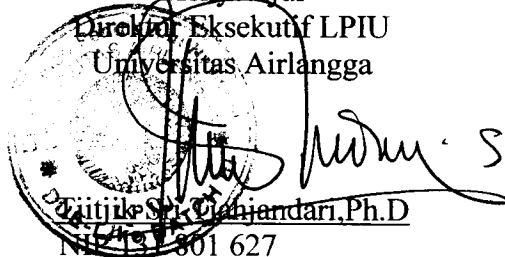
Surabaya,

Ketua Peneliti

Endang Suprihati, M.S., Drh
NIP. 131 291 818

Menyetujui

Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga



Fitjile Sri Cahjandari, Ph.D
NIP. 131 301 627

RINGKASAN

Identifikasi dan Produksi Antibodi Poliklonal Spesifik terhadap Protein Immunogenik Jenis Skizon *Leucocytozoon sp.* Untuk Pengembangan Kit Diagnostik

Diagnosis terhadap Leucocytozoonosis selama ini melalui pemeriksaan ulas darah untuk melihat adanya stadium gamet dan gerusan jaringan untuk melihat stadium skizon *Leucocytozoon*. Cara diagnosis seperti ini kurang akurat dan sering terlambat karena adanya parasit stadium gamet maupun skizon dalam tubuh induk semang akan mengakibatkan gejala klinis yang berat bahkan kematian. Oleh karena itu diagnosis secara serologis sangat dibutuhkan untuk menegakkan diagnosis secara cepat dan akurat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi protein skizon *Leucocytozoon* yang immunogenik. Dengan ditemukannya protein yang immunogenik diharapkan bisa memproduksi antibodi poliklonal yang spesifik. Antibodi tersebut bisa dipakai sebagai bahan diagnosis molekuler. Protein skizon yang bersifat immunogenik selanjutnya dapat dikembangkan sebagai bahan vaksin untuk penanggulangan Leucocytozoonosis.

Ayam yang positif terkena Leucocytozoonosis diambil organ paru, hati, ginjal, limfa untuk diisolasi protein skizon *Leucocytozoon* dengan cara sonikasi. Dari hasil isolasi protein kemudian dilakukan elektroforesis dengan SDS-Page untuk menentukan fraksi protein yang dihasilkan. Selanjutnya, protein diinjeksikan ke kelinci untuk mendapatkan antibodi poliklonal yang akan digunakan untuk immunoblotting guna mendapatkan protein yang immunogenik. Protein yang immunogenik dipisahkan dengan kolom kromatografi. Hasil pemisahan tersebut digunakan sebagai bahan produksi antibodi poliklonal spesifik pada kelinci.

Pengukuran titer antibodi yang didapat dilakukan dengan uji ELISA. Setelah mencapai titer antibodi yang tinggi, kelinci dikorbankan untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal spesifik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada 6 protein skizon *Leucocytozoon* dengan BM sebagai berikut : 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa, 44,7 kDa, 30,7 kDa, 20,2 kDa. Sedangkan yang immunogenik ada 4 protein yaitu dengan BM : 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa dan 44,7 kDa yang dapat memproduksi antibody poliklonal spesifik pada kelinci. Disarankan penelitian lebih lanjut penggunaan protein skizon *Leucocytozoon* tersebut

kemungkinannya bisa digunakan sebagai bahan vaksin serta perlu dilakukan uji sensitifitas dan spesifisitas terhadap antibodi poliklonal spesifik tersebut

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III dengan Nomor Kontrak 52/PL/DUE-Like/UA/2005



SUMMARY

IDENTIFICATION AND PRODUCTION OF SPECIFIC POLYCLONAL ANTIBODY TO SCHIZONT IMMUNOGENIC PROTEIN OF *Leucocytozoon* sp. IN DIAGNOSTIC KITT DEVELOPMENT

Endang Suprihati, Nunuk Dyah Retno Lastuti, Ririen Ngesti Wahyuti
Departemen of Parasitology Faculty of Veterinary Medicine, University of Airlangga

Diagnosis to Leucocytozoonosis by blood and organs smear examinations is to identify gamet and schizont stages, respectively. However, those diagnostic techniques are mostly late coincided severe infection and death of host. Based on that the reason, serological diagnostic is really needed to establish the accurate diagnostic.

The aims of the research are to identify immunogenic protein of *Leucocytozoon* schizont then to be continued to produce specific polyclonal antibody. The specific polyclonal antibody could be used as molecular diagnostic kitt. Moreover, immunogenic protein of *Leucocytozoon* schizont could be used as vaccine.

Schizont protein of pulmo, liver kidney and spleen were isolated by sonication technique. The protein fraction was identified by SDS-Page with electrophoresis. Then, the proteins were administrated to rabbit to produce polyclonal antibody and to those polyclonal antibody were assigned immunogenic protein by immunoblotting. The immunogenic protein was separated from protein fraction by chromatography column to produce specific polyclonal antibody on rabbit. The antibody titer was measured by ELISA. When the antibody titer reach high point, sera were collected.

The result of the research showed that the *Leucocytozoon* has six protein fractions to molecular weight. They were 68.2 kDa, 55.2 kDa, 49.7 kDa, 44.7 kDa, 30.7 kDa, 20.2 kDa, respectively. Among those protein fractions, 68.2 kDa, 55.2 kDa, 49.7 kDa and 44.7 kDa were immunogenic protein that could be produced on rabbit..

PRAKATA

Dengan selesainya penelitian yang berjudul : Identifikasi dan Produksi Antibodi Poliklonal Spesifik terhadap Protein Immunogenik jenis Skison *Leucocytozoon sp.* untuk Pengembangan Kit Diagnostik, maka dengan ini kami mengharapkan hasil penelitian ini dapat ditindak lanjuti dengan penelitian yang lebih aplikatif agar betul-betul dapat diambil manfaatnya oleh praktisi dalam mendiagnosis Leucocytozoonosis dini dan akurat.

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

1. Prof. Dr. Med. Puruhito selaku Rektor Universitas Airlangga Suarabaya
2. Tjitjiek Srie Tjahjandari, Ph.D., selaku Direktur LPIU Unair
3. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan FKH Unair
4. Nunuk Dyah Retno Lastuti M.S., drh. selaku Asisten Direktur bidang Akademik
5. Retno Biyanti, M.S., drh. selaku Koordinator Due-like Batch III FKH Unair
6. Dr. Fedik A. Rantam selaku PIC Hibah Penelitian dan Kepala Laboratorium Biomolekuler Veteriner FKH Unair.
7. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini hingga selesai

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

Desember, 2005

Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB IV. METODE PENELITIAN	11
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Hasil elektroforesis protein skizon <i>Leucocytozoon</i>	17
Gambar 2. Hasil Immunoblotting protein skizon <i>Leucocytozoon</i>	18



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil ELISA produksi antibodi poliklonal protein skizon <i>Leucocytozoon</i>	23
Lampiran 2. Grafik protein standart (marker) dan perhitungan berat Molekul	24
Lampiran 3. Abstrak penelitian mahasiswa yang mengikuti penelitian Proyek DUE-Like	25





BAB I

PENDAHULUAN

Leucocytozoonosis merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh genus *Leucocytozoon*. Pada ayam, spesies yang sering menyerang adalah *L. caulleryi*. Parasit ini merupakan salah satu parasit yang dapat menyerang ayam sepanjang tahun meskipun frekuensinya mungkin tidak tetap (Partoutomo dan Sutedjo, 1977). Gejala klinis *Leucocytozoonosis* yang dapat diamati antara lain adalah feses berwarna hijau, depresi, nafsu makan hilang, muntah darah dan paralisis yang diikuti oleh kematian akibat kolaps. Pada penyakit yang tidak menunjukkan gejala klinis ditandai oleh penurunan produksi telur dan daya tetasnya serta penurunan berat badan (Levine, 1995)

Leucocytozoonosis telah tersebar luas di Indonesia, sebagaimana yang diungkapkan oleh Sukardono dalam Wasito, *dkk.* (1990). Di Jawa Timur tingkat kejadian *Leucocytozoonosis* memang belum terdata secara konkrit, namun berdasarkan hasil pemeriksaan ayam yang dibawa mahasiswa ko-ass, yang berasal dari peternakan-peternakan ayam, baik peternakan maju maupun tradisional menunjukkan tingkat kejadian yang tinggi (sekitar 70%).

Masalah yang timbul berkaitan dengan kasus *Leucocytozoonosis* adalah seringkali ayam menunjukkan gejala klinis yang berat bahkan kematian pada saat terjadi proses skizogoni dari parasit sebelum terjadi proses gemetogoni dimana dalam stadium ini parasit nampak dalam darah. Pada proses skizogoni di jaringan, parasit sulit dideteksi, sehingga seringkali ayam mati sebelum terdiagnosa dengan jelas (Soulsby, 1986).

Berdasarkan masalah tersebut di atas maka perlu dikembangkan teknik diagnosa yang bisa mendeteksi sedini mungkin infeksi parasit secara akurat.

Metode diagnosis yang bisa menjawab permasalahan tersebut adalah dengan memproduksi antibodi poliklonal dari parasit sebagai kit diagnostik untuk mendeteksi adanya antigen *Leucocytozoon* dalam tubuh induk semang pada stadium skizon dari parasit dengan melihat profil protein yang imunogenik



BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT

2.1 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui profil protein skizon *Leucocytozoon sp.*
2. Untuk mendapatkan protein skizon *Leucocytozoon sp.* yang bersifat imunogenik.
3. Produksi antibodi poliklonal spesifik

2.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi perkembangan ilmu terutama Ilmu Parasitologi dan Imunologi. Di samping itu juga diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi praktisi di dunia peternakan untuk dapat mendiagnosis Leucoccytozoonosis secara dini dan akurat

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Etiologi

Leucocytozoon adalah protozoa darah dari famili Haemoproteidae, ordo Haemospiridia, kelas Sporozoa. Pada ayam, penyakit ini disebabkan oleh *L. caulleryi* dan *L. sabrozesi*; pada itik dan angsa disebabkan oleh *L. simondi*; pada kalkun disebabkan oleh *L. smithi*; pada burung merpati oleh *L. marchouxi* dan pada burung belibis oleh *L. bonasae*. Ciri-ciri yang dapat dipakai sebagai pedoman untuk membedakan spesies *Leucocytozoon* adalah dengan melihat bentuk, ukuran, warna sitoplasma dan inti dari gemetosit (Soekardono, 1986).

Leucocytozoonosis adalah penyakit yang disebabkan oleh protozoa darah, *Leucocytozoon*, dan ditularkan oleh lalat *Simulium* dan *Culicoides*. Penyakit ini mempunyai kemiripan bentuk dan gejala klinis dengan Malaria Unggas yang disebabkan oleh *Plasmodium sp.* Leucocytozoonosis tersebar luas di Indonesia terutama menyerang ayam ras pada umur muda. Kerugian yang ditimbulkan bisa berupa hambatan pertumbuhan pada ayam muda, penurunan produksi telur pada ayam dewasa, peningkatan biaya produksi maupun kematian. Angka kejadian penyakit bervariasi tergantung dari populasi vektor, umur ayam dan cara pemeliharaannya. Pada ayam ras, angka tersebut berkisar antara 7-40%. Angka kematian pada anak ayam adalah 7-50%, sedang pada ayam dewasa 2-60% (Soekardono, 1986)

3.2 Siklus Hidup *Leucocytozoon*

Penularan *Leucocytozoonosis* terjadi melalui gigitan vektor (*Culicoides / Simulium*). *Leucocytozoon* stadium gametosit yang terdapat dalam darah unggas akan terhisap oleh vektor pada saat lalat tersebut menggigitnya. Di dalam tubuh vektor, *L. caulleryi* mengalami fertilisasi dan membentuk zigot (stadium seksual). Ookinet yang terbentuk segera menembus usus dan membentuk ookista yang mengandung sporozoit pada dinding usus. Sporozoit keluar dari ookista yang pecah dan akan segera menuju ke kelenjar ludah vektor dan menjadi bentuk infeksius. Sporozoit ditularkan ke unggas yang lain melalui gigitan lalat, kemudian masuk ke sel endotel pembuluh darah unggas tersebut. Dalam tubuh unggas ini, sporozoit mengalami siklus eksoeritrositik menghasilkan skizon pada organ-organ tubuh. Skizon berbentuk bulat dan dapat membentuk megaloskizon. Bentuk gametosit akan terbentuk dalam sel darah tepi 14 hari setelah infeksi pada eritrosit dan eritroblas. Apabila eritrosit pecah, maka parasit akan hidup di plasma darah. Proses pembentukan gametosit terjadi dalam eritrosit (Dejon and Muzzall, 2000).

Proses sporogoni terjadi pada tubuh serangga, sedang skizogoni dan gemetogoni terjadi pada tubuh unggas. Parasit stadium skizogoni eritrositik dapat melakukan invasi massif ke organ-organ viseral dan jaringan serta dapat menyebabkan efek patogenik pada organ/ jaringan tersebut (Levine, 1995). Megaloskizon dari *L. caulleryi* dibungkus oleh membran dan terdiri dari skizon-skizon dimana setiap skizon mengandung sejumlah merozoit granular. Apabila skizon pecah, maka akan keluar eritrosit, merozoit dan sel-sel radang, dengan infiltrasi histiosit, heterofil dan sel raksasa berinti banyak (Carlton, 1996).

Secara skematis siklus hidup tersebut dapat digambarkan sebagai berikut



Menurut Wahyuti (2003), kejadian Leucocytozoonosis tidak berhubungan dengan jumlah lalat *Culicoides* 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. Gametosit dan merozoit 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 paska inokulasi sporozoit dan ditemukan 3 skizon pada jaringan hati dan 1 skizon pada limpa. Adanya skizon tersebut memberi petunjuk kuat bahwa skizon merupakan sumber epizootik selama periode laten pada induk semang reservoir, sehingga penyakit bisa berjangkit kembali.

3.3 Diagnosa dan Pengendalian Leucocytozoonosis

Diagnosa penyakit didasarkan pada gejala klinik dan perubahan paska mati. Tetapi untuk kepastian diagnosa harus dilakukan pemeriksaan laboratorik dengan cara ulas darah dan preparat sentuh untuk menemukan parasit. Selain itu bisa dilakukan pemeriksaan histopatologik pada organ-organ yang mengalami perubahan untuk menemukan stadium skizon / megaloskizon dari parasit.

Pemeriksaan secara serologis bisa dilakukan dengan cara uji AGP (*agar gel precipitation*) atau ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) (Isobe, *et al.*, 1998), dan untuk mengetahui berat molekul dari antigen skizon *L. caulleryi* bisa dianalisa dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electroporesis* (SDS-PAGE) serta *western blot* 30–35 protein dengan 25 – 300 kDa bisa terdeteksi dengan cara ini (Isobe, *et al.*, 1998).

Ayam-ayam yang dapat bertahan terhadap infeksi pertama oleh *L. caulleryi* akan menunjukkan resistensi yang kuat terhadap infeksi berikutnya. Penelitian yang dilakukan dengan menggunakan Cyclosporin A (Cs-A) untuk mengetahui apakah imunitas seluler atau humoral yang mempunyai peran penting untuk melindungi ayam terhadap infeksi *L. caulleryi* tersebut, ternyata hasilnya adalah : setelah infeksi sekunder, ayam-ayam yang diberi Cs-A menampakkan adanya parasitemia, antigen terlarut serta antibodi spesifik terhadap *L. caulleryi*. Di samping itu juga terjadi penurunan jumlah CD4(+), CD8(+) dan reseptor sel T pada darah tepi, proliferasi limfosit, dan hambatan pembentukan faktor-faktor pertumbuhan sel T. Dengan demikian, hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa imunitas berperantara sel memegang peran penting pada perkembangan resistensi terhadap reinfeksi *L. caulleryi* pada ayam (Isobe, 2000).

Pada ayam-ayam yang telah diimunisasi dengan antigen sporozoit dari *L. caulleryi* atau telah sembuh dari penyakit tersebut, dapat dilakukan pengujian terhadap adanya antibodi spesifik dengan menggunakan reaksi presipitasi sirkum sporozoit (*circum sporozoite precipitation reaction* = CSP). Antibodi akan berada pada serum darah dari ayam-ayam tersebut dan apabila sporozoit matur diinkubasikan bersama-sama dengan serum tersebut, maka akan terjadi aglutinasi dan akhirnya terbentuk presipitat dari sporozoit. Efek dari infektifitas sporozoit pada serum imun spesifik bisa diuji dengan aktivitas netralisasi sporozoit (*sporozoite neutralization activity* = SNA test). Sporozoit yang diinkubasikan secara *in vitro* dengan serum dari ayam yang kebal akan kehilangan infektifitasnya. Reaksi CSP dan uji SNA bersifat spesies spesifik (Morii, *et al.*, 1999).

Obat-obat yang bisa dipakai adalah Pyrimethamin 1 ppm, Sulfonamide 50 ppm atau Clopidol 125 ppm. Akan tetapi obat-obat tersebut tidak efektif untuk stadium skizon akhir

dan gametosit (Akiba, 1975). Pemberian Sulfamonomethoxin 30-40 ppm pada makanan selama 29 hari dimulai dari saat sebelum terinfeksi oleh sporozoit, dapat mencegah penyakit tersebut (Nakamura, *et al.*, 1979). Menurut Takashi, *et al.*(1983), pemberian Sulfamonomethoxin 50 ppm secara terus-menerus selama terjadi wabah pada tahun 1981 – 1982, ternyata mampu melindungi hingga infeksi terberat.

Cara pengendalian terbaik dari penyakit ini adalah dengan menekan populasi vektor, baik secara mekanis maupun secara kimiawi dan membatasi kontak dengan vektor, misalnya dengan pemakaian kelambu atau penggunaan repelen.

Pengendalian juga dapat dilakukan dengan cara pemberian imunisasi pada ayam dengan menggunakan antigen skizon dari *L. caulleryi* yang ternyata mampu melindungi secara penuh terhadap infeksi ulangan dan memberi proteksi sebagian terhadap infeksi baru (Isobe, 1998). Menurut Onaga, *et al.* (1999), ekstrak skizon 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 skizon generasi kedua dapat mengenali protein-protein yang terlibat dalam proses imunitas.

Hampir semua ayam yang diimunisasi dengan antigen sporozoit dari *L. caulleryi* mampu bertahan terhadap tantangan sporozoit *L. caulleryi*. Derajat parasitemia dari ayam-ayam yang diimunisasi jauh lebih rendah dibanding pada ayam yang tidak diimunisasi. Antibodi spesifik akan tampak pada serum darah ayam yang diimunisasi tersebut atau pada ayam-ayam yang telah sembuh dari infeksi *Leucocytozoon* (Morii, *et al.*, 1999).

Isobe *et al.*, (1998) berpendapat bahwa ayam-ayam yang terinfeksi secara alam dengan *L. caulleryi*, apabila dapat bertahan hidup akan menunjukkan proteksi penuh terhadap infeksi ulangan sedang ayam yang diimunisasi dengan antigen skizon dari *L.*

caulleryi hanya menunjukkan proteksi sebagian. Berat molekul dari Ig G yang diperoleh dari serum kedua kelompok ayam tersebut juga berbeda, dimana ayam yang terinfeksi oleh *L. caulleryi* menunjukkan BM sebesar 33, 44, 58, 79, 94, 141 kDa sedangkan ayam yang diimunisasi oleh skizon *L. caulleri* menunjukkan BM protein sebesar 36, 58, 71, 81, 97, 112, 123 kDa.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Isolasi organ yang mengandung skizon dari ayam yang terinfeksi *Leucocytozoonosis*

Ayam yang terkena *Leucocytozoonosis* diperoleh dari peternakan ayam di Jawa Timur. Ayam-ayam yang menunjukkan gejala demam, kurus, pucat, diare berwarna hijau, muntah darah dan terdapat bintik-bintik merah pada bagian dada dan paha, diperiksa darahnya dengan pewarnaan Giemsa untuk menemukan stadium gamet, untuk kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan organ-organ viseral seperti paru, hati, limpa untuk mendapatkan skizon. Organ yang mengandung skizon disimpan dalam lemari es (suhu - 20⁰C) untuk pemeriksaan selanjutnya.

Sebanyak 100 gram jaringan yang mengandung skizon *Leucocytozoon* dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3-5 kali hingga bersih kemudian diinkubasikan dalam PBS sebanyak 10 ml pada cawan petri dengan suhu 37 ⁰C selama semalam. (Mufasirin, 1999)

4.2 Isolasi whole protein dari jaringan

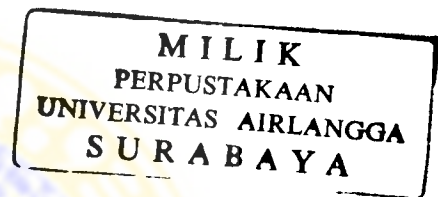
Ekstraksi protein dilakukan dengan teknik Sonikasi. Jaringan yang mengandung skizon tersebut dicuci PBS dengan cara disentrifugasi kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan PBS sebanyak 2X dengan cara yang sama. Pelet jaringan dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 30 Hz selama 30 detik istirahat 1 menit, diulang sebanyak 5 kali. Larutan hasil sonikasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan siap digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci

Protein skizon yang terdapat di dalam PBS diisolasi dengan penambahan amonium jenuh sama banyak dan dicampur serta diinkubasi dalam suhu 4 °C selama semalam kemudian dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan PBS 3-5 X sampai bersih dengan cara sentrifugasi dengan cara yang sama seperti di atas. Pelet yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 1-2 ml. Untuk mendapatkan protein didialisis semalam sehingga didapatkan protein yang bebas dari garam-garam lain. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 460.

4.3 Karakterisasi Protein

Elektroforesis 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, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam gelas beker. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 2:1 dilakukan perebusan pada 100 °C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers IX* dengan 100 volt, 40mA. Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam 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, gel diwarnai dengan AgNO₃ selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades 2X masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan



pengembangan warna yang terdiri dari formaldehid 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 gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker (Axeisen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

4.4 Imunisasi Protein pada Kelinci

Kelinci jantan dewasa sehat diinjeksi dengan protein dengan dosis 50-100 µg yang sebelumnya sudah ditambahkan adjuvant *complete* (Sigma) dengan perbandingan yang sama sehingga volume akhir sebanyak 500 µl. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada empat lokasi tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan adjuvant *incomplete* (Sigma) pada 2 minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang berikutnya menggunakan protein yang sama dengan adjuvant *incomplete* dengan cara yang sama sampai seterusnya hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum dilakukan booster untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

4.5 Penentuan Titer Antibodi Paska Imunisasi

Penentuan titer antibodi dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100 µl larutan protein membran dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam buffer karbonat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Plat mikro dicuci sebanyak 3X dengan buffer pencuci dan kemudian tiap sumuran

ditambahkan 200 µl blocking solution. Setelah diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 1-2 jam, dilakukan 3X pencucian. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100 µl serum mencit yang mengandung antibodi primer yang telah diencerkan (pengenceran berseri, dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam, serta diikuti dengan 3X pencucian. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100 µl konjugat antibodi sekunder (Santa Cruz, USA) dan diinkubasikan selama 1 jam, diikuti 3-4X pencucian. Sebanyak 150 µl substrat 4 nitrophenil (Sigma, USA) (dimasukkan dalam tiap sumuran, diinkubasikan pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl larutan asam oksalat 2%. Titer antibodi dibaca pada *ELISA reader* (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

4.6 Immunoblotting (Western blot)

Antigen skizon jaringan direaksikan dengan antibodi poliklonal dengan menggunakan metode *westren blott*. *SDS-PAGE* ditransfer ke membran niroselulose, selanjutnya membran dibloking dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit, dan pencucian diulang 3X. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal terhadap *Leucocytozoon* dalam PBS (1:50) dan diinkubasikan 1 jam pada suhu ruang dengan *shacker* dan dilakukan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit. Pencucian diulang 4X dengan cara yang sama. Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan konjugat (1:3.000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada suhu kamar dengan *shacker* dan diikuti dengan pencucian sebanyak 5X dengan 0,05% Tween dalam TBS dan sekali tanpa Tween. Membran diwarnai dengan substrat *Western nBlue Ready*. Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambahkan

aquades. Membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul yang imunogenik dilakukan dengan membandingkan pita protein yang tampak dengan standart marker yang diwarnai dengan Commasi Blue (Sambrook, *et al.*, 1989 yang sudah dimodifikasi).

4.7 Pemisahan Protein skizon

Setelah diketahui pita protein yang imunogenik, protein skizon yang didapat dari kultivasi skizon jaringan dilakukan pemisahan fraksi dengan kolom kromatografi dengan menggunakan matriks sephadex. Matrix Sephadex dibuat dengan melarutkan 1 gram dengan 20 ml aquades deionized. Campuran tersebut dibiarkan semalam dalam suhu ruang, dan setelah mengembang, Sephadex dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang bagian dasarnya sudah dilapisi dengan *glass wool* dan dibiarkan beberapa jam agar terjadi proses polimerisasi. Setelah terbentuk matrix yang kuat, larutan dalam kolom dikeluarkan dan diganti PBS dengan jumlah yang seimbang. Kecepatan alir per menit diukur dengan mengeluarkan PBS dari kolom. Sampel dimasukkan dalam kolom secara perlahan tanpa merusak matrix kolom. Ditambahkan PBS di atas sampel sebanyak 2 ml dan kolom dibiarkan beberapa saat dan sampel siap dilakukan pemisahan. Sampel ditampung dengan cara mengalirkan sesuai kecepatan alir yang dikehendaki pada beberapa tabung kolektor (Sudjadi, 1988). Untuk mengetahui kemurnian protein yang diharapkan dilakukan SDS-PAGE.

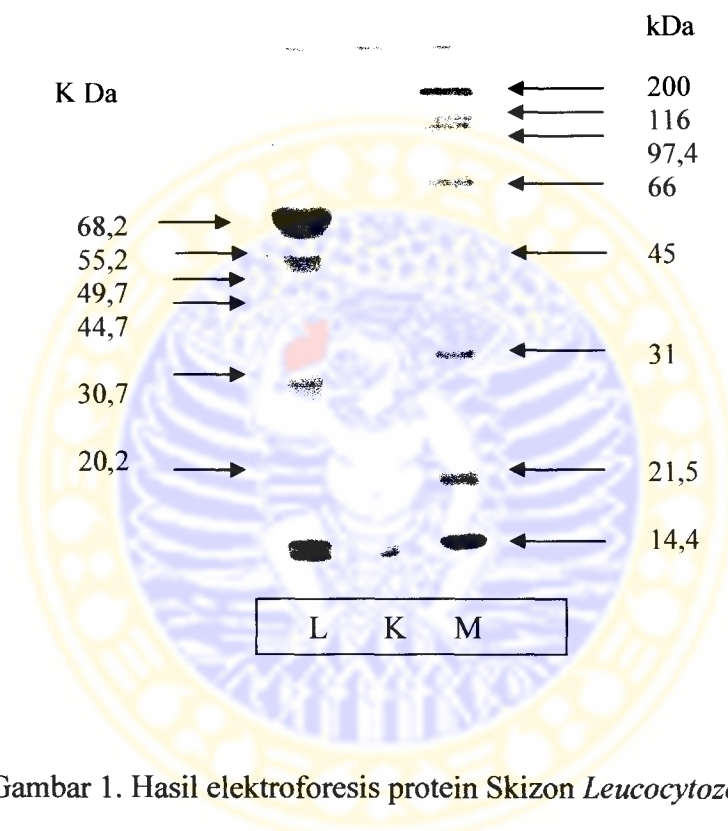
4.8 Produksi Antibodi Poliklonal dari whole protein dan protein skizon jaringan

Protein whole yang didapat dari skizon jaringan digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci. Antibodi poliklonal yang didapat digunakan untuk immunoblotting terhadap protein whole dan protein skizon yang imunogenik (Mufasirin, 1999)

Kelinci jantan dewasa sehat diinjeksi protein dengan dosis 50-100 μg yang sebelumnya sudah ditambahkan adjuvant complete (Sigma, USA) dengan perbandingan yang sama sehingga volume akhir sebanyak 1 ml. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada 4 lokasi tubuh yang jaringan di bawah kulitnya longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan adjuvant incomplete (Sigma, USA) pada 2 minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang berikutnya menggunakan protein yang sama dengan adjuvant incomplete dengan cara yang sama sampai seterusnya hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama, dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum dilakukan booster untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

BAB V**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil elektroforesis protein skizon *Leucocytozoon* dengan SDS-PAGE didapatkan enam fraksi protein yaitu : 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa, 44,7 kDa, 30,7 kDa, 20,2 kDa. Hasil selengkapnya bisa dilihat pada Gambar 1.



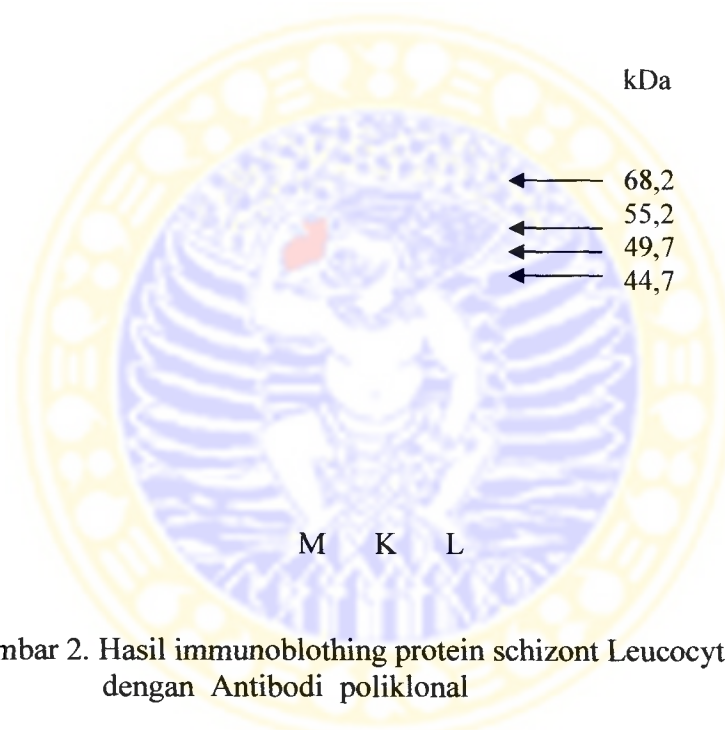
Gambar 1. Hasil elektroforesis protein Skizon *Leucocytozoon*

Keterangan : L : *Leucocytozoon*; K : Kontrol ; M : Marker

Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang diperoleh Isobe (1998) bahwa berat molekul skizon *Leucocytozoon caulleryi* yaitu : 36 kDa, 58 kDa, 71 kDa, 81 kDa, 97 kDa, 112 kDa dan 123 kDa. Bellanti (1993) mengatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolit, beberapa diantaranya adalah spesifik untuk stadium tertentu serta bersifat sementara dan yang lain tetap ada pada

seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik yang berbeda. Diantara keenam pita protein skizon, protein dengan BM 68,2 kDa merupakan major protein karena menunjukkan pita yang paling tebal.

Hasil immunoblotting protein skizon *Leucocytozoon* menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein tersebut yang diproduksi dari kelinci didapatkan 4 pita protein yang imunogenik yaitu 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa dan 44,7 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Hasil immunoblotting protein schizont *Leucocytozoon* dengan Antibodi poliklonal

Keterangan : M : Marker ; K : Kontrol ; L : *Leucocytozoon*

Diantara keempat pita protein yang imunogenik tersebut, protein dengan BM 55,2 kDa merupakan protein yang paling imunogenik.

Hasil immunisasi protein skizon pada kelinci menunjukkan reaksi antibodi seperti tampak pada tabel 1 berikut :

Tabel1. Hasil ELISA produksi antibodi poliklonal protein skizon *Leucocytozoon*

Pengenceran	1	2	3	4	5	6	7
1/5	0,878	1,147	1,356	1,356	1,591	2,113	2,131
1/10	0,465	0,470	0,572	0,549	0,772	1,117	1,290
1/20	0,232	0,276	0,328	0,294	0,582	0,655	0,555
1/40	0,153	0,193	0,212	0,194	0,273	0,432	0,405
1/80	0,124	0,139	0,131	0,116	0,167	0,225	0,262
1/160	0,101	0,113	0,096	0,116	0,148	0,166	0,193

(Keterangan : 1. kontrol; 2. post immunisasi I ; 3. post boster I ; 4. Post boster II ; 5. post boster III ; 6. Post boster IV ; 7. Post boster V)

Hasil produksi antibodi poliklonal protein skizon *Leucocytozoon* pada kelinci lokal menunjukkan kecenderungan meningkat yang cukup besar hal ini menunjukkan skizon *Leucocytozoon* mempunyai tingkat antigenisitas yang tinggi. Faktor yang mempengaruhi produksi antibodi adalah antigen yang diinjeksikan. Kompleksitas antigen berpengaruh terhadap respon imun yang dihasilkan khususnya berat molekul dengan susunan asam amino yang dikandung. Semakin kompleks dan besar berat molekul semakin tinggi respon imunologinya. Tizzard (1982) mengatakan bahwa faktor yang berpengaruh terhadap antigenisitas suatu bahan adalah keasingan, ukuran molekul, kerumitan struktur kimiawi dan konstitusi genetik.

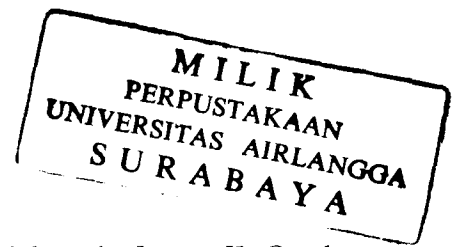
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil elektroforesis protein skizon *Leucocytozoon* dengan SDS-PAGE didapatkan enam fraksi protein yaitu : 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa, 44,7 kDa, 30,7 kDa, 20,2 kDa.
2. Hasil immunoblotting protein skizon *Leucocytozoon* didapatkan 4 pita protein yang imunogenik yaitu 68,2 kDa, 55,2 kDa , 49,7 kDa dan 44,7 kDa.
3. Antibodi poliklonal protein skizon *Leucocytozoon* dapat diproduksi pada kelinci.

5.2 Saran

1. Penelitian lebih lanjut tentang kemungkinannya protein skizon *Leucocytozoon* bisa dipakai sebagai vaksin
2. Perlu dilakukan uji sensitivitas dan spesifitas terhadap antibodi poliklonal spesifik tersebut



DAFTAR PUSTAKA

- Akiba, K., 1960. Studies on the *Leucocytozoon* found in the chicken, in Japan. II. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. Jap.J.Vet. Sci, 22 : 309 – 317.
- Axelsen, N.D., 1983 Handbook of Immunoprecipitation M-gel technique. Blackwell Scientific Publication. London.
- Bellanti, J.A., 1993. Immunologi III (terjemahan : A.S. Wahab). Gadjah Mada University Press. Jogjakarta
- Charlton, B.R., 1996. Blood borne parasites. In : AvianDisease Manual 4th ep. Pp. 162-165. American Associated of Avian Pathologists. University of Pemsylvania, New Bolton Center, PA.
- Dejon, R.J. and Muzzal, P.M., 2000. Haematozoa of waterfowl from Michigan. J. Wildl Dis. Oct ; 36 (4) : 767-773.
- Isobe, T., Shimizu, S., Yoshihara, S. and Suzuki, K., 1998. Immunoblot Analisis of humoral immune respons 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 bursectomi abolishe the protective immunity of chickens against *Leucocytozoon caulleryi*. Dev. Compl. Immuno. Jun;24(4) : 433-441.
- Kozo, F., Zhigo, K., Tsugihiko, K. and Haruhisa, T., 1982. Detection of schizonts in Chickens Covered from Experimental Infection with *Leucocytozoon caulleryi*. Nat. Inst Anim Hlth 3 (22) : 144-145.
- Levine, N.D., 1995. Protozoologi veteriner (terjemahan). Gadjah Mada University Press. Jogjakarta
- Morii T., Matsui, T., Kobayashi, F. and Tsuji, T., 1999. Immunogenicity of *Leucocytozoon caulleryi* sporozoites and their reactivity with specific immune sera. Parasitol. Res ; 82(5) : 454-458.
- Mufasirin, 1999. Kloning dan ekspresi cDNA yang menyandi protein membran *Toxoplasma gondii* isolat Bogor. Tesis. Pusat Antar Universitas UGM. Yogyakarta.
- Nakamura, K., Mitarai, Y., Tanimura, N., Hara, H., Ikeda, A., Shimada, J. and Isobe T., 1997. Pathogenesis of reduced egg production and soft shelled eggs in laying hens associated with *Leucocytozoon caulleryi* infection. J. Parasitol. 83 (2) : 325-327.

- 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 schizonts of *Leucocytozoon caulleryi*. *J. Vet Med Sci.* 58(7) : 677-679.
- Partoutomo da, S. dan Soetedjo, R., 1977. Adanya Leucocytozoonosis pada Ayam di Indonesia. Seminar pertama tentang ayam dan industri perunggasan 30-31 Mei 1977. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning : Laboratory Manual* 2nd. Cold Spring Harbour Press. New York.
- Soekardono, S., 1986. Leucocytozoonosis pada Ayam di Jawa dan Bali. Disertasi Doktor IPB. Bogor.
- Soulsby, E.J.L., 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal*. 7th Ed. The English and Protozoa of Society and Baillire, Tindall, London.
- Sudjadi, 1988. *Metode Pemisahan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tizzard, I.R., 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. 2nd Ed. W.B. Saunders Co Ontario. Canada.
- Wahyuti, R.N., 2004. Potensi lalat *Culicoides* terhadap prevalensi Leucocytozoonosis pada ayam. *Jurnal Biosains Pascasarjana* vol 6 no 1 ; 5-9
- Wasito, Salfina Nurdin dan Tarmudji, 1990. Leucocytozoonosis pada ayam buras di propinsi Kalimantan Selatan. *Penyakit Hewan* Vol XXII no 39 SMT I, Jakarta

Lampiran 1. Hasil ELISA produksi antibodi poliklonal protein skizon *Leucocytozoon*

Model 680 Microplate Reader S/N 13998
 Raw data report
 27/09/2005 15:54:13
 Lab. name: Bio-Rad Laboratories
 Kit name : End point #01
 Reading mode: Single
 Measurement Filter: 415nm(1)

	1	2	3	4	5	6
A	0.025	0.058	0.029	0.030	0.032	0.032
B	0.045	0.878	1.147	1.356	1.356	1.591
C	0.057	0.465	0.470	0.572	0.549	0.772
D	0.030	0.232	0.276	0.328	0.294	0.582
E	0.029	0.153	0.193	0.212	0.194	0.273
F	0.028	0.124	0.139	0.131	0.116	0.167
G	0.023	0.101	0.113	0.096	0.116	0.148
H	0.027	0.058	0.032	0.024	0.021	0.025
	7	8	9	10	11	12
A	0.041	0.052	0.027	0.031	0.037	0.045
B	2.113	2.131	1.452	1.450	0.927	0.031
C	1.117	1.090	0.585	0.946	0.921	0.042
D	0.655	0.755	0.320	0.524	0.572	0.027
E	0.432	0.35	0.200	0.300	0.354	0.027
F	0.225	0.262	0.150	0.224	0.252	0.031
G	0.166	0.193	0.126	0.164	0.193	0.040
H	0.028	0.037	0.030	0.024	0.048	0.038

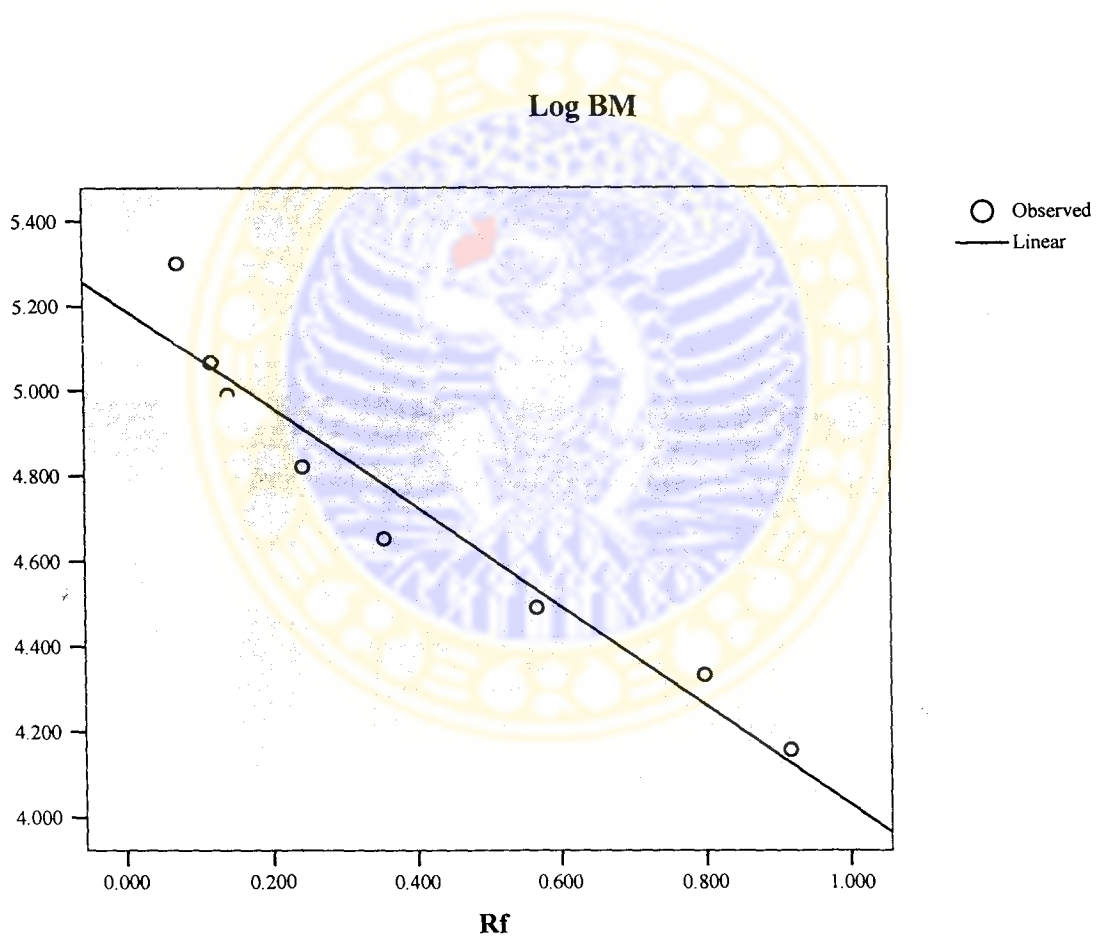
Lampiran 2. Grafik protein standar (marker) dan perhitungan berat molekul

Marker

jarak	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
13,0	0,073	200,0	200000	5,301
21,0	0,118	116,3	116300	5,066
25,0	0,140	97,4	97400	4,989
43,0	0,242	66,2	66200	4,821
63,0	0,354	45,0	45000	4,653
101,0	0,567	31,0	31000	4,491
142,0	0,798	21,5	21500	4,332
163,0	0,916	14,4	14400	4,158

Panjang Gel = 178 mm

Curve Fit



Linear

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,966	,933	,922	,109

The independent variable is Rf.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	,992	1	,992	83,942	,000
Residual	,071	6	,012		
Total	1,063	7			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-1,163	,127	-,966	-9,162	,000
(Constant)	5,193	,064		81,424	,000

Interpretasi Hasil

$b_0 = 5,193$; $b_1 = -1,163$; $r = -0,966$; persamaan grs regresi: $y = 5,193 - 1,163x$

	rf	$y = 5,193 - 1,163x$	antilog		
sampel	sampel	log y Da	y (BM) Da	BM kDa	
a	55,0	0,309	4,8336	68,71,053	68,2
b	69,0	0,388	4,7422	55,233,144	55,2
c	76,0	0,427	4,6964	49,704,031	49,7
d	83,0	0,466	4,6507	44,740,414	44,7
e	108,0	0,607	4,4874	30,718,199	30,7
f	136,0	0,764	4,3044	20,155,138	20,2

} ANTIGENIK

Prevalensi Leucocytozoon pada Ayam Buras di Surabaya

Oleh :

Vera Roma Uli Saragih
060213038

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

Dosen Pembimbing I



Drh. Nunuk Dyah Retno L., MS

130 687 546

Dosen Pembimbing II

Dr. Hario Puntodewo S., M.App.Sc., Drh

130 687 292

Prevalensi Leucocytozoon pada Ayam Buras di Surabaya

Vera Roma Uli Saragih

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi infeksi leucocytozoon pada ayam kampung yang dipotong di pasar tradisional di kota Surabaya, sehingga nantinya dapat dimanfaatkan sebagai informasi bagi penelitian yang lain.

Pada penelitian ini digunakan 100 sampel preparat ulas darah ayam kampung. Darah diambil dari ayam yang dipotong kemudian dibuat ulasan pada gelas objek. Setelah kering, kemudian difiksasi dengan methanol absolut selama 2-3 menit, kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa 10%. Untuk identifikasi leucocytozoon dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop perbesaran 1000x dengan minyak emersi.

Hasil penelitian menunjukkan kejadian infeksi leucocytozoon pada ayam kampung di pasar tradisional di kota Surabaya sebesar 37%

**PROFIL PROTEIN STADIUM SKIZON *Leucocytozoon caulleryi*
DENGAN TEKNIK SODIUM DODECYL SULPHATE POLY
ACRYLAMID GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE)**

Skripsi adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

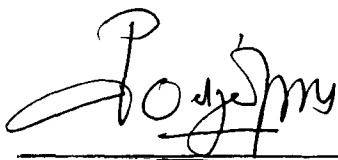
Oleh

NOVITA BUDIARTI RAHAYU

NIM 060213052

Menyetujui

Komisi Pembimbing



Poedji Hastutiek, M.Si, Drh

Pembimbing Pertama



Rochmah Kurnijasanti, M.Si, Drh

Pembimbing Kedua

PROFIL PROTEIN STADIUM SKIZON *Leucocytozoon caulleryi* DENGAN TEKNIK SODIUM DODECYL SULPHATE POLY ACRYLAMID GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE)

Novita Budiarti Rahayu

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein stadium skizon *Leucocytozoon caulleryi* berdasarkan berat molekul yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian tentang immunogenitas protein *L. caulleryi* sehingga dapat digunakan sebagai dasar pengembangan pembuatan vaksin dalam upaya pengendalian penyakit menular akibat dari *L. caulleryi*.

Pengambilan organ-organ dalam pada ayam terinfeksi kemudian diletakkan pada masing-masing tabung reaksi yang berbeda sebagai persiapan melakukan sonikasi. Sonikasi dilakukan dengan kecepatan 25.000 Hz. Supernatan diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda untuk diberi ethanol dengan perbandingan 1:1 dan disimpan di *freezer* dengan suhu -20°C selama 24 jam. Supernatan dibuang dan pellet dilarutkan dalam media PBS. Pellet protein didapatkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit dan dilakukan perhitungan konsentrasi dengan spektrofotometer. Protein dianalisis dengan menggunakan teknik SDS-PAGE untuk mendeteksi pita protein yang dinyatakan dalam berat molekul.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat enam pita protein pada *L. caulleryi* stadium skizon yaitu pada berat molekul (BM): 68.2 kDa, 55.2 kDa, 49.7 kDa, 44.7 kDa, 30.7 kDa dan 20.2 kDa.

Identifikasi Protein Antigenik Stadium Skizon *Leucocytozoon*

Oleh :

Margaret Wijayanti

060213070



Dosen Pembimbing I

Rimayanti MKes.drh

Dosen Pembimbing II

Nunuk Dyah R.L.,MS.drh

Identifikasi Protein Antigenik Stadium Skizon *Leucocytozoon*

Margaret Wijayanti

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan berat molekul protein skizon *Leucocytozoon sp.* yang bersifat antigenik. Metode yang digunakan adalah sonikasi, SDS-PAGE, dan Western blot. Hasil yang diperoleh dari SDS-PAGE adalah ditemukannya 6 pita protein skizon *Leucocytozoon sp.* dengan berat molekul 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa, 44,7 kDa, 30,7 kDa, dan 20,2 kDa. Protein dengan berat molekul 68,2 kDa, 55,2 kDa, 49,7 kDa, dan 44,7 kDa merupakan protein skizon yang bersifat antigenik.