

Profil Protein Stadium Sporozoit *Eimeria tenella* Isolat Yogyakarta Melalui Analisis Protein SDS-PAGE

(PROTEIN PROFILE OF THE SPOROZOITE OF *Eimeria tenella* ISOLATES
FROM YOGYAKARTA USING SDS-PAGE PROTEIN ANALYSIS)

Galuh Tresnani¹, Joko Prastowo², Wisnu Nurcahyo², Budi Setiadi Daryono³

¹Program Doktor Ilmu Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada;
Program Studi Biologi, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Mataram, Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Nusa Tenggara Barat
Telp (0370) 646506, email : galuh.tresnani@gmail.com

²Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada

⁴Lab Genetika, Fakultas Biologi, UGM Yogyakarta

ABSTRAK

Koksidiosis merupakan salah satu penyakit penting pada industri perunggasan. Di Indonesia morbiditas akibat penyakit ini pada ternak ayam dapat mencapai 80 hingga 90%. Diagnosis yang tepat dan cepat merupakan salah satu langkah utama dalam penanggulangan koksidiosis selain kegiatan vaksinasi. Penelitian mengenai protein sebagai bahan dasar vaksin koksidiosis di Indonesia masih belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat profil protein *E. tenella* pada stadium sporozoit yang diisolasi dari Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Dalam penelitian ini digunakan analisis protein *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk melihat profil protein stadium sporozoit dari *E. tenella*. Analisis protein dilakukan dalam gel 12% dan dielektroforesis pada tegangan 100 volt serta menggunakan pewarnaan *Coomasie Blue*. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa sporozoit *E. tenella* isolat Yogyakarta memiliki lima protein dengan bobot molekul berturut-turut 15, 26, 32, 80, dan 91 kDa.

ABSTRACT

Coccidiosis is one of the important diseases in poultry industry. In Indonesia the morbidity of the disease is between 80 to 90%. A rapid and prompt diagnosis would be one of the essential steps in eradication and control of the disease. The objective of this study is to determine the protein profile of sporozoite of *Eimeria tenella* isolated in Yogyakarta using sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) protein analysis. Protein analysis was performed in 12% polyacrilamide gel and further electrophoresis at 100 volts and over-staining with Coomasie brilliant blue. The results showed that the sporozoite of *E. tenella* isolated in Yogyakarta contained five proteins with molecular weights of 15, 26, 32, 80, and 91 kDa, respectively.

Keywords: protein profile, SDS-PAGE, *Eimeria tenella*

PENDAHULUAN

Eimeria tenella merupakan salah satu jenis protozoa yang menyebabkan koksidiosis atau penyakit berak darah pada ayam. Penyakit tersebut adalah salah satu penyakit penting dalam industri perunggasan. Setiap tahun di seluruh dunia, kerugian yang dialami oleh peternak ayam dapat mencapai 13 milyar dolar AS (Brothers *et al.*, 1988). Di Indonesia, morbiditas akibat koksidiosis dapat mencapai

80 hingga 90%. Kerugian yang diakibatkan oleh penyakit tersebut baik pada ayam pedaging maupun petelur juga beragam, antara lain penurunan bobot hidup, masa bertelur terlambat, penurunan produksi telur, dan penurunan efisiensi pakan (Iskandar, 2005).

Diagnosis yang tepat dan cepat merupakan salah satu langkah utama dalam penanggulangan koksidiosis. Saat ini metode diagnosis yang dilakukan berdasarkan pada pengamatan gejala klinik dan morfologi oosista

Eimeria yang ditemukan pada tinja ayam yang sakit. Metode ini membutuhkan waktu yang relatif lama dan keahlian khusus untuk mengidentifikasi jenis *Eimeria* serta hanya dapat dilakukan di laboratorium (Badran dan Lukasova, 2006; Morris and Gasser, 2006). Metode diagnosis koksidiosis yang lebih akurat dan cepat telah dikembangkan dengan menggunakan teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) maupun *Polymerase Chain Reaction* (PCR), namun metode ini membutuhkan peralatan yang cukup mahal, laboratorium khusus dan tenaga ahli (Su *et al.*, 2003).

Protein pada *E. tenella* telah banyak diteliti, baik pada stadium oosista maupun sporozoit, namun di Indonesia penelitian serupa masih belum banyak dilakukan. Sejumlah protein dengan ukuran bobot molekul yang bervariasi telah ditemukan. Penelitian oleh Wisner (1968) menemukan sebanyak 20 protein pada sporozoit *E. tenella* dengan bobot molekul antara 14–90 kDa. Soon *et al.*, (2006) menemukan tiga protein yang diduga bersifat imunogenik dengan bobot molekul 36 kDa, 60 kDa, dan 120 kDa. Protein-protein ini dapat dikembangkan untuk pembuatan vaksin koksidiosis maupun sebagai media diagnosa cepat koksidiosis secara serologi.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat profil protein pada stadium sporozoit dari *E. tenella* yang berada di Indonesia, khususnya di wilayah Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta. Profil protein diamati dengan menggunakan metode analisis protein SDS-PAGE. Protein yang ditemukan diharapkan dapat digunakan sebagai media vaksin maupun sebagai media cepat melacak koksidiosis secara serologi.

METODE PENELITIAN

Oosista.

Isolat parasit *E. tenella* diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Prosedur perbanyakkan isolat sesuai dengan prosedur yang dilakukan oleh Prastowo *et al.*, (1998). Sebanyak 30 ekor ayam pedaging diinfeksi dengan isolat *E. tenella* untuk perbanyakkan parasit. Pada hari ke sembilan ayam dikorbankan nyawanya dan sekumnya diambil. Parasit *E. tenella* diperoleh melalui kerokan sekum yang disaring dengan saringan bertingkat 100, 200, dan 325 *mesh*. Oosista *E. tenella* yang diperoleh kemudian disporulasikan dalam medium kalium bikromat

2,5% selama dua hari. Oosista yang telah bersporulasi dibersihkan dengan metode pengapungan menggunakan sodium hipoklorit 13,5% dan disentrifus pada kecepatan 1200 rpm selama lima menit. Proses pengapungan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan aquadest sebanyak tiga kali dan masing-masing disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Oosista yang telah bersih disimpan sebagai stok pada suhu 4°C (Gambar 1).

Sporozoit.

Isolasi sporozoit dilakukan sesuai dengan metode Tomley *et al.*, (1991); Tomley (1994); Tomley (1994a). Sporozoit *E. tenella* diperoleh dengan cara menghancurkan oosista menggunakan *glass beads* yang berdiameter 1 mm. Perlakuan tersebut akan menghasilkan suspensi sporosista yang akan dieksistasi untuk mengeluarkan sporozoit. Medium eksistasi terdiri dari campuran 2,5% sodium taurokolat dan 0,15% tripsin. Sporosista dieksistasi dalam penangas air bersuhu 41°C selama 3–4 jam. Sporozoit yang diperoleh kemudian dicuci dengan aquadest sebanyak tiga kali, masing-masing disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Sampel sporozoit dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan *deionizer exchange column* (DE)-52, kemudian sampel yang sudah bersih disimpan dalam PBS pH 7,6 pada suhu 4°C (Gambar 1).

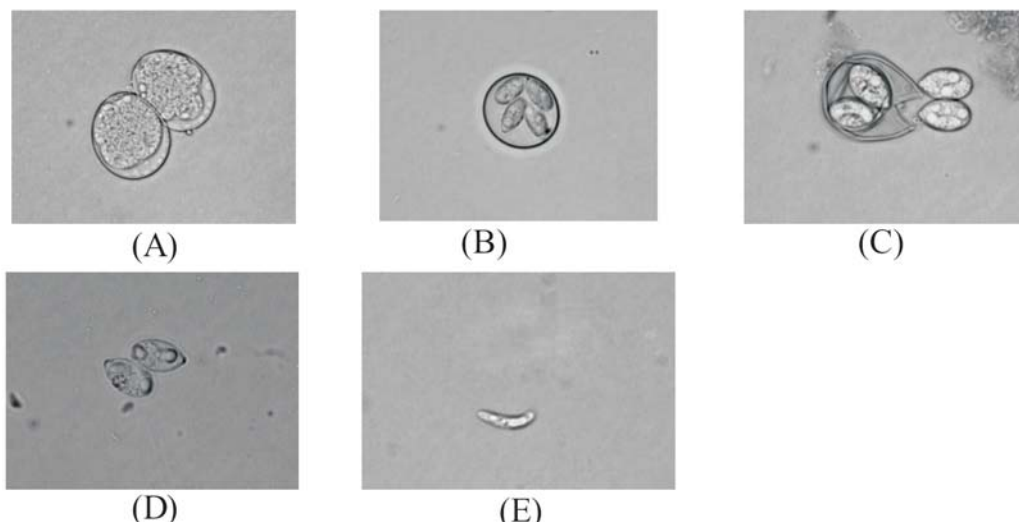
Analisis Protein.

Analisis protein dilakukan sesuai dengan prosedur dari Tomley *et al.* (1991) dengan sedikit modifikasi. Profil protein sporozoit *E. tenella* dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE pada gel 12% dan dielektroforesis pada tegangan 100 volt. Sampel sporozoit disonikasi pada amplitudo 173 Hz selama lima kali 30 detik. Suspensi protein yang diperoleh kemudian disiapkan untuk SDS-PAGE.

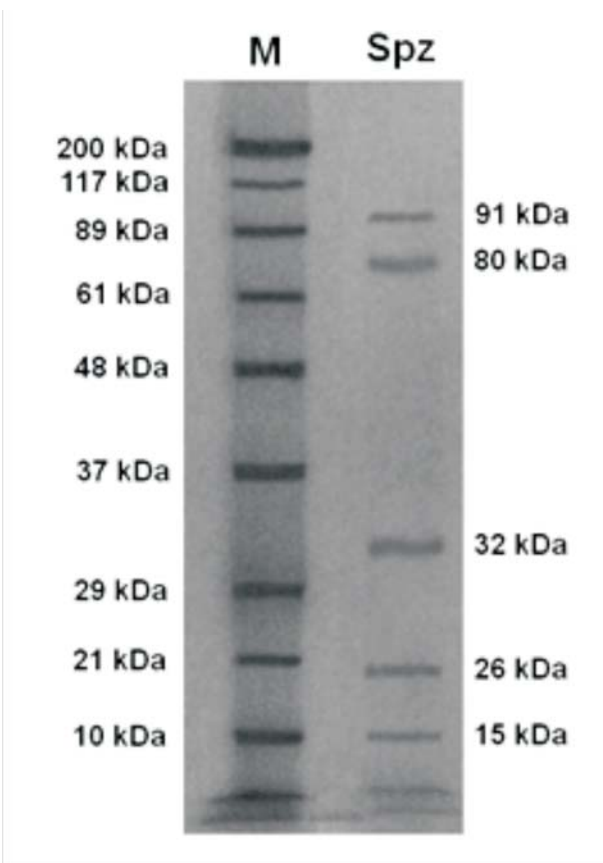
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis profil protein sporozoit *E. tenella* menunjukkan adanya lima pita protein. Gambaran profil protein sporozoit tersebut disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE pada sampel sporozoit *E. tenella* isolat Yogyakarta ditemukan lima macam protein dengan bobot molekul 15, 26, 32, 80, dan 91 kDa. Hasil penelitian ini memiliki sedikit kesesuaian



Gambar 1. Oosista yang belum bersporulasi (A); oosista yang sudah bersporulasi berisi 4 sporosista (B); oosista yang pecah dan membebaskan sporosista (C); sporosista yang berisi 2 sporozoit (D); sporozoit (E)



Gambar 2. Gel SDS-PAGE yang menunjukkan profil protein sporozoit isolat Yogyakarta. M = marker protein; Spz = sampel protein sporozoit.

dengan hasil penelitian dari Wisher (1968). Wisher (1968) menemukan sebanyak 20 protein pada sporozoit *E. tenella* dengan berat molekul yang bervariasi antara 14–90 kDa. Di antara kelima protein yang ditemukan dalam penelitian ini, dua protein memiliki bobot molekul yang sama dengan protein yang ditemukan oleh Wisher (1968), yaitu protein dengan berat molekul 26 dan 32 kDa.

Penelitian ini memiliki hasil yang sedikit berbeda dengan penelitian dari Soon *et al.*, (2006). Dalam penelitiannya, Soon *et al.*, (2006) menemukan protein sporozoit dengan bobot molekul 30, 60, dan 120 kDa dan protein-protein tersebut sudah diketahui bersifat imunogenik. Penelitian profil protein sporozoit *E. tenella* isolat Yogyakarta tidak menemukan protein dengan bobot molekul 30, 60, dan 120 kDa. Selain itu, pada penelitian ini belum dapat diketahui protein yang imunogenik dari kelima protein yang dijumpai.

Perbedaan hasil profil protein *E. tenella* dari isolat Yogyakarta dengan profil protein dari Wisher (1968) dan Soon *et al.*, (2006) dapat disebabkan karena berbagai macam hal, di antaranya perbedaan persentase gel SDS-PAGE yang digunakan, besar konsentrasi protein, kontaminan pada sampel protein, dan juga jenis isolat yang digunakan. Perbedaan isolat sampel dapat memengaruhi perbedaan hasil profil protein sebab dalam *E. tenella* terdapat variasi

genetik yang cukup luas. Variasi genetik tersebut dapat menyebabkan perbedaan beberapa protein dalam *E. tenella*.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa sporozoit *E. tenella* yang berasal dari isolat Yogyakarta memiliki lima macam protein. Protein-protein tersebut memiliki berat molekul antara 15–91 kDa.

SARAN

Mengingat pada *Eimeria* ditemukan variasi genetik yang cukup besar, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan sampel yang diambil dari beberapa daerah atau lokasi yang berbeda. Selain itu, perlu juga dilakukan analisis protein yang lebih spesifik seperti analisa untuk mencari protein antigenik dengan menggunakan Western Blot.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Bapak Supriadi MSi yang sangat membantu dalam proses koleksi sampel penelitian di lapangan. Ucapan yang sama juga kami tujukan kepada Bapak Suharto dari Lab Parasitologi FKH UGM yang dengan sepenuh hati membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Badran I, Lukesova D. 2006. Control of Coccidiosis and Different Coccidia of Chicken in Selected Technologies Used in Tropics and Subtropics. *Agricultura Tropica et Subtropica* 39 (1) : 39–43.

Brothers VM, I Kuhn, LS Paul, JD Gabe, WH Andrews, SR Sias, MT McCaman, EA Dragon, JG Files. 1988. Characterization of a Surface Antigen of *Eimeria tenella* Sporozoites and Synthesis from a Cloned cDNA in *Escherichia coli*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 28 : 235–248.

Iskandar T. 2005. Pengaruh Pemberian Vitamin A Terhadap Nilai Perlukaan Sekum, Waktu Sporulasi, dan Produksi Oosista *Eimeria tenella* Pada Ayam Arab. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.

Morris GM, Gasser RB. 2006. Biotechnological Advances in The Diagnosis of Avian Coccidiosis and The Analysis of The Genetic Variation in *Eimeria*. *Biotechnology Advances* 24 : 590–603.

Prastowo J, Artama WT, Sumartono. 1998. Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap Membran Protein Koksidia Isolat Yogyakarta. Tesis Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.

Soon, P E, Tomley FM, Sanusi M J, Wan KL. 2006. Pengenalpastian Protein Membran Putatif dalam Sporozit *Eimeria tenella* Melalui Penyaringan Imuno. *Sains Malaysia* : 23–28.

Tomley FM, LE Clarke, U Kawazoe, R Dijkema, JJ Kok, 1991. Sequence of The Gene Encoding an Immunodominant Microneme Protein of *Eimeria tenella*. *Molecular and Biomedical Parasitology* 49 : 277–288.

Tomley FM. 1994. Characterization of Rhoptry Proteins of *Eimeria tenella* Sporozoites : Antigenic Diversity of Rhoptry Epitopes Within Species of The Genus *Eimeria* and Among Three Asexual Generations of a Single Species *E. tenella*. *Infection and Immunity* : 4656–4658.

Tomley FM. 1994a. Antigenic Diversity of The Asexual Developmental Stages of *Eimeria tenella*. *Parasite Immunology* 16 : 407–413.

Wisher MH, 1968. Identification of the Sporozoite Antigens of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem Parasitol.* 21 : 7–15.

Su YC, Fei AC, Tsai F. 2003. Differential Diagnosis of Five Avian *Eimeria* Species by Polymerase Chain Reaction Using Primers Derived from The Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) Sequence. *Veterinary Parasitology* 117 : 221–227.