

# Identifikasi Antigen Ekskresi – Sekresi Sporozoit *Eimeria tenella* dengan Menggunakan Antibodi Monoklonal

(Identification of Excretory – Secretory Sporozoite Antigens of *Eimeria tenella* with Monoclonal Antibody)

Joko Prastowo<sup>1)</sup>, Wisnu Nurcahyo<sup>1)</sup>, Kurniasih<sup>2)</sup> dan R. Wasito<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

<sup>2</sup>Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

---

## Abstract

The research done specifically to identified the *Eimeria tenella* excretory-secretory sporozoite antigen by using the monoclonal antibody reaction instead. *Eimeria tenella* excretory-secretory sporozoite antigen. The  $10^7$  sporozoites were obtained from existation of  $5 \times 10^7$  oocysts with 25 ml tripsin and sodium taurocholat. Excretion - secretion antigen were prepared by freezing and thawing and then be isolated with ice bath 20 second, 20 meter of amplitude as the further treatment. Determinating the excretion - secretion sporozoite protein by using BCA-test. While the visualization sporozoite protein antigen by SDS-PAGE. Monoclonal antibody were produced through hybridization between B BALB/c limphosit immunized with *Eimeria tenella* excretion-secretion sporozoite antigen and myeloma cells. The monoclonal antibody identification of excretion – secretion antigen were done through western blott. The visualization of protein molecule weight of *Eimeria tenella* sporozoite were resulted 20 protein fraction, included 14, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 32, 34, 36, 39, 43, 47, 56, 65, 67, 76, 87, 94, and 96 KDa. There were 12 kinds of monoclonal antibody could be produced from these proteins. While the 5 hybridoma immunoblotting resulted specific reaction by the appearances of reaction ribbon obviously, there were MABset 1 which identified protein epitop with 14.7 KDa of molecule weight, MABset 2 which identified protein epitop with 43 KDa of molecule weight, MABset 3 which identified protein epitop with 42 KDa of molecule weight, MABset 4 which identified protein epitop with 47 KDa of molecule weight and MABset 5 which identified protein epitop with 90 KDa of molecule weight. As the conclusion, five of excretion-secretion sporozoite antigen were proper immunogen to stimulate the hospes immunity.

**Key Words:** Sporozoit, Antigen, *Eimeria tenella*, Coccidiosis

---

## Pendahuluan

Koksidiosis adalah penyakit yang menyerang saluran pencernaan ayam yang disebabkan oleh parasit koksidia genus *Eimeria* (Soulsby, 1986) dan merupakan penyakit merugikan dalam industri perunggasan (Wisher, 1986). Upaya pencegahan yang dilakukan selama ini adalah dengan memberikan obat-obatan anti koksidia dan meningkatkan kekebalan dengan vaksinasi. Vaksin yang telah dicoba di laboratorium adalah vaksin bentuk sporozoit (Saadi dan Al-Attar, 1993). Penggunaan sporozoit sebagai vaksin didasarkan pada siklus hidupnya bahwa sporozoit merupakan

stadium infeksi pertama yang masuk ke dalam sel induk semang dan merupakan stadium pertama yang kontak dengan respon imun hospes (Tress *et al.*, 1989). Sporozoit sendiri daya imunogenitasnya terletak pada protein yang terdapat pada protein bagian apikal tetapi antigen yang mampu menginduksi imunitas protektif bagi hospes belum dapat diidentifikasi. Identifikasi diperlukan kaitannya dengan kemampuan sporozoit yang telah diyakini mampu menginduksi imunitas bagi hospes, untuk menghasilkan kandidat vaksin dari sporozoit yang betul-betul melindungi ayam dari koksidiosis (Wisher, 1986). Karakteristik sporozoit yang merupakan filum Apikomplexa

adalah adanya struktur organela yang kompleks penghasil ekskretori dan sekretori yang mempunyai arti penting dalam menginfeksi sel hospesnya baik manusia maupun hewan dan juga bersifat imunogenik dan belum banyak diteliti (Gissela, 1999; Dubremetz *et al.*, 1998).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi antigen ekskretori – sekretori sporozoit *Eimeria tenella* menggunakan antibodi monoklonal anti antigen ekskretori – sekretori sporozoit *Eimeria tenella*. Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini dihasilkannya kandidat vaksin koksidirosis dari protein antigen ekskretori-sekretori sporozoit *Eimeria tenella* yang mampu menginduksi kekebalan ayam untuk mencegah kejadian koksidirosis.

## Metode Penelitian

### Parasit

Oosista *Eimeria tenella* dari lapang diperbanyak menurut metode Shirley (1996) dengan cara menginfeksi pada anak ayam ras Leghorn putih umur 3 minggu. Setiap ekor anak ayam diinfeksi dengan 3.000 oosista *Eimeria tenella* yang telah disporulasikan dengan kalium bikromat 2,5%. Hari ke-6 sampai dengan hari ke-9 setelah infeksi dilakukan pemanenan oosista melalui feses. Oosista tersebut kemudian dibersihkan dari material feses dengan cara penyaringan secara bertahap menggunakan saringan berukuran 40 mesh, 100 mesh, 200 mesh dan 325 mesh dengan pelarut air. Hasil penyaringan dibiarkan mengendap selama 12 – 24 jam. Setelah supernatan dibuang, endapan oosista kemudian disimpan dalam suhu 4°C. Oosista yang telah bersih dari tinja disporulasikan dengan menggunakan kalium bikromat 2,5% selama 3 hari.

Pengeluaran sporosista dari oosista menggunakan cara mekanik untuk memecah selubung oosista. Oosista sebanyak  $3 \times 10^7$

dalam 10 ml larutan HANK'S 41°C dan ditambahkan 30g *glassbeads* ukuran 0,5 mm lalu digojok yang kuat dengan tangan selama 30 detik. Suspensi sporosista diambil dengan hati-hati menggunakan pipet dan *glasbeads* dicuci tiga kali dengan 10 ml larutan HANK'S 41°C selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit dan dilakukan pemeriksaan mikroskopis. Sedimen yang berisi sporosista dicuci 3 kali dengan 50 ml larutan HANK'S 41°C.

Pelepasan sporozoit dari sporosista menggunakan 25 ml enzim tripsin dan sodium taurokholat kemudian diinkubasikan pada *waterbath* suhu 41°C selama 90 menit. Sporozoit dimurnikan dari enzim tripsin dan sodium taurokholat dengan cara disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 8 menit. Sedimen sporozoit yang diperoleh ditambahkan 50 ml larutan HANK'S 41°C.

Proses sterilisasi sporozoit digunakan metode anionkromatographi (Schmatz *et al.*, 1999). Proses dimulai dengan spuit ukuran 50 cc yang berisi kira-kira 1 cm *glasswool*, 6 cm Nylon dan 6 cm DE-52 selulose (dari bawah ke atas). Larutan DE-52 selulose diaktivasi terlebih dahulu selama 1 jam dalam larutan buffer yang ditambah glukosa 1%. Suspensi sporozoit kemudian disaring dengan cara meneteskan pada anionkromatographi dengan kecepatan 90 tetes per menit dan ditampung dalam 50 ml tabung sentrifus. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 8 menit dan disimpan dalam 20 ml medium RPMI 1640 dengan 2,5% FCS (*Fetal Calf Serum*).

### Preparasi Antigen Ekskretori – Sekretori Sporozoit *Eimeria tenella*

Protein dari sporozoit diperoleh dengan *freezing* dan *thawing* kemudian disonikasi. Sporozoit disuspensi dalam media PBS dibekukan dalam nitrogen cair dan dicairkan kembali pada *waterbath* suhu 41°C, pekerjaan ini diulang 3 kali. Suspensi tersebut kemudian

disonikasi dengan amplitudo 20 m selama 20 detik dalam *icebath*, dan disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan protein antigen dan disimpan pada suhu -20°C (Braun dan Shirley, 1995).

Penentuan kadar protein ekskresi - sekresi sporozoit sampel menggunakan *Bichinchronin Acid- test* (BCA) (Smith *et al.*, 1999). Identifikasi protein antigen sporozoit dilakukan dengan SDS-PAGE (Laemmli, 2000)

### **Produksi Antibodi Monoklonal terhadap Antigen Ekskretori dan Sekretori Sporozoit *Eimeria tenella***

Protein sporozoit sebanyak 5 µg dilarutkan dalam PBS pH 7,4, kemudian diemulsikan dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) perbandingan 1:1 hingga homogen. Emulsi disuntikan ke mencit BALB/c betina umur 8 minggu secara intraperitoneal. Imunisasi diulangi 14 hari kemudian dengan emulsi protein dalam *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA). Imunisasi diulang kembali setelah 14 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti pada imunisasi kedua. Serum mencit diambil pada hari ke 14 setelah vaksinasi terakhir untuk penentuan titer antibodi guna mengetahui respon imun dari mencit. *Booster* dilakukan 3 kali berturut-turut selama 3 hari sebelum dilakukan fusi, dengan injeksi 2 µg protein tanpa *adjuvant* secara intravena.

Penentuan titer antibodi dari serum mencit yang diimunisasi dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Sumber limfosit B diambil dari limpa mencit BALB/c yang menghasilkan titer antibodi tertinggi dieutanasi dan diambil limpanya secara aseptis. Limfosit dikeluarkan dengan cara menyemprotkan medium RPMI ke dalam limpa sampai warnanya transparan dan ditampung dalam tabung sentrifus, didiamkan selama 5 menit. Supernatan

disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, endapan ditambah dengan larutan amonium kloride dan diinkubasikan pada suhu 4°C selama 5 menit. Suspensi tersebut disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, sel limfosit B dihitung dan dicuci 2 kali dengan medium tanpa serum.

Sel mieloma (X.63-Ag 8.653) ditumbuhkan sampai mencapai pertumbuhan yang eksponensial pada *flask* yang berisi medium RPMI dan 10% FCS. Sel-sel dipanen, lalu disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang diperoleh dicuci 2 kali dan dihitung jumlah keseluruhan sel mieloma.

Sel limpa dan sel mieloma dicampur menjadi satu dalam tabung sentrifus dengan perbandingan 1 : 8, dengan 1 ml *Polyethylene Glikol* (PEG) diperoleh sel hibridoma. Pertumbuhan sel hibridoma membutuhkan sel feeder. Untuk menyeleksi biakan sel hibrid yang memproduksi antibodi dilakukan dengan ELISA.

Koloni sel hibrid yang menghasilkan antibodi selanjutnya diklon. Kloning dilakukan pada plat mikro 96 sumuran. Plat mikro dibagi 2 bagian, 48 sumuran bagian pertama diisi dengan 200 µl pengenceran rendah, 48 sumuran bagian kedua diisi dengan 200 µl sel berikutnya. Rekloning dilakukan sampai diperoleh klon yang berasal dari satu sel hibrid dalam 1 sumuran. Selanjutnya dari sel hibrid yang tumbuh dilakukan uji ELISA untuk mengetahui produksi antibodi.

Klon yang menghasilkan antibodi ditumbuhkan pada medium RPMI dan 20% FCS dalam *flask*. Propagasi hibridoma secara *in vivo* dilakukan pada mencit BALB/c. Identifikasi antigen ekskresi - sekresi sporozoit *E. tenella* menggunakan antibodi monoklonal terhadap antigen ekskresi - sekresi sporozoit *E. tenella* dengan metode *Western blott* (Towbin *et al.*, 1979).

## Hasil dan Pembahasan

### Konsentrasi Antigen Ekskretori – Sekretori Sporozoit *Eimeria Tenella*

Hasil analisis konsentrasi antigen ekskresi – sekresi sporozoit *Eimeria tenella* dengan perbedaan pengenceran (1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000) menunjukkan kadar protein 1,42 mg/ml. Protein tersebut dapat digunakan untuk memproduksi antibodi monoklonal dan untuk karakterisasi antigen ekskresi – sekresi sporozoit.

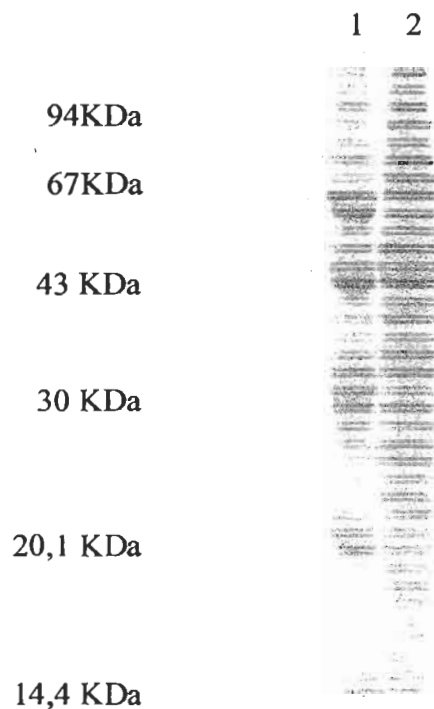
### SDS – Polyacrylamidgel – Elektrophorese

Protein antigen dapat dipisahkan dan diidentifikasi dengan elektroforesis gel akrilamid 10%. Pemisahan protein bisa berdasarkan ukuran, kelarutan, berat molekul dan afinitas ikatan (Styrer, 1998).

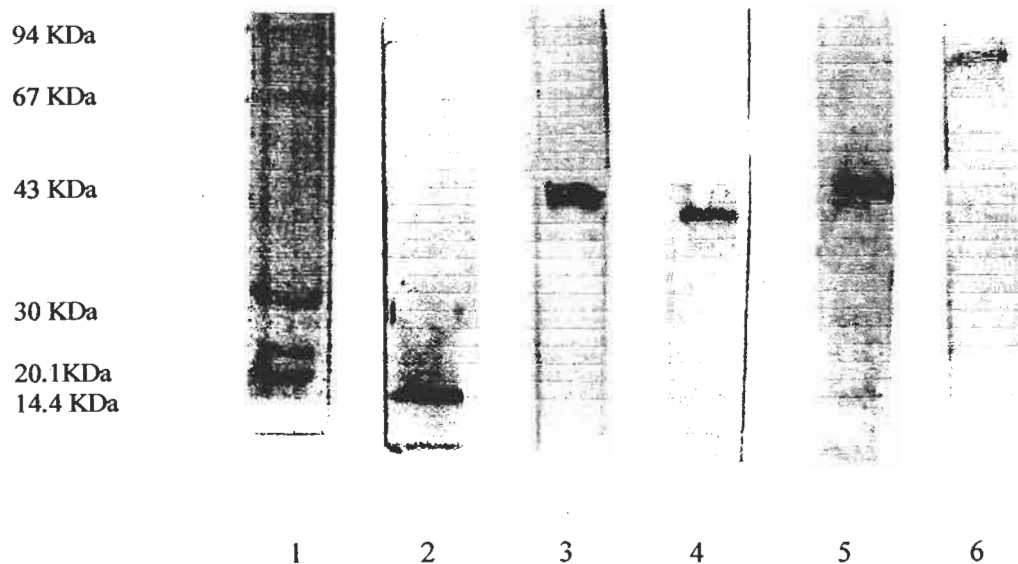
Hasil elektroforesis protein ekskresi – sekresi sporozoit *E. tenella* menggunakan

SDS - PAGE dapat dilihat pada Gambar 1. Analisa SDS – PAGE dari sporozoit *E. tenella* menunjukkan berat molekul antara 14 dan 100 KDa.

Berdasarkan hasil identifikasi berat molekul protein ekresi – sekresi sporozoit *Eimeria tenella* diperoleh sebanyak 20 protein dengan berat molekul 14, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 32, 34, 36 39, 43, 47, 56, 65, 67, 76, 87, 94 dan 96 KDa. Berat molekul 17, 20, 24, 26, 32, 34, 36, 39, 43, 47, 67, 87 KDa sesuai dengan penelitian Wisner (1986). Imunogen yang efektif menimbulkan respon imun harus mempunyai berat molekul lebih dari 10 KDa. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa protein ekskretori – sekretori sporozoit dari *Eimeria tenella* merupakan antigen yang baik sehingga dapat menimbulkan respon imun pada hospes.



Gambar 1. Elektroforesis dari antigen ekskresi – sekresi sporozoit *E. tenella*.  
Konsentrasi loding 20 µg. Gel agarus 10%.  
Lubang 1 : Protein –Marker, 2 : Protein ekresi –sekresi sporozoit *E. tenella*.



Gambar 2. *Imunoblotting* antigen ekskresi-sekresi sporozoit *E. tenella* menggunakan antibodi monoklonal, 1 = standar, 2 = MABset 1, 3 = MABset 2, 4 = MABset 3, 5 = MABset 4 dan 6 = MABset 5

### Anti Bodi Monoklonal

Dengan menggunakan antigen ekskresi - sekresi sporozoit *Eimeria tenella* dihasilkan 12 macam antibodi monoklonal yaitu MABset 1 sampai MABset 12. Hasil imunoblotting dengan menggunakan keduabelas hibridoma, 5 hibridoma menunjukkan reaksi yang menciri ditunjukkan dengan terlihatnya pita reaksi yang jelas yaitu MABset 1 mengenal epitop protein dengan berat molekul 14.7 KDa, MABset 2 mengenal epitop protein dengan berat molekul 43 KDa, MABset 3 mengenal epitop protein dengan berat molekul 42 KDa, MABset 4 mengenal epitop protein dengan berat molekul 47 KDa dan MABset 5 mengenal epitop protein dengan berat molekul 90 KDa, dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi monoklonal yang dihasilkan mengenali antigen yang diimunisasikan, sehingga antigen tersebut merupakan imunogen yang baik untuk menimbulkan imunitas pada hospes.

### Kesimpulan

Antigen ekskresi - sekresi sporozoit *Eimeria tenella* yang diidentifikasi menggunakan anti bodi monoklonal terhadap antigen ekskresi - sekresi sporozoit *Eimeria tenella* adalah MABset 1 mengenal epitop protein dengan berat molekul 14.7 KDa, MABset 2 mengenal epitop protein dengan berat molekul 43 KDa, MABset 3 mengenal epitop protein dengan berat molekul 42 KDa, MABset 4 mengenal epitop protein dengan berat molekul 47 KDa dan MABset 5 mengenal epitop protein dengan berat molekul 90 KDa. Lima antigen ekskresi - sekresi sporozoit tersebut merupakan imunogen yang baik untuk menimbulkan imunitas pada hospes.

Hasil penelitian ini perlu ditindaklanjuti pada uji coba lapangan sebagai kandidat vaksin koksidiosis pada ayam.

## Daftar Pustaka

- Braun, R and W.M. Shirley, 1995. Special Techniques of molecular Biology. In: Biotechnology Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research. Brussels – Luxembourg. Pp.147.
- Dubremetz, J.F., N. Garcia-Requet and M.N. Fourmax, 1998. Apical organelles and host cell invasion by apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28: 1007 – 1013.
- Gissela, G. 1999. Infection with *Eimeria tenella* : Modulation of lymphocyte blastogenesis by specific antigen and evidence for immunodepression. *J. Protozool.* 31: 549 – 553.
- Laemmli, U.K. 2000. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 684
- Saadi, L. and M.A. Al-Attar. 1993. Immunisation of Chickens Against *Eimeria tenella* by Intramuscular Injection of Live Sporozoit. Proceeding : VI<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference (Jun, 1993). Canada. Pp.166.
- Schmatz, DM., M.S. Crane and P.K. Murray, 1999. Purification of *Eimeria tenella* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. *J. Protozool.* 31: 181 – 183.
- Shirley, M.W., 1996. Biological Principle of Lives, Attenuated Vaccines. *Eimeria* Species and Strains of Chickens. In: Eckert, J, Braun, R., *Magyar Allatorvasak lapja.* 51: 23 – 29.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gustner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, and D.L. Klenk, 1999. Measurement of protein using bichinchronic acid. *Anal Biochem*, 150: 76 – 85.
- Soulsby, E.J.L. 1986. Helminths Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7<sup>th</sup> ed. Baillere Tindall, London. 507-645
- Styrer, L. 1998. Biochemistry. 4<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company, New York. 46 – 48, 275 – 282.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350 – 4354
- Tress, A.J., M.J. Karim, B. McKellar and S.D. Carter, 1989. *Eimeria tenella* : Local antibodies and interaction with the sporozoit surface, *J. Protozool.* 36: 326 - 333
- Wisher, M.H., 1986. Identification of the sporozoite antigens of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 7 – 15.