

**STUDI RESPON IMUN PADA AYAM YANG DIIMUNISASI DENGAN ANTIGEN EKSKRESI SEKRESI SPOROZOIT *Eimeria tenella***

**STUDY OF IMMUNE RESPONSES TOWARDS IMMUNISATIONS OF EXCRETORY SECRETORY *Eimeria tenella* SPOROZOITS ANTIGEN IN THE CHICKENS**

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

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

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

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imun terhadap antigen ekskresi sekresi sporozoit *Eimeria tenella* pada ayam. Sebanyak 40 ayam broiler jenis lohman umur 4 hari dikelompokkan menjadi 4 kelompok masing-masing 10 ekor ayam. Kelompok I diimunisasi dengan Immucox dengan kadar  $10^5$  oosista berspora tiap ayam yang dicampur dengan air minum. Kelompok II diimunisasi dengan antigen ekskretori sekretori sporozoit yang diemulsikan dengan Compleat Freund's Adjuvant (CFA) dengan perbandingan 1:1 dengan dosis 100 g perekor secara subkutan. Kelompok III diimunisasi antigen ekskretori sekretori sporozoit yang dilarutkan dengan PBS dosis 100 g tiap ekor secara subkutan, dan kelompok IV sebagai kontrol. Infeksi tantang pada semua kelompok dengan menggunakan 2000 oosista dilakukan pada 10 hari setelah imunisasi. Serum dari masing-masing ayam untuk uji ELISA diambil pada hari ke 14 setelah imunisasi, dilanjutkan sehari kemudian dengan penilaian derajat lesi sekum pada 4 ekor ayam pada masing-masing kelompok. Enam ekor sisanya dihitung jumlah eliminasi oosista dalam feses hingga hari ke 9 setelah infeksi tantang. Pengujian ELISA dilakukan kembali pada hari ke 14 setelah infeksi tantang. Hasil *rank test* terhadap derajat lesi sekum menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada semua kelompok. Rerata eliminasi oosista menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok setiap periode. Hasil pengujian serologis dengan ELISA menggambarkan bahwa penggunaan antigen ekskretori sekretori sporozoit yang diemulsikan dengan ajuvan lebih tinggi titer antibodinya jika dibanding dengan kelompok yang divaksin menggunakan vaksin komersial dan antigen ekskretori sekretori sporozoit yang diemulsikan dengan larutan PBS.

**Kata kunci:** imunisasi, antigen, sporozoit, *Eimeria tenella*, respon imun

**ABSTRACT**

This research done to know the immune responses towards *Eimeria tenella* excretory secretory sporozoites. The research used fourteen of 4 days old lohman broiler chickens that divided into four groups, each group consists of ten chickens. While the group I were immunized with immucox that had  $10^5$  of oocyst mixed to aquadest, the group 2 were immunized with excretory secretory sporozoit antigen that been emulsated with Complete Freund's Adjuvant (CFA) with 1 : 1 in substances comparison and had 100 g per chickens subcutane in dosage. The third group were immunized with excretory secretory sporozoit antigen that had been soluted in to PBS and have 100 g per chicken subcutan in dosage, and the fourth group as a control. We also done the challenge infection to all group of chickens by using 2000 of oocyst and had been done within 10 days after immunization. The serum from each chickens were taken for ELISA examination and it took at fourth day after doing challenge infection, after that we continued by marking the coecum lesion degree on 4 chickens from each groups a day after. While the other six chickens were also marked about the oocyst elimination in their feces till the ninth day after infection. At last the ELISA examination were done again at eighteenth days after the challenge infection. The test rank result toward coecum lesion degree shown us that there was no significant differences among the group. The mean of oocyst eliminated shown us that there was a significant differences in every period among the group. The results of ELISA examination described us that the used of excretory secretory sporozoit antigen emulsated with adjuvant had more higher antibody titer than the group that been vaccinated with excretory secretory sporozoit antigen emulsated with PBS and commercial vaccine.

**Keyword :** immunization, antigen, sporozoite, *Eimeria tenella*, immune respon

**PENDAHULUAN**

Koksidiosis bentuk sekal yang disebabkan oleh *Eimeria tenella* (*E. tenella*) ditandai dengan mortalitas, morbiditas yang tinggi dan pertumbuhan terhambat pada ayam. Penyakit ini berdasarkan laporan penelitian ditemukan pada setiap periode pemeliharaan ayam di Indonesia dan sangat merugikan peternak secara ekonomi. Kontrol koksidiosis bentuk sekal oleh *E. tenella* pada ayam dilakukan dengan memberikan koksidiostat, tetapi efek negatif dari obat ini menyebabkan reistensi pada parasit, hal ini menyebabkan terjadinya sulitnya dan pemborosan uang untuk pengembangan penemuan obat yang baru. Oleh karena itu sangat diperlukan suatu penelitian yang bertujuan untuk mencegah terjadinya koksidiosis dengan metode imunologi, bioteknologi dan rekayasa genetik. Pencegahan koksidiosis dengan pendekatan imunologis sangatlah penting (Chapman, 1988). Jenis antigen dari *E. tenella* yang bisa digunakan untuk kandidat vaksin adalah oosista yang bersporulasi, sporosista, sporozoit dan merozoit (Wisher, 1986; Sutton *et al.*, 1989; Karkhanis *et al.*, 1991; Rhalem *et al.*, 1993). Dari latar belakang diatas sporozoit dari *E. tenella* merupakan kandidat yang potensial digunakan untuk antigen vaksin karena sporozoit adalah stadium pertama yang kontak dengan sel epitel/imun sistem dari hospes. Untuk itu pencegahan koksidiosis perlu dilakukan yang bertujuan mengimunisasi ayam dengan antigen ekskretori sekretori sporozoit *E. tenella* dan memonitor produksi antibodi dan respon imun seluler terhadap antigen sporozoit.

**MATERI DAN METODE**

**Pemeliharaan ayam**

Ayam broiler jenis lohman dan jenis kelamin tidak dibedakan dipelihara pada lingkungan yang bebas koksidia, koksidiostat dan makan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

**Parasit**

Isolat lapangan *E. tenella* diperbanyak di laboratorium parasitologi FKH UGM. Infeksi sekum diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis untuk mengidentifikasi spesies koksidia. Perbanyak oosista *E. tenella* dilakukan pada 25 ayam broiler jenis lohman umur 3 minggu dengan jumlah infeksi oosista bersporulasi 5000 dan feses dikumpulkan dari hari ke 5 sampai 9 pasca infeksi (Prastowo dkk, 1998). Oosista *E. tenella* di purifikasi dengan cara teknik pengambangan menggunakan garam dan sterilisasi oosista menggunakan Sodium hipoklorit 13%. Pemecahan sporosista dari oosista yang bersporulasi menggunakan *glass beads* ukuran 2121-300 m. Eksitasi sporozoit dari sporosista menggunakan larutan tripsin 0,4% dalam larutan empedu sapi 20 ml (Sunandjak dan Prastowo, 2004).

**Preparasi antigen sporozoit**

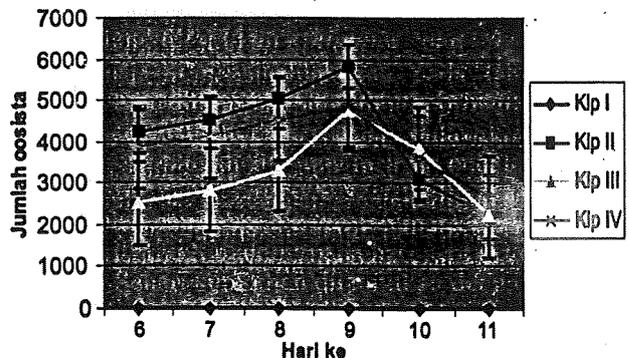
Preparasi antigen sporozoit dengan cara sporozoit  $10^7$  dicuci tiga kali dengan larutan PBS kemudian dilakukan *thawing* dan *freezing* lalu disonikasi. Sonikasi dilakukan pada tabung reaksi dengan suhu dingin sampai semua sporozoit hancur dan dipastikan dengan pemeriksaan mikroskop. Material sonikasi kemudian di sentrifuse 10.000 g selama 30 menit suhu 4 °C dan supernatan digunakan sebagai antigen yang digunakan untuk penelitian. Konsentrasi antigen protein dihitung dengan metode Lowry *et al* (1999).

**Imunisasi dan Infeksi buatan pada ayam**

Ayam broiler jenis lohman sebanyak 40 ekor umur sehari dikelompokkan menjadi 4 kelompok sebagai berikut: Kelompok I diimunisasi dengan Immucox dengan kadar  $10^5$  oosista berspora tiap ayam yang dicampur dengan air minum. Kelompok II diimunisasi dengan antigen sporozoit yang diemulsikan dengan CFA dengan perbandingan 1:1 dengan dosis 100 g perekor secara subkutan. Kelompok III diimunisasi antigen sporozoit yang dilarutkan dengan PBS dosis 100 g tiap ekor secara subkutan, dan kelompok IV sebagai kontrol. Infeksi tantang pada semua kelompok dengan menggunakan 2000 oosista dilakukan pada 10 hari setelah imunisasi. Serum dari masing-masing ayam untuk uji ELISA diambil pada hari ke 4 setelah infeksi tantang. Sehari kemudian dilanjutkan dengan penilaian derajat lesi sekum pada 4 ekor pada masing-masing kelompok dengan metode Johnson and Reid (1970). Enam ekor sisanya dihitung jumlah eliminasi oosista dalam feses hingga hari ke 9 setelah infeksi tantang dengan metode McMaster. Pengujian ELISA dilakukan kembali pada hari ke 14 setelah infeksi tantang.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

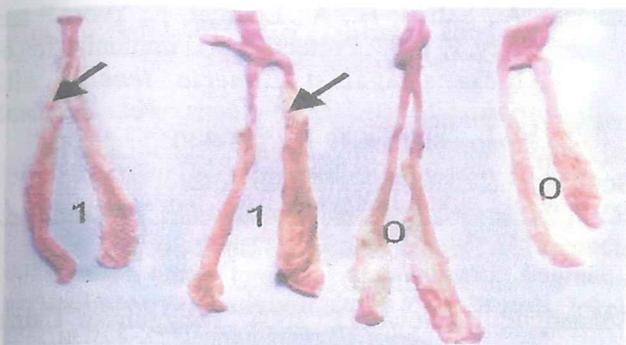
Rata-rata jumlah eleminasi oosista yang diperiksa mulai hari ke-6 hingga hari ke- 11 per gram tinja pada ayam perlakuan semua terlihat pada gambar 1.



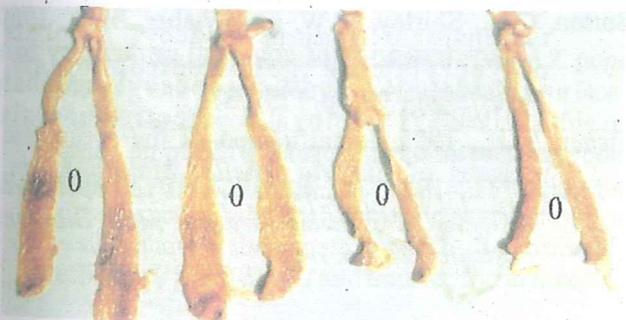
Gambar 1. Grafik rata - rata jumlah eliminasi oosista per gram tinja ayam percobaan mulai hari ke 6 sampai hari ke 11

Pada gambar 1 terlihat bahwa mulai hari ke 7 setelah infeksi tantangan jumlah eliminasi oosista meningkat sampai pada hari ke 9, setelah itu eliminasi oosista mengalami penurunan sampai dengan hari ke 11. Hasil analisa statistik dengan metode *spli-plot* terhadap jumlah oosista pergram tinja yang dieliminasi menunjukkan perbedaan yang signifikan pada perlakuan dan periode ( $P < 0,01$ ). Sehingga pemberian vaksinasi sporozoit mampu menimbulkan efek imunitas yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang divaksin dengan vaksin komersial (*immucox*).

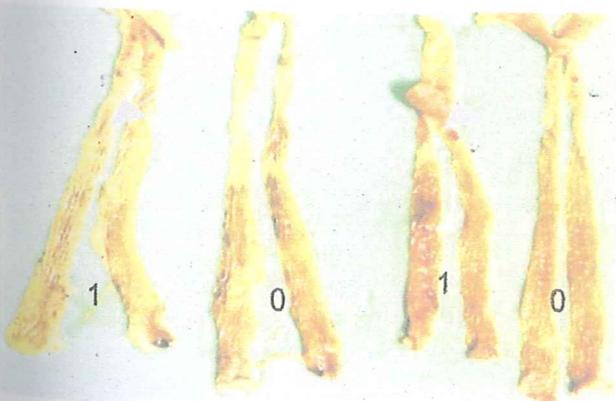
Berdasarkan hasil penilaian derajat lesi sekum ayam perlakuan yang dinekropsi pada hari ke 5 setelah infeksi tantangan dapat dilihat pada gambar 2, 3, 4 dan 5.



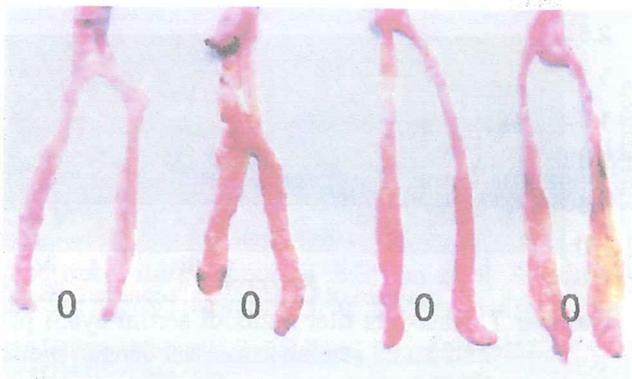
Gambar 2. sekum ayam kelompok 1 di immunisasi dengan immucox dan infeksi tantang pada hari ke-10 setelah immunisasi



Gambar 3. Sekum ayam kelompok II, diimmunisasi dengan antigen sporozoit yang diemulsikan dengan CFA



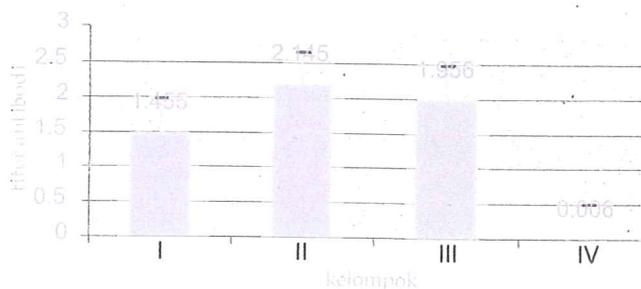
Gambar 4. Sekum kelompok III diimmunisasi dengan antigen sporozoit yang diemulsikan dalam PBS



Gambar 5. sekum ayam kelompok kontrol

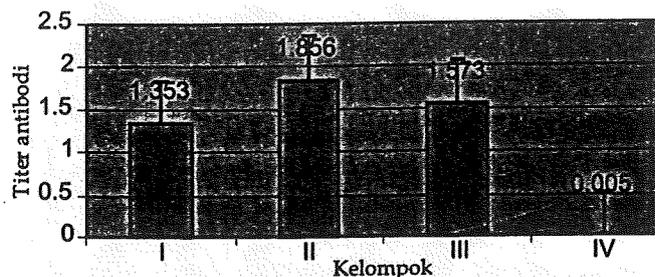
Hasil rank test terhadap lesi sekum tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Namun penilaian secara diskriptif terhadap lesi sekum pada kelompok I terdapat nilai +1 tiga ayam dari empat ayam dan begitu juga pada kelompok III. Sedang pada kelompok II tidak ditemukan adanya lesi. Penilaian derajat lesi sekum dilakukan pada hari ke-5 setelah infeksi dikarenakan pada saat itu baru berkembang skizon generasi ke II yang merupakan stadium yang paling patogen (Soulsby, 1982). Faktor yang mempengaruhi berat ringannya derajat lesi sekum antara lain spesies koksidia, umur hospes, jumlah sel hospes yang rusak. Sehingga pemberian vaksinasi akan menimbulkan efek imunitas yang lebih baik dibandingkan kelompok yang tidak divaksin.

Hasil dari titer antibodi serum ayam perlakuan yang diimmunisasi dengan immucox dan antigen ekskretori sekretori sporozoit *E. tenella* menggunakan metode ELISA dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Rata-rata titer antibodi serum ayam pada hari ke-14 setelah immunisasi dengan metode ELISA

Dari gambar 6 dan 7 terlihat bahwa immunisasi dengan antigen ekskretori sekretori sporozoit yang diemulsikan dengan CFA menyebabkan timbulnya titer antibodi yang lebih tinggi dari pada kelompok ayam yang diimmunisasi dengan immucox dan antigen ekskretori sekretori sporozoit dengan menggunakan larutan PBS baik pada hari ke-14 maupun 28 hari setelah vaksinasi.



Gambar 7. Rata-rata titer antibodi serum ayam pada hari ke-28 setelah imunisasi dengan metode ELISA

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat diambil kesimpulan adanya perbedaan yang bermakna jumlah eliminasi oosista antara kelompok ayam yang divaksin menggunakan antigen ekskretori sekretori sporozoit *E. tenella* dengan kelompok yang divaksin dengan vaksin komersial (Immucox). Derajat lesi sekum tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada perbandingan antar kelompok. Hasil imunisasi dengan antigen ekskretori sekretori sporozoit yang diemulsikan dengan CFA titer antibodinya lebih tinggi jika dibanding dengan yang menggunakan vaksin komersial (Immucox) dan yang menggunakan antigen sporozoit yang diemulsikan dengan larutan PBS.

### DAFTAR PUSTAKA

Chapman, H.D., 1988. Strategies for the control of coccidiosis in chickens. Proc. 5<sup>th</sup> European multicolloquium Parasitology, Budapest, Hungary, 4-9 September 1988

Johnson and Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drug : lesion scoring techniques in battery and floor. Pen. Experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28

Karkhanis, Y.D., Noltstadt, K.A., Bhogal, B.S., Ravin O., Pellegrino, R., Crane, M.S., Murray, P.K. and Turner, M.J., 1991. Purification and characterization of a protective antigen from *Eimeria tenella* *Infect. Immun.* 59, pp. 983-988

Lowry, O.H., Rosenbrough, M.J., Farr, A.L and Randall R.S., 1999. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, pp. 265-275

Prastowo, J. Artama, W.T., Sumartono. 1998. Produksi Antibodi Monoklonal terhadap Membran Protein Koksidia Isolate Yogyakarta. Program Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Rhalem, A., Sahibi, H., A., Lourent, F., Yvore, P and Perry, P. 1993. Protective oral immunization of chickens against *Eimeria tenella* with sporozoite surface antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 39, pp. 327-340

Soulsby, E.J.L. 1986. Helminths Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals 7<sup>th</sup> edition. The English Language Book Society and Bailliere Tindal. London.

Sunandjak, Prastowo, J. 2004. Penggunaan Cairan Empedu sapi untuk produksi Sporozoit *Eimeria tenella* Melalui Eksistasi *In Vitro*, Jurnal sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Sutton, C.A., Shirley, M.W. and Wisher, M.H., 1989. Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 99, pp. 175-187

Wisher, M.H., 1986. Identification of the sporozoite antigens of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, pp. 7-15