

B.I.,  
neht  
rain  
96,  
gala,  
The  
mes  
nce  
H.,  
n of  
nt of  
tion  
r. J.  
D.P.,  
A.,  
fect  
rom  
men  
l. J.  
980:  
dies  
999:  
vs in  
11)  
ents  
ific  
0: A  
lytic  
.83,

**ANALISIS HOMOLOGI SEKUEN FRAGMENT GENOM *Eimeria tenella* ISOLAT JEPANG, JOGYA DAN SOLO**

**HOMOLOGY ANALYSIS OF FRAGMENT OF *Eimeria tenella* GENOMIC SEQUENCE OF JEPANG, JOGYA AND SOLO ISOLATES**

Sumartono \*)

\*) Bagian Parasitology Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Gadjah Mada

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis homologi suatu sekuen fragmen genom *Eimeria tenella* dari isolat Jepang, Jogja dan Solo. Ekstraksi DNA (*deoxyribonucleic acid*) dari ketiga isolat tersebut dilakukan dengan menggunakan metode fenol-kloroformisoamilalkohol, sedang amplifikasi fragmen DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan *forward primer* GCTGTGGCCAGAGCAAC dan *reverse primer* CAACTCCATCGGGCCCA. Sekuensing fragmen yang sama besar dilakukan di laboratorium Eijkman dan analisis sekuen dilakukan dengan *Gene-analyser* Genetyx-Max versi 9. Kesimpulan penelitian menunjukkan bahwa homologi fragmen genom *Eimeria tenella* dari isolat Jepang, Jogja dan Solo terjadi pada sekuen AAAAGCCAAACAGGGTTTGTTCAGGCCTTGCACTGCGCA, TCAGCGGCGCCT TACC dan ACGCGTATTG. Diantara ketiga isolat, homologi yang tinggi yaitu 62,2 %, terlihat pada isolat Jogja terhadap isolat Solo

Kata-kata kunci : *Eimeria tenella*, genom, homologi

**ABSTRACT**

The goal of the research was to analysis the homology of fragment of *Eimeria tenella* genomic sequence of Jepang, Jogja dan Solo isolates. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) extraction of the those isolates was carried out with phenol-chloroformisoamylalcohol metode, whereas the DNA fragmen amplification was done by *polymerase chain reaction* (PCR) using GCTGTGGCCAGAGCAAC as forward primer and CAACTCCATCGGGCCCA as reverse primer. The same DNA fragment amplified was sequenced in Eijkman laboratory and the sequence analysis was done by *gene-analyser* Genetyx-Max version.9. The conclusion of the research was that the homology of *E. tenella* genomic fragment of Jepang, Jogja dan Solo isolates occurred at AAAAGCCAAACAGGGTTTGTTCAGGCCTTGCACTGCGCA, TCAGCGGCGCCT TACC dan ACGCGTATTG sequences. From those isolates, the homology Jogja to Solo isolates was high, 62,2 %

Key words : *Eimeria tenella*, genome, homology

## PENDAHULUAN

*Eimeria tenella* adalah salah satu penyebab koksidiosis yang sangat patogen pada ayam dan distribusinya bersifat kosmopolit (Soulsby, 1982). Stadium infeksi dari *Eimeria* adalah oosista yang telah mengalami sporulasi. Beberapa isolat *E. tenella* yang ada di Indonesia infektifitasnya hampir sama (Sumartono, 2000). Sampai saat ini kajian-kajian tentang genom *Eimeria tenella* belum banyak dilakukan di Indonesia. Genom adalah materi genetik yang ada di dalam setiap sel berupa molekul DNA (*deoxyribonucleic acid*). Berdasarkan strukturnya molekul DNA merupakan rangkaian asam nukleat yang terdiri dari adenin (A), guanin (G), sitosin (C) dan timin (T) (Mohammad dan Hartono, 1987). Ukuran DNA bervariasi tergantung jenis selnya. Menurut Primrose (1999) ukuran genom haploid virus terkecil (Coliphage MS2) adalah sebesar  $3,5 \times 10^3$  bp, sedang ukuran genom sel eukariotik uniseluler adalah sebesar  $1-2 \times 10^7$  bp. Fragmen-fragmen DNA dapat diamplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Mac Pherson dan Gajahdar (1993) berhasil melakukan amplifikasi fragmen DNA *E. tenella* sebesar 200-2200 bp dengan menggunakan primer sebesar 10-20 nukleotida. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis homologi sekuen fragmen genom *Eimeria tenella* dari berbagai isolat.

## MATERI DAN METODE

Alat-alat utama yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroskop dengan perbesaran 100-1000x, sentrifus dengan kecepatan sampai 3500 rpm, saringan 100 mesh, 200 mesh dan 325 mesh, vortex Genie-2 model G-560 E, homogeniser Model Potter S, perangkat elektroforesis, *gene-cycler* BioRad, spektrofotometer DU-65 Beckman, mikro-mikro pipet dan alat-alat gelas lainnya. Bahan utama yang digunakan adalah tiga isolat *Eimeria tenella* (Jepang, Jogja dan Solo), primer GCTGTGGCCAGAGCAAC dan CAACTCCATCGGGCCCA, Ready TO GO Beads (Amarsham), tip-tip mikro, tabung eppendorf 15 ml, tabung-tabung plastik steril 10 dan 15 ml, Kalium bikhromat 2%, NaOCL 13 %, Clorox, Trisbase, Agarose, sodium ethidium bromide, phenol, chloroform-isoamilalkohol, sodium asetat, sodium kloride, EDTA, alkohol absolut dan lain lain.

### Perbanyakkan oosista

Perbanyakkan oosista dilakukan pada 20 ekor ayam umur 2 minggu/isolat. Isolat Jepang diperbanyak dengan cara diinfeksi secara oral dengan dosis  $2.10^3$  oosista/ekor. Dengan cara yang sama, isolat Jogja diinfeksi dengan dosis  $3.10^3$  oosista/ekor, dan isolat Solo dengan dosis  $2,4.10^3$  oosista/ekor. Pemanenan oosista dilakukan pada hari ke 8-12 setelah infeksi. Pemurnian oosista dari debris feses dilakukan

dengan dua kali. Pemurnian pertama dengan penyaringan bertingkat (100 mesh, 200 mesh dan 325 mesh). Setelah oosista disporulasikan dengan Kalium bikhromat 2 %, pemurnian ke dua dilakukan dengan cara pengapungan dengan NaOCL 13%.

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari  $1,95.10^6$  oosista isolat Jepang,  $3,54.10^6$  oosista isolat Yogya, dan  $9,25.10^6$  oosista isolat Solo dilakukan dengan metode MacPerson dan Gajahdar, (1993).

Oosista-oosista tersebut mula-mula dicuci dengan TE bufer (1:1) dan kemudian dicuci dengan akuades steril 3x dengan sentrifugasi 3500 rpm, selama 10 menit. Setelah direndam dalam 5 ml chlorox 100 % selama 30 menit, oosista dicuci lagi 3 x dengan akuades dengan cara yang sama seperti pencucian oosista sebelumnya. Pelet oosista yang terbentuk diberi 500 l bufer ekstrasi, dan setelah dicampur dengan baik larutan oosista dituang kedalam tabung gelas 10 ml yang berisi 20 butir glass bead dengan 4 mm. Campuran tersebut divortex selama 20 menit dan kemudian dipindah ke dalam tabung homogeniser dan dihomogenisasi dengan kecepatan 9000, 2 menit 9 x. Homogenat yang dihasilkan kemudian dipindah kedalam tabung plastik 15 ml dan ditambah bufer ekstraksi 1,5 ml, campuran 10 N NaOH dan 10 % SDS sebanyak 0,2 ml dan proteinase -K 10%, 3 l. Setelah diinkubasikan pada suhu  $65^{\circ}$  C selama 15 menit, larutan tersebut disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Lapisan paling atas atau supernatan dipindah dengan pipet ke tabung-tabung eppendorf 1,5 ml masing-masing 500 l dan setelah ditambah 250 l phenol dan 250 l CIAA setiap tabungnya, tabung eppendorf tersebut digojok kuat-kuat. Setelah terbentuk emulsi lalu dimasukkan kedalam es selama 5 menit. Kemudian tabung-tabung eppendorf tersebut disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan jernih yang terbentuk (mengandung DNA) dipindah kedalam tabung-tabung eppendorf yang baru. Untuk presipitasi DNA digunakan larutan 3M sodium asetat sebanyak 1/10 volume dan alkohol absolut dingin sebanyak 2 volume, dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu  $4^{\circ}$  C selama semalam. Larutan yang mengandung presipitat DNA tersebut lalu disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit dan presipitatnya dicuci dengan alkohol 70 % dingin. Presipitat DNA yang terbentuk kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan diresuspendi dengan 50 l TE.

Hasil isolasi lalu dielektrophoresis dan diukur optical densitinya (OD) dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 dan 260. Elektrophoresis dilakukan dengan bufer TBE 1%, agarose 1 % dan pewarnaan DNA dengan sodium

ethidium bromid..

**Amplifikasi fragmen DNA dengan metode PCR**

Amplifikasi fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan Ready To Go beads 25 ml (Amarsham) dan primer: GCTGTGGCCAGAGCAAC sebagai forward primer dan CAACTCCATCGG GCCCA sebagai reverse primer masing-masing sebanyak 20 p mol. Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan gene-cycler BioRad pada suhu persiapan 95° C, suhu denaturasi 94° C, suhu anealing 54° C, suhu elongasi 72° C dan terminasi 72° C. Hasil amplifikasi lalu di elektroforeses dengan bufer TBE 1%, agarose 1% dan pewarnaan DNA dengan sodium ethidium bromid.

**Sekuensing hasil PCR**

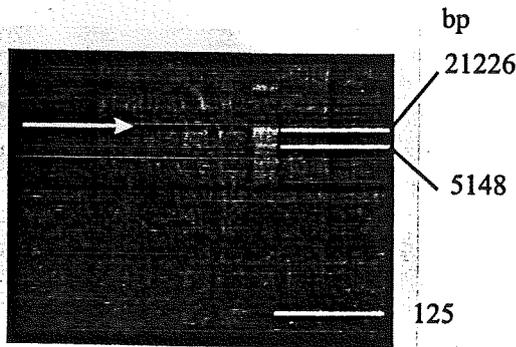
Band-band DNA dari isolat Jepang, Jogja dan Solo (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> dan R<sub>4</sub>) yang memiliki besar yang sama (400-500 bp) disekuensing dengan Big Dye Terminator Mix melalui ABI 377A sequencer (Yayasan Geneka, Eijkman, 2004).

**E. Analisis sekuen**

Hasil sekuensing dari produks PCR yang dipilih dianalisis dengan gene-analyser Genetyx-Max versi 9.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil isolasi DNA dari berbagai isolat *E. tenella* (Jepang, Jogja, Magelang, Solo dan Boyolali) dapat dilihat pada Gambar 1. dan Tabel 1.



Gambar 1. Elektroforesis DNA dari isolat Jepang (R1), Jogja (R2) dan Solo. (R4) . M ( marker digest EcoRI dan HindIII ), Agarose 1 %, TBE 1 % dan ethidium bromide)

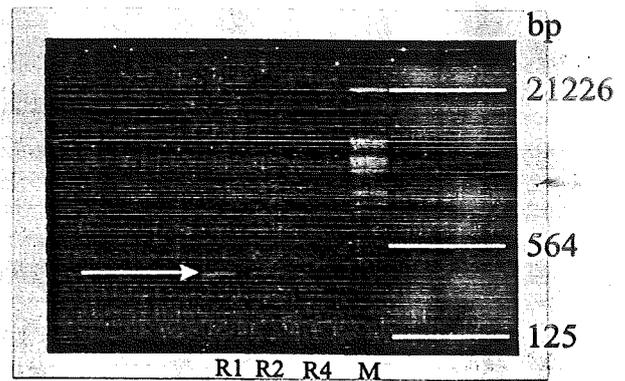
Gambar 2 menunjukkan bahwa DNA dari isolat Jepang, isolat Jogja maupun isolat Solo berhasil diisolasi. Dari gambar tersebut terlihat bahwa besarnya DNA dari ke tiga isolat tampak sama besar yaitu antara 5148 bp dan 21226 bp, namun jumlah DNA yang terisolasi bervariasi antara satu isolat dengan isolat lainnya (Lihat Tabel 1). Jumlah DNA yang terbanyak diperoleh dari isolat Jogja yaitu sebesar 32,75 µg/50 µl, kemudian dari isolat Solo sebesar 28,38 µg/50 µl dan yang paling sedikit diperoleh dari isolat Jepang yaitu 9,75 µg/50 µl.. Perbedaan jumlah tersebut

Tabel 1. Hasil isolasi DNA dari berbagai isolat *E. tenella* yang diukur dengan spektrofotometer

Isolat		8		Hasil	
Asal	Kode	280	260	Kadar	µg / 50 µl
Jepang	R1	0,037	0,078	195	9,75
Yogya	R2	0,124	0,262	655	32,75
Solo	R4	0,099	0,227	567,5	28,38

dkarenakan jumlah oosista yang diisolasi DNANYA juga berbeda, sedangkan berdasarkan kemurniannya, pada umumnya kurang bagus yaitu diluar kisaran (1,5-1,8), yaitu sebesar 2,108 untuk isolat Jepang, 2,110 untuk isolat Jogja dan 2,290 untuk isolat Solo.

Hasil amplifikasi fragmen DNA *Eimeria tenella* dengan metode polymerase chain reaction dengan menggunakan forward primer: GCTGTGGCCAGAGCAAC dan reverse primer: CAACTCCATCGG GCCCA dapat dilihat pada Gambar 2.



Pada gambar tersebut terlihat bahwa ada fragmen DNA dari ketiga isolat yang teramplifikasi dengan menggunakan forward primer: GCTGTGGCCAGAGCAAC dan reverse primer: CAACTCCATCGG GCCCA. Gambar tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan hasil amplifikasi dimana untuk isolat Jepang dan isolat Jogja teramplifikasi pada dua tempat/(terlihat ada dua band), sedang untuk isolat Solo teramplifikasi pada satu tempat (terlihat satu band).

Namun demikian dari gambar tersebut tampak ada satu band yang besarnya 400-500 bp yang teramplifikasi pada semua isolat. Dengan demikian fragmen tersebut merupakan fragmen DNA yang dipilih untuk dianalisis homologinya.

Tabel 2. Perbandingan ( %) homologi sekuen parsial genom *E. tenella* dari isolat Jepang (R<sub>1</sub>), Jogya (R<sub>2</sub>) dan Solo (R<sub>4</sub>)

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>
R <sub>1</sub>	100	53,1	49,8
R <sub>2</sub>		100	62,2
R <sub>4</sub>			100

Aligment hasil sekuensing dengan menggunakan Genetyx-Max dapat dilihat pada gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa dari ketiga isolat tampaknya ada homologi sekuen yang panjang nukleotida bervariasi. Homologi sekuen tampaknya dimulai dari nukleotida no 174 sampai dengan no 256, namun karena ada nukleotida yang tidak terbaca yaitu nukleotida (nt) pada R<sub>4</sub> no 188 dan no 199 serta adanya mutasi pada nt G no 217 dari isolat R<sub>1</sub> dan R<sub>2</sub> berubah menjadi nt C pada isolat R<sub>4</sub>, maka homologi dari ketiga

isolat tersebut tampak ada 3 katagori yaitu homologi yang tinggi mulai dari nt no. 218 nt no 256 dengan nt A: 11; G: 10; C: 95; dan T: 8 dengan urutan sekuen AAAA GCCAAACAGGGT TTGTTTCAGGCC TTGCACTGCGCA, homologi sedang mulai dari nt no. 200-216 dengan nt A: 2; G: 4; C: 7 dan T: 3 dengan urutan sekuen TCAGCGGCGCCTTACC dan homologi yang rendah mulai dari nt no. 189-199 dengan nt A: 2; G: 3; C: 2 dan T: 3 dengan urutan sekuen ACGC GTATTG. Hasil prosentasi homologi antar isolat dapat dilihat pada tabel 2.

Dari tabel 2 terlihat bahwa homologi yang paling besar terjadi antara isolat Jogya (R<sub>2</sub>) terhadap isolat Solo (R<sub>4</sub>) yaitu sebesar 62,2 %. Antara isolat Jogya terhadap isolat Jepang (R<sub>1</sub>) sebesar sebesar 53,1 %, sedang yang terkecil adalah antara isolat Solo terhadap isolat Jepang yaitu 49,8 %

[GENETYX-MAC/Malign]

2004.11.10

Peptide

```

R1      1:ACGGTTCNNCGAGTTTCCCACCATACCNAAAGGACCCAACHGGCCACC-GCCTTTGTA
R2      1:-----N...NT..-N...-.....
R4      1:--AA.C...AAA.TAG...-.N...-T..C..N...CAT...-N..N.N..-C
          *** ** ** ** *

R1      61:CCAGTCCGAAGCCCTGCCCTGAAAGGAGGATACTGTGTTCTCCTTGGGCAACAGGAAG
R2      61:.....-.....-.....-.....-.....
R4      61:...CG.T..NTN...N...N..N.N.C.C...A.-C..NN...NN..N.A.CA.N.
          *** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

R1      121:TGTACGCAAATACATGTCTTG-ATGGTCGGCACTGGCAAGAAGGCTCAC-GAGTAGGC
R2      121:..G.....A.....-.....-.....
R4      121:--T.NATTHT...C..NNN..A.C.NC...N...-TCN...N...N.AA.....
          * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

R1      181:TATTGGAGACCGTATTGTTGAGCGGCGCCTTACCCGAAAGCCAAACAGGTTTGTTC
R2      181:.....-.....-.....-.....-.....
R4      181:.....N.....N.....C.....-.....
          *****

R1      241:GGCCTTGCACTGCGCATGNTNGNCNACNAACAANNANTNTTGTNTGTCCC--C--C
R2      241:.....G.-C..C...NGN.AA.AAANA.GTTG..TG...AA.NAN.
R4      241:.....-G.-T.-GC.C-CA.AG.NAANNT...G--.GN-TTN-
          ↓ : --- ***** * * * * * * * *
          ↓ : ---
    
```

5

Gambar 3. Sekuen produk PCR dari DNA *Eimeria tenella* isolat Jepang (R<sub>1</sub>), Jogya (R<sub>2</sub>) dan Solo (R<sub>4</sub>)

Kesimpulan penelitian ini adalah Sekuen-  
sekuen AAAAGCCAAACAGGGTTTGTTTC  
AGGCCTTGCACTGCGCA merupakan homologi  
tinggi; TCAGCGGCGCCTTACC merupakan  
homologi sedang dan ACGC GTATTG merupakan  
homologi rendah dari fragmen genom *E. tenella* yang  
ditemukan pada isolat Jepang, Jogja dan Solo.  
Homologi yang tinggi diantara ketiga isolat terjadi  
pada isolat Jogja terhadap isolat Solo yaitu sebesar  
62,2% sedang yang paling rendah terdapat antara isolat  
Solo terhadap isolat Jepang sebesar 49,8%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.  
drh Widyasmoro dan drh. Heru susetyo, MP, PhD  
Fakultas Kedokteran Hewan UGM yang memberikan  
masukan-masukan dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

MacPherson, J.M dan Gajadhar, A.A, 1993.  
Differentiation of seven *Eimeria* species by  
random amplified polymorphic DNA.

Veterinary Parasitology, 45 :257-266

Mohammad, S.A dan Hartono, 1987. Dasar-dasar  
genetika kedokteran. Yayasan Essentia Medica  
:1-102

Primrose, S.B., 1995. Principles of Genome Analysis.  
A. guide to mapping and sequencing DNA  
from different organisms. Blackwell Science :  
25-37

Soulsby, E.J.L., 1986. Helminths, Arthropods and  
Protozoa of domesticated animal. 7<sup>th</sup> ed.  
Bailliere Tindall. London : 507-645

Sumartono, 2000. Produksi dan uji infektifitas  
sporosista dari berbagai isolat *Eimeria tenella*  
terhadap ayam ras. Laporan Penelitian. Dik/S  
(DRK-UGM)