

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *Ea1433*, *EiIMP1*, DAN *EmIMP1*
SEBAGAI PROTEIN TARGET DALAM PEMBUATAN VAKSIN
KOKSIDIOSIS PADA AYAM**

SKRIPSI

Oleh:
SYAFRUDIN
NIM. 15620106



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *Ea1433*, *EiIMP1*, DAN *EmIMP1*
SEBAGAI PROTEIN TARGET DALAM PEMBUATAN VAKSIN
KOKSIDIOSIS PADA AYAM**

SKRIPSI

Oleh:
SYAFRUDIN
NIM. 15620106

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *Ea1433*, *EtIMP1*, DAN *EmIMP1*
SEBAGAI PROTEIN TARGET DALAM PEMBUATAN VAKSIN
KOKSIDIOSIS PADA AYAM**

SKRIPSI

Oleh:
SYAFRUDIN
NIM.15620106

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal: 12 Desember 2019

Pembimbing I

Kholifah Holil, M. Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Pembimbing II

Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M. Si., D. Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN *Ea1433*, *EtIMP1*, DAN *EmIMP1*
SEBAGAI PROTEIN TARGET DALAM PEMBUATAN VAKSIN
KOKSIDIOSIS PADA AYAM**

SKRIPSI

Oleh:
SYAFRUDIN
NIM. 15620106

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal: 20 Desember 2019

Penguji Utama	: Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si NIP. 19710919 200003 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Fitriyah, M. Si NIP. 19860725 201903 2 013	(.....)
Sekretaris Penguji	: Kholifah Holil, M. Si NIP. 19751106 200912 2 002	(.....)
Anggota Penguji	: Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc NIP. 19860512 201903 1 002	(.....)



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Allhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT atas segala limpahan rida, hidayah, dan inayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Ekspresi Protein Rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* sebagai Protein Target dalam Pembuatan Vaksin Koksidirosis pada Ayam” dapat diselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Selawat serta salam tetap tercurah untuk Nabi Muhammad SAW yang telah membawa kita dari zaman kegelapan ke zaman yang terang-benderang.

Saya mempersembahkan karya ini kepada orang-orang luar biasa yang telah memberikan energi positif yang dahsyat kepada saya, teruntuk:

1. Kedua orang hebat yang tidak pernah menyerah untuk saya Bapak H. Ruslan dan Ibu Saleha.
2. Saudara kandung saya mas Jufrin, mbak Sri Rahmawati, mbak Khaerunisa, mbak Nuraini, dan adik saya Ana Septriana yang selalu mendukung, membantu, dan mendoakan saya.
3. Profesor saya Aj. Kanokwan, supervisor saya Phi Yo, Mbak Meme, Phi Naji dan anggota-anggota lab Animal Cell Culture Phi Gib, Phi Wattey, Phi Oemar, Phi Dew, Phi Jump, Phi Tawan, dan Phi Apple.
4. Senior-senior dari Indonesia Pak Nas, Pak Eko, Pak Penta, Mas Hasan, Mas Khoiri, Mas Adit, Mas John, Mas Taufik, Mas Malik, Bu Ade, Mbak Fitri, Mbak Gita, Mbak Ica, dan Mbak Nindy.
5. Teman-teman *Acceleration seven force* (ACEFOR) yang sangat saya banggakan Bima Putra Manaf, Dian Febriani, Farid Agus Pratama, Iin Nurmutmainah, Nur Ardiatun Cahyati, M. Wildan Mudjakir, Ramdan Zulfa, dan Sri Ratna Wahyuni.
6. Teman-teman Biologi yang saya cintai dan sayangi, kelas saya Gen D 2015 dan angkatan saya GENETIST 2015.
7. Sahabat rasa keluarga yang benar-benar luar biasa dan sangat saya sayangi dari Barakallah yang terdiri dari si mata api mbak Nuri, pasangan idaman mbak Tria dan mas Real, informan saya yang paling cepat dapat informasi mbak Ambar dan mas Zaka, teman seperjuangan untuk makan mbak Rhesma, teman yang bisa diandalkan mas Noval, dan yang terakhir sang motivator saya mas Luhur.
8. Semua pihak yang penulis tidak dapat sebutkan.

Atas doa dan dukungan yang diberikan telah menjadi energi positif yang dahsyat kepada saya, semoga Allah SWT membalas semua kebaikannya. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat untuk diri saya sendiri dan bagi orang lain yang memiliki minat penelitian yang sama.

Aamiin ya Robbal ‘Aalamiin

MOTTO

“You Only Live Once, But If You Do It Right, Once Is Enough” — Mae West

“Maja Labo Dahu” — Falsafah Bima

قُلْ يَاقَوْمِ أَعْمَلُوا عَلَىٰ مَكَانَتِكُمْ إِنِّي عَمِلٌ فَسَوْفَ تَعْلَمُونَ (٣٩)

Artinya: Katakanlah: “Hai kaumku, bekerjalah sesuai dengan keadaanmu, sesungguhnya aku akan bekerja (pula), maka kelak kamu akan mengetahui”. (Q.S. Az-Zumar: 39).

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Syafrudin
NIM : 15620106
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Ekspresi Protein Rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* sebagai Protein Target untuk Pembuatan Vaksin Koksidiosis pada Ayam

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya siap menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 12 Desember 2019

Yang membuat pernyataan,



Syafrudin

NIM. 15620106

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini merupakan projek penelitian dari Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa dari *Biotechnology International Graduate Program, School of Bioresources, and Technology King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bangkuntien)*. Penelitian ini tidak dipublikasikan namun tersedia untuk umum dan diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.



Ekspresi Protein Rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* sebagai Protein Target dalam Pembuatan Vaksin Koksidiosis pada Ayam

Syafrudin¹, Kanokwan Poomputsa², Patomporn Phadungchaya², Kholifah Holil¹,
Mujahidin Ahmad¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

² Biotechnology International Graduate Program, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi

ABSTRAK

Koksidiosis merupakan penyakit utama penyebab kerusakan jaringan pada usus ayam. Penyakit ini disebabkan oleh tujuh spesies dari *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* and *E. tenella*), dimana untuk mengatasinya memerlukan vaksin protein rekombinan. Salah satu komponen utama dalam pembuatan vaksin protein rekombinan adalah protein target. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi protein rekombinan *E. acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella* immune mapped protein 1 (*EtIMP1*), dan *E. maxima* immune mapped protein 1 (*EmIMP1*) sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam. Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif dengan sampel berupa gen *EtIMP1*, *EmIMP1*, *Ea1433*. Terdapat empat tahapan utama pada penelitian yaitu: sintesis gen target, penyisipan dan transformasi ke sel *E. coli*, ekstraksi DNA target, dan ekspresi protein rekombinan. Parameter dalam penelitian ini adalah ada tidaknya pita DNA berukuran 1180 bp (*EtIMP1*), 1147 bp (*EmIMP1*), dan 837 bp (*Ea1433*) serta adanya kecocokan hasil dari sekuensing. Selain itu ekspresi protein diketahui dari adanya pita protein yang dihasilkan dari *western blot* dengan ukuran 45 kDa (*EtIMP1*), 45 kDa (*EmIMP1*), dan 37 kDa (*Ea1433*). Hasil PCR dari gen *EtIMP1* menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk redup dengan ukuran \approx 1100 dan dua pita DNA yang sangat jelas berukuran $<$ 750 bp. Hasil sekuensingnya tidak menunjukkan adanya kecocokan sekuens dengan spesies *E. tenella*. Sedangkan hasil PCR pada gen *EmIMP1* tidak menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk. Ekspresi gen *EtIMP1* dan *EmIMP1* tidak dapat dilakukan karena gen target tidak dapat disintesis. Gen *Ea1433* berhasil disintesis dengan ukuran 837 bp dan hasil sekuensingnya cocok. Gen *Ea1433* berhasil diekspresi pada sel BL21(DE3) yang ditunjukkan oleh adanya pita protein yang terbentuk dengan ukuran 37 kDa. Oleh karena itu protein target *EtIMP1* dan *EmIMP1* tidak dapat diekspresikan, sedangkan protein *Ea1433* berhasil diekspresikan sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam.

Kata Kunci: Ayam, *Ea1433*, *EmIMP1*, *EtIMP1*, Koksidiosis

Expression Recombinant Proteins *Ea1433*, *EtIMP1*, and *EmIMP1* as Target Proteins in Production Coccidiosis Vaccines in Chickens

Syafrudin¹, Kanokwan Poomputsa², Patomporn Phadungchaya², Kholifah Holil¹,
Mujahidin Ahmad¹

¹Biology Department, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang

² Biotechnology International Graduate Program, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi

ABSTRACT

Coccidiosis is a major disease that causes damage to tissue in the chicken intestine. This disease is caused by seven species of *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* and *E. tenella*), which requires recombinant protein vaccine to overcome them. One of the main components in making recombinant protein vaccines is target proteins. The purpose of this study was to determine the expression of recombinant protein *E. acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella* immune mapped protein 1 (*EtIMP1*), and *E. maxima* immune mapped protein 1 (*EmIMP1*) as a target protein in the production of coccidiosis vaccine in chickens. This type of research is descriptive with samples in the form of *EtIMP1*, *EmIMP1*, *Ea1433* genes. There are four main stages in the research, namely: synthesis of target genes, insertion and transformation into *E. coli* cells, extraction of target DNA, and recombinant protein expression. The parameters in this study are the presence or absence of DNA bands measuring 1180 bp (*EtIMP1*), 1147 bp (*EmIMP1*), and 837 bp (*Ea1433*) and the matching results of sequencing. In addition, protein expression is known from protein bands produced from western blots of size 45 kDa (*EtIMP1*), 45 kDa (*EmIMP1*), and 37 kDa (*Ea1433*). PCR results from the *EtIMP1* gene showed a DNA band formed dimmed with a size of ≈ 1100 and two very clear DNA bands < 750 bp in size. The results of sequencing did not show any compatibility of the sequence with *E. tenella* species. While the PCR results in the *EmIMP1* gene did not show the presence of DNA bands formed. Expression of *EtIMP1* and *EmIMP1* genes cannot be done because the target gene cannot be synthesized. *Ea1433* gene was synthesized with size 837 bp and the result of sequencing was matched. *Ea1433* gene was successfully expressed in BL21(DE3) cells which was shown by the presence of a protein band formed in the size of 37 kDa. Therefore the *EtIMP1* and *EmIMP1* target proteins cannot be expressed, while the *Ea1433* protein has been successfully expressed as a target protein in the production of the coccidiosis vaccine in chickens.

Keywords: Chicken, *Ea1433*, *EmIMP1*, *EtIMP1*, Coccidiosis

تعبيرات البروتين المؤتلف ل *Ea1433* و *EdMP1* و *EmIMP1* كبروتين مستهدف في صنع لقاحات الكوكسيديا في الدجاج

شفرالدين¹، كانوكوان بومبوتسا²، باتومبورن بادونجشيا²، خليفة خليل¹، مجاهدين أحمد¹

¹ قسم البيولوجيا، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية الإسلامية في مالانج

² برنامج الدراسات العليا للتكنولوجيا الحيوية الدولية، كلية المصادر الحيوية والتكنولوجيا، جامعة الملك موبنكوت للتكنولوجيا ثونبوري

ملخص البحث

الكوكسيديا هو مرض رئيسي الذي يسبب تلف الأنسجة في أمعاء الدجاج. هذا المرض يسبب بسبعة أنواع من الإيميريا (*E. tenella*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. acervulina*)، التي تتطلب لقاح البروتين المؤتلف لتغلب عليها. واحدة من المكونات الرئيسية في صنع لقاحات البروتين المؤتلف هي البروتين المستهدف. الاهداف البحث هي لتحديد التعبير عن البروتين المؤتلف (*Ea1433*) ، *E. tenella immune mapped* البروتين 1 (*EdMP1*) ، و *E. tenella immune mapped* البروتين 1 (*EmIMP1*) كبروتين مستهدف في صنع لقاح الكوكسيديا في الدجاج. هذا النوع بحث وصفي مع عينات في شكل جينات *EdMP1* ، *EmIMP1* ، *Ea1433* هناك أربع مراحل رئيسية في البحث، وهي: تخليق الجين المستهدف، الإدراج والتحول إلى خلايا إ القلونية ، استخراج البصمة الوراثية المستهدف ، وتعبير البروتين المؤتلف. كانت المعلومات في هذا البحث وجود أو عدم وجود عصابات البصمة الوراثية في قياس 1180 بـ (*EdMP1*) ، 1147 بـ (*EmIMP1*) ، و 837 بـ (*Ea1433*) ونتائج مطابقة من التسلسل. بالإضافة إلى ذلك ، يُعرف التعبير البروتيني عن نطاق البروتين الذي ينتج من البقع الغربية بحجم 45 كيلو دالتون (*EdMP1*) و 45 كيلو دالتون (*EmIMP1*) و 37 كيلو دالتون (*Ea1433*) دلت نتائج PCR من الجين *EdMP1* أن شريط الحمض النووي يتشكل خافتًا بحجم 1100 ≈ و نطاقين البصمة الوراثية الواضحة جدًا بحجم >750 بـ. لم تظهر نتائج التسلسل أي توافق للتسلسل مع أنواع إ تنيلا *E. tenella*. في حين أن نتائج PCR في الجين *EmIMP1* لم تظهر وجود عصابات البصمة الوراثية التي تشكلت. لا يمكن أن يفعل التعبير عن جينات *EdMP1* و *EmIMP1* لأنه لا يمكن ان يصنع الجين المستهدف. صنع الجين *Ea1433* بحجم 837 بـ ونتيجة مطابقة في التسلسل. تتعبير الجين *Ea1433* بنجاح في خلايا BL21 (DE3) الذي ظهر من خلال وجود شريط بروتين الذي يتكون بحجم 37 كيلو دالتون. لذلك لا يمكن ان يعتبر عن البروتين المستهدف *EdMP1* و *EmIMP1* ، والبروتين *Ea1433* لا يعتبر بنجاح كبروتين مستهدف في صنع لقاح الكوكسيديا في الدجاج.

الكلمات الرئيسية: الدجاج ، *Ea1433* ، *EmIMP1* ، *EdMP1* ، الكوكسيديا

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan tugas akhir Skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M. Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M. Si., D. Sc selaku ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Kholifah Holil, M.Si selaku pembimbing skripsi dan Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc selaku pembimbing agama, yang telah banyak memberikan bimbingan selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi ini.
5. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Fitriyah, M.Si selaku penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran yang membangun.
6. Ayah dan Ibu tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu dan saudara-saudara yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
7. Advisor saya Asst. Prof. Dr. Kanokwan Poomputsa dan supervisor saya Patomporn Phadungchaya dari King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT).
8. Anggota lab *Animal Cell Culture* dan Senior-senior di KMUTT.
9. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat khususnya kepada para pembaca yang memiliki minat penelitian yang sama, *Aamiin ya Robbal 'Aalamiin.*

wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Malang, Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
ملخص البحث.....	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan	8
1.4 Hipotesis.....	8
1.5 Manfaat Penelitian	9
1.6 Batasan Masalah.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Koksidiosis.....	10
2.1.1 Pengertian.....	10
2.1.2 Siklus hidup <i>Eimeria</i>	12
2.2 Vaksin	14
2.3 Antigen pada <i>Eimeria</i>	16
2.3.1 <i>Immune mapped protein 1 (IMP1)</i>	16
2.3.2 Protein 1433	16
2.4 Sistem Ekspresi pada Plasmid pET.....	17
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Penelitian	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.3 Alat dan Bahan.....	21
3.3.1 Alat.....	21
3.3.2 Bahan	22
3.4 Prosedur Penelitian.....	23
3.4.1 Gen yang disintesis sendiri.....	24
3.4.2 Gen yang disintesis oleh <i>GeneScript</i>	32

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 *Eimeria tenella* Immune mapped protein 1 (EtIMP1) dan *E. maxima*
Immune mapped protein 1 (EmIMP1).....36

4.2 Protein *Eimeria acervulina* 1433 (Ea1433).....43

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan49

5.2 Saran.....49

DAFTAR PUSTAKA50

LAMPIRAN.....58



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.5.1.4. Primer yang digunakan untuk gen IMP1	28



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1.1 Ookista dari <i>Eimeria</i> dengan perbesaran 400 X	10
2.1.2 Siklus hidup khas koksidia pada ayam.....	13
2.4.1. Peta plasmid pET28a(+)	18
2.4.2. Ekspresi pada pET yang diinduksi IPTG	19
3.4. <i>Flowchart</i> prosedur penelitian	24
3.4.1.1. Kotak perhitungan di haemositometer	25
4.1.1. Hasil optimasi PCR	37
4.1.2. <i>Escherichia coli</i> DH5 α hasil transformasi	38
4.1.3. Hasil koloni PCR dengan DNA <i>Taq Polimerase</i>	39
4.1.4. pGEMT-Easy-EtIMP dan hasil pemotongan enzim restriksi EcoRI-HF dan XhoI, EcoRI-HF dan HindIII	40
4.2.1. Koloni PCR sel <i>E. coli</i> DH5 α hasil transformasi.....	45
4.2.2. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi BamHI-HF dan XhoI dan pET28a(+)- <i>Ea1433</i>	46
4.2.3 Hasil SDS-PAGE dan <i>Western blot</i>	47

DAFTAR LAMPIRAN

1. Hasil sekuensing	58
2. Hasil BLAST di NCBI.....	58
3. Tabel konsentrasi RNA, cDNA dan DNA	59
4. Peta plasmid pUC57- <i>Ea</i> 1433	59
5. <i>Eimeria</i> yang mengalami lisis dengan <i>glass beads</i>	60



DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
°C	Derajat <i>Celcius</i>
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pairs</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribo Nukleid Acid</i>
CH ₃ COONa	Natrium asetat
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
<i>Ea1433</i>	<i>Eimeria acervulina 1433</i>
<i>EtIMP1</i>	<i>Eimeria tenella immune mapped protein 1</i>
<i>EmIMP1</i>	<i>Eimeria maxima immune mapped protein 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunoglobulin G
IgY	Immunoglobulin Y
IPTG	<i>Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside</i>
kb	<i>Kilobase pairs</i>
kDa	Kilodalton
LB broth	<i>Luria bertani broth</i>
M	Molar
mg	Miligram
Mg ²⁺	Ion magnesium
MgCl ₂	Magnesium klorida
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mL	Mililiter
MSS	<i>Modified sheater solution</i>
ng	Nanogram
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered salin</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered salin tween</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i>
rpm	<i>Rotation per minute</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SM growth powder	<i>Skim milk growth powder</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite</i>

TBE buffer
TEMED
TMB
U
X-Gal

repression
Tris-borate-EDTA *buffer*
Tetramethylethylenediamine
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Unit
*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-
pyranoside*



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ayam merupakan penghasil daging dan telur yang paling banyak di dunia. Sejak tahun 1960, konsumsi per kapita dari daging ayam meningkat lima kali lipat, sedangkan konsumsi dari telur ayam per kapita hampir mencapai dua kali lipat. Konsumsi daging dan telur ayam paling tinggi ada di Asia dan Amerika Latin (Food and Agriculture). Permintaan tahunan rata-rata untuk daging ayam selama 50 tahun terakhir adalah 5%, sementara untuk daging sapi 1,5%, daging babi 3,1% dan ruminansia kecil 1,7% (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Permintaan per kapita untuk daging ayam diprediksi meningkat sebesar 271% di Asia Selatan, 116% di Eropa Timur dan Asia Tengah, 97% di Timur Tengah dan Afrika Utara dan 91% di Asia Timur dan Pasifik antara tahun 2000 dan 2030 (Food and Agriculture).

Daging unggas yang paling diminati saat ini berasal dari ayam. Permintaan global untuk daging ayam pada bulan April 2019 meningkat 3% dari tahun 2018, yaitu dari 95.500 ton menjadi 98.382 ton (USDA, 2019) dan terus meningkat hingga saat ini (Food and Agriculture). Peningkatan produksi daging dan telur ayam merupakan langkah untuk memenuhi permintaan akibat dari peningkatan populasi manusia (Shirley & Lillehoj, 2012). Salah satu masalah yang timbul untuk mempengaruhi permintaan tersebut adalah koksidiosis (Shirley & Lillehoj, 2012). Dampak ekonomi akibat koksidiosis tidak menentu, tetapi diperkirakan 2,4 dolar AS per tahun karena kerugian produksi dikombinasikan dengan biaya pencegahan dan perawatan (McDonald & Shirley, 2009; Blake & Tomley, 2014; Haile, 2018).

Koksidiosis pada ayam disebabkan oleh *Eimeria* spp. (Deplazes dkk., 2006). Tujuh spesies dari *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* and *E. tenella*) diketahui menginfeksi ayam (Williams, 1999), empat diantaranya yaitu: *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, dan *E. tenella* dilaporkan sebagai spesies yang sangat patogen. Spesies yang dilaporkan sebagai patogen ringan adalah *E. acervulina*, *E. mitis*, dan *E. mivati*, sedangkan *E.*

praecox dan *E. hagani* dianggap tidak terlalu patogen (Nematollahi dkk., 2009; Jadhav dkk., 2011). Ketujuh spesies tersebut memiliki tempat berkembang yang khusus sehingga menyulitkan untuk diagnosis dan pengobatan (Nolan dkk., 2015). *E. acervulina* berkembang di duodenum, *E. necatrix* berkembang di usus kecil, *E. maxima* dan *E. mitis* berkembang di bagian tengah usus kecil, *E. tenella* berkembang di sekum, dan *E. brunetti* berkembang di sekum dan rektum (Deplazes dkk., 2006; Raman dkk., 2011; Tan dkk., 2017). Spesies-spesies *Eimeria* yang berkembang di bagian yang sama menyebabkan kesulitan terhadap diagnosis karena bentuk ookista yang hampir sama (Nolan dkk., 2015; Tan dkk., 2017), hal tersebut berdampak pada pengobatan yang memerlukan informasi yang tepat dari diagnosis (Cosentino dkk., 2010).

Eimeria acervulina, *E. tenella*, dan *E. maxima* merupakan tiga spesies yang paling banyak ditemukan pada ayam (Yang dkk., 2016; Kundu dkk., 2017; Liu dkk., 2018). Selain itu ketiga spesies tersebut juga telah diteliti oleh beberapa ilmuwan untuk mengidentifikasi antigen yang memiliki kemampuan untuk menginduksi imun. Liu dkk. (2018) melaporkan bahwa antigen 1433 pada *E. acervulina* yang mampu menginduksi respon imun yang signifikan untuk melawan infeksi oleh *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, dan *E. maxima*. Antigen IMP1 pada *E. maxima* mampu menginduksi 50% perlindungan kekebalan terhadap infeksi strain W dari *E. maxima* (Blake dkk., 2011). Pada *E. tenella* antigen IMP1 mampu mengurangi ookista sebesar 60-66% setelah imunisasi (Yin dkk., 2013).

Infeksi yang disebabkan oleh *Eimeria* pada ayam memiliki risiko yang besar. Pada saat ookista yang telah sporulasi masuk ke dalam sel usus, sekum atau rektum ayam, koksidia berubah menjadi tahap seksual baru dan bereproduksi dan pada akhirnya melisiskan sel usus, sekum atau rektum. Satu ookista dapat menyebabkan infeksi dan kerusakan ribuan sel usus (Barbour dkk., 2015). Semakin banyak sel-sel yang terinfeksi dan kemudian rusak akan memberikan risiko besar bagi ayam. Secara klinis akan terjadi pendarahan pada usus dan sekum yang berdampak pada mobilitas, morbidity, pertumbuhan, dan penyerapan makanan (Mohammed & Sunday, 2015).

Pengendalian penyakit koksidiosis dilakukan dengan pemberian obat antikoksidia, vaksin hidup yang tidak dilemahkan dan vaksin hidup yang telah dilemahkan (Vermeulen dkk., 2001; Chapman dkk., 2002; Williams, 2002; Lillehoj dkk., 2004). Namun, penggunaan obat antikoksidia telah menyebabkan resistensi obat akibat genotip ookista pada *Eimeria* yang memiliki varian alel akibat mutasi (Peek & Landman, 2003; Williams dkk., 2009; Tan dkk., 2017). Selain itu penggunaan dari obat antikoksidia juga meninggalkan residu di daging dan telur (Young & Craig, 2001). Vaksin yang tidak dilemahkan penggunaannya sangat terbatas karena risiko yang disebabkan oleh parasit yang masih hidup. Sedangkan vaksin yang telah dilemahkan memiliki beberapa kelemahan utama, yaitu biaya produksi yang tinggi dan kekurangan manajemen selama aplikasi, seperti kesalahan dosis yang dapat mengakibatkan respon imun yang tidak mencukupi (Peek & Landman, 2011).

Akibat kemampuan *Eimeria* yang resisten terhadap obat, vaksin hidup yang tidak dilemahkan dan vaksin hidup yang telah dilemahkan masih perlu untuk dikembangkan agar lebih efektif dan efisien. Oleh karena itu, hal tersebut menyebabkan permasalahan dibidang peternakan ayam. Penelitian untuk menemukan cara pengobatan selain yang telah disebutkan perlu untuk dilakukan. Hal tersebut sebagaimana sabda Rasulullah SAW:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ. فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: *dari Jabir bin Abdullah radhiyallahu anhu bahwa Nabi SAW bersabda, "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila obat itu tepat untuk suatu penyakit, penyakit itu akan sembuh dengan seizin Allah Azza wa Jalla". (HR. Muslim no. 5705)*

Hadist riwayat Muslim di atas menjelaskan bahwa apapun penyakit yang diderita pasti memiliki obat, maka apapun penyakit yang diderita dapat disembuhkan selama obatnya tepat dan atas seizin Allah SWT (Imam An-Nawawi, 1994). Penyakit koksidiosis sejauh ini diobati dengan kemoprofilaksis, vaksin hidup yang tidak dilemahkan dan yang dilemahkan. Pengobatan tersebut masih kurang efektif, efisien dan memberikan dampak negatif setelah penggunaannya. Maka dari itu diperlukan suatu obat baru yang tidak najis, efektif,

efisien dan tidak membahayakan tubuh. Hadist diatas selaras dengan Alquran surah Ash-Shu'ara ayat 80, Allah SWT berfirman:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ (٨٠)

Artinya: “Dan apabila aku *sakit*, Dialah Yang *menyembuhkan* aku.” (QS. Ash-Shu'ara: 80)

Kata *maridtu* yang berarti sakit menjelaskan bahwa disandarkan penyakit pada dirinya, sekalipun hal itu merupakan qadar, qadla dan ciptaan Allah SWT dan dengan ijin-Nya maka dapat sembuh (Ibnu Katsir, 2004). Sesungguhnya tidak seorang pun selain-Nya yang dapat menyembuhkan makhluk-Nya dengan berbagai macam sarana pengobatan apa pun yang menjadi penyebab kesembuhan. Ketika Allah SWT mengizinkan suatu penyakit untuk sembuh, maka penyakit tersebut akan sembuh (Al-Muyassar, 2016). Akan tetapi, sebagai seorang hamba-Nya berusaha untuk mencari kesembuhan dari suatu penyakit yang ada di manusia maupun yang ada di hewan atau tumbuhan sekalipun itu wajib, misalnya penyembuhan untuk penyakit koksidirosis pada ayam. Allah SWT berfirman pada Alquran surah Ar-Ra'd ayat 11 yang berbunyi:

لَهُ مَعْجَبَاتٌ مِّن بَيْن يَدَيْهِ وَمِنْ خَلْفِهِ يَحْفَظُونَهُ مِنْ أَمْرِ اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّى يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ وَإِذَا أَرَادَ اللَّهُ بِقَوْمٍ سُوءًا فَلَا مَرَدَّ لَهُ وَمَا لَهُمْ مِّن دُونِهِ مِن وَالٍ (١١)

Artinya: “Bagi manusia ada malaikat-malaikat yang selalu mengikutinya bergiliran, di muka dan di belakangnya, mereka menjaganya atas perintah Allah. **Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri.** Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap sesuatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; **dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia.**”(Q.S. Ar-Ra'd: 11)

Potongan ayat yang berbunyi *innallaaha laa yughayyiru maa biqaumin hattaa yughayyiru maa bi-anfusihim* yang berarti sesungguhnya Allah SWT tidak

merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri. Perbuatan yang baik akan dibalas dengan kebaikan dan perbuatan yang buruk akan dibalasan dengan keburukan oleh-Nya (Ibnu Katsir, 2004). Menurut tafsir Al-Muyassar (2016) Allah SWT tidak akan merubah keadaan suatu kaum, dari keadaan yang baik menjadi keadaan buruk yang tidak mereka sukai, hingga mereka sendiri yang merubah apa yang mereka miliki dari keadaan syukur. Ketika hamba-Nya taat kepada Allah SWT, Maka Dia tidak mencabut kenikmatan yang diberikan kepada hamba-Nya sampai seseorang itu merubah kebaikan dan amal shalih mereka menjadi keburukan. Potongan ayat *wa ma lahum min dunih miw wal* yang berarti dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia. Potongan ayat tersebut menjelaskan bahwa tidak ada penolong selain Allah membantu urusan mereka dan membimbing mereka menuju kebaikan dan melindungi mereka dari keburukan (Al-Mukhtasar, 2013).

Usaha untuk menemukan suatu pengobatan baru untuk koksidiosis sangat dibutuhkan karena suatu penyakit tidak akan sembuh jika tetap dibiarkan. Hal tersebut berdasarkan hadis riwayat Muslim yang intinya adalah suatu penyakit pasti ada obatnya dan kesembuhan dari suatu penyakit itu atas izin Allah SWT. Hadist tersebut selaras dengan Alquran surah Ash-Shu'ara ayat 80 yang intinya adalah kesembuhan suatu penyakit karena-Nya. Allah SWT menjelaskan di dalam Alquran surah Ar-Ra'd ayat 11 bahwa Allah SWT tidak akan merubah nasib suatu kaum jika dia tidak merubahnya. Oleh karena itu penelitian untuk menemukan pengobatan yang tepat perlu untuk dilakukan.

Vaksin protein rekombinan merupakan langkah yang tepat untuk melawan koksidiosis pada ayam. Vaksin jenis ini dihasilkan melalui teknik DNA rekombinan untuk menghasilkan produk protein target yang akan digunakan sebagai vaksin. Vaksin protein rekombinan lebih aman jika dibandingkan dengan vaksin yang tidak dilemahkan dan vaksin yang telah dilemahkan. Hal tersebut karena vaksin jenis ini tidak dapat bereproduksi dan berkembang di dalam tubuh penerima. Selain itu, vaksin ini mampu merangsang respon imun humoral melalui pembentukan antibodi dan merangsang imun selular melalui aktivasi sel T (Du dkk., 2009; Leonardi dkk., 2009).

Protein 1433 dan *immune mapped* protein 1 (IMP1) merupakan antigen yang imunogenik. Pada apikompleksan protein 1433 memainkan peran penting pada proses invasi parasit, molekular, dan biologikal dengan respon imun (Assossou dkk., 2004; Lalle dkk., 2011; Meng dkk., 2012; Zhao dkk., 2014). Pada *E. tenella* protein 1433 telah terbukti berinteraksi dengan aktifitas telomerase dan pertumbuhan koksidia (Zhao dkk., 2014). Protein 1433 pada *E. acervulina* diketahui memiliki kemampuan yang signifikan untuk menginduksi imun yang efektif terhadap infeksi dari *E. acervulina*, *E. tenella*, dan *E. maxima*, baik secara individu maupun secara bersamaan (Liu dkk., 2018). Sedangkan protein IMP1 dari *E. tenella* dan *E. maxima* mampu menginduksi produksi IgY yang signifikan untuk melawan infeksi dari *E. maxima* maupun *E. tenella* (Blake dkk., 2011; Kundu dkk., 2017).

Protein 1433 yang berasal dari *E. acervulina* hanya mampu melawan tiga spesies yang menginfeksi ayam (Liu dkk., 2018). IMP1 dari *E. tenella* hanya mampu melindungi infeksi dari *E. tenella* (Kundu dkk., 2017), sedangkan *E. maxima* IMP1 dilaporkan hanya mampu melawan infeksi dari *E. maxima* (Blake dkk., 2011). Oleh karena itu IMP1 yang berasal dari *E. tenella* dan *E. maxima* merupakan vaksin yang univalen karena hanya mampu melindungi dari infeksi dari satu spesies *Eimeria*, sedangkan 1433 dari *E. acervulina* merupakan vaksin multivalen tetapi tidak mampu untuk melawan ketujuh spesies *Eimeria* yang menginfeksi ayam.

Saat ini vaksin multivalen merupakan vaksin yang diminati, hal tersebut dikarenakan kemampuannya dalam melindungi dua atau beberapa infeksi akibat mikroorganisme patogen (Lillehoj dkk., 2005; Blake dkk., 2017; Liu dkk., 2018). Vaksin jenis ini dapat berupa satu antigen, gabungan dua atau lebih antigen. Saat ini vaksin multivalen sangat diperlukan karena kemampuannya yang mampu melawan semua mikroorganisme dalam satu genus dengan cara menginduksi imun yang signifikan terhadap spesies-spesies yang menginfeksi (Willey dkk., 2008; Liu dkk., 2018). Akan tetapi proses untuk mengekspresikan vaksin jenis ini memiliki kendala pada tahapan sintesis gen targetnya yang berdampak pada kegagalan untuk diekspresikan (Campbell dkk., 2017; Kundu dkk., 2017; Yang dkk., 2016).

Proses sintesis gen target merupakan tahapan yang sangat penting untuk menghasilkan gen target yang spesifik dan tidak mengalami mutasi (Campbell dkk., 2017; Kundu dkk., 2017). Gen target merupakan gen yang diinginkan untuk disisipkan atau digunakan sebagai cetakan dalam proses ekspresi. Gen target diperoleh dari metode penargetan gen yang menggunakan rekombinasi homolog untuk modifikasi gen endogen (Miller dkk., 2010). Apabila sintesis gen target mengalami kendala, maka diperlukan optimasi-optimasi. Gen target dapat disisipkan ke dalam plasmid untuk mempermudah penyisipan ke dalam suatu organisme. Gen target sangat penting untuk proses ekspresi karena proses ekspresi tidak dapat dilakukan jika tidak ada gen target sebagai cetakan (Hickman dkk., 2008; Murray dkk., 2012).

Ekspresi protein mengacu pada cara di mana protein disintesis, dimodifikasi dan diatur dalam organisme hidup. Istilah ini dalam penelitian protein dapat berlaku untuk objek studi atau teknik laboratorium yang diperlukan untuk memproduksi protein (Hickman dkk., 2008). Ekspresi protein merupakan proses biologis yang paling mendasar. Organisme prokariotik yang paling sederhana diperkirakan menghasilkan hampir setengah dari berat kering sel dan lebih dari 80% energinya untuk proses ini (Maaloe, 1979). Langkah pertama ekspresi protein, transkripsi, membuat salinan portabel dari informasi genetik yang disimpan dalam nukleus. Langkah kedua, translasi, membaca informasi yang disalin untuk mensintesis protein yang bertanggung jawab untuk melaksanakan berbagai tugas yang diperlukan untuk kehidupan (Hickman dkk., 2008; Echeverría dkk., 2009; Campbell dkk., 2017).

Saat ini, proses ekspresi dapat dilakukan di luar sel asli dari suatu organisme untuk menghasilkan protein target yang diinginkan. Salah satu sel inang yang biasa digunakan untuk proses ekspresi adalah *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Sel bakteri tersebut merupakan sel kompeten yang bagus untuk mengekspresikan protein karena memiliki salinan gen T7 RNA polimerase yang dikendalikan di bawah kontrol *lacUV5* (Sathiamoorthy & Shin, 2012; Li dkk., 2017). Setelah terekspresi, protein dideteksi melalui *western blot*, yaitu teknik penting yang digunakan dalam biologi sel dan molekuler untuk mendeteksi keberadaan protein spesifik. Teknik ini dapat mengidentifikasi protein spesifik

dari campuran kompleks protein yang diekstraksi dari sel. *Western blot* menggunakan tiga elemen penting antara lain: pemisahan berdasarkan ukuran, transfer ke pendukung yang solid, dan menandai protein target menggunakan antibodi primer dan sekunder yang tepat (Mahmood & Yang, 2012; Gilda & Gomes, 2013; Moritz dkk., 2014).

Penelitian tentang ekspresi protein dari *Eimeria* perlu untuk dilakukan dan dicek terekspresi atau tidaknya protein target. Protein target yang ingin diekspresi dan dicek ada tiga yaitu: protein 1433 dari *E. acervulina*, protein IMP1 dari *E. tenella*, dan protein IMP1 dari *E. maxima*. Ketiga protein tersebut akan diuji sebagai protein multivalen yang akan dilakukan dengan mengabungkan *Ea1433* dengan *EtIMP1*, *Ea1433* dengan *EmIMP1* atau *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* untuk menginduksi imun secara signifikan untuk melawan ketujuh spesies *Eimeria* yang menginfeksi ayam.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah apakah protein rekombinan *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) dapat diekspresikan sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi protein rekombinan *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian yaitu protein rekombinan dari *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*) dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) mampu diekspresi sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

1. Secara teoritis penelitian ini memberikan informasi tentang ekspresi protein rekombinan *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*).
2. Secara aplikatif penelitian ini diharapkan protein rekombinan dari *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) yang berhasil terekspresi dapat digunakan untuk pengujian secara *in vivo* ke ayam.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini antara lain:

1. Protein rekombinan yang diproduksi hanya *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*).
2. Gen *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*) merupakan gen sintesis yang dipesan melalui *GeneScript*. Sedangkan gen *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*) didapatkan dari isolasi RNA *E. tenella*, sedangkan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) didapatkan dari isolasi RNA *E. maxima*.
3. Plasmid yang digunakan adalah pUC57 untuk replikasi gen *Ea1433*, pGEMT-Easy untuk replikasi gen *EtIMP1* dan *EmIMP1*, dan pET28a(+) digunakan sebagai vektor ekspresi.
4. Terdapat dua strain *Escherichia coli* yang digunakan, yaitu DH5 α dan BL21(DH3). *E. coli* strain DH5 α digunakan untuk propagasi, sedangkan *E. coli* strain BL21(DH3) digunakan untuk ekspresi.
5. Parameter dalam penelitian ini adalah ada tidaknya pita DNA berukuran 1180 bp (*EtIMP1*), 1147 bp (*EmIMP1*), dan 837 bp (*Ea1433*) serta adanya kecocokan hasil dari sekuensing. Selain itu ekspresi protein diketahui dari adanya pita protein yang dihasilkan dari *western blot* dengan ukuran 45 kDa (*EtIMP1*), 45 kDa (*EmIMP1*), dan 37 kDa (*Ea1433*).
6. Penelitian ini hanya mengecek terekspresi atau tidaknya gen target yang digunakan dengan *western blot*.

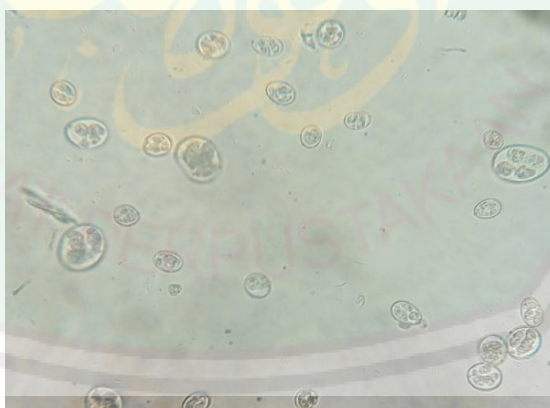
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Koksidiosis

2.1.1 Pengertian

Koksidiosis adalah penyakit enterik yang disebabkan oleh parasit *Eimeria* dan merupakan masalah utama dalam industri unggas (Frolich & Wallach, 2016). Parasit tersebut menyebabkan kerugian besar pada produksi daging dan telur pada unggas, khususnya ayam. Parasit berkembang biak di usus dan menyebabkan kerusakan jaringan yang berakibat pada buruknya penyerapan nutrisi, dehidrasi, kehilangan darah, dan dapat mengalami infeksi sekunder oleh bakteri (ATTRA, 2006; Barbour dkk., 2015; Mohammed & Sunday, 2015). Koksidiosis disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Eimeria*. Terdapat tujuh spesies *Eimeria* yang diketahui menginfeksi ayam yaitu: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* dan *E. tenella* (Williams, 1999). Penyakit ini telah dikenal selama bertahun-tahun dan masih dianggap sebagai parasit yang mempengaruhi produksi unggas di seluruh dunia dan menyebabkan kerugian ekonomi (Beraa dkk., 2010; Blake & Tomley, 2014; Haile, 2018).



Gambar 2.1.1 Ookista dari *Eimeria* dengan perbesaran 400 X (koleksi pribadi)

Empat spesies dari *Eimeria* yaitu: *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, dan *E. tenella* dilaporkan sebagai spesies yang sangat patogen. Spesies yang dilaporkan sebagai patogen ringan adalah *E. acervulina*, *E. mitis*, dan *E. mivati*, sedangkan *E. praecox* dan *E. hagani* dianggap tidak terlalu patogen (Nematollahi

dkk., 2009; Jadhav dkk., 2011). Ketujuh spesies tersebut memiliki tempat berkembang yang khusus sehingga menyulitkan untuk diagnosis dan pengobatan (Nolan dkk., 2015). *E. acervulina* berkembang di duodenum, *E. necatrix* berkembang di usus kecil, *E. maxima* dan *E. mitis* berkembang di bagian tengah usus kecil, *E. tenella* berkembang di sekum, dan *E. brunetti* berkembang di sekum dan rektum (Deplazes dkk., 2006; Raman dkk., 2011; Tan dkk., 2017). Spesies-spesies *Eimeria* yang berkembang di bagian yang sama menyebabkan kesulitan terhadap diagnosis karena bentuk ookista yang hampir sama (Gambar 2.1.1), hal tersebut berdampak pada pengobatan yang memerlukan informasi yang tepat dari diagnosis (Cosentino dkk., 2010; Nolan dkk., 2015; Tan dkk., 2017).

Bentuk ookista *Eimeria* yang terlihat hampir mirip dan memiliki daerah yang mengandung sitoplasma dimana sporokista berada. Sitoplasma menyusun sebagian besar dari ookista. Sitoplasma merupakan cairan yang mengandung air didalamnya (Phelps, 2013). Air merupakan penyusun sebagian besar tubuh makhluk hidup di dunia. Allah SWT telah menjelaskan di dalam Alquran surah An-Nur ayat 45 yang berbunyi:

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ قَدِيرٌ
(٤٥)

Artinya: “Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendakinya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu.” (QS. An-Nur: 45)

Allah SWT yang maha sempurna dan yang maha agung menyebutkan tentang kekuasaannya dan pengaruhnya dalam menciptakan makhluk hidup dari air (Ibnu Katsir, 2004) dan telah menciptakan semua jenis hewan yang berjalan di bumi. Sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya seperti ular, ikan paus, cacing, dan lain sebagainya (Al-Mukhtashar, 2013). Allah SWT menciptakan apa yang Dia kehendaki yang telah disebutkan itu ataupun yang

belum disebutkan, sesungguhnya Allah SWT Maha Kuasa atas segala sesuatu dan tiada sesuatupun yang membuat-Nya lemah (Al-Muyassar, 2016). Allah SWT menciptakan makhluk hidup di dunia dalam berbagai bentuk, ukuran, dan fungsi. Makhluk-makhluk tersebut tersusun sekitar 47-67% air (Campbell dkk., 2017). Demikian juga dengan ciptaan Allah SWT dari golongan protozoa diantaranya adalah *Eimeria* yang menginfeksi ayam. Protozoa tersebut juga tersusun sebagian besar tubuhnya dari air dan beberapa tahap hidupnya bergerak meluncur dengan bantuan filamen aktin (Hickman dkk., 2008).

Penanganan koksidiosis pada unggas saat ini dikendalikan dengan kemoprofilaksis, vaksin yang tidak dilemahkan dan vaksin yang dilemahkan. Kemoprofilaksis merupakan obat yang digunakan untuk mencegah perkembangan penyakit (McBride, 2010), akan tetapi penggunaan obat profilaksis tersebut tidak mampu untuk melawan koksidia yang mengalami resistensi. Selain itu obat tersebut meninggalkan beberapa residu kimia pada unggas, sehingga akan membahayakan konsumen (Young & Craig, 2001; Allen & Fetterer, 2002; Kundu dkk., 2017). Vaksin yang tidak dilemahkan penggunaannya sangat terbatas karena risiko yang disebabkan oleh parasit yang masih hidup, sedangkan vaksin yang telah dilemahkan memiliki beberapa kelemahan utama, yaitu biaya produksi yang tinggi dan pemberian dosis yang harus tepat untuk merangsang respon imun yang mencukupi (Peek & Landman, 2011). Akibatnya, dua dekade terakhir para ilmuwan telah melakukan penelitian untuk mengendalikan penyakit koksidiosis yaitu dengan pengembangan vaksin baru. Pengembangan tersebut berdasarkan analisis dari genomik dan proteomik dari beberapa spesies *Eimeria*, dan juga karakterisasi molekul efektor inang yang berdampak pada resistensi terhadap obat (Min dkk., 2004; Yin dkk., 2015; Kundu dkk., 2017).

2.1.2 Siklus hidup *Eimeria*

Eimeria adalah parasit intraseluler obligat yang menjalankan siklus hidupnya di sel epitel mukosa usus, sekum atau rektum yang menyebabkan kerusakan serius pada integritasnya (Min dkk., 2004). Siklus hidup *Eimeria* terdiri dari tahap intraseluler, ekstraseluler, aseksual, dan seksual yang menyebabkan reaksi imun yang kompleks pada imunitas spesifik maupun non-spesifik yang

yang lama sebelum dimakan oleh ayam dan memulai siklus hidup lagi (Min dkk., 2004; ATTRA, 2006; Lai dkk., 2009; Shi dkk., 2016).

Infeksi yang disebabkan oleh *Eimeria* pada ayam memiliki risiko yang besar. Pada saat ookista yang telah sporulasi masuk ke dalam sel usus, sekum atau rektum ayam, koksidia berubah menjadi tahap seksual baru dan bereproduksi dan pada akhirnya melisiskan sel usus, sekum atau rektum. Satu ookista dapat menyebabkan infeksi dan kerusakan ribuan sel usus (Barbour dkk., 2015). Semakin banyak sel-sel yang terinfeksi dan kemudian rusak akan memberikan risiko besar bagi ayam. Secara klinis akan terjadi pendarahan pada usus dan sekum yang berdampak pada mobilitas, morbiditas, pertumbuhan, dan penyerapan makanan (Mohammed & Sunday, 2015). Akibatnya konsumsi makanan akan menurun, diare darah, dan pertumbuhan yang terhambat, sehingga pada akhirnya akan menyebabkan infeksi sekunder oleh mikroorganisme lain atau kematian setelah infeksi oleh *Eimeria* (Lillehoj & Lillehoj, 2000; Gilberts dkk., 2011; Blake dkk., 2017; Liu dkk., 2018).

2.2 Vaksin

Vaksin merupakan suatu substansi yang berasal dari mikroorganisme patogen yang mampu menimbulkan respon dari imun tubuh. Vaksin berperan dalam mencegah dan melawan suatu penyakit (Radji, 2009; Lauer dkk., 2017). Pada hewan, vaksin sangat diperlukan untuk kesehatan, kesejahteraan, dan kesehatan masyarakat yang mengkonsumsinya. Penggunaan vaksin merupakan cara yang tepat untuk mencegah penyakit pada hewan, meningkatkan efisiensi produksi makanan, dan mengurangi atau mencegah penularan infeksi zoonosis dari hewan ke hewan atau dari hewan ke manusia (Roth, 2011).

Vaksin hewan yang aman dan efektif sangat penting bagi masyarakat saat ini. Hal tersebut berkaitan dengan kebutuhan dari masyarakat akan protein hewani. Ketika hewan terkena suatu penyakit, maka tidak mungkin kebutuhan akan protein hewani dapat terpenuhi. Oleh karena itu, kebutuhan akan vaksin untuk mencegah epizootik pada hewan penghasil makanan, misalnya vaksin koksidiosis pada ayam sangat diperlukan (Roth, 2011; Shirley & Lillehoj, 2012). Banyak jenis vaksin koksidiosis sedang diformulasikan, namun terdapat dua jenis vaksin

yang biasa digunakan yaitu: vaksin hidup yang tidak dilemahkan dan vaksin hidup yang dilemahkan. Vaksinasi dengan vaksin yang tidak dilemahkan memperkenalkan sejumlah ookista terkontrol sebanyak satu atau lebih spesies *Eimeria* tipe liar untuk menginduksi kekebalan protektif. Sedangkan vaksin hidup yang dilemahkan melalui proses seleksi dari beberapa strain menggunakan telur ayam atau ayam dewasa dan memiliki patogenisitas yang berkurang selama proses induksi imunitas (Williams, 2002).

Vaksin yang tidak dilemahkan penggunaannya sangat terbatas karena risiko yang disebabkan oleh parasit yang masih hidup, sedangkan vaksin yang dilemahkan biaya produksi sangat tinggi akibat fekunditas yang lebih rendah dari parasit dewasa, selain itu vaksin ini tidak secara konsisten memberikan kombinasi imunogenisitas dan virulensi yang memuaskan (Innes & Vermeulen, 2006; McDonald & Shirley, 2009; Peek & Landman, 2011; Barbour dkk., 2015). Vaksin hidup yang tidak dilemahkan dan vaksin hidup yang dilemahkan mungkin tidak mengandung jumlah spesies tertentu yang memadai; dengan demikian, produksi imunitas pelindung sangat tergantung pada infeksi ulang dari ookista yang dihasilkan dari dosis inokulasi (Dalloul & Lillehoj, 2005; Barbour dkk., 2015). Akibat dari vaksin hidup yang memiliki beberapa kelemahan, maka vaksin jenis baru yang memiliki biaya murah, masa penyimpanan jangka panjang, dan mampu untuk menginduksi respon imun yang kuat untuk melawan koksidiosis ini diperlukan (Barbour dkk., 2015).

Vaksin rekombinan adalah vaksin yang diproduksi melalui teknologi DNA rekombinan yang melibatkan penyisipan DNA yang mengode antigen (seperti protein permukaan bakteri) yang merangsang respon imun dalam sel bakteri atau mamalia, mengekspresikan antigen dalam sel-sel ini dan kemudian memurnikannya dari sel (Reglinski dkk., 2018). Vaksin ini sangat bergantung pada kapasitas satu atau beberapa antigen yang digunakan untuk menginduksi kekebalan terhadap patogen, ketika diberikan dengan *adjuvant* atau ketika diekspresikan oleh plasmid atau vektor bakteri/virus yang tidak berbahaya. Vaksin protein rekombinan memungkinkan terhindar dari beberapa potensi yang ditimbulkan oleh vaksin berdasarkan kemurnian makromolekulnya (Nascimento & Leite, 2012; Reglinski dkk., 2018).

Vaksin rekombinan terdiri dari dua jenis yaitu vaksin monovalen dan multivalen. Vaksin monovalen merupakan vaksin rekombinan yang mengandung satu antigen tunggal, sedangkan vaksin polivalen mengandung dua atau lebih dari antigen (World Health Organization). Saat ini vaksin multivalen diminati dibandingkan vaksin monovalen. Hal tersebut dikarenakan kemampuannya dalam melindungi dari dua atau beberapa infeksi akibat mikroorganisme patogen (Lillehoj dkk., 2005; Blake dkk., 2017; Liu dkk., 2018).

2.3 Antigen pada *Eimeria*

2.3.1 *Immune mapped protein 1 (IMP1)*

Immune mapped protein 1 (IMP1) merupakan antigen yang berasal dari permukaan sporozoit dari *Eimeria* (Jenkins dkk., 2015). IMP1 pertama kali ditemukan pada *Eimeria maxima* dan telah terbukti imunogenik dan memberikan perlindungan terhadap *E. maxima* pada ayam. IMP1 pada *E. maxima* mampu meningkatkan sistem imun ayam sebanyak 50% terhadap infeksi oleh strain W dari *E. maxima* berdasarkan pengurangan ookista pada feses dibandingkan dengan kontrol yang tidak diimunisasi (Blake dkk., 2011).

Setelah ditemukannya gen IMP1 pada *E. maxima* yang imunogenik, IMP1 juga ditemukan pada *E. tenella* (Blake dkk., 2011). IMP1 pada *E. tenella* yang divaksinasi ke ayam mampu mengurangi 67% jumlah genom parasit pada sekum yang ditentukan menggunakan qPCR dibandingkan dengan ayam yang tidak diimunisasi, dan mampu mengurangi 79% dibandingkan dengan ayam yang diimunisasi dengan thioredoxin (Yin dkk., 2015). Sebelumnya, Yin dkk. (2013) telah melaporkan penurunan sebesar 60-66% ookista setelah imunisasi dengan *E. tenella* IMP1 atau turunan terminal-C dari *E. tenella* IMP1.

2.3.2 **Protein 1433**

Protein 1433 merupakan kelompok molekul yang ada di semua eukariota (Moore & Oerez, 1967; Yaffe dkk. 1997; Shi dkk., 2006), diwakili oleh berbagai isotipe yang mendistribusikan dalam berbagai sel. Kelompok protein tersebut sangat stabil di seluruh spesies eukariotik (Yaffe dkk. 1997; Shi dkk., 2006). Protein 1433 telah didokumentasi terlibat dalam banyak proses imun patologis-

fisiologis dan seluler dengan memicu atau mengganggu aktivitas protein spesifik (Cau dkk., 2017). Pada apikompleksan protein 1433 memainkan peran penting pada proses invasi parasit, molekular, dan biologikal dengan respon imun (Assossou dkk., 2004; Inoue dkk., 2005; Lalle dkk., 2011; Meng dkk., 2012; Zhao dkk., 2014).

Protein 1433 merupakan protein imunogenik yang mampu menstimulasi aktivitas imun inang pada beberapa parasit apikompleksan. Meng dkk. (2012) telah melaporkan bahwa antigen 1433 dari *Toxoplasma gondii* menginduksi respon imun yang efektif pada tikus BALB/c dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin DNA baru terhadap toksoplasmosis. Protein ini juga ditemukan dan diuji untuk melawan *E. tenella*. Pada *E. tenella* antigen 1433 telah terbukti berinteraksi dengan aktivitas telomerase dan terlibat pada proses perkembangan dari koksidia (Wang dkk., 2017; Liu dkk., 2018).

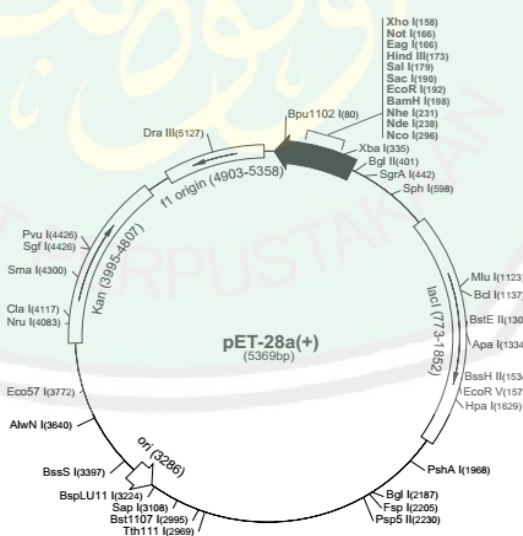
Selain ditemukan pada dan *E. tenella*, antigen 1433 ditemukan juga pada *E. acervulina* dan telah diuji pada ayam petelur keturunan-Hy. Antigen *Ea1433* diidentifikasi sebagai salah satu antigen imunodominan umum dari *E. tenella*, *E. acervulina* dan *E. maxima*. Imunogenisitas dan perlindungan dari *Ea1433* terhadap *E. tenella*, *E. acervulina* dan *E. maxima* diselidiki mampu memicu respon imun seluler yang memainkan peran dominan dalam imunitas terhadap koksidiosis (Chapman & Jeffers, 2014; Liu dkk., 2018). Beberapa sitokin telah terbukti terlibat dalam respon imun terhadap infeksi Eimeria (Diloul & Lillehoj, 2006; Chapman & Jeffers, 2014), yaitu IFN- γ , IL-2, IL-4, TNFSF15, IL17D and TGF- β , terbukti diproduksi secara signifikan setelah divaksinasi dengan pVAX-Ea14-3-3. Selanjutnya, proporsi Limfosit T CD4⁺/CD3⁺ dan CD8⁺/CD3⁺ meningkat secara signifikan. Peningkatan tersebut sesuai dengan peningkatan dari IFN- γ dan IL-2 (Liu dkk., 2018).

2.4 Sistem Ekspresi pada Plasmid pET

Vektor pET awalnya dibangun oleh Studier dan rekannya (Studier dan Moffatt, 1986; Rosenberg dkk., 1987; Studier dkk., 1990; Sathiamoorthy & Shin, 2012). Sistem pET adalah sistem yang paling kuat yang telah dikembangkan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan dalam *Escherichia coli*. Gen

target dikloning dalam plasmid pET di bawah kendali yang kuat dari bakteriofag T7 transkripsi dan translasi. Ekspresi diinduksi dengan menyediakan sumber T7 RNA polimerase dalam sel inang. T7 RNA polimerase sangat selektif dan aktif sehingga hampir semua sumber daya sel dikonversi menjadi target gen ekspresi. Produk yang diinginkan dapat terdiri lebih dari 50% dari total protein sel beberapa jam setelah induksi. Manfaat penting lain dari sistem ini adalah kemampuannya untuk mempertahankan gen target secara transkripsi diam dalam keadaan tidak terinduksi (Novagen, 1999; Glen dkk., 2014).

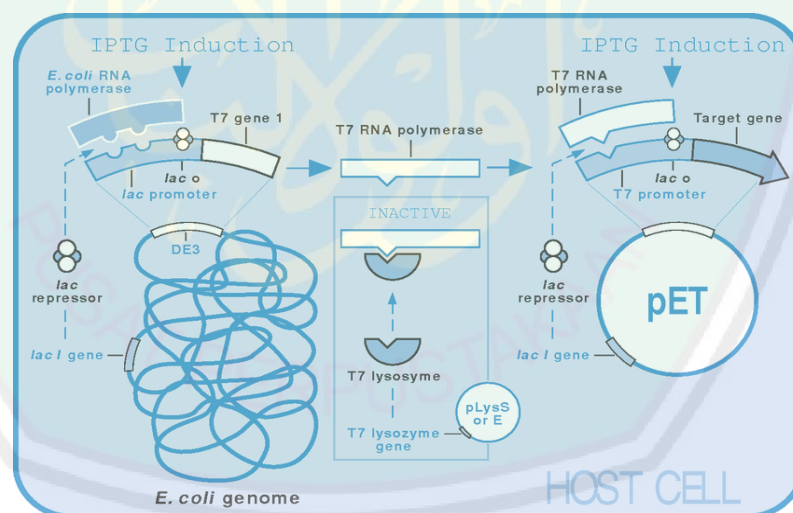
Vektor pET memiliki beragam jenis berdasarkan antibiotik, promotor, protease, His tag, situs protease dan lain-lain. Salah satu contoh dari pET adalah pET28, yang merupakan vektor ekspresi pada bakteri dengan promotor *T7lac*, N-terminal His tag, C-terminal His tag, situs protease pada trombin, dan memiliki antibiotik kanamisin. pET28 memiliki tiga jenis yaitu pET-28a(+), pET-28b(+), dan pET-28c(+). Peta untuk pET-28b(+) dan pET-28c(+) sama dengan pET-28a(+) (Gambar 2.4.1) dengan pengecualian berikut: pET-28b(+) adalah plasmid 5368 bp dan berkurang 1 bp dari setiap situs di luar BamHI pada 198 bp. pET-28c(+) adalah plasmid 5367 bp dan berkurang 2 bp dari setiap situs di luar BamHI di 198 bp (Novagen, 1999; Glen dkk., 2014; Wurm dkk., 2016).



Gambar 2.4.1. Peta plasmid pET28a(+) (Novagen, 1999)

Gen target awalnya dikloning menggunakan inang yang tidak mengandung gen T7 RNA polimerase, sehingga menghilangkan ketidakstabilan plasmid karena

produksi protein yang berpotensi toksik pada sel inang (Glen dkk., 2014). Bakteri inang yang cocok untuk kloning termasuk strain *E. coli* K12, NovaBlue, JM109, dan DH5 α . Strain-strain tersebut adalah inang yang baik untuk kloning awal DNA target ke dalam vektor pET dan untuk mempertahankan plasmid karena mereka adalah *recA*-*endA*- dan memberikan efisiensi transformasi yang tinggi dan hasil plasmid yang baik (Teodosio dkk., 2012). Setelah terbentuk dalam inang tanpa ekspresi, plasmid kemudian ditransfer ke inang ekspresi yang berisi salinan kromosom dari gen T7 RNA polimerase di bawah kontrol *lacUV5*. Sel inang tersebut adalah strain *E. coli* yang mengandung salinan kromosom gen T7 RNA polimerase. Inang ini adalah *lysogen bakteriofag* DE3, turunan lambda yang memiliki daerah kekebalan *fag* 21 dan membawa fragmen DNA yang mengandung gen *lacI*, promotor *lacUV5*, dan gen untuk T7 RNA polimerase (Studier & Moffatt, 1986; Glen dkk., 2014). Satu-satunya promotor yang diketahui mentranskripsi gen T7 RNA polimerase adalah promotor *lacUV5*, yang diinduksi oleh isopropil- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sathiamoorthy & Shin, 2012; Li dkk., 2017).



Gambar 2.4.2. Ekspresi pada pET yang diinduksi IPTG (Mierendorf dkk., 1994)

Operon *lac* dalam genom *E. coli* (*lac O* ditemukan pada DE3 dan pET) memiliki situs pengikatan untuk RNA polimerase *E. coli*. Namun, operon *lac* bergantung pada laktosa atau IPTG untuk memulai proses transkripsi, jika tidak ada maka represor *lacI* akan mengikat ke situs itu sebagai gantinya dan mencegah

RNA polimerase bekerja. Ketika IPTG hadir, perubahan konformasi terjadi, menyebabkan represor *lac* terikat dengan IPTG dan RNA polimerase *E. coli* mulai mentranskripsi gen T7 untuk T7 RNA polimerase. Operon *lac* yang ditemukan pada vektor pET di mana transkripsi pada promotor itu hanya akan terjadi jika T7 RNA polimerase tersedia. IPTG akan menyebabkan perubahan konformasi dan represor *lacI* berdisosiasi sehingga transkripsi terjadi. T7 RNA polimerase akan mengikat ke situs pengikatan dan ekspresi gen target akhirnya terjadi. Proses regulasi dan ekspresi dapat dilihat pada gambar 2.4.2 (Glen dkk., 2014; Wurm dkk., 2016).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ekspresi protein rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *IMP1* sebagai protein target dalam pembuatan vaksin koksidiosis pada ayam merupakan penelitian deskriptif. Protein target yang akan diekspresikan antara lain: *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*), *E. tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*), dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) yang hasil ekspresinya akan dilihat dari hasil *western blot*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2019. Tempat penelitian berlokasi di *Laboratorium Animal Cell Culture, Biotechnology International Graduate Program, School of Biresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 49 Soi Thian Thale 25, Bang Khun Thian Chai Thale Road, Tha Kham, Bang Khun Thian, Bangkok, Thailand*.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *spin down* (Corning Inc., New York, USA), *spectrafuge 16 M* (Labnet Thailand, Meditop co. ltd, Bangkok, Thailand), *vortex-genie-2* (Scientific Industries, Inc., New York, USA), haemositometer (Thermo Fisher Scientific, Norcross, Georgia, USA), *hot air oven venticell* (BMT USA, Monroe, USA), *sorvall™ legend™ X1R centrifuge* (Thermo Fisher Scientific), *thermo holten safe 2010 class II biological safety cabinet* (Thermo Fisher Scientific), *intellowave microwave* (LG Thailand, Bangkok, Thailand), *i.MyRun.N agarose gel electrophoresis* (Cosmo Bio co. ltd, Tokyo, Jepang), *SI600C large cooled shaking incubator* (Stuart, Staffordshire, UK), *GFL shaking incubator* (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany), *hirayama hiclave GVE-50* (Marshall Scientific, Hampton, USA), *Memmert waterbath 10 I* (Neolab International co. ltd, Bangkok, Thailand),

Ultra high definition microscope GR3400 (Shodensha, Bangkok, Thailand), pH meter (Mettler Toledo co. ltd, Bangkok, Thailand), *hot plate* UC150 (RITM Industry, Mahnitohorska, Ukraine), *fisherbrand™ anodized aluminium block* (Thermo Fisher Scientific), *kulkas, revco DxF -40°C upright ultra-low temperature freezers* (Thermo Fisher Scientific), *Eagle 1947 flammable storage cabinet, manual-latching door, 45 Gallon* (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA), mikropipet (0.5-10 µl, 2-20 µl, 20-1000 µl), tip steril (putih, kuning, dan biru), *micro glass beads*, tabung erlenmeyer (50 ml, 100 mL), gelas beker (200 ml dan 800 ml), gelas ukur (50 mL dan 100 mL), 55 mm x 15 mm *laboratory plastic petri dish* (DhGate, Bangkok, Thailand), neraca analitik (Mettler Toledo co. ltd), spatula, tabung endorff (1.5 ml dan 2 ml), tabung konikel (15 mL dan 50 mL), T100™ *thermal cycler* (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA), *SpecMate UV-Vis spectrophotometer* (Chemglass Life Sciences, Vineland, USA), *nanodrop ND 1000* (Thermo Fisher Scientific), *acrilamide gel electrophoresis* (Thermo Fisher Scientific), *platinum Q9-gel documentation system* (Clever Scientific ltd, Warwickshire, UK), kontainer plastik, plastik, *trans-blot SD semi-dry transfer cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3.3.2 Bahan

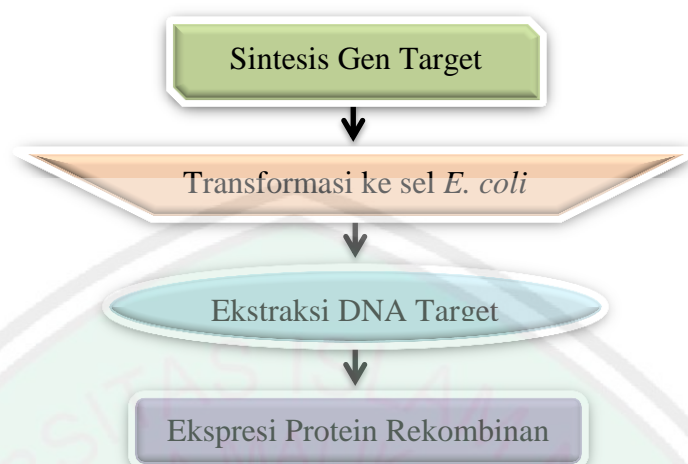
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: *coccivac*-D* (Schering-plough animal health), *trizol™ reagent* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), kloroform, etanol 99%, tris (Bio-Rad Laboratories, Inc.), *sodium dodecyl sulfate* (SDS, Bio-Rad Laboratories, Inc.), metanol absolut (Reagent chemicals, Chesire, UK), magnesium klorida (MgCl₂, Thermo Fisher Scientific), natrium asetat (CH₃COONa, Bio-Rad Laboratories, Inc.), *modified sheater solution* (MSS), 10 X *phosphate buffered saline* (PBS, pH 7.3), *hyclone molecular water*, DNase I (Sigma-Aldrich, Singapore), *RevertAid first strand cDNA sythesis* (Thermo Fisher Scientific), *Phusion high-fidelity DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific), *Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific), *Primer F-EtIMP1-EcorI* (Integrated DNA Technologies, Singapore), *R-EtIMP1-XhoI* (Integrated DNA Technologies), *F-EmIMP1-EcorI* (Integrated DNA Technologies), deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs, Thermo Fisher

Scientific), R-*Em*IMP1-XhoI (Integrated DNA Technologies), F-*Ea*1433-BamHI (Integrated DNA Technologies), R-*Ea*1433-XhoI (Integrated DNA Technologies), GeneJET *gel extraction kit* (Thermo Fisher Scientific), GeneJET *plasmid miniprep kit* (Thermo Fisher Scientific), T4 DNA *Ligase* (Thermo Fisher Scientific), pGEM-T *Easy vector system* (Novagen, USA), pET28a(+) *vector system* (Novagen, USA), pUC57-*Ea*1433 *gene synthesis* (GeneScript, Piscataway, USA), *luria bertani broth*, Miller (LB broth, HiMedia Laboratories, Mumbai, India), *skim milk growth powder* (SM, HiMedia Laboratories), *super optimal broth with catabolite repression* (SOC, Thermo Fisher Scientific), *CutSmart*[®] *buffer* (New England BioLabs inc., Massachusetts, USA), BamHI-HF (New England BioLabs inc.), XhoI (New England BioLabs inc.), *agar-agar powder*, ampicillin, kanamisin, *isopropyl β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG, Thermo Fisher Scientific), X-Gal, 1 Kb *plus DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific), 100 bp *DNA ladder* (New England Biolabs inc.), *Escherichia coli strain DH5α*, *Escherichia coli strain BL21(DE3)*, 2-Merkaptoetanol (Bio-Rad Laboratories, Inc), 6X *loading dye* (New England BioLabs inc.), 10X *Tris-borate-EDTA buffer* (*TBE buffer*, Thermo Fisher Scientific), 10X *Tris-Glycine SDS running buffer*, *towbin buffer*, *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-pyranoside* (X-Gal, Thermo Fisher Scientific), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO, Thermo Fisher Scientific), *ammonium persulfate* (APS, Bio-Rad Laboratories, Inc.), *tetramethylethylenediamine* (TEMED, Bio-Rad Laboratories, Inc.), *bis-acrilamide solutions* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), *tween 20* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), nitroselulosa 0.45 μm (Bio-Rad Laboratories, Inc), *mouse anti-his 6X taq* (Thermo Fisher Scientific), *goat anti-mouse IgG (H+L) HRP* (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA), *PageRuler*[™] *unstained broad range protein ladder* (Thermo Fisher Scientific), *precision plus protein*[™] *dual color standards* (Thermo Fisher Scientific), 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* untuk membran (TMB, Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini secara garis besar terdiri atas empat tahapan utama yaitu: sintesis gen target, penyisipan dan transformasi ke sel *E. coli*, ekstraksi DNA

target, dan ekspresi protein rekombinan atau dapat dilihat pada Gambar 3.4. Penjelasan dari tahapan-tahapan pada penelitian ini dapat dilihat di bawah ini.



Gambar 3.4. Flowchart prosedur penelitian

3.4.1 Gen yang Disintesis Sendiri

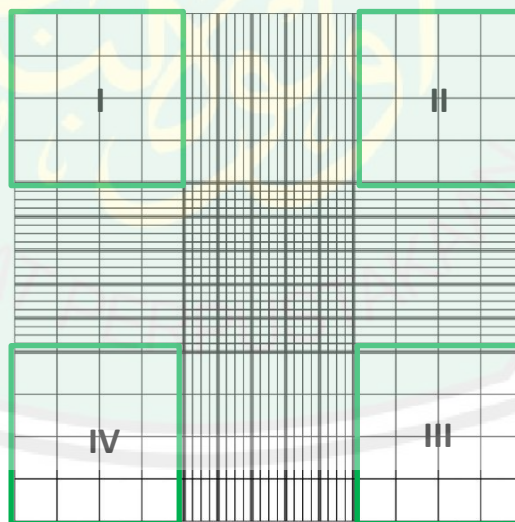
3.4.1.1 Isolasi ookista *Eimeria* dari feses ayam

Isolasi ookista pada *Eimeria* bertujuan untuk memisahkan ookista dari feses ayam, sehingga akan diperoleh ookista bersih. Ookista *Eimeria* dibeli dari Schering-plough *animal health* yang bernama coccivac*-D yang masih bercampur dengan feses ayam. Ookista diisolasi dengan metode *floatation* dari Lassen & Lepik (2014) untuk mendapatkan ookista yang bersih dari feses. Coccivac*-D diambil sebanyak 4,5 mL dan dicampur dengan 40,5 mL *modified sheater solution* (MSS) atau dengan perbandingan 1:10 dalam tabung konikal. Campuran dari coccivac*-D dan MSS dialikuot sebanyak 7,5 mL dalam 6 tabung konikal dan ditetesi secara perlahan dengan *hyclone molecular water* sebanyak 5 mL di setiap tabung konikal.

Campuran didiamkan selama 30 menit di es, lalu disentrifugasi pada 5000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Campuran pada lapisan paling atas dipindah sebanyak 1000 µL ke tabung steril 1,5 mL dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 1000 µL *hyclone molecular water* untuk melarutkan pelet (*floatation no. 1*). Selanjutnya, diulangi langkah-langkah pada *floatation no. 1* dengan menambahkan MSS dan dilapisi

dengan *hyclone molecular water*. Campuran didiamkan selama 30 menit di es, lalu disentrifugasi pada 5000 rpm suhu 4 °C selama 10 menit. Lapisan paling atas dipindah sebanyak 1000 µL ke tabung steril 1,5 mL dan disentrifugasi kembali pada 14.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 1000 µL *hyclone molecular water* untuk melarutkan pelet (*floatation no. 2*).

Hasil *floatation no. 2* diamati di bawah mikroskop, jika masih ada kotoran, diulangi langkah-langkah *floatation* sampai mendapatkan hasil yang bersih dari feses. Setelah mendapatkan hasil yang bersih, pelet dilarutkan ke dalam 1000 µL PBS. Ookista dihitung dengan menggunakan hemositometer dengan cara dihitung ookista yang terletak pada 16 kotak dibagian pojok. Ookista yang terletak pada garis kotak bagian atas dan kanan paling luar tetap dihitung, sedangkan ookista yang terletak pada garis kotak bagian bawah dan kiri paling luar tidak dihitung. Perhitungan ookista berhenti sampai 4 tempat dari 16 kotak dibagian pojok terhitung semua (Gambar 3.4.1.1). Jumlah ookista dihitung rata-ratanya dengan cara tempat I + tempat II + tempat III + tempat IV/4, kemudian rata-rata ookista x faktor pengenceran x 10^4 untuk mengetahui jumlah ookista yang didapatkan dari hasil isolasi.



Gambar 3.4.1.1. Kotak perhitungan di haemositometer (Hickman dkk., 2008)

3.4.1.2 Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA bertujuan untuk memecah ookista dan mengeluarkan sporozoit, sehingga RNA dapat diekstraksi dari sporozoit. Hasil dari proses

ekstraksi adalah RNA murni tanpa ada kontaminan. Proses ekstraksi menggunakan *trizolTM reagent* (Invitrogen), prosedur ekstraksi mengikuti reagen tersebut (MAN0001271) dan dimodifikasi pada tahap presipitasi RNA. Ookista sebanyak $1,5 \times 10^8$ sel/ml digunakan untuk ekstraksi RNA. Ookista disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh pelet. Supernatan dibuang dan ditambahkan 250 μ L PBS dan 750 μ L *trizolTM*, kemudian dicampur dengan mikropipet secara perlahan. Campuran dialikuot menjadi 500 μ L ke tabung 1,5 mL.

Glass beads ditambahkan sampai mencapai volume 250 μ L dan divorteks selama 20 detik, lalu dimasukkan ke dalam es. Vorteks diulangi sebanyak 20-30 kali sampai ookista pecah. Ookista diperiksa di bawah mikroskop untuk melihat lisisnya ookista dan mengeluarkan sporozoit. Jika 90% ookista telah pecah, dipindahkan larutan ke dalam tabung baru yang sama sehingga volume larutan menjadi 1000 μ L. Larutan diinkubasi selama 5 menit, kemudian ditambahkan 200 μ L kloroform per 1000 μ L *trizolTM* yang digunakan untuk lisis. Larutan divorteks atau dibolak-balik sampai tercampur dan terlihat tiga lapisan, kemudian diinkubasi selama 3 menit dan disentrifugasi sampel pada 12.000 x g suhu 4 °C selama 15 menit. Campuran akan terpisah menjadi fenol-kloroform berwarna merah di bagian paling bawah, interfase, dan fase berair yang tidak berwarna di bagian paling atas.

Fase berair yang mengandung RNA ditransfer ke tabung baru dengan memiringkan tabung 45 derajat dan dikeluarkan larutan perlahan. Natrium asetat 3 M (pH 5.5) ditambahkan 1/10 dari volume bahan, kemudian ditambahkan 2.5 dari volume sample etanol 100%. Sample diinkubasi pada suhu -20 °C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 12.000 rpm suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dikeluarkan dengan perlahan. Etanol 70% ditambahkan 200 μ L ke dalam pelet, lalu divorteks. Sample disentrifugasi pada 12.000 rpm suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dikeluarkan dengan perlahan dan dibiarkan pelet mengering di suhu ruang selama 5 menit. Pelet diresuspensi dengan 30 μ L *hyclone molecular water* dan diukur absorbansinya menggunakan nanodrop ND 1000 (prosedur penggunaan mengikuti prosedur yang telah disediakan oleh alat). RNA disimpan pada -20 °C atau -80 °C untuk penyimpanan jangka panjang.

3.4.1.3 Sintesis cDNA

Proses sintesis cDNA dilakukan untuk mengubah RNA menjadi *complementary DNA* (cDNA) karena RNA tidak dapat digunakan untuk proses selanjutnya, yaitu PCR. Hasil dari sintesis akan diperoleh cDNA. RNA hasil ekstraksi diberi perlakuan dengan DNase I (Sigma-Aldrich) untuk menghilangkan DNA, kemudian RNA diubah menjadi cDNA dengan RevertAid first strand cDNA sythesis (Thermo Fisher Scientific). Prosedur untuk menghilangkan DNA mengikuti protokol dari DNase I (AMPD1) dan protokol perubahan RNA menjadi cDNA mengikuti protokol *RevertAid first strand cDNA sythesis* (MAN0012757).

RNA sebanyak 8 μL , 1 μL 10X *reaction buffer*, dan 1 μL DNase I (tingkat amplifikasi, 1 unit/ μL) ditambahkan ke tabung PCR bebas RNase. Sample dicampur dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 1 μL *stop solution*. Sample dipanaskan pada suhu 70 °C selama 10 menit, lalu didinginkan di es selama beberapa detik. Random *hexamer primer* sebanyak 1 μL ditambahkan, dicampur dengan perlahan, dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit. Sample didinginkan di es selama beberapa detik. 5X *reaction buffer* sebanyak 4 μL , 1 μL *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/ μL), 2 μL dNTPs 10 mM, dan 1 μL *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/ μL) ditambahkan ke dalam tabung PCR. Sample diinkubasi pada 25 °C selama 5 menit dan diikuti dengan suhu 42 °C selama 60 menit. Reaksi dihentikan dengan dipanaskan pada suhu 70 °C selama 5 menit.

3.4.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) bertujuan untuk mengamplifikasi gen target sehingga akan diperoleh gen target (amplikon) dalam jumlah yang banyak. Hasil amplikon berupa pita DNA dengan ukuran 1180 bp untuk *EtIMP1* dan 1147 bp *EmIMP1* pada gel agarose. Amplifikasi dari DNA dilakukan dengan menggunakan *phusion high-fidelity DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific) untuk menghasilkan amplikon yang spesifik. Prosedur mengikuti *Phusion high-fidelity DNA polymerase* (MAN0012393). 5X *phusion HF buffer* sebanyak 10 μL , 1 μL dNTPs 10 mM, 2,5 μL *forward primer* 10 μM , 2,5 μL *reverse primer* 10 μM ,

cDNA (50-250 ng), 0,5 μL *phusion* DNA polimerase (2 U/ μL), dan *hyclone molecular water* hingga 50 μL dimasukkan ke dalam tabung PCR (primer yang digunakan ada pada tabel 3.5.1.4).

Siklus diatur sebagai berikut: denaturasi awal pada 98 °C selama 30 detik, denaturasi pada 98 °C selama 10 detik, *annealing* pada 50-60 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72 °C selama 30 detik/kb (siklus denaturasi, *annealing*, dan ekstensi sebanyak 30 kali), dan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dan divisualisasikan menggunakan platinum Q9-gel documentation system. Optimasi dilakukan pada tahap ini, **Optimasi I** dilakukan pada *annealing* 50 °C, kemudian dilakukan PCR kembali dikarenakan pita DNA yang *smear*. **Optimasi II** ditambah 1.5 μL DMSO 100% ke dalam sample dengan *annealing* 55 °C. **Optimasi III** dilakukan pada *annealing* 55 °C. **Optimasi IV** suhu *annealing* dibuat bervariasi yaitu 50 °C dan 60 °C untuk dua sample. **Optimasi V** dilakukan dengan konsentrasi cDNA 112.5 ng dan cDNA 187.5 ng. **Optimasi VI** terdapat empat sample yang digunakan yaitu cDNA 180 ng, cDNA 300 ng, cDNA 300 ng dan DMSO 3%, dan cDNA 300 ng dan MgCl_2 0.8 mM. **Optimasi VII** dilakukan dengan dua gen (*EmIMP1* dan *EtIMP1*) dan dua konsentrasi primer yang berbeda (0.5 μM dan 0.3 μM). **Optimasi terakhir** dilakukan pada *annealing* 43 °C.

Tabel 3.5.1.4. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen IMP1

No.	Species	Primer	Sequence
1.	<i>Eimeria tenella</i>	F- <i>EtIMP1</i> -EcorI	5'-CGGAATTCATGGGGGGGGCTTGC-3'
		R- <i>EtIMP1</i> -XhoI	5'-CCGCTCGAGAGTTGCTGCCGC-3'
2.	<i>Eimeria maxima</i>	F- <i>EmIMP1</i> -EcorI	5'-CGGAATTCATGGGGGGCCGCTT-3'
		R- <i>EmIMP1</i> -XhoI	5'-CCGCTCGAGATCTTGCGACAC-3'

3.4.1.5 Ekstraksi gel

Prosedur ekstraksi gel bertujuan untuk mengisolasi gen *EtIMP1* dari gel agarose. Hasil dari proses ekstraksi gel adalah gen *EtIMP1*. Gel agarose yang mengandung gen target diekstraksi dengan *GeneJET gel extraction kit* (Thermo Fisher Scientific) dan mengikuti protokol dari *kit* tersebut (#K0691, #K0692). Hasil elektroforesis dari *EtIMP1* pada gel agarose 1% dipotong menggunakan

pisau bedah atau silet yang bersih. Gel dipotong sedekat mungkin dengan DNA target untuk meminimalkan volume gel. Hasil potongan gel diletakkan ke dalam tabung 1,5 mL yang telah ditimbang sebelumnya. Hasil potongan ditimbang dan dicatat berat gel. *Binding buffer* ditambahkan ke dalam potongan gel dengan perbandingan 1:1 (volume:berat) (misalnya, ditambahkan 100 μ L binding buffer untuk setiap 100 mg gel agarose).

Campuran gel dinkubasi pada 55 °C selama 10 menit atau sampai potongan gel benar-benar terlarut. Tabung dibolak-balik setiap beberapa menit untuk memudahkan proses pencampuran dan dipastikan gel benar-benar larut. Campuran gel divorteks beberapa detik sebelum dituang pada kolom. Larutan gel yang terlarut ditransfer hingga 800 μ L ke *GeneJET purification column*, lalu disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit. *Flow-through* dibuang dan ditempatkan kembali kolom ke tabung koleksi yang sama. *wash buffer* sebanyak 700 μ L ditambahkan ke *GeneJET purification column*, kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit. *Flow-through* dibuang dan ditempatkan kembali kolom ke tabung koleksi yang sama. *GeneJET purification column* yang kosong disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit untuk menghilangkan sisa *wash buffer*. *GeneJET purification column* ditransfer ke dalam tabung 1.5 mL yang steril. *Hyclone molecular water* ditambahkan sebanyak 30 μ L ke tengah membran kolom dan disentrifugasi pada 14,000 rpm selama 1 menit. Kolom dibuang dan diukur konsentrasi DNA dengan menggunakan *nanodrop* ND 1000, prosedur penggunaan *nanodrop* mengikuti prosedur dari alatnya. DNA disimpan pada -20 °C.

3.4.1.6 Ligasi *EtIMP1* ke pGEMT-Easy

Proses ligasi bertujuan untuk menyisipkan gen *EtIMP1* ke plasmid pGEMT-Easy. Hasil ligasi akan diperoleh plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1* yang membawa gen *EtIMP1*. Proses ligasi dilakukan dengan T4 DNA *Ligase* (Thermo Fisher Scientific) dan mengikuti protokol dari enzim ligase tersebut (#EL0014). Campuran reaksi disiapkan sebagai berikut: 50 ng vektor pGEMT-Easy, gen *EtIMP1* hasil ekstraksi dari gel dengan perbandingan 3:1 (rasio molar atas vektor), 2 μ L 10X T4 DNA *ligase buffer*, 1 Weiss U T4 DNA ligase, dan ditambahkan

hyclone molecular water hingga volume menjadi 20 μL . Campuran diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ untuk membentuk plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1*.

3.4.1.7 Transformasi ke *E. coli* DH5 α

Proses transformasi dilakukan untuk memasukkan plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1* ke dalam sel kompeten yaitu *E. coli* DH5 α . Transformasi akan menghasilkan *E. coli* DH5 α yang membawa pGEMT-Easy-*EtIMP1* dan akan dipropagasi sehingga menghasilkan banyak plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1*. Prosedur transformasi mengikuti prosedur dari Novagen (#TB055). Sel kompeten *E. coli* DH5 α Dicairkan di es selama 10-20 menit atau sampai sel mencair. Produk ligasi yaitu pGEMT-Easy-*Ea1433* ke ditambahkan 10 μL ke sel kompeten. Sel dan produk ligasi diinkubasi di atas es selama 20 menit.

Sel diberi sengatan panas (*heat shock*) selama 60 detik pada suhu 42 $^{\circ}\text{C}$, kemudian diletakkan di atas es selama 5 menit. Medium *luria bertani broth* (LB *broth*) ditambahkan tanpa antibiotik hingga 1 mL. Sel diinkubasi di pada GFL *shaking incubator* suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam. Sel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan 200 μL . Pelet diresuspensi dengan cara dipipet ke atas dan ke bawah, kemudian ditetesi ke media agar LB *broth* yang berisi IPTG/X-Gal/ampisilin dan disebar dengan *spreader glass* hingga merata. Medium yang berisi sel diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 6-18 jam. Hasil kultur disimpan di 4 $^{\circ}\text{C}$ untuk penyimpanan sebelum sel digunakan untuk prosedur selanjutnya.

3.4.1.8 Koloni PCR

Koloni PCR dilakukan untuk mengecek koloni yang membawa gen target yang telah disisipkan, hasilnya berupa pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan *EtIMP1*, yaitu 1180 bp. Koloni PCR menggunakan *Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific) dan prosedur mengikuti protokol dari enzim tersebut (#10342020). Koloni yang terbentuk dari hasil kultur, kemudian di PCR untuk mengecek ada atau tidaknya gen *EtIMP1*. 10X PCR *Buffer* ($-\text{Mg}^{2+}$) sebanyak 5 μL , 1 μL dNTPs 10 mM, 1,5 μL MgCl_2 1,5 mM, 2,5 μL *forward primer* 0,5 μM ,

2,5 μL *reverse primer* 0,5 μM , koloni *E. coli* DH5 α hasil dari transformasi, dan 0,5 μL *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μL) dimasukkan ke dalam tabung PCR (primer *EtIMP1* yang digunakan ada pada tabel 3.5.1.4). Siklus diatur sebagai berikut: denaturasi awal pada 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 3 menit, denaturasi pada 95 $^{\circ}\text{C}$ selama 40 detik, *annealing* pada 55 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik, dan ekstensi pada 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 90 detik/kb (siklus denaturasi, *annealing*, dan ekstensi sebanyak 30 kali), dan ekstensi akhir pada 72 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dan divisualisasikan menggunakan *platinum Q9-gel documentation system* untuk melihat pita DNA. Prosedur penggunaan *platinum Q9-gel documentation system* mengikuti prosedur dari alatnya.

3.4.1.9 Ekstraksi plasmid

Ekstraksi plasmid bertujuan untuk mengeluarkan plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1* dari sel *E. coli* DH5 α , sehingga diperoleh plasmid pGEMT-Easy-*EtIMP1* yang nantinya akan dikonfirmasi dengan enzim restriksi dan sekuensing. Plasmid diekstraksi dengan *GeneJET* plasmid *miniprep kit* (Thermo Fisher Scientific) dan protokol mengikuti *kit* tersebut (#K0503). Sel *E. coli* DH5 α hasil transformasi dikultur dalam 5 mL *luria bertani broth* yang mengandung antibiotik ampisilin selama 16-18 jam pada 200 rpm suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Hasil kultur disentrifugasi pada 8000 rpm selama 2 menit. Sel pelet diresuspensi dalam 250 μL *resuspension solution*. *Lysis solution* ditambahkan 250 μL dan diaduk rata dengan membolak-balik tabung sebanyak 6 kali sampai larutan menjadi kental dan sedikit jernih. *Neutralization solution* ditambahkan 350 μL dan dicampur segera dengan membolak-balik tabung 4-6 kali.

Campuran disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit, kemudian ditransfer supernatan ke kolom *GeneJET* yang disediakan dan disentrifugasi pada 14.000 selama 1 menit. *Flow-through* dibuang dan ditempatkan kembali kolom ke tabung koleksi yang sama. *Wash solution* ditambahkan 500 μL ke kolom *GeneJET*. Kolom disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 60 detik dan dibuang *flow-through*. Kolom ditempatkan kembali ke tabung koleksi yang sama. Prosedur mencuci diulangi. *Flow-through* dibuang dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 1 menit untuk menghilangkan sisa *wash solution*. Kolom *GeneJET*

ditransfer ke dalam tabung 1.5 mL yang baru. *Hyclone molecular water* ditambahkan 30 μ L, kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar. Tabung disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit. Plasmid hasil ekstraksi dikonfirmasi dengan enzim restriksi (NEB) dan sekuensing (Sanger dkk., 1977).

3.4.2 Gen yang disintesis oleh *GeneScript*

3.4.2.1 Persiapan pUC57-*Ea1433*

3.4.2.1.1 Transformasi pUC57-*Ea1433* ke *E. coli* DH5 α

Proses transformasi dilakukan untuk memasukkan plasmid pUC57-*Ea1433* ke dalam sel kompeten yaitu *E. coli* DH5 α untuk propagasi. Transformasi akan menghasilkan *E. coli* DH5 α yang membawa pUC57-*Ea1433* dan akan dipropagasi sehingga menghasilkan banyak plasmid pUC57-*Ea1433*. Prosedur transformasi mengikuti prosedur dari Novagen (#TB055) yang telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.7. Medium *luria bertani broth* diganti dengan *super optimal broth with catabolite repression* setelah diberi sengatan panas (*heat shock*). Setelah sel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit, sel ditetesi ke media agar *luria bertani broth* yang berisi antibiotik kanamisin.

3.4.2.1.2 Ekstraksi plasmid

Ekstraksi plasmid bertujuan untuk mengeluarkan plasmid pUC57-*Ea1433* dari sel *E. coli* DH5 α , sehingga diperoleh plasmid pUC57-*Ea1433* yang nantinya akan dikonfirmasi dengan enzim restriksi. Plasmid diekstraksi dengan *GeneJET* plasmid *miniprep kit* (Thermo Fisher Scientific) dan protokol mengikuti *kit* tersebut (#K0503) atau dapat dilihat pada sub bab 3.4.1.9.

3.4.2.2 Konstruksi pET28a(+)-*Ea1433*

3.4.2.2.1 Pemotongan pUC57-*Ea1433* dengan enzim restriksi

Pemotongan pUC57-*Ea1433* dengan bantuan enzim restriksi bertujuan untuk mengeluarkan gen *Ea1433* dari plasmid pUC57, sehingga diperoleh gen *Ea1433* berupa pita DNA dengan ukuran 837 bp di gel agarose. Prosedur pemotongan dengan enzim restriksi mengikuti protokol dari NEB (#R3136, #R0146S). Plasmid hasil ekstraksi (1 μ g) dicampurkan dengan 2 μ L *CutSmart*[®]

buffer, 0,5 μ L BamHI-HF dan 0,5 μ L XhoI, dan ditambahkan *hyclone molecular water* hingga volume menjadi 20 μ L. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Hasil pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi BamHI-HF dan XhoI kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dan divisualisasikan menggunakan *platinum Q9-gel documentation system* untuk melihat pita DNA.

3.4.2.2.2 Ekstraksi gel

Prosedur ekstraksi gel bertujuan untuk mengisolasi gen *Ea1433* dari gel agarose. Hasil dari proses ekstraksi gel adalah gen *Ea1433*. Gel agarose yang mengandung gen *Ea1443* diekstraksi dengan *GeneJET gel extraction kit* (Thermo Fisher Scientific) dan mengikuti protokol dari *kit* tersebut (#K0691, #K0692). Protokol ekstraksi telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.5.

3.4.2.2.3 Ligasi *Ea1433* ke pET28a(+)

Proses ligasi bertujuan untuk menyisipkan gen *Ea1433* ke plasmid pET28a. Hasil ligasi akan diperoleh plasmid pET28a(+)-*Ea1433* yang membawa gen *Ea1433*. Proses ligasi dilakukan dengan T4 DNA *Ligase* (Thermo Fisher Scientific) dan mengikuti protokol dari enzim *ligase* tersebut (#EL0014) yang telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.6.

3.4.2.3 Transformasi pET28a(+)-*Ea1433* ke *E. coli* DH5 α

Proses transformasi dilakukan untuk memasukkan plasmid pET28a(+)-*Ea1433* ke dalam sel kompeten yaitu *E. coli* DH5 α . Tujuan dari prosedur ini adalah untuk menghilangkan ketidakstabilan plasmid karena produksi protein yang berpotensi toksik bagi sel inang. Hasil dari prosedur ini diperoleh plasmid yang stabil dan banyak karena dipropagasi oleh sel *E. coli* DH5 α . Prosedur transformasi mengikuti prosedur dari Novagen (#TB055) yang telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.7. Medium *luria bertani broth* diganti dengan *super optimal broth with catabolite repression* setelah diberi sengatan panas (*heat shock*). Setelah sel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit, sel ditetesi ke media agar *luria bertani broth* yang berisi antibiotik kanamisin.

3.4.2.4 Koloni PCR

Koloni PCR dilakukan untuk mengecek koloni yang membawa gen target yang telah disisipkan. Hasilnya berupa pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan *Ea1433*, yaitu 837 bp. Koloni PCR menggunakan *Taq* DNA *polymerase* (Thermo Fisher Scientific) dan prosedur mengikuti protokol dari enzim tersebut (#10342020) atau yang telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.8. Suhu *annealing* yang digunakan adalah 50 °C selama 30 detik. Primer yang digunakan yaitu F-*Ea1433*-BamHI: 5'-CGCGGATCCATGATTGAGGACATCAAGAC-3' dan R-*Ea1433*-XhoI: 5'-CCGCTCGAGCTACTGYTGCTCAGTAG-3'.

3.4.2.5 Ekstraksi plasmid

Ekstraksi plasmid bertujuan untuk mengeluarkan plasmid pET28a(+)-*Ea1433* dari sel *E. coli* DH5 α , sehingga diperoleh plasmid pET28a(+)-*Ea1433* yang nantinya akan dikonfirmasi dengan enzim restriksi dan sekuensing. Plasmid diekstraksi dengan *GeneJET* plasmid *miniprep kit* (Thermo Fisher Scientific) dan protokol mengikuti *kit* tersebut (#K0503) atau dapat dilihat pada sub bab 3.4.1.9.

3.4.2.6 Transformasi pET28a(+)-*Ea1433* ke *E. coli* BL21(DE3)

Proses transformasi dilakukan untuk memasukkan plasmid pET28a(+)-*Ea1433* ke dalam sel kompeten yaitu *E. coli* BL21(DE3) untuk proses ekspresi, sehingga diperoleh sel *E. coli* BL21(DE3) yang membawa plasmid pET28a-*Ea1433*. Prosedur transformasi mengikuti prosedur dari Novagen (#TB055) yang telah dipaparkan pada sub bab 3.4.1.7. Medium *luria bertani broth* diganti dengan *super optimal broth with catabolite repression* setelah diberi sengatan panas (*heat shock*). Setelah sel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 5 menit, sel ditetesi ke media agar *luria bertani broth* yang berisi antibiotik kanamisin.

3.4.3 Western blot

Western blot merupakan metode yang bertujuan untuk mendeteksi protein spesifik. Hasil dari prosedur ini ini berupa pita protein *Ea1433* dengan ukuran 37 kDa. Produksi protein mengikuti Novagen (#TB055). Sel BL21(DE3) yang mengandung pET28a(+) dan pET28a(+)-*Ea1433* dikultur ke dalam 50 mL *lurian*

bertani broth yang mengandung antibiotik kanamisin pada suhu 37 °C kecepatan 150 rpm selama 4 jam atau sampai *optical density* (OD) mencapai 0,5. Ketika OD mencapai 0,5 sel diinduksi dengan 500 µL IPTG 100 mM. Diinkubasi pada 37 °C kecepatan 150 rpm selama 4 jam, kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm suhu 4 °C selama 10 menit. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 1X PBS dan diambil 200 µL dan dicampurkan dengan 6X *loading dye* dan 2-Merkaptoetanol. Didenaturasi pada suhu 95 °C selama 10 menit, kemudian SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*).

Gel hasil SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa mengikuti prosedur dari *Trans-blot SD semi-dry transfer cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Gel ditransfer pada 20 volt selama 1 jam. Membran nitroselulosa direndam dengan *skim milk* (SM) 5% selama 16-18 jam. Prosedur deteksi mengikuti Novagen (#TB055) dengan modifikasi pada konsentrasi antibodi yang digunakan. Membran nitroselulosa dicuci dengan PBS-T 1% selama 10 menit (3 kali), lalu diinkubasi dengan 2 µL antibodi primer (*Mouse Anti-His 6X taq*), 5 mL PBS-T 0,05%, dan 5 mL SM 0,25% selama 1 jam. Membran nitroselulosa dicuci dengan PBS-T 1% selama 10 menit (3 kali), kemudian diinkubasi dengan 2 µL antibodi sekunder (*Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP*), 5 mL PBS-T 0,05%, dan 5 mL SM 0,25% selama 1 jam. Membran nitroselulosa dicuci dengan PBS-T 1% selama 10 menit (3 kali). Membran nitroselulosa diinkubasi dengan *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine* (TMB) selama 15 menit pada keadaan gelap sampai muncul pita protein (Novagen, 1999; Mahmood & Yang, 2012; Gilda & Gomes, 2013; Moritz dkk., 2014).

BAB IV

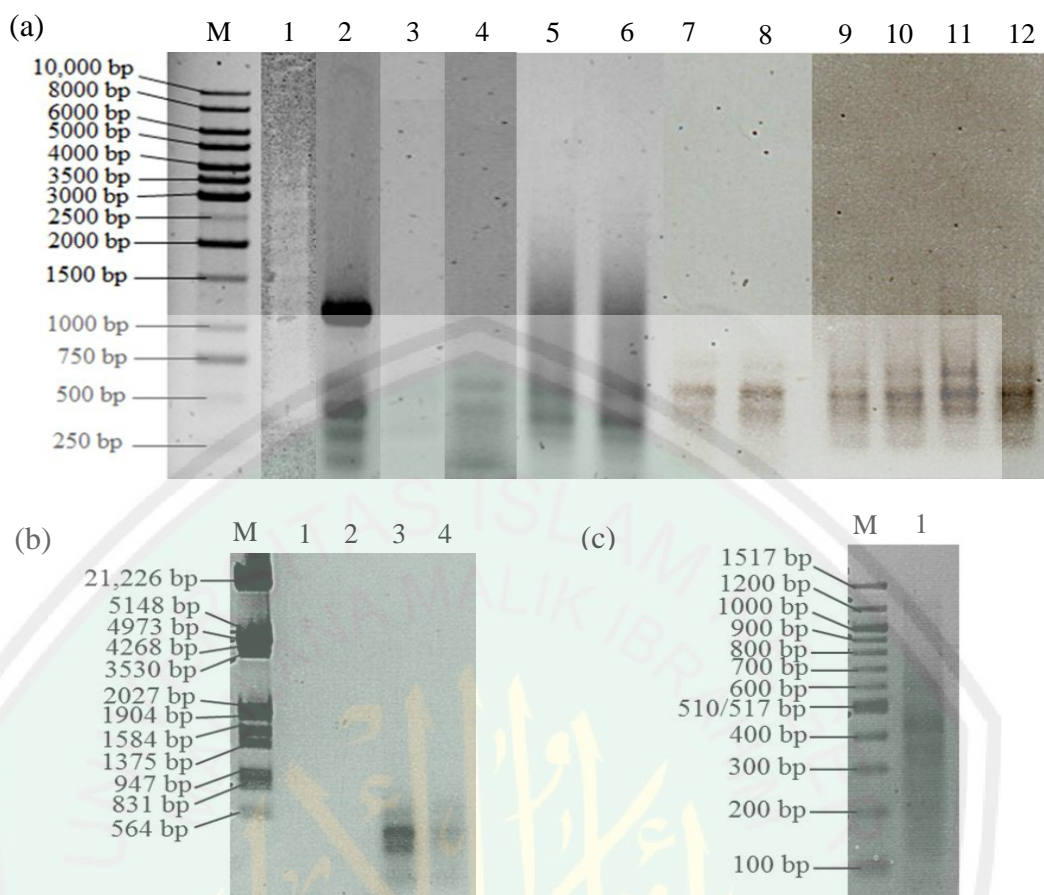
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 *Eimeria tenella* Immune mapped protein 1 (EtIMP1) dan *E. maxima* Immune mapped protein 1 (EmIMP1)

Immune mapped protein 1 (IMP1) merupakan antigen yang berasal dari permukaan sporozoit *Eimeria* (Jenkins dkk., 2015). IMP1 pada *Eimeria maxima* telah terbukti imunogenik dan memberikan perlindungan terhadap infeksi *E. maxima* pada ayam. IMP1 pada *E. maxima* mampu meningkatkan sistem imun ayam sebanyak 50% terhadap infeksi strain W dari *E. maxima* (Blake dkk., 2011). Gen IMP1 pada *E. tenella* juga terbukti mampu mengurangi 67% jumlah genom parasit pada sekum yang ditentukan menggunakan qPCR (Blake dkk., 2011; Yin dkk., 2015).

IMP1 merupakan antigen imunogenik yang dimiliki oleh *E. tenella* dan *E. maxima* memiliki potensi untuk dijadikan sebagai vaksin multivalen, yaitu vaksin yang mampu untuk melawan tujuh spesies dari *Eimeria* yang menginfeksi ayam. Antigen tersebut yang mampu menginduksi respon imun yang signifikan (Yin dkk., 2015). Oleh karena itu, ketika digunakan bersamaan sebagai vaksin multivalen diharapkan mampu untuk menginduksi respon imun untuk melawan tidak hanya *E. tenella* dan *E. maxima*, akan tetapi mampu untuk melawan spesies lainnya yang menginfeksi ayam.

Tahapan untuk mengekspresikan IMP1 dari *E. tenella* dan *E. maxima* mengalami kendala pada saat proses sintesis gen. Proses sintesis gen target merupakan tahapan yang sangat penting untuk menghasilkan gen target yang spesifik dan tidak mengalami mutasi (Campbell dkk., 2017; Kundu dkk., 2017). Apabila sintesis gen target mengalami kendala, maka diperlukan optimasi-optimasi untuk bisa menghasilkannya (Hickman dkk., 2008; Murray dkk., 2012). Proses sintesis terhambat pada tahapan PCR karena produk ampifikasi yang tidak sesuai. Gen ini perlu dilakukan optimasi untuk mendapatkan produk ampifikasi yang sesuai dengan *E. tenella* dan *E. maxima*. Hasil optimasi yang telah dilakukan dapat dilihat pada gambar 4.1.1.

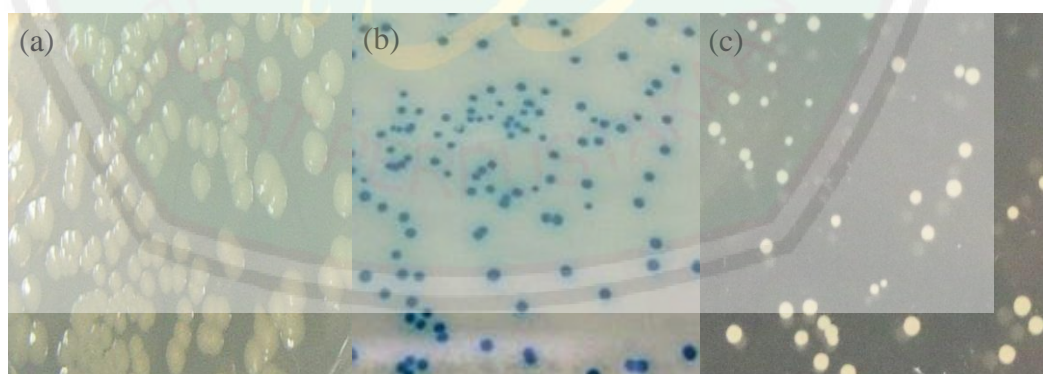


Gambar 4.1.1. Hasil optimasi PCR **a)** lane 1 *annealing* pada suhu 55 °C, lane 2 PCR kedua dari sample pada lane 1, lane 3 penambahan DMSO, lane 4 *annealing* pada suhu 53 °C, lane 5 *annealing* pada suhu 50 °C, lane 6 *annealing* pada suhu 60 °C, lane 7 menggunakan cDNA 124,8 ng, lane 8 menggunakan cDNA 208 ng, lane 9 menggunakan cDNA 83,2 ng, lane 10 menggunakan cDNA 164,6 ng, lane 11 menggunakan cDNA (164,6 ng) + DMSO, lane 12 menggunakan cDNA (164,6 ng) + MgCl₂, **b)** M = marker, 1 = *EmIMP1* primer 0.5 μM, 2 = *EmIMP1* primer 0.3 μM, 3 = *EtIMP1* primer 0.5 μM, 4 = *EtIMP1* primer 0.3 μM, **c)** M = marker dan 1 = *annealing* pada suhu 43 °C

Gambar 4.1.1a lane 1 merupakan hasil dari PCR untuk gen *EtIMP1* yang menunjukkan adanya *smear*. *Smear* yang muncul kemungkinan dikarenakan adanya DNA yang terfragmentasi atau kontaminasi oleh protein (Fibriana dkk., 2012; Skutkova dkk., 2013). Hasil PCR ini menggunakan suhu *annealing* 55 °C selama 30 detik. Hasil PCR dari 4.1.1a lane 1 kemudian dilakukan PCR kembali dengan suhu *annealing* yang sama. Gambar 4.1.1a lane 2 merupakan hasil PCR kembali dari lane 1. Lane 2 menunjukkan adanya lima pita DNA yang muncul

dengan ukuran ≈ 1100 bp dan < 750 bp. Munculnya lima pita DNA tersebut dikarenakan primer *EtIMP1* menempel pada beberapa wilayah sekuens akibat suhu *annealing* yang kurang tepat atau sekuens primer yang kurang komplementer dengan sekuens target (Lorenz, 2012). Pita DNA ≈ 1100 bp memiliki ukuran yang hampir sama dengan gen *EtIMP1* yaitu 1180 bp (NCBI), sedangkan keempat pita DNA lainnya muncul akibat dari penempelan primer yang acak (Lorenz, 2012). Pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan *EtIMP1* kemudian disisipkan ke plasmid pGEMT-Easy.

Gen target yang telah disisipkan ke dalam pGEMT-Easy ditransformasi ke dalam sel *Escherichia coli* DH5 α dan dikultur pada medium luria bertani (LB) agar yang mengandung antibiotik ampisilin, IPTG dan X-Gal untuk *screening blue/white*. Sel bakteri yang membawa gen target pada plasmidnya akan berwarna putih, sedangkan sel bakteri yang tidak membawa gen target akan berwarna biru (Gambar 4.1.2). Gambar 4.1.2a merupakan *E. coli* yang telah disisipkan gen target ke dalam plasmid pGEMT-Easy, sehingga koloni berwarna putih. Gambar 4.1.2b merupakan *E. coli* yang tidak disisipkan gen target dan hanya mengandung plasmid pGEMT-Easy, sedangkan gambar 4.1.2c adalah *E. coli* yang mengandung plasmid pGEMT-Easy yang telah disisipkan gen *luc* (pGEM[®]-*luc*). Koloni *E. coli* yang hanya mengandung pGEMT-Easy berwarna biru dan koloni *E. coli* yang mengandung pGEM[®]-*luc* berwarna putih.



Gambar 4.1.2. *Escherichia coli* DH5 α hasil transformasi dengan a). pGEMT-Easy-*EtIMP1*, b). pGEMT-Easy (kontrol negatif), dan c). pGEM[®]-*luc* Vector DNA (kontrol positif)

Metode *screening blue/white* bekerja dengan mengganggu proses α -*complementation*. α -*complementation* merupakan gabungan antara β -

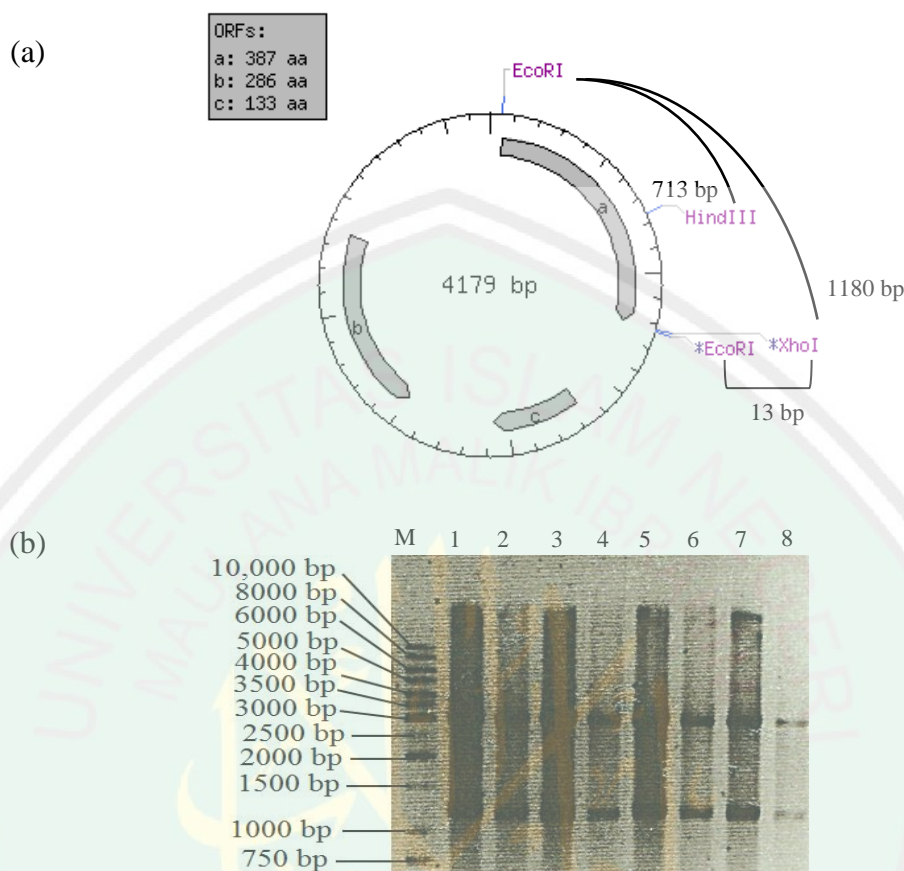
galaktosidase dengan α -peptida. Plasmid membawa urutan *lacZ α* sebuah situs *multiple cloning internal* (MCS) yang dapat dipotong oleh enzim restriksi sehingga DNA asing dapat dimasukkan ke dalamnya, sehingga mengganggu gen yang menghasilkan α -peptida. Akibatnya, dalam sel yang mengandung plasmid gen hasil penyisipan, tidak akan menghasilkan β -galaktosidase fungsional. Keberadaan β -galaktosidase aktif dapat dideteksi oleh X-gal, analog laktosa tidak berwarna yang dapat dibelah oleh β -galaktosidase untuk membentuk *5-bromo-4-chloro-indoxyl*, yang kemudian secara spontan dimerisasi dan dioksidasi menjadi suatu pigmen biru *5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo*, sehingga menghasilkan warna biru yang khas dalam sel yang mengandung β -galaktosidase fungsional. Oleh karena itu koloni biru (Gambar 4.1.2b) menunjukkan bahwa mereka mengandung vektor dengan *lacZ α* yang tidak terputus (tidak ada penyisipan gen dari luar), sedangkan koloni putih (gambar 4.1.2a), di mana X-gal tidak dihidrolisis, menunjukkan adanya penyisipan di *lacZ α* yang mengganggu pembentukan β -galaktosidase aktif (Juers dkk., 2012; Speltz & Regan, 2013).



Gambar 4.1.3. Hasil koloni PCR dengan DNA *Taq Polimerase*

Koloni yang berwarna putih pada gambar 4.1.2a kemudian di PCR untuk mengecek kebenaran adanya gen target. Hasil PCR menunjukkan terdapat sembilan sampel dari sepuluh sampel yang positif membawa gen target dengan ukuran pita DNA \approx 1100 bp. Satu koloni memiliki pita DNA dengan ukuran $<$ 947 bp dan tidak sesuai dengan ukuran gen target (Gambar 4.1.3). Hal tersebut dikarenakan primer *EtIMP1* menempel pada wilayah sekuens yang hampir mirip dengan beberapa sekuens dari primer tersebut (Lorenz, 2012). Kemudian dipilih secara acak empat koloni positif untuk diekstrak plasmidnya. Plasmid hasil

eskraksi dilakukan pengecekan secara molekuler dengan menggunakan pemotongan enzim restriksi dan sekuensing.



Gambar 4.1.4. **a).** pGEMT-Easy-*EtIMP*, **b).** Hasil pemotongan dengan enzim restriksi, 1-4 dipotong dengan EcoRI-HF dan XhoI dan 5-8 dipotong dengan EcoRI-HF dan HindIII

Pemotongan pGEMT-Easy-*EtIMP* dengan enzim restriksi EcoRI-HF dan XhoI menunjukkan hasil yang sesuai dengan ukuran yaitu: ≈ 3000 bp dan ≈ 1100 bp. Akan tetapi pemotongan dengan enzim restriksi EcoRI-HF dan HindIII menunjukkan hasil yang tidak sesuai yaitu: ≈ 3000 bp dan ≈ 1100 bp. Ukuran tersebut hampir sama dengan ukuran pemotongan dengan menggunakan EcoRI-HF dan XhoI. Ukuran yang seharusnya adalah ≈ 3000 bp, ≈ 713 bp, dan ≈ 13 bp (Gambar 4.1.4a-b). Hal tersebut menunjukkan bahwa gen target yang disisipkan di pGEMT-Easy bukan gen *EtIMP1*. Pengecekan selanjutnya dengan sekuensing yang hasilnya dianalisis dengan BLAST di NCBI. Hasil BLAST menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan yang diinginkan. Hasil BLAST menunjukkan

bahwa sekuen yang diduga sebagai *EtIMP1* mirip dengan sekuen yang dimiliki oleh *Eimeria maxima* mRNA for immune mapped protein 1 (*imp-1 gene*), strain Houghton sebanyak 4% (NCBI). Hal tersebut menunjukkan bahwa sekuen dari gen target yang diperoleh tidak ada kemiripan dengan gen *EtIMP1*. Oleh karena itu gen target yang disisipkan ke plasmid pGEMT-Easy bukan merupakan gen *EtIMP1*.

Berdasarkan hasil dari pemotongan dengan enzim restriksi dan sekuensing dari data sebelumnya, maka dilakukanlah beberapa optimasi lanjutan untuk mendapatkan gen target IMP1. Optimasi kedua dilakukan dengan menambah DMSO ke dalam campuran PCR. *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) pada optimasi kedua digunakan sebagai PCR *additives* dengan tujuan untuk mendenaturasi cetakan yang mengandung banyak GC (Hardjasa dkk., 2010) karena Gen *EtIMP1* mengandung 57.3% GC dari total gen dengan jumlah guanin (G) sebanyak 355 dan sitosin (C) sebanyak 321 (Biotools). Hasil dari optimasi ini pada gambar 4.1.1a *lane 3* tidak menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan ukuran *EtIMP1*, yaitu 1180 bp. *Lane 3* hanya terbentuk pita DNA dengan ukuran < 750 bp dan tidak terlihat dengan jelas. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan waktu ekstensi yang kurang sehingga DNA tidak dapat diperbanyak pada saat PCR dan primer menempel pada wilayah yang tidak sesuai (Lorenz, 2012).

Optimasi ketiga dilakukan dengan menurunkan suhu *annealing* sebanyak 2 °C, sehingga menjadi 53 °C. Penurunan suhu *annealing* untuk mengoptimalkan penempelan primer pada sekuen yang sesuai, sehingga produk PCR hanya akan mengamplifikasi gen *EtIMP1* (Lorenz, 2012). Hasil PCR dari optimasi ini menunjukkan adanya tiga pita DNA yang muncul, yaitu satu pita DNA berukuran ≈ 1100 bp dan dua pita DNA berukuran < 750 bp (Gambar 4.1.1a *lane 4*). Pita DNA yang berukuran ≈ 1100 bp terlihat kurang jelas jika dibanding dengan dua pita DNA yang berukuran < 750 bp. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh proses amplifikasi yang kurang pada saat PCR (Lorenz, 2012). Walaupun suhu dari *annealing* sudah diturunkan 2 °C dari optimasi kedua, masih belum mampu menghasilkan pita DNA yang berukuran ≈ 1100 bp yang jelas dan tebal. Optimasi ini masih menghasilkan pita DNA yang tidak diinginkan.

Hasil dari optimasi ketiga sama dengan hasil PCR suhu *annealing* 50 °C pada *lane* 5 dan suhu *annealing* 60 °C pada *lane* 6 (Gambar 4.1.1a), menunjukkan pita DNA yang terbentuk berukuran < 750 bp. Tetapi pada *lane* 5 maupun 6 tidak menunjukkan adanya pita DNA pada ukuran \approx 1100 melainkan hanya muncul *smear* di atas pita DNA yang berukuran \approx 550 bp. Hasil yang sama juga didapatkan dari penurunan suhu *annealingnya* menjadi 43 °C (Gambar 4.1.1c). Hal tersebut menunjukkan bahwa ketiga optimasi tersebut masih belum mampu menghasilkan pita DNA yang spesifik dengan *EtIMP1*. Optimasi berikutnya adalah dengan menggunakan konsentrasi cDNA yang bervariasi, yaitu 124.8 ng dan 208 ng. Optimasi ini menghasilkan tiga pita DNA yang berukuran < 750 bp (Gambar 4.1.1a *lane* 7-8). Hal tersebut kemungkinan primer lebih tertarik untuk menempel pada sekuens dengan ukuran < 750 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa sekuens primer kurang komplementer dengan sekuens DNA target yang diinginkan (Lorenz, 2012).

Optimasi selanjutnya dilakukan dengan cDNA (83,2 ng), cDNA (164,6 ng), cDNA (164,6 ng) + DMSO 3%, dan cDNA (164,6 ng) + 0,5 mM MgCl₂. Hasil PCR dari optimasi ini menunjukkan adanya empat pita DNA, yaitu satu pita DNA berukuran \approx 1100 bp dan tiga pita DNA berukuran < 750 bp (Gambar 4.1.1a *lane* 9-12). Pita DNA yang berukuran \approx 1100 bp terlihat kurang jelas jika dibanding dengan dua pita DNA yang berukuran < 750 bp. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh proses amplifikasi yang kurang pada saat PCR (Lorenz, 2012). Selain itu primer masih menempel pada wilayah sekuens yang berukuran < 750 bp. Optimasi terakhir menggunakan dua primer yaitu *EtIMP1* dan *EmIMP1* dengan dua konsentrasi primer, yaitu 0.5 μ M dan 0.3 μ M. Hasil dari PCR ini, gen *EmIMP1* tidak terbentuk pita DNA (Gambar 4.1.1b *lane* 1-2), sedangkan untuk gen *EtIMP1* terbentuk pita DNA tetapi dengan ukuran < 750 bp (Gambar 4.1.1b *lane* 3-4). Pada optimasi ini masih terbentuk pita DNA dengan ukuran < 750 bp dan tidak terbentuk pita DNA yang berukuran 1180 bp (*EtIMP1*) dan 1147 bp (*EmIMP1*). Menurut Lorenz (2012) hal tersebut kemungkinan besar dikarenakan primer yang kurang komplementer.

Optimasi-optimasi yang telah dilakukan masih belum mampu untuk menghasilkan pita DNA spesifik yang berukuran 1180 bp (*EtIMP1*) dan 1147 bp

(*EmIMP1*). Kendala yang dihadapi akibat primer yang tidak mampu menempel pada sekuens gen target dan menempel pada sekuens yang berukuran < 750 bp. Selain itu tahapan sebelum PCR, misalnya pada tahapan pengubahan RNA menjadi cDNA perlu dicek terlebih dahulu kualitas RNA sebelum diubah dan kualitas cDNA setelah diubah. Allah SWT menjelaskan di dalam Alquran tentang adanya jalan di balik kesulitan, yaitu pada surah Al-Insyirah ayat 5, Allah SWT berfirman:

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا (٥) إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا (٦)

Artinya: “Karena sesungguhnya sesudah **kesulitan** itu ada **kemudahan**, sesungguhnya sesudah **kesulitan** itu ada **kemudahan**.”(Q.S. Al Insyirah: 5)

Ayat di atas menjelaskan bahwa setelah kesulitan pasti ada kemudahan yang diulang sebanyak dua kali. Hal tersebut menunjukkan bahwa pasti ada jalan dari suatu masalah (Ibnu Katsir, 2004). Sesungguhnya bersamaan dengan kesusahan itu terdapat kelapangan (Al-Muyassar, 2016). Menurut tafsir Al-Maraghy (2000) Tidak ada kesulitan yang tidak teratasi, sekalipun menggunakan sarana yang tidak memadai, seseorang bisa meraih apa yang menjadi tujuannya jika mempersejatai diri dengan kesabaran dan tawakal Kepada Allah SWT. Proses sintesis gen *EtIMP1* dan *EmIMP1* terkendala akibat beberapa faktor seperti kualitas cDNA, suhu *annealing* yang mungkin perlu untuk dicek kembali, atau mungkin sekuens primer yang perlu didesain ulang. Oleh karena itu, gen *EtIMP1* dan *EmIMP1* tidak dapat untuk diekspresi dan masih perlu optimasi lanjutan untuk memperoleh gen target yang akan digunakan sebagai cetakan untuk diekspresikan oleh *E. coli* BL21(DE3).

4.2 Protein *Eimeria acervulina* 1433 (*Ea1433*)

Protein 1433 merupakan kelompok molekul yang ada di semua eukariota (Moore & Oerez, 1967; Yaffe dkk. 1997; Shi dkk., 2006), diwakili oleh berbagai isotope yang terdistribusi dalam berbagai sel. Kelompok protein tersebut sangat stabil di seluruh spesies eukariotik (Yaffe dkk. 1997; Shi dkk., 2006). Protein 1433 telah didokumentasi terlibat dalam banyak proses imun patologis-fisiologis

dan seluler dengan memicu atau mengganggu aktivitas protein spesifik (Cau dkk., 2017). Pada apikompleksan protein 1433 memainkan peran penting pada proses invasi parasit, molekular, dan biologikal dengan respon imun (Assossou dkk., 2004; Inoue dkk., 2005; Lalle dkk., 2011; Meng dkk., 2012; Zhao dkk., 2014).

Protein 1433 merupakan protein imunogenik yang mampu menstimulasi aktivitas imun inang pada beberapa parasit ampikompleksan. Meng dkk. (2012) telah melaporkan bahwa antigen 1433 dari *Toxoplasma gondii* menginduksi respon imun yang efektif pada tikus BALB/c dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin DNA baru terhadap toksoplasmosis. Protein ini juga ditemukan dan diuji untuk melawan *E. tenella*. Pada *E. tenella* antigen 1433 telah terbukti berinteraksi dengan aktivitas telomerase dan terlibat pada proses perkembangan dari koksidia (Wang dkk., 2017; Liu dkk., 2018).

Selain ditemukan pada dan *E. tenella*, antigen 1433 ditemukan juga pada *E. acervulina* dan telah diuji pada ayam petelur keturunan-Hy. Antigen *Ea1433* diidentifikasi sebagai salah satu antigen imunodominan umum dari *E. tenella*, *E. acervulina* dan *E. maxima*. Imunogenisitas dan perlindungan dari *Ea1433* terhadap *E. tenella*, *E. acervulina* dan *E. maxima* diselidiki mampu memicu respon imun seluler yang memainkan peran dominan dalam imunitas terhadap koksidiosis (Chapman & Jeffers, 2014; Liu dkk., 2018). Beberapa sitokin telah terbukti terlibat dalam respon imun terhadap infeksi *Eimeria* (Diloul & Lillehoj, 2006; Chapman, 2014), yaitu IFN- γ , IL-2, IL-4, TNFSF15, IL17D and TGF- β , terbukti diproduksi secara signifikan setelah divaksinasi dengan pVAX-Ea14-3-3. Selanjutnya, proporsi Limfosit T CD4⁺/CD3⁺ dan CD8⁺/CD3⁺ meningkat secara signifikan. Peningkatan tersebut sesuai dengan peningkatan dari IFN- γ dan IL-2 (Liu dkk., 2018).

Gen 1433 dari *E. acervulina* disintesis oleh *GeneScript* dan disisipkan pada plasmid pUC57. Plasmid pUC57-*Ea1433* di propagasi pada sel *E. coli* DH5 α untuk memperbanyak plasmid. Plasmid pUC57-*Ea1433* diekstraksi dan dipotong dengan menggunakan BamHI-HF dan XhoI untuk mengeluarkan gen *Ea1433* dari plasmid pUC57. Gen *Ea1433* kemudian disisipkan ke plasmid pET28a(+) untuk proses ekspresi. Sistem pET merupakan sistem yang paling kuat yang telah dikembangkan untuk kloning dan ekspresi protein rekombinan dalam *Escherichia*

coli. Gen target dikloning dalam plasmid pET di bawah kendali yang kuat dari bakteriofag T7 transkripsi dan translasi (Novagen, 1999; Glen dkk., 2014). Plasmid pET28a(+)-*Ea1433* kemudian ditransformasi ke *E. coli* DH5 α kemudian ditransformasi ke *E. coli* BL21(DE3) sebagai inang yang akan mengekspresikan protein *Ea1433*.

pET28a(+)-*Ea1433* ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α dengan tujuan untuk menstabilkan plasmid akibat produksi protein yang toksik bagi sel inang (Glen dkk., 2014). DH5 α merupakan inang yang baik untuk kloning awal DNA target ke dalam vektor pET dan untuk mempertahankan plasmid karena mereka adalah *recA*⁻ *endA*⁻ dan memberikan efisiensi transformasi yang tinggi dan hasil plasmid yang baik (Teodosio dkk., 2012). Sel *E. coli* DH5 α hasil kultur dipilih sepuluh koloni secara acak untuk koloni PCR. Koloni PCR adalah metode yang digunakan untuk mengecek plasmid yang mengandung sisipan yang diinginkan langsung dari koloni bakteri tanpa perlu langkah kultur atau pemurnian plasmid (Pavlov dkk., 2006).

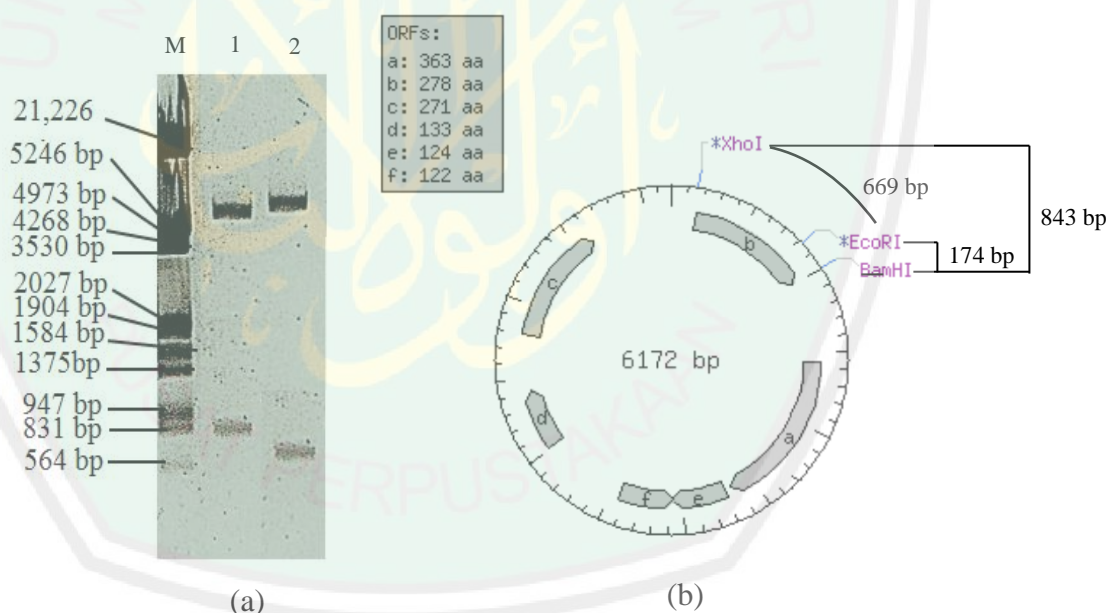


Gambar 4.2.1. Koloni PCR sel *E. coli* DH5 α hasil transformasi

Hasil koloni PCR menunjukkan hanya ada sembilan dari sepuluh koloni yang membawa gen target. Koloni pada *lane* 6 tidak menunjukkan adanya pita DNA, sedangkan koloni pada *lane* 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, dan 10 menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk jelas dengan ukuran 837 bp (Gambar 4.2.1). Satu koloni yang tidak membawa gen target kemungkinan tidak tertransformasi dengan baik pada saat transformasi dengan plasmid pET28a(+)-*Ea1433*. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi yaitu strain bakteri, fase pertumbuhan koloni bakteri, komposisi campuran transformasi, dan ukuran

dari DNA asing. Menurut Liu dkk. (2014) faktor yang paling mempengaruhi proses transformasi adalah strain dari bakteri dan fase pertumbuhan koloni. Strain bakteri yang digunakan haruslah berasal dari sel kompeten dan fase pertumbuhan yang paling baik untuk transformasi adalah pada fase log atau eksponensial.

Hasil pemotongan dengan enzim restriksi menunjukkan ukuran yang sesuai dengan sisi pemotongan. Pemotongan dengan BamHI-HF dan XhoI menunjukkan ukuran pita DNA 5329 bp dan 843 bp, sedangkan pemotongan dengan EcoRI dan XhoI menunjukkan ukuran pita DNA 5503 bp dan 669 bp (Gambar 4.2.2 a). Hasil pemotongan sesuai dengan ukuran pemotongan dari pET28a(+)-*Ea1433* (Gambar 4.2.2. b). Hasil sekuensing yang di BLAST di NCBI menunjukkan kecocokan 100% dengan *Eimeria acervulina* 14-3-3 protein, putative partial mRNA. Berdasarkan hasil pengecekan, maka plasmid selanjutnya ditransformasi ke *E. coli* BL21(DE3) sebagai inang yang akan mengekspresikan protein *Ea1433*.

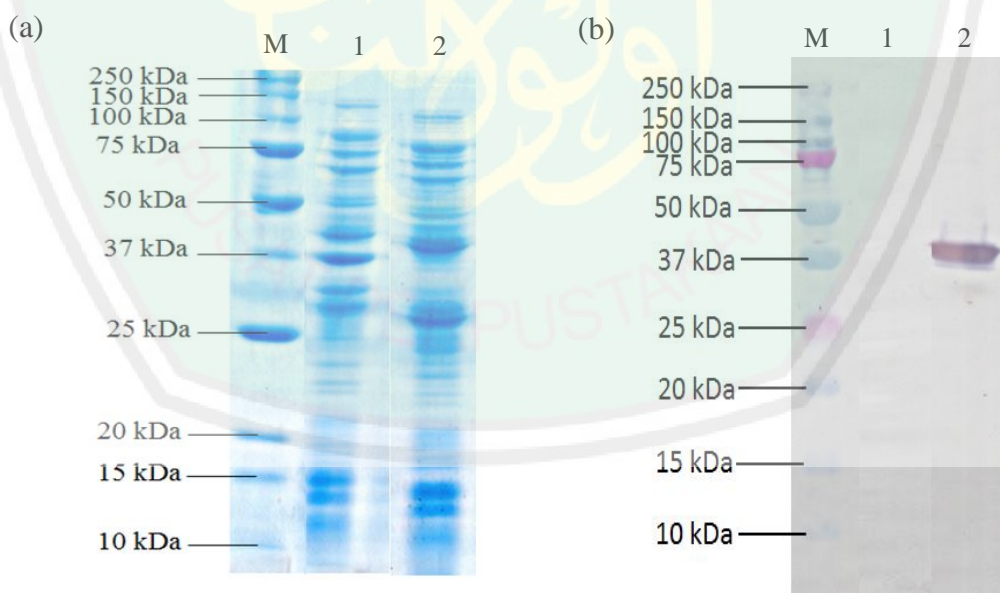


Gambar 4.2.2. **a).** Hasil pemotongan dengan enzim restriksi, M (marker), no. 1 dipotong dengan BamHI-HF dan XhoI dan no. 2 dipotong dengan EcoRI dan XhoI, **b).** pET28a(+)-*Ea1433*

Setelah terbentuk dalam inang tanpa ekspresi, plasmid kemudian ditransformasi ke inang ekspresi yang berisi salinan kromosom dari gen T7 RNA polimerase di bawah kontrol *lacUV5*. Sel inang tersebut adalah strain *E. coli* yang

mengandung salinan kromosom gen T7 RNA polimerase, yaitu *lysogen bakteriofag* DE3 atau BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986; Glen dkk., 2014). Sel bakteri *E. coli* BL21(DE3) yang membawa pET28a(+)-*Ea1433* dikultur pada medium luria bertani broth yang mengandung antibiotik kanamisin dan isopropil- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). IPTG digunakan untuk menginduksi terjadinya ekspresi dengan cara mengubah konformasi dari *repressor lacI*, menyebabkan *repressor lacI* terikat dengan IPTG dan RNA polimerase *E. coli* mulai mentranskripsi gen T7 sehingga proses ekspresi dimulai (Glen dkk., 2014; Wurm dkk., 2016).

Hasil SDS-PAGE pada gambar 4.2.3a menunjukkan bahwa semua sampel mengekspresikan protein dengan ukuran yang beragam. Hal tersebut karena metode ini hanya bisa memisahkan molekul-molekul bermuatan dalam campuran dengan massa molekulnya di medan listrik. Gambar 4.2.3a menunjukkan bahwa sampel bakteri yang dikultur pada suhu 37 °C berhasil mengekspresikan protein di dalam selnya, baik itu protein struktural maupun fungsional. Oleh karena itu, sampel yang digunakan untuk SDS-PAGE selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk proses *western blot*.



Gambar 4.2.3. **a).** Hasil SDS-PAGE, M = marker, *lane 1* = pET28a(+) (kontrol), dan *lane 2* = pET28a(+)-*Ea1433*, **b).** hasil *western blot*, M = marker, *lane 1* = pET28a(+) (kontrol), dan *lane 2* = pET28a(+)-*Ea1433*

Sampel yang telah dicek dari SDS-PAGE selanjutnya diuji dengan *western blot* untuk melihat ada atau tidaknya protein *Ea1433*. Proses ini menggunakan antibodi primer *mouse anti-his 6X tag* dan antibodi sekunder menggunakan *goat anti-mouse IgG (H+L) HRP*. Hasil *western blot* menunjukkan sampel pET28a(+) (kontrol) pada *lane 1* tidak mengekspresikan protein *Ea1433* yang ditunjukkan dengan tidak adanya pita protein yang muncul. Hal ini dikarenakan pada sampel pET28a(+) tidak terdapat gen target yang disisipkan, tetapi hanya plasmid saja. Sampel pET28a(+)-*Ea1433* pada *lane 2* menunjukkan adanya pita protein spesifik untuk protein *Ea1433* dengan ukuran 37 kDa (Gambar 4.2.3b). Munculnya protein dengan ukuran 37 kDa menunjukkan bahwa plasmid pET28a(+)-*Ea1433* mampu untuk mengekspresikan protein *Ea1433* karena plasmid tersebut membawa gen *Ea1433* yang digunakan sebagai cetakan pada saat transkripsi dan akan dibaca pada tahapan translasi. Transkripsi dan translasi merupakan dua langkah utama pada proses ekspresi protein (Hickman dkk., 2008; Echeverría dkk., 2009; Campbell dkk., 2017).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa protein target *Eimeria tenella immune mapped protein 1* (*EtIMP1*) dan *E. maxima immune mapped protein 1* (*EmIMP1*) tidak dapat diekspresikan, sedangkan protein *E. acervulina* 1433 (*Ea1433*) berhasil diekspresikan.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian berikutnya antara lain:

1. Suhu *annealing* primer *EtIMP1* dan *EmIMP1* perlu dilakukan optimasi, sehingga diperoleh suhu yang tepat untuk proses penempelan primer pada sekuens DNA komplementernya.
2. Perlu diketahui kualitas RNA yang digunakan dan cDNA yang dihasilkan dalam proses RT sebelum disintesis melalui PCR.
3. Desain ulang primer *EtIMP1* dan *EmIMP1* untuk dibandingkan hasilnya dengan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mukhtasar. 2013. **Mukhtashar Zadul Ma'ad**. Terjemahan Asep Sobari dik Al-I'tishom. Jakarta.
- Al-Muyassar. 2016. **Tafsir Muyassar**. Terjemahan Hikmat Basyir, Hazim Haidar Dr. Musthafa Muslim, & Abdul Aziz Ismail. Pustaka Darul Haq Jakarta.
- Alexandratos, N. & N. Bruinsma. 2012. **World Agriculture towards 2030/2050**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Allen, P. C. & R. H. Fetterer. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(1): 58-65.
- Assossou, O., F. Besson, J. P. Rouault, F. Persat, J. Ferrandiz, M. Mayencon, F. Peyron & S. Picot. 2004. Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *FEMS Microbiology Letters*. 234(1):19–25.
- ATTRA. 2006. Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis. <https://attra.ncat.org>. Diakses 3 Januari 2018.
- Barbour, E. K., D. B. Ayyash, A. Iyer, S. Harakeh & T. Kumosani. 2015. A Review of Approaches Targeting the Replacement of Coccidiostat Application in Poultry Production. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17(4): 405-418.
- Beraa, A. K., D. Bhattacharyaa, D. Pana, A. Dharab, S. Kumarc & S. K. Das. 2010. Evaluation of Economic Losses due to Coccidiosis in Poultry Industry in India. *Agricultural Economics Research Review*. 23: 91-96.
- Biotoools. 2019. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. <http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Diakses 10 November 2019.
- Blake, D. P., K. J. Billington, S. L. Copestake, R. D. Oakes, M. A. Quail, K. L. Wan, M. W. Shirley & A. L. Smith. 2011. Genetic mapping identifies novel highly protective antigens for an apicomplexan parasite. *PLoS Pathogen*. 7: e1001279.
- Blake, D. P. & F. M. Tomley. 2014. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*, 30(1): 12-19.
- Blake, P. D., I. Pastor-Fernandez, M. J. Nolan, dan F. M. Tomley. 2017. Recombinant anticoccidial vaccines – a cup half full? *Infection, Genetic and Evolution*. 55:358-365.

- Briand, L., G. Marcion, A. Kriznik, J. M. Heydel, Y. Artur, C. Garrido, R. Seigneuric, & F. Neiers. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Report*. 1-11.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky & R. B. Jackson. 2017. **Biologi**. (Edisi ke-11). Pearson Education, Inc. New Jersey.
- Chapman, H. D., T. E. Cherry, H. D. Danforth, G. Richards, M. W. Shirley & R. B. Williams. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: The role of live vaccines. *International Journal for Parasitology*. 32: 617–629.
- Chapman, H. D. & T. K. Jeffers. 2014. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4: 214-217.
- Cosentino, S., G. S. Podda, A. Corda, M. E. Fadda, M. Deplano & M. B. Pisano. 2010. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *Journal of Preventive Medicine Hygiene*. 51:31–36.
- Dalloul, R. A. & H. S. Lillehoj. 2005. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Disease*. 49(1):1-8.
- Deplazes, P., J. Eckert, A. Mathis, G. von Samson-Himmelstjerna & H. Zahner. 2006. **Parasitology in Veterinary Medicine**. Wageningen Academic Publisher. Wageningen.
- Echeverría, C., A. R. A. Marshall, M. Dorywalska & J. D. Puglisi. 2009. **Single Molecule Biology**. Academic Press. Cambridge.
- Fibriana, F., Widiarti, T., Retnoningsih, A. & Susanti. 2012. Deteksi Daging Babi Pada Produk Bakso di Pusat Kota Salatiga menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Biosantifika*. 4 (2): 106-112.
- Food and Agriculture. 2017. Livestocks. <http://www.fao.org/livestock-systems/production-systems/chicken/en/>. Diakses pada tanggal 5 Juni 2019.
- Frolich, S. & M. Wallach. 2016. Use of fluorescent nanoparticles to investigate nutrient acquisition by developing *Eimeria maxima* macrogametocytes. *Scientific Reports*. 6: 29030.
- Fruitos, E.G. 2010. Inclusion bodies: a new concept. *García-Fruitós Microbial Cell Factories*. 9: 2-3.
- Gilbert, E. R., C. M. Cox & P. M. Williams. 2011. *Eimeria* species and genetic background influence the serum protein profile of broilers with coccidiosis. *PLoS ONE*. 6(1): e14636.

- Gilda, J. E. & A. V. Gomes. 2013. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Analytical Biochemistry*. 440(2): 186–188.
- Haile, G. H. 2018. Review on Eimeria: The Role of Characteristic Lesions as Routine Diagnostic Technique. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 6(7): 9-18.
- Hardjasa, A., M. Ling, K. Ma & H. Yu. 2010. Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 16: 161-164.
- Hickman, C. P., L. S. Roberts, S. L. Keen, A. Larson, H. P'Anson & D. J. Eisenhour. 2008. **Integrated Principles of Zoology**. (Edisi ke-14). McGraw Hill Higher Education. New York.
- Ibnu Katsir. 2004. **Tafsir Ibnu Katsir**. Terjemahan oleh M. Abdul Ghoffar E.M., Abdurrahim Mu'thi, & Abu Ihsan Al-Atsri. Pustaka Imam Asy-Syafi'i. Bogor.
- Innes, E. A. & A. N. Vermeulen. 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology*. 133: 145-168.
- Inoue, M., Y. Nakamura, K. Yasuda, N. Yasaka, T. Hara, A. Schnauffer, K. Stuart & T. Fukuma. 2005. The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(14):14085–96.
- Jadhav, B. N., S. V. Nikam, S. N. Bhamre & E. L. Jaid. 2011. Study of *Eimeria necatrix* in broiler chicken from Aurangabad District of Maharashtra state India. *International Multidisciplinary Research Journal*. 1(11): 11-12.
- Jan, K. 2006. **DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup**. Jones and Bartlett Learning. Massachusetts.
- Jenkins, M. C., R. Fetterer, K. Miska, W. Tuo, O. Kwok & J. P. Dubey. Characterization of the *Eimeria maxima* sporozoite surface protein IMP1. *Veterinary Parasitology*. 211: 146-152.
- Juers, D. H., Matthews, B. W. & Huber, R. E. 2012. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*. 21(12): 1792-1807.
- Klug, W. S., M. R. Cummings & C. A. Spencer. 2018. **Concept of Genetics**. Perason Education Inc. New York.
- Kundu, K., R. Garg, Kumar, M. Mandal, F. Tomley, D. & Blake, P. Banerjee. 2017. Humoral and cytokine response elicited during immunisation with recombinant immune mapped protein-1 (*EtIMP-1*) and oocysts of *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*. 244: 44-53.

- Lai, K., E. Bromley, R. Oakes, J. H. Prieto, S. J. Sanderson, D. Kurian, L. Hunt, J. R. Yates, J. M. Wastling, R. E. Sinden & F. M. Tomley. 2009. Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *NIH Public Access*. 9(19): 4566-4576.
- Lalle, M., C. Curra, F. Ciccarone, T. Pace, S. Cecchetti, L. Fantozzi, B. Ay, C. B. Breton & M. Ponzi. 2011. Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with *Plasmodium* 14-3-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(2):1227-1236.
- Lassen, B. & T. Lepik. 2014. Isolation of *Eimeria* Oocyst from Soil Samples: a simple method described in detail. *Journal of Agriculture Science*. 25(2): 77-81.
- Lauer, K. B., R. Borrow & T. J. Blancharda. 2017. Multivalen and Multipathogen Viral Vector Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*. 24(1): e00298-16.
- Liu, X., L. Liu, Y. Wang, X. Wang, Y. Ma & Y. Li. 2014. The Study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27(3): 679-684.
- Liu, J., L. Liu, L. Li, D. Tian, W. Li, L. Xu, R. Yan, X. Li & X. Song. 2018. Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14-3-3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. *BMC Veterinary Research*. 14(337): 1-11.
- Lillehoj, H. S. 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *International Journal of Parasitology*. 28:1071-1081.
- Lillehoj, H. S. & E. P. Lillehoj. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Disease*. 44:408-425.
- Lillehoj, H. S., W. Min & R. A. Dalloul. 2004. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science*. 83:611-623.
- Lillehoj, H. S., X. Ding, R. A. Dalloul, T. Sato, A. Yasuda & E. P. Lillehoj. 2005. Embryo Vaccination Against *Eimeria tenella* and *E. acervulina* Infections Using Recombinant Proteins and Cytokine Adjuvants. *The Journal of Parasitology*. 91(3):666-673.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63: 1-15.
- Mahmood, T. & P. C. Yang. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *National America Journal of Medical Science*. 4(9): 429-434.

- McBride, W. J. H. 2010. Chemoprophylaxis of Tropical Infectious Diseases. *Pharmaceuticals*. 3: 1561-1575.
- McDonald, V. & M. W. Shirley. 2009. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*. 136(12): 1477-1489.
- Meng, M., S. He, G. Zhao, Y. Bai, H. Zhou, H. Cong, G. Lu, Q. Zhao, X. Q. Zhu. 2012. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice. *Parasites and Vectors*. 5(1): 273.
- Miller, J. C., S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng, D. E. Paschon, E. Leung, S. J. Hinkley, G. P. Dulay, K. L. Hua, I. Ankoudinova, G. J. Cost, F. D. Urnov, H. S. Zhang, M. C. Holmes, L. Zhang, P. D. Gregory & E. J. Rebar. 2010. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*. 29 (2): 143–148.
- Min, W., R. A Dalloul & H. S. Lillehoj. 2004. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *Journal of Veterinary Science*. 5(4): 279–288.
- Mohammed, B. R. & O. S. Suday. 2015. An Overview of the Prevalence of Avian Coccidiosis in Poultry Production and Its Economic Importance in Nigeria. *Veterinary Research International*. 3(3): 35-45.
- Moore, B. & V. J. Oerez. 1967. **Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. New Jersey.
- Moritz, C. P., S. X. Marz., R. Reiss, T. Schulenburg & E. Friauf. 2014. Epicocconone staining: A powerful loading control for Western blots. *Proteomics*. 14(2–3): 162–168.
- Murray, C. J. L., V. T Lozano, R. Naghavi, A. D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J. A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, J. Abraham. 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380: 2197–2223.
- Nascimento, I. P. & L. C. C. Leite. 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45: 1102-1111.
- NCBI. 2013. Nucleotide. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/482425887>. Diakses 10 November 2019.
- NCBI. 2015. Nucleotide. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_013394831. 1. Diakses 10 November 2019.
- NCBI. 2019. BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses 12 Juni 2019.

- NCBI. 2019. BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses 12 Juni 2019.
- Nematollahi, A., G.H. Moghaddam & P. R. Farshbaf. 2009, Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). *Munis Entomology & Zoology*. 4(1), 53–58.
- Nolan, M. J., F. M. Tomley, P. Kaiser & D. P. Blake. 2015. Quantitative real-time PCR (qPCR) for *Eimeria tenella* replication-Implications for experimental refinement and animal welfare. *Parasitology International*. 64(5): 464-470.
- Novagen. 1999. **pET System Manual**. Novagen, Inc. Madison.
- Peek, H. W. & W. J. Lanmand. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*. 31(3):143-161.
- Phelps, K. R. 2013. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update. *Molecular Biology of the Cell*. 24(17): 2593-2596.
- Price, K. R. 2015. Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. *Poultry Science Association*. 1: 681-692.
- Radji, M. 2009. Vaksin DNA: Vaksin Generasi Keempat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 6(1): 28-37.
- Raman, M. R. U., S. S. Banu, S. S. Banu, S. G. A. Gomathinayagam, & G. D. Raj. 2011. Lesion scoring technique for assessing the virulence and pathogenicity of Indian field isolates of avian *Eimeria* species. *Veterinarski Archive*. 81(2): 259-271.
- Reglinski, M., G. Ercoli, C. Plumtre, E. Kay, F. C. Petersen, J. C. Paton, B. W. Wren & J. S. Brown. A recombinant conjugated pneumococcal vaccine that protects against murine infections with a similar efficacy to Prevnar-13. *Nature Partner Journal*. 53: 1-11.
- Rosenberg, A. H., B. N. Lade, D. Chui, S. Lin, J. J. Dunn & F. W. Studier. 1987. *Gene*. 56: 125.
- Roth, J. A. 2011. Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia in Vaccinology*. 5: 127-136.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 5463-5467.
- Sathiamoorthy, S. & J. A. Shin. 2012. Boundaries of the origin of replication: creation of a pET-28a-derived vector with p15A copy control allowing compatible coexistence with pET vectors. *PLoS One*. 7(10):e47259.

- Shi, H., X. Wang, D. Li, W. Tang, H. Wang, W. Xu & L. Xi. 2006. Molecular characterization of cotton 14-3-3L gene preferentially expressed during fiber elongation. *Journal of Genetics and Genomics*. 34:151–9.
- Shi, T., G. Tao, G. Bao, J. Suo, L. Hao, Y. Fu & X. Suo. 2016. Stable Transfection of *Eimeria intestinalis* and Investigation of Its Life Cycle, Reproduction and Immunogenicity. *Frontier Microbiology*. 7: 807.
- Shirley, M. W. & H. S. Lillehoj. 2012. The long view: a selective review of 40 years of coccidiosis research. *Avian Pathology*. 41(2):111–121.
- Skutkova, H., M. Vitek, P. Babula, R. Kizek, & I. Povaznik. 2013. Classification of genomic signals using dynamic time warping. *BMC Bioinformatics*. 14: 1-7.
- Speltz, E. B. & L. Regan. 2013. White and green screening with circular polymerase extension cloning for easy and reliable cloning. *The Protein Society*. 22: 859-864.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt. 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal Molecular Biology*. 189: 113.
- Tan, L., Y. Lin, X. Yang, Q. Ke, W. Lei, M. N. Mughal, R. Fang, Y. Zhou, B. Shen & J. Zhao. 2017. Genetic diversity and drug sensitivity studies on *Eimeria tenella* field isolates from Hubei Province of China. *Parasites and Vectors*. 10(137):1-10.
- Teodósio, J. S., M. Simoes, M. A. Alves, L. F. Melo & F.J. Mergulhao. 2012. Setup and Validation of Flow Cell Systems for Biofouling Simulation in Industrial Settings. *The Scientific World Journal*. 1: 1-10.
- USDA. 2019. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Rome.
- Vermeulen, A. N., D. C. Schaap & T. P. Schetters. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*. 100:13–20.
- Wang, X., A. S Kiess, E. D. Peebles, K. G. S. Wamsley & W. Zhai. 2018. Effects of *Bacillus subtilis* and zinc on the growth performance, internal organ development, and intestinal morphology of male broilers with or without subclinical coccidia challenge. *Poultry Science*. 97(11): 3947–3956.
- Willey, J. M., L. M. Sherwood & C. J. Woolverton. 2008. **Prescott, Harley, and Klein's Microbiology**. Edition 7th. McGraw Hill. New York.
- Williams, R. B. 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*. 29(8): 1209–1229.
- Williams, R. B., 2002. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952–2002). *Avian Diseases*. 46:775–802.

- Williams. 2011. *Eimeria* species and genetic background influence the serum protein profile of broilers with coccidiosis. *PLoS ONE*. 6(1): .1-10.
- Wurm, D. J., L. Veiter, S. Ulonska, B. Eggenreich, C. Herwig & O. Spadiut. 2016. The *E. coli* pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:8721–8729.
- Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon & L. Cantley. 1997 The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 91:961–971.
- Yang, J., W. Zhu, J. Huang, X. Wang, X. Sun, B. Zhan & X. Zhu. 2016. Partially protective immunity induced by the 14-3-3 protein from *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*. 231:63–8.
- Yin, G., M. Qin, X. Liu, J. Suo, X. Tang, G. Tao, Q. Han, X. Suo & W. Wu. 2013. An *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 440: 437-442.
- Yin, G., Q. Lin, J. Qiu, M. Qin, X. Tang, X. Suo, Z. Huang & X. Liu. 2015. Immunogenicity and protective efficacy of an *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and chicken CD40 ligand. *Veterinary Parasitology*. 210(1-2):19-24.
- Young, R. & A. Craig. 2001. **The Use and Misuse of Antibiotics in UK Agriculture – Part 3. Residues of Dangerous Drugs in Intensively Produced Chicken Meat and Eggs.** The Soil Association. Bristol.
- Yun, C. H., H. S. Lillehoj & E. P. Lillehoj. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*. 24:303-324.
- Zhao, N., P. Gong, B. Cheng, J. Li, Z. Yang, H. Li, J. Yang, G. Zhang & X. Zhang. 2014. *Eimeria tenella*: 14-3-3 protein interacts with telomerase. *Parasitology Research*. 113(10):3885–9.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil sekuensing

a. Hasil sekuensing dari *Ea1433*

```
>3586520_A_T7_promoter
NNNNNGNNNNNNANNTTCNTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACC
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCAGCCAT
ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGGATCCATGATTGAGGACATCAAG
ACTCTTCGCAGGAGCATGTGTACCAGCCAGCTCGCTGAGCAGGCAGGAGCCTATGAC
GAGATGGCCGAGGCCATGAAGAAGCTTGGTGGAGAAGTGTCTCAGTACAGAACAGTCCACC
CCAGGTGGCAAGGGAGACGAGTTGACTGTGGAGGAGAGGAAC TTGCTTAGCGTTGCCATC
AAGAAGCCGTGGGAGCGCCGTGCTAGCTGGCCATATTTCTTCTGTCGAGCAGAAG
GAAAGCAACAGGAACACATGACGAACAAAGCACTTGCAGCTAGCTACAGACAGAAGGTT
GAAAATGAGCTCAACAAAATATGCCAAGAAATCTTACCCTGCACAGTACAGCAGGCTG
CCCCGACCCAGGATCTGAGAGCCGTGTTTCTACTTTAAGATGAAGGGGGAC TACTAC
CGGTACATTTCTGAGTTCAGCAACGAAGAAGGGAAGAAGGCATCAGCAGAAGAGCCGAA
GAGTGTACAAGCGTGCAGGACACCCTGAAGCAGAGCTCCCGTCTACGCCACCCAACT
CGTTTGGGCTGGCCGTAAC TACTCCGTGTTCTACTATGAAATTTCTCAATCAGCCGAC
AAGGCTTGTGAAATGGCCAGCTGGCTTTT GATGATGCATAAACC GAATTCGACAGCGTT
TCCGAGGAGCTTACAAGGATTCAC TTTGATCATGCACTGTTGCGCGACAACTGACG
CTCTGGACAGTGCATGTCAGACGCAGGAGCAGCAGCAGCAGCCGTGGGGGAAGGCGCC
GAGGCGCCAAGGTGGAAGCTACTACTGAGCAGCAGCTCGAGCACCACCCACCCACTT
GAGTCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGC
AATAAGCATAAACCCCTGGGGCTTAACGGGCTTGGGGGTTTTTGTGAAAGGAG
GAATAAATCCGGATTGGCAAGGGAACCCCTGAACCCGCCATTAACCCGCGGGGGG
GGGGGTTACGCCAAGGGGACGTTACTTGGCAGGCCAAGCCCGCTTTNNTTTTTT
CTTTTTTCCCCCTTCCGGTTTCCCCCAACC TAAAAGGGGGGCCNCTTGGTTGTTA
TTTTTTTTTTTTGCCCCCCCCCAANNATTTAGGGGGGGCCCCNGGCCCCCC
```

b. Hasil sekuensing dari *EtIMP1*

```
>3586525_C_SP6
GNNNNNNNNNTCCACGC GTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGC GGCCGGA
ATTCAC TAGTGATTCCGCTC GAGAGTTGCTGCCGCACATGGGGACGTCACGACAGAATCC
CGTGGATGCAATGCAAAACCCAGCCGCTACATATATGCTAAACAAAAACGCTGCACA
CTGCTACTCTCCGCGCTAAACCCACGCATCCACTTTCAGGTCCACTCTTCCGCGAAATACAC
CGAAAATCGCTGCACATTTCCGCGCAACGCAGCAGATACCTACC GACCCAAACAGCTCC
ACACACTGCTTTATAATGGCCGTGACGCCACACAAAACCCGGTAATCAAACATCCAGC
AAGAGAGCC TCACTTAACGGGGTGGATCATGCGCCTCTGTAACGGTATCATCCGGGAG
ATTGACATAC TAGTGCAGCACC GTTGGCGCTGTCCTCAACGGCAAAGGAAAATGCTGACG
AGATACAGGTAGTGCCTGCAATTCAGCCACCCCTCCTGTGCTGCGACGCAAGCCACTAAA
GACACGAAAC TCGAGCTCTGTCTTTATACGCACACCCGACGCGACATAATCTGCCCTC
ATTGTAGGCTGCAAGTCCACACAGTTCCACAGCTAGTCAAGACAGACC TGCCTGCAATC
GGAGAGATTCCATCAGATAGAGTGTATCCCGGGCCATCACCGGCAACTAGTCAATGCC
ACACTCACAGTGCAGTGCAGCTACCCGTAAGGCAAGCAGAAAGGACACGAGGATGCGATG
CATCCACCC TTTGTGGGCATAGCTATTTCTGCTGACCAAGCCGACGCAATGTGTAGAAGC
GCCAAAGCCAAATCACAGTGGCGGGCTGACGATGCAGAAAAATCCCAAACATCTTTCTA
CCGCTTTCGCAAGTGGCCGAGAAGCACAGCAGTTCAACGCAAAAGTGTACGCAAGCCGACG
GGACTCCCAAATGCAGAGCCGCC TTTTACCGGGGGTGGAGTTCCGACGCAAAAGAAACGA
CCTACTGCTGCATTAATCAAGTCAATGGCCACTCCATCGCTTCTTATCCCCGACGCA
CGGACC AAAAACGCCAAGGC GNGGTTAGTGCCCTTCCGCACTGAAAGTGACCCGATCGGC
AAAGGCACAGAGGAAGAAACGCTCAAAATCC TCCAGCTCAAAAAGCCAACTAGCTCGGGC
CGGAAAGAACCCCTTCTCCACTCGGGAAAAATCC TCCAGGGGGAACAAATTTCTAAANN
NAATNNGG GGGNNNNNNGGGGNNNNNANNNGANAGCGGGGCCCATTTCCCAAAGGNN
NGGATATAAAAATNNGGGCCCGCTTTAACGGGGGGGGGAAAACNNGGGGNACCCCA
TATATCCCTGGGACAAACCCCTTTCCCCCGGGGAAAAAAAAGNNCCCCCNCC
ACTTTGCCCCAGAGGAGGGACCCCNNGNACCACACNNGGGGGGGGAGCACAAAG
CAAATAAAGCCCCCTTTTTTTTTTTTCCCCGNCNNAAGGGCGNCTTTTTANNCC
CCAC
```

Lampiran 2. Hasil Blast di NCBI

c. Blast hasil sekuensing dari *Ea1433*

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100
<input checked="" type="checkbox"/> select all 5 sequences selected							GenBank	Graphics	Distance tree of results	
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession			
<input checked="" type="checkbox"/>	Eimeria acervulina 14-3-3 protein, putative partial mRNA	1456	1456	95%	0.0	100.00%	XM_013394831.1			
<input checked="" type="checkbox"/>	Eimeria maxima 14-3-3 protein, putative partial mRNA	924	924	95%	0.0	87.68%	XM_013480135.1			
<input checked="" type="checkbox"/>	Eimeria necatrix 14-3-3 protein, putative partial mRNA	830	830	95%	0.0	85.68%	XM_013581868.1			
<input checked="" type="checkbox"/>	Eimeria tenella 14-3-3 protein partial mRNA	819	819	95%	0.0	85.42%	XM_013374079.1			
<input checked="" type="checkbox"/>	Eimeria tenella 14-3-3 protein mRNA, complete cds	819	819	95%	0.0	85.42%	AF056715.1			

d. Blast hasil sekuensing dari *EtIMP1*

Sequences producing significant alignments Download ▾ Manage Columns ▾ Show 100 ▾ ?

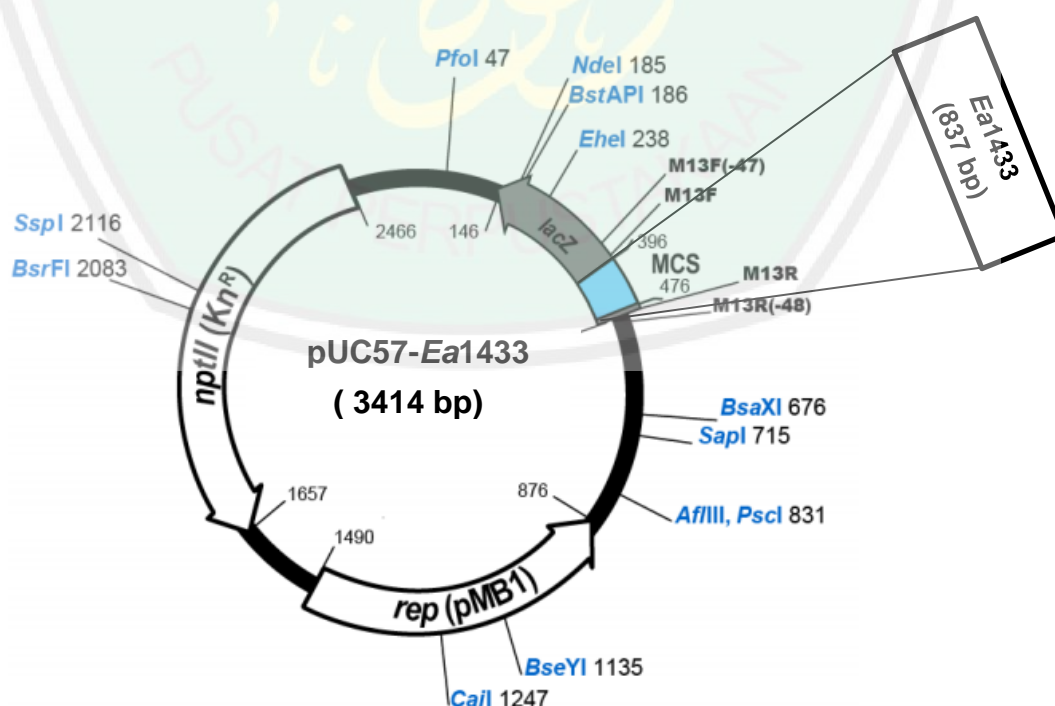
select all 4 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria maxima mRNA for immune mapped protein 1 (imp-1 gene), strain Houghton	111	111	4%	2e-23	98.44%	FN813228.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria maxima Green fluorescent protein, related partial mRNA	71.3	71.3	2%	4e-11	95.45%	XM_013480425.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria maxima Green fluorescent protein, related partial mRNA	71.3	71.3	2%	4e-11	95.45%	XM_013480423.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria acervulina GFP-like fluorescent chromoprotein FP506, related partial mRNA	71.3	71.3	2%	4e-11	95.45%	XM_013393261.1

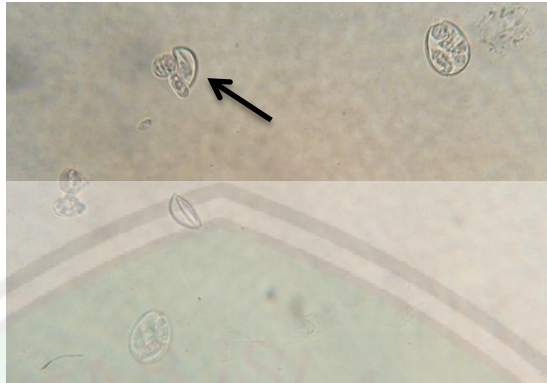
Lampiran 3. Tabel konsentrasi RNA, cDNA dan DNA

Sampel	Abs230	Abs260	Abs280	260/280	260/230	Kons (ng/μL)
RNA	5,070	1,324	0,877	1,51	0,26	66,2
RNA	4,703	2,532	1,641	1,54	0,54	101,3
cDNA	-0,436	5,520	-2,547	-2,17	-12,67	182,1
pUC57-	3,930	8,934	4,907	1,82	2,24	446,7
pGEMT-Easy- <i>EtIMP1</i>	1,408	3,095	1,674	1,85	2,20	151,7
pET28a(+)- <i>Ea1433</i>	2,326	0,445	0,237	1,88	2,00	223

Lampiran 4. Plasmid pUC57-*Ea1433*



Lampiran 5. *Eimeria* yang mengalami lisis dengan glass beads





BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Syafrudin
NIM : 15620106
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019/2020
Pembimbing : Kholifah Holil, M. Si
Judul Skripsi : Ekspresi Protein Rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* sebagai Protein Target dalam Pembuatan Vaksin Koksidirosis pada Ayam

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	11 Januari 2019	Konsultasi Judul Penelitian	1. ✓
2.	21 Januari 2019	Konsultasi BAB I, BAB II, dan BAB III	2. ✓
3.	23 Januari 2019	Konsultasi BAB I dan BAB III	3. ✓
4.	24 Januari 2019	Konsultasi BAB I, BAB II, dan BAB III	4. ✓
5.	01 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	5. ✓
6.	05 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	6. ✓
7.	07 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	7. ✓
8.	12 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	8. ✓
9.	14 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	9. ✓
10.	20 Agustus 2019	Konsultasi BAB I	10. ✓
11.	10 September 2019	Konsultasi BAB I	11. ✓
12.	18 September 2019	Konsultasi BAB I	12. ✓
13.	25 September 2019	Konsultasi BAB III	13. ✓
14.	07 Oktober 2019	Konsultasi BAB III	14. ✓
15.	09 Oktober 2019	Konsultasi BAB III	15. ✓
16.	15 Oktober 2019	Konsultasi BAB III	16. ✓
17.	25 November 2019	Konsultasi BAB II	17. ✓
18.	27 November 2019	Konsultasi BAB II	18. ✓

19.	01 Desember 2019	Konsultasi BAB II	19. ✓
20.	02 Desember 2019	Abstrak dan Konsultasi BAB IV	20. ✓
21.	03 Desember 2019	Konsultasi BAB IV dan BAB V	21. ✓
22.	04 Desember 2019	Acc Skripsi	22. ✓

Pembimbing Skripsi,



Kholifah Holil, M. Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Malang, 5 Desember 2019

Ketua Jurusan,



Romardi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019





KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gayamsari No. 59 Malang 65144 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933
BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Syafrudin
NIM : 15620106
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019/2020
Pembimbing : Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc
Judul Skripsi : Ekspresi Protein Rekombinan *Ea1433*, *EtIMP1*, dan *EmIMP1* sebagai Protein Target dalam Pembuatan Vaksin Koksidiosis pada Ayam

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	09 Januari 2019	Integrasi Al-Qur'an dan Hadits BAB I	1.
2.	11 Januari 2019	Konsultasi BAB I dan BAB II	2.
3.	26 November 2019	Konsultasi BAB I, BAB II, dan BAB IV	3.
4.	02 Desember 2019	Konsultasi BAB I dan BAB II	4.
5.	03 Desember 2019	Konsultasi BAB I dan BAB II	5.
6.	04 Desember 2019	Konsultasi BAB I, BAB II, dan BAB IV	6.

Pembimbing Skripsi,

Mujahidin Ahmad, S. Pt., M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002



Malang, 5 Desember 2019
Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019