

Variasi Morfologi dan Deteksi *Leucocytozoon caulleryi* dengan Metode PCR pada Ayam Ras di Wilayah Endemis Indonesia

Morphological Variation and Detection of Leucocytozoon caulleryi by PCR on Domesticated Chickens (Gallus Sp.) in Endemic Area of Indonesia

Endang Suprihati¹, Wiwik Misaco Yuniarti²

¹Departemen Parasitologi, ² Departemen Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Kampus C, Surabaya, 60115
 Email: esuprihati@yahoo.co.id; wiwikmisaco@yahoo.com

Abstract

The purpose of this study was to analyze the variation in morphology and detection *Leucocytozoon caulleryi* by PCR in mtDNA genes *cyt b* that attacking bred chickens in endemic areas of Indonesia. This study was divided into three stages, data collection of *Leucocytozoonosis* cases in endemic areas of Indonesia; identification of parasites *Leucocytozoon caulleryi* morphologically through microscopic examination; and the identification of *Leucocytozoon caulleryi* *cyt b* genes that attack bred chickens in endemic areas by PCR. The results showed that there are variations in morphology of *Leucocytozoon caulleryi* that attacking chicken in endemic areas of Indonesia. Gamete morphometry of *L. caulleryi* had an average length and width 18.233 ± 4.672 dan 12.934 ± 3.349 μm . Nested PCR clearly showed positive reaction of *Leucocytozoon* infections by amplicons in 600 bp and 03 bp length.

Key words: *Leucocytozoon caulleryi*, *cyt b* gene, domesticated chicken, Indonesia

Abstrak

Tujuan penelitian untuk menganalisis variasi morfologi dan deteksi *Leucocytozoon caulleryi* dengan metode PCR pada mtDNA gen *cyt b* yang menyerang ayam ras di wilayah endemis Indonesia. Penelitian ini dibagi dalam tiga tahap, yaitu: koleksi data kejadian kasus *Leucocytozoonosis* di daerah endemis Indonesia (63 ekor ayam dengan gejala klinis *Leucocytozoonosis*); identifikasi parasit *Leucocytozoon caulleryi* secara morfologis melalui pemeriksaan mikroskopis (15 sampel darah positif); dan identifikasi gen *cyt b* *Leucocytozoon caulleryi* yang menyerang ayam ras di daerah endemis dengan metode PCR (15 sampel darah positif). Hasil penelitian menunjukkan, bahwa di wilayah endemis Indonesia variasi morfologi *Leucocytozoon caulleryi* yang menyerang ayam ras memiliki ukuran rata-rata panjang dan lebar $18,233 \pm 4,672$ dan $12,934 \pm 3,349$ μm . Hasil identifikasi *Leucocytozoon caulleryi* dengan PCR menunjukkan panjang basa 600 bp pada putaran ke 1 dan 503 bp pada putaran kedua.

Kata kunci: *Leucocytozoon caulleryi*, gen *cyt b*, ayam ras, Indonesia

Pendahuluan

Leucocytozoon adalah parasit protozoa darah yang termasuk famili *Plasmodiidae* yang menyerang unggas. Pada ayam ras, *L. caulleryi* adalah protozoa yang sangat patogen, ditularkan oleh *Culicoides* spp., sering terjadi di beberapa negara Asia termasuk Indonesia. Pada industri perunggasan, *Leucocytozoonosis* pada ayam ras merupakan

ancaman serius, selain dapat menyebabkan kematian juga dapat menimbulkan kerugian besar dalam bentuk hambatan pertumbuhan, penurunan berat badan dan penurunan produksi telur. Selain itu, serangan *Leucocytozoonosis* di daerah endemis selalu muncul sepanjang tahun. Pada ayam pedaging kejadian *Leucocytozoonosis* tertinggi dijumpai pada umur 25-30 hari sebesar 66,67 % (Isobe *et al.*, 1987; Purwanto, 2009).

Sejak tahun 2007, kejadian *Leucocytozoonosis* pada ayam ras muncul di beberapa daerah endemis di Indonesia yaitu Jawa Timur, Jawa Tengah dan Kalimantan Selatan. Pada 2009 sampai pertengahan 2010, kasus *Leucocytozoonosis* masih sering ditemukan di beberapa wilayah Jawa Tengah dan Jawa Timur. Kejadian *Leucocytozoonosis* pada ayam ras di Jawa Timur sebesar 32 %, Jawa Tengah 67 %, sedangkan angka kejadian *Leucocytozoonosis* pada ayam lokal dan burung belum dilaporkan (Purwanto,2009).

Selama ini deteksi terhadap *Leucocytozoon* pada ayam didasarkan pada analisis morfologi parasit menggunakan mikroskop terhadap hapusan ulas darah. Kelemahan metode ini adalah kegagalan menemukan parasit pada kasus parasitemia yang rendah, apalagi stadium gamet dari parasit ini hanya satu minggu berada di sirkulasi darah (Isobe *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 2007). Oleh karena itu perlu dikembangkan metode diagnosis secara molekuler, antara lain dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang selama ini belum dikembangkan di Indonesia untuk deteksi *Leucocytozoonosis* Darmono dkk.,2006).

Identifikasi morfologi *Leucocytozoon spp.* tidak dapat digunakan untuk penentuan spesies karena terdapat variasi morfologi, sehingga sering menimbulkan kesulitan dalam mengkarakterisasi morfologi parasit. Penggunaan PCR memungkinkan kita untuk mengetahui perbedaan profil fragmen DNA hasil amplifikasi. Hasilnya bisa kita gunakan untuk membedakan mikroorganisme pada tingkat genus, hingga spesies bahkan genotipe spesifik dari patogen Martinsen,2006).

Selama ini analisis DNA terhadap *Leucocytozoon* dilakukan pada gen *cyt b* (Perkins *et al.*, 2002; Sehgal *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007). Fragmen *gen cyt b* merupakan salah satu fragmen yang berada di dalam genom mitokondria dan banyak

digunakan untuk mempelajari filogenetik karena variasi susunan nukleotida di dalam *gen cyt b* sangat berguna untuk membandingkan spesies pada genus ataupun famili yang sama. Rangkaian informasi genetik yang terkandung di dalam DNA mitokondria dilaporkan dapat menggambarkan karakteristik suatu populasi, filogenetik dan merekonstruksi sejarah evolusi (Kvist,2000).

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis variasi morfologi dan deteksi *Leucocytozoon caulleryi* dengan metode PCR pada mtDNA gen *cyt b* yang menyerang ayam ras di wilayah endemis Indonesia.

Materi dan Metode

Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di daerah endemis yaitu: Jawa Timur meliputi Pasuruan, Blitar, Lumajang dan Lamongan. Jawa Tengah meliputi Boyolali dan Purbalingga, serta Kalimantan Selatan di Kecamatan Kurau, Kabupaten Tanah Laut. Pemeriksaan sampel dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Populasi dan Sampel Penelitian

Ayam ras yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 63 ekor ayam yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi *Leucocytozoonosis*. Jumlah tersebut berasal dari daerah Blitar (10 ekor), Lamongan (6 ekor), Pasuruan (10 ekor), Lumajang (4 ekor), Boyolali (10 ekor), Purbalingga (8 ekor) dan Banjarmasin (15 ekor) menggunakan metode *purposive sampling*. Sampel yang akan dianalisis adalah darah ayam segar yang berasal dari ayam dengan gejala klinis dan patologi anatomi yang mengarah pada infeksi *Leucocytozoon*.

Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan menggunakan tabung *vacutainer* yang telah diisi antikoagulan EDTA 10 % melalui vena *brachialis* sebanyak 1 ml. Darah yang diambil sebagian dibuat untuk pembuatan preparat ulas darah dengan pewarnaan Giemsa, sebagian yang lain diekstraksi dengan metode standar fenol kloroform untuk digunakan sebagai sumber DNA genom dan dilanjutkan deteksi DNA *Leucocytozoon* dengan *Nested* PCR.

Pemeriksaan parasit melalui preparat ulas darah

Pemeriksaan ini dilakukan dengan cara melihat parasit dari preparat ulas darah yang telah diwarnai. Ulas darah dibuat setipis mungkin, biarkan mengering kemudian direndam dalam metanol jenuh selama satu menit, selanjutnya direndam dalam larutan Giemsa 20% selama 20 menit. Tahapan berikutnya preparat disiram dengan air mengalir lalu ditiriskan atau dikeringkan dengan kertas saring. Setelah kering diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000×; menggunakan mikroskop *Olympus BX-50.Pentax optio 230 Camera Digital 2.0 megapixel*. Identifikasi parasit dilakukan terhadap panjang dan lebar serta persentase parasit tertutup inti eritrosit, hasil pemeriksaan ini akan menggambarkan bentuk atau morfologi dan ukuran gamet (Martinsen *et al.*, 2006). Gamet diukur berdasarkan panjang, lebar dan lingkaran. Hasil pengukuran di antara sampel akan menggambarkan variasi morfologi gamet di antara sampel dari darah ayam ras.

Variasi morfologi dihitung menggunakan koefisien variasi yang besarnya dihitung dari rasio simpangan baku terhadap nilai rata-rata dari masing-masing variabel yang diukur dikalikan 100 % (Steel dan Torie, 1989). Variabel yang diukur adalah panjang, lebar dan lingkaran.

Isolasi Gen *cyt b* mtDNA *Leucocytozoon*

Gen *cyt b* *Leucocytozoon* di ekstraksi menggunakan metode *phenol-chloroform*. Gen *cyt b* mtDNA diisolasi dari darah ayam utuh (*whole blood*) yang diberi EDTA. Darah ditampung menggunakan tabung *vacutainer* dari vena *brachialis* (\pm 1 ml) dengan antikoagulan larutan EDTA 10 %. Prosedur ekstraksi DNA darah didasarkan pada metode standar fenol-kloroform dengan modifikasi waktu inkubasi sampel lebih pendek.

Secara ringkas prosedur ekstraksi yang dilakukan adalah mengambil sampel darah sebanyak 200 μ l, kemudian ditambah 200 μ l larutan penyangga pelisis (*lysis buffer*), divortex dan disentrifugasi untuk mendapatkan pelet. Selanjutnya, ditambahkan larutan pencuci (*rinse buffer*) dan dilakukan vortex sampai endapan larut. Kemudian ditambahkan larutan digesti (*digestion buffer*), enzim proteinase K dan RNAse dan diinkubasikan *overnight* pada suhu 55°C. Setelah sampel tercerna semua, ditambahkan fenol dan dilakukan vortex atau digunakan *rotary mixer* agar larutan tercampur sempurna.

Larutan disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 2 menit, kemudian supernatan dipindahkan ke tabung *ependorf* baru. Supernatan diberi fenol dan kloroform (1:1), kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 13 000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan etanol absolut (100%) untuk presipitasi DNA, kemudian dilakukan sentrifugasi untuk mengendapkan pelet DNA yang diperoleh. Selanjutnya etanol absolut dibuang dan pelet dicuci dengan 70% etanol. Selanjutnya, pelet diendapkan kembali dengan melakukan sentrifugasi 13000 rpm. *Ethanol* dibuang dengan hati-hati agar pelet DNA tidak ikut terbang. Material atau pelet DNA yang mengendap dalam tabung dikeringkan dengan bantuan aspirator. Setelah kering, pada pelet DNA ditambahkan larutan TE dan dan disimpan dalam *freezer* untuk proses selanjutnya.

Setelah DNA hasil isolasi dimurnikan dan diketahui konsentrasinya, maka dipreservasikan untuk disiapkan sebagai cetakan (*template*) pada reaksi PCR.

Proses *polymerase chain reaction*

Perancangan primer didasarkan pada sekuen yang ada sebelumnya, baik dari data hasil penelitian dalam jurnal maupun data yang terdapat dalam *GenBank*. Primer gen *cyt b* yang digunakan sebanyak dua primer untuk PCR putaran pertama dan dua primer untuk PCR putaran kedua. Urutan nukleotida untuk putaran pertama : 5' CATATATTAAGAGAATTATGGAG3' dan 5'ATAAAATGGTAAGAAATACCATTC 3'. Sedangkan untuk putaran kedua adalah 5' ATGTGCTTTAGATATATGCATGCT 3' dan 5'GCATTATCTGGATGTGATAATGGT 3', (Hellgren *et al.*, 2004; Omori *et al.*, 2008).

Amplifikasi mtDNA gen *cyt b* *Leucocytozoon spp.* dilakukan dengan menggunakan *nested* PCR, seperti yang dilakukan oleh Cosgrove *et al.* (2006). *Nested* PCR adalah proses amplifikasi DNA yang menggunakan dua pasang primer untuk dua kali PCR. Pada putaran pertama menggunakan primer yang bisa menangkap gen lebih panjang dibanding pada putaran ke dua (Hellgren *et al.*, 2004; Omori *et al.*, 2008).

Pada putaran pertama, volume total untuk reaksi ini adalah 25µl campuran larutan terdiri atas 2 µl genomic DNA, 0,125 mM dNTP, 0,2 µM primer, 3

mM MgCl₂ dan 0,25 unit *Taq* Polimerase dengan ditambahkan *buffer* dengan perbandingan 1 kali volume bahan-bahan tersebut. Suhu denaturasi 94° C selama 30 detik, suhu *annealing* 50° C selama 30 detik dan suhu perpanjangan (*extension*) 72° C selama 45 detik. Perbanyak siklus diulang 35 sampai 45 kali.

Bahan-bahan untuk putaran kedua sama dengan putaran pertama, kecuali primer yaitu 0,4 µM dan 0,5 unit *Taq* Polymerase, kemudian 0,2 µl dari produk PCR pertama dijadikan *template* DNA untuk putaran ke dua. Suhu dan waktu di setiap tahapan PCR sama dengan putaran pertama dan perbanyak siklus sebanyak 20 sampai 35 kali. Dua sampai 8 µl hasil PCR putaran ke dua di *running* dalam agarose 2 % yang diwarnai dengan *ethidium bromide*, kemudian divisualisasi menggunakan ultra violet transluminator. Panjang basa yang diharapkan adalah 600 bp pada putaran pertama dan 503 bp pada putaran kedua.

Hasil dan Pembahasan

Tingkat Kejadian *Leucocytozoonosis* pada Ayam Ras di Wilayah Endemis Indonesia

Pengambilan sampel darah ayam ras dilakukan terhadap ayam yang menunjukkan gejala klinis) *Leucocytozoonosis* di wilayah endemis, meliputi Jawa Timur, Jawa Tengah dan Kalimantan Selatan. Peternakan ayam ras yang mengalami kejadian *Leucocytozoonosis* bisa dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Tingkat Kejadian *Leucocytozoonosis* pada Ayam Ras di Wilayah Endemis di Indonesia

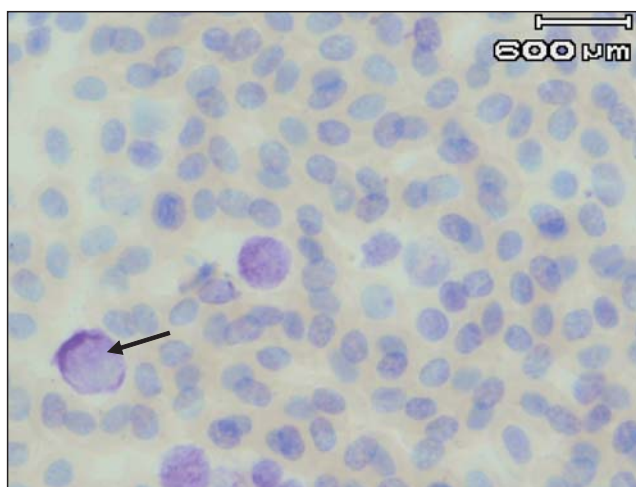
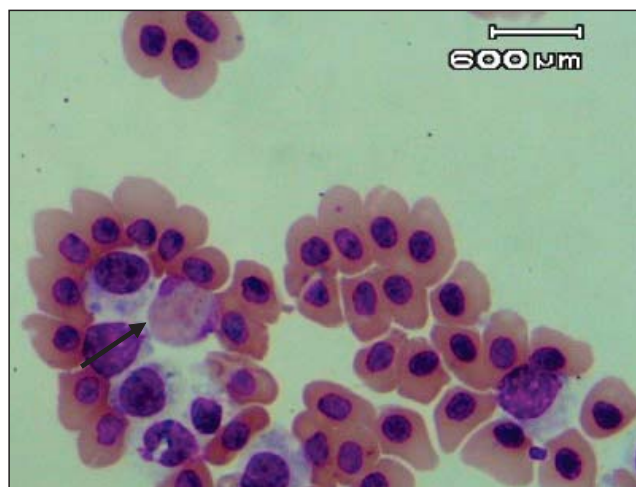
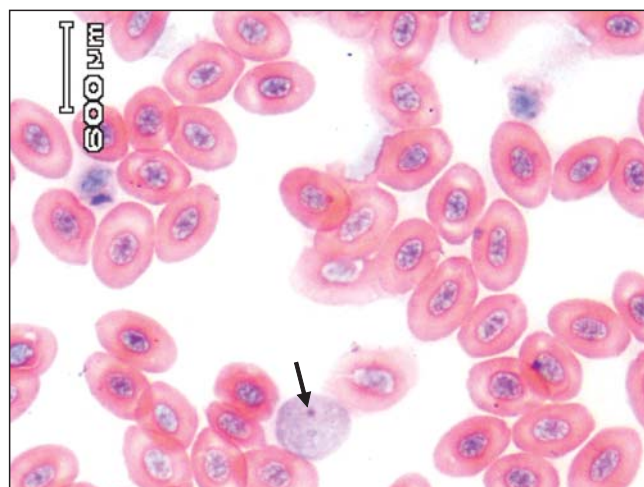
No	Lokasi	Ayam yang nampak gejala klinis/PA (ekor)	Parasitemia (ekor)	Histopatologis dari yang parasitaemia (ekor)
1	Blitar	10	2	2
2	Lamongan	6	2	2
3	Pasuruan	10	4	4
4	Lumajang	4	2	2
5	Boyolali	10	1	1
6	Purbalingga	8	2	2
7	Banjarmasin	15	2	2
Total		63	15	15

Identifikasi *L. caulleryi* Secara Mikroskopis

Pemeriksaan Parasitologis

Hasil pemeriksaan ulas darah dengan pewarnaan Giemsa didukung dengan hasil

pemeriksaan PCR menunjukkan bahwa *Leucocytozoon* yang ditemukan dalam penelitian ini seluruhnya adalah *L. caulleryi*, seperti yang terlihat dalam Gambar 1.



Gambar 1. *Leucocytozoon caulleryi* dari daerah penelitian. A = *L. caulleryi* dari Purbalingga 2, B = *L. caulleryi* dari Pasuruan 3, C = Pasuruan 4, D = *L. caulleryi* dari Banjarmasin 1. (Olympus CX-21, 1000x; OptiLab Camera Digital 2.0 megapixel).

L. caulleryi yang ditemukan dalam penelitian ini secara umum berbentuk bulat membentuk fusi dengan sel inang, tidak ada proses memanjang dari sitoplasma sel inang seperti yang terjadi pada species lain. Masing-masing parasit dari berbagai daerah endemis ini ada perbedaan fenotipiknya, yaitu ukuran bervariasi: panjang 11,32 - 25,88 μm lebar 9,08 - 21,79 μm , dengan rata-rata panjang 18,23 μm dan lebar 12,93 μm . Koefisien variasi untuk panjang sebesar 25,62 % dan lebar 25,89 % (Tabel 2).

Hasil temuan *L. caulleryi* dalam penelitian ini secara umum berbentuk bulat dan terdapat variasi morfologi diantara *L. caulleryi* yang diambil dari berbagai wilayah endemis. Variasi yang terjadi disamping berdasar ukuran, terlihat sitoplasma parasit yang berbeda dalam penyerapan zat warna Giemsa. Menurut Valkiunas *et al.* (2010), untuk penentuan species hal yang paling menentukan adalah bagaimana proses sitoplasma inang dalam mengadakan fusi dengan parasit, masing-masing species memiliki

Tabel 2. Morfometri Gamet *L. caulleryi* yang Menyerang Ayam Ras dari Berbagai Daerah Endemis di Indonesia

Asal sampel	Panjang (µm)	Lebar (µm)	Keliling (µm)
Banjarmasin 1	16.5	11.04	44.72
Banjarmasin 2	22.05	12.84	62.08
Blitar	25.88	21.79	71.85
Boyolali	14.26	11.26	39.09
Lamongan 1	18.83	12.06	47.38
Lamongan 2	16.02	12.51	45.51
Pasuruan 1	24	15.5	60.88
Pasuruan 2	17.72	13.72	46.33
Pasuruan 3	13.55	10.87	37.53
Pasuruan 4	11.32	10.19	35.16
Purbalingga 1	11.36	9.08	36.1
Purbalingga 2	25.5	9.48	59.03
Rata2	18.233	12.934	47.613
SD	4.672	3.349	9.441
Koef. variasi (%)	25.623	25.8934	19.829

pertumbuhan fusiform yang bersifat spesifik, dimana sifatnya bisa ditentukan secara genetik, yang kemungkinan besar mencerminkan sejarah evolusinya.

Perbedaan morfologi dapat diakibatkan oleh perbedaan genetik akibat evolusi, hal ini sesuai dengan yang disampaikan Valkiunas *et al.*, (2010). Keragaman *Leucocytozoon* sangat tinggi, tetapi dapat dibedakan dengan penanda molekuler yang dapat menghasilkan kriteria morfologi baru untuk pengembangan taksonomi spesies parasit haemosporidian. Kriteria seperti itu penting karena identifikasi *morphospecies* *Leucocytozoon* saat ini hanya didasarkan pada sifat-sifat morfologi sel inang, tetapi tidak pada data parasit secara molekuler.

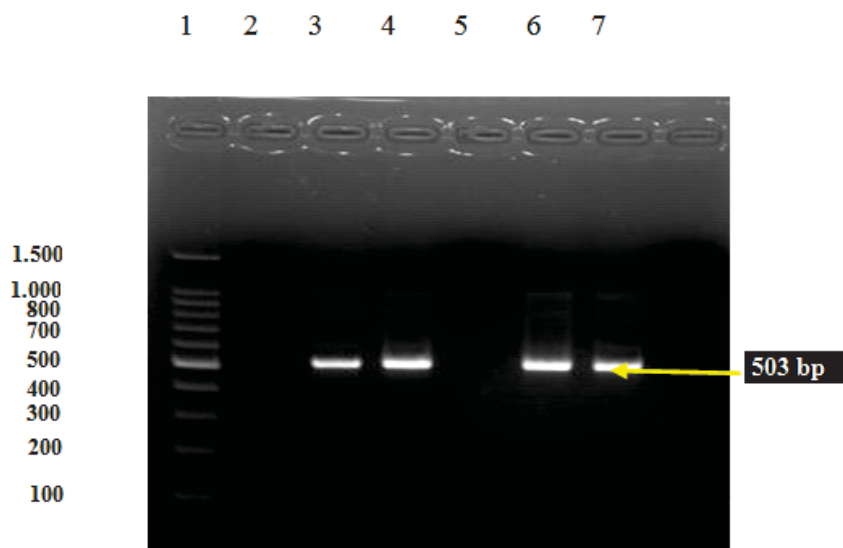
Kriteria untuk penentuan bahwa spesies tersebut adalah *L. caulleryi* termasuk inangnya dan gambaran gametositnya harus menggunakan beberapa karakteristik seperti pewarnaan, ukuran, sifat, dan tingkat distorsi sel inang, bentuk dan perubahan posisi dari sel inang termasuk dengan intinya (Martinsen *et al.*, 2006). Dalam pemeriksaan darah dari ayam yang menderita *Leucocytozoonosis* didapatkan gambaran

mikroskopis baru berupa protozoa darah yang bercirikan bulat membesar dan berwarna kebiruan.

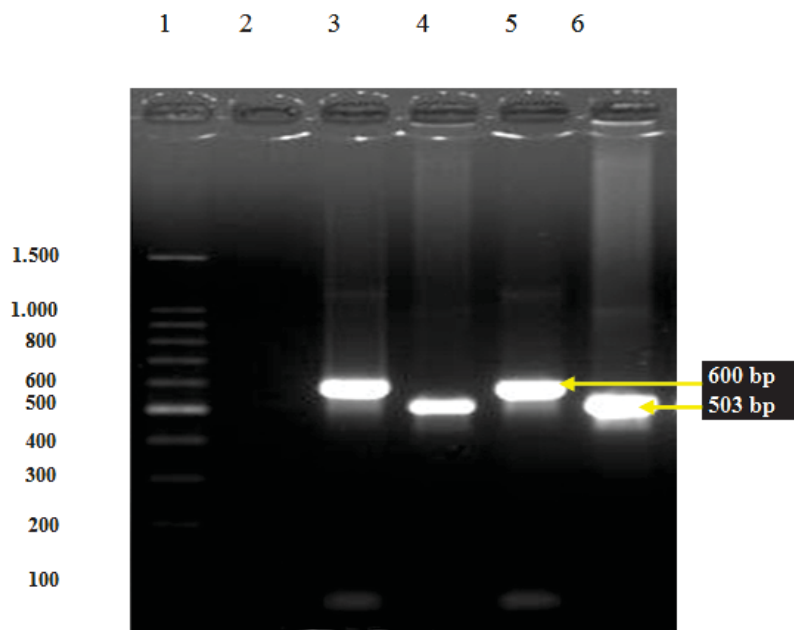
Berdasarkan analisis morfologi dan morfometri karakteristik gametosit dan sel inang maka Omori *et al.* (2008) mengusulkan untuk mendeskripsikan dengan jelas *L. caulleryi* dengan kriteria dari morfologi intraspesifik maupun interspesifik dari gametosit serta sel inangnya. Studi yang didasarkan pada pemeriksaan mikroskopis dari pemeriksaan ulas darah tipis telah mengungkapkan bahwa ayam terinfeksi parasit darah sering membawa parasit yang berbeda (Valkiūnas, 2005). Namun dalam penelitian ini tidak dijumpai infeksi campuran, hal ini kemungkinan memang tidak didapatkannya agen protozoa darah yang lain. Namun perlu penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel maupun wilayah yang lebih banyak

Identifikasi *L. caulleryi* dengan Penggunaan PCR pada mt DNA Gen *cyt b* *Leucocytozoon*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ayam yang mengalami parasitemia, seluruhnya dinyatakan positif terhadap *Leucocytozoon* dengan pemeriksaan menggunakan metode *nested* PCR. Gen *cyt b* mtDNA berhasil diamplifikasi dengan primer *Haem NFI* dan *Haem NR3* untuk menjangkit ketiga genus *Haemosporidia* yang menyerang ayam dan *Haem FL* dan *Haem R3L*, khusus untuk *Leucocytozoon* (Hellgren, 2004). Dari semua sampel yang diamplifikasi menunjukkan produk PCR dengan spesifikasi tinggi yaitu hanya terbentuk *band* tunggal dengan panjang nukleotida sekitar 600 bp pada PCR putaran pertama dan 503 bp pada PCR putaran kedua (Gambar 2 dan 3).



Gambar 2. *Gen cyt b* 503 bp *L. caulleryi* pada putaran II. Lajur 1 marker; lajur 2 dan 5 kontrol negatif, lajur 3, 4, 6 dan 7 hasil positif gen *cyt b* *L. caulleryi*.



Gambar 3. *Gen cyt b* 503 bp putaran II dan gen *cyt b* 600 bp putaran I. Lajur 1 marker; lajur 2 kontrol negatif, lajur 3 dan 5 hasil positif gen *cyt b* *Leucocytozoon* putaran I, lajur 4 dan 6 hasil positif gen *cyt b* *Leucocytozoon* putaran II.

Hasil positif parasitemia *Leucocytozoon* yang menyerang ayam ras di daerah endemis juga menunjukkan hasil positif produk PCR. Hal ini merupakan bukti bahwa PCR dapat diandalkan dalam mendeteksi infeksi *Leucocytozoonosis* pada ayam ras. Pendapat ini didukung oleh penelitian tentang parasit

malaria khususnya *Leucocytozoon* pada ayam lokal di Uganda dan Cameroon yang menggabungkan pemeriksaan menggunakan PCR dengan pemeriksaan konvensional. *Leucocytozoon* pada burung juga dapat dideteksi dengan PCR dengan DNA yang diekstraksi dari darah yang dikoleksi lebih dari 2 tahun sejak

infeksi yang pertama. Hal ini menunjukkan ketahanan jangka panjang infeksi aktif. Namun, deteksi dengan metode PCR pada stadium skizont belum pernah dilakukan (Cosgrove *et al.*, 2006; Sehgal *et al.*, 2006; Valkiunas *et al.*, 2010).

Nested PCR dipilih pada penelitian ini karena nested PCR menggunakan dua (2) pasang primer. Satu (1) pasang primer yang kedua (nested) berada dalam fragmen primer yang pertama. Hasil PCR dengan primer kedua lebih pendek daripada dengan primer yang pertama dan lebih spesifik. Selain itu, keuntungan lain penggunaan nested PCR adalah meminimalkan kesalahan amplifikasi. Nested PCR memiliki aplikasi yang luas, karena memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, sehingga hasilnya lebih akurat dibandingkan metode PCR lainnya.

Perkiraan prevalensi parasit berdasarkan ulas darah dan tes PCR mewakili tingkat minimum infeksi, sedangkan perkiraan berdasarkan pemeriksaan serologis dapat mewakili tingkat maksimum infeksi. Hal ini dapat diperoleh dari hasil penelitian semua individu yang pernah terinfeksi (Perkins dan Schall, 2002). Teknik diagnostik baru berupa tes PCR perlu terus dilakukan untuk mengungkapkan prevalensi parasit malaria unggas (2004). Intensitas infeksi dapat dengan mudah terdeteksi pada hapusan darah yang dapat mencerminkan melemahnya sistem kekebalan inang. Namun kasus *Leucocytozoonosis* memiliki kesulitan tersendiri dalam mendeteksi parasit, karena keberadaan gamet dalam darah hanya 1 minggu. Penggunaan PCR untuk mendeteksi DNA parasit yang diamplifikasi dari parasit utuh, tidak mencerminkan tahap penyakit atau tingkat keparahan infeksi (Cosgrove *et al.*, 2006).

Cytochrom adalah daerah genom mitokondria yang merupakan area yang sangat tidak mudah mengalami mutasi, sehingga lokasi ini sangat baik untuk merancang primer PCR untuk mendeteksi infeksi oleh spesies tertentu (Chasar, 2009).

Metode *nested* PCR pada putaran pertama bertujuan untuk mendapatkan genom yang panjang yang dapat mewakili tingkat *family*, yaitu *family*

Plasmodidae. Sementara putaran kedua (nested) akan mendapatkan genom pada tingkat species (spesifik). Penggunaan PCR juga dapat mendeteksi *L. caulleryi* yang bervariasi hingga perbedaan urutan 12% dalam gen *cytochrom b* (Martinsen *et al.*, 2006).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa. Terdapat perbedaan variasi morfologi (bentuk dan ukuran) gamet *Leucocytozoon caulleryi* yang menyerang ayam ras di daerah endemis di Indonesia. *L. caulleryi* dapat dideteksi menggunakan PCR dengan panjang basa 600 bp pada putaran pertama dan 503 bp pada putaran kedua.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Bapak Suyud dari PT SHS yang telah membantu dalam pengambilan sampel darah ayam ras yang terkena *Leucocytozoonosis* di daerah endemis, Bapak Amin dari *Institute Tropical Disease* (ITD), Universitas Airlangga, yang membantu dalam proses PCR, serta para mahasiswa yang membantu dalam proses penelitian.

Daftar Pustaka

- Aiello, S.E.,(2008). *Leucocytozoonosis*. Merck Veterinary Manual, 8th Ed. National Publishing, Philadelphia, Pennsylvania. 256
- Chasar, A., Loiseau, C., Valkiunas, G., Iezhova, T.,Smith, T.B.,and Sehgal, R.N.M., (2009). Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol. Ecol.* 18: 4121–4133.
- Cosgrove, C.L.,Day, K.P., and Sheldon, B.C., (2006). Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic test for avian malaria : A cautionary note. *J. Parasitol.* 92: 1362-1365.
- Darmono, T.W., Jamil, I., and Santosa, D.A., (2006). Pengembangan penanda molekuler untuk deteksi *Phylophthori palmivora* pada tanaman kakao. *Menara Perkebunan.* 74: 87–96.
- Hellgren, O.J.,Waldenstrom,J., and Bensch, S.,(2004).A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and

- Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 797-802.
- Isobe, T., and Suzuki, K., (1987). Detection of Serum Antibody to *Leucocytozoon caulleryi* in Naturally Infected Chickens by ELISA. *J. of Vet. Med. Sci.*, 49: 165-167.
- Kvist, L., (2000). Phylogeny and Phylogeography of European Parids. Departement of Biology, Oulu University.
- Martinsen, E.S., Paperna, I., and Schall, J.J., (2006). Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitol.*, 133:279–288.
- Morii, T., and Fukuda, M., (2005). Observations on First-Generation Schizogony of *Leucocytozoon caulleryi* in Chickens. *J. of Euk. Microbiol.*, 39:281–287.
- Omori, S., Sato, Y., Hirakawa, S., Isobe, T., Yukawa, M., and Murata, K., (2008). Two extra chromosomal genomes of *Leucocytozoon caulleryi*: complete nucleotide sequences of the mitochondrial genome and existence of the apicoplast genome. *Parasitol. Res.*, 103:953–957.
- Perkins, S.L., and Schall, J.J., (2002). A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.*, 88: 972-978.
- Purwanto, B., (2009). Kalau ayam kena Malaria, Majalah Trobos, Edisi Juli.
- Sato, Y., Hagahira, M., Yamaguchi, T., Yukawa, M., and Murata, K., (2007). Phylogenetic Comparison of *Leucocytozoon* spp from Wild Birds of Japan. *J. of Vet. Med. Sci.*, 69:55-59.
- Steel, R.G.D.I and Toorie, 2.H (1987) Principle and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. Mc. Graw Hill Book Co., New York.
- Sutarno, J. A., Purwoko, A, dan Lelana, N.I. (2002). Identifikasi dan karakterisasi polimorfisme gen hormone pertumbuhan pada sapi Bali, sapi Madura dan sapi Bengkulu. *Biodiversitas* 3: 169-173.
- Waldenstrom, J., Bensch, S., Hasselquist, D., and Ostman, O. (2004). A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infection from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 191-194.
- Valkiunas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p.
- Wardhana, A.H. (2004). Keragaman genetic populasi lalat Myiasis *Chrysomya bezziana* di Indonesia berdasarkan analisis DNA mitokondria. *JITV*, 9: 108 – 114.
- Sehgala., R.N.M., Valkiunas, G., Iezhova, T.A., and Smith, T.B. (2006). Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinaru*. *J. Parasitol.* 92: 1336–1343.