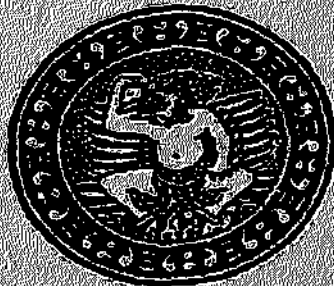


## LAPORAN HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL



### **IDENTIFIKASI ASAM AMINO PROTEIN SHP YANG BERPERAN DALAM TERMINASI SIGNALING PROTEIN *Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)***

Oleh :

**Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh**  
**Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phil., Ph.D., drh**  
**Noye Ridajati, M.Kes., Drh**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan  
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi  
Tahun Anggaran 2012 Nomer : 2613/H3/KR/2012  
Tanggal 9 Maret 2012**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2012**

**LAPORAN HASIL PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**IDENTIFIKASI ASAM AMINO PROTEIN SHP YANG BERPERAN DALAM  
TERMINASI SIGNALING PROTEIN *Signal Transducers and Activators of  
Transcription (STAT)***

**Oleh :**

**Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh  
Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phil., Ph.D., drh  
Nove Hidajati, M.Kes, Drh**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan  
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi  
Tahun Anggaran 2012 Nomer : 2613/H3/KR/2012  
Tanggal 9 Maret 2012**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. **Judul :**

Identifikasi Asam Amino Protein SHP Yang Berperan Dalam Terminasi Signaling Protein *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)

2. **Ketua Peneliti :**

- a. Nama Lengkap : Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., drh  
 b. Jenis kelamin : Laki-Laki  
 c. NIP : 196509051993031004  
 d. Pangkat/Golongan : Penata Tk. I/3d  
 e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 f. Bidang Keahlian : Fisiologi Veteriner  
 g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan  
 h. Perguruan tinggi : Universitas Airlangga

3. **Tim Peneliti**

No	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes, drh	Fisiologi Veteriner	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2	Prof. Mas'ud Hariadi, drh, M.Phil, Ph.D	Reproduksi Veteriner	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
3	Nove Hidajati, M.Kes, drh	Biokimia Veteriner	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga

4. **Lokasi Penelitian** : Laboratorium Faal FK Universitas Brawijaya

5. **Penadanaan dan Jangka Waktu Penelitian**

- a. Jangka Waktu Yang Diusulkan : Rp 3 tahun  
 b. Biaya Yang Diusulkan : Rp 50.000.000;  
 c. Biaya Yang disetujui Tahun Ini : Rp 32.500.000;

Surabaya, 31 Oktober 2012  
 Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
 Dekan

Prof.Hj. Romziah Sidik, Ph.D, drh  
 NIP. 195312161978062001

Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes, drh  
 NIP. 196509051993031004

Menyetujui :  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

(Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si)  
 NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

*Growth hormone* diketahui mengaktifkan STAT 1, 3, 5A dan 5B. Aktifnya protein STAT akan mempengaruhi pola ekspresi dari gen target. Untuk mengakiri signaling protein STAT yang diaktifkan GH ternyata diperlukan suatu protein fosfatase SHP-1 dan SHP-2. Dua fosfatase tersebut sangat berperan sebagai regulator negatif signaling yang diaktifkan GH. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein SHP 2 sebagai dasar untuk mengetahui susunan asam amino protein fosfatase SHP pada ayam pedaging yang sedang mengalami pertumbuhan akibat meningkatnya *growth hormone* (GH).

Ayam dipelihara dalam kandang mulai umur 1-21 hari, ayam mendapat pakan dua kali sehari yaitu pukul 06.00 WIB dan 18.00 WIB dengan jumlah 10 % lebih kecil dari standar. Pada umur 21 hari ayam dipotong untuk diambil sampelnya berupa jaringan hepar untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut (1) Isolasi protein fosfatase SHP-2 dari jaringan hepar ayam pedaging, (2) Analisis protein fosfatase SHP-2 dari jaringan hepar ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*), (3) Identifikasi berat molekul protein fosfatase SHP-2 dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari *gel polyacrylamide*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat molekul protein SHP-2 adalah 72 kDa, hal ini menunjukkan bahwa pada ayam pedaging fase pertumbuhan protein SHP-2 diduga sama dengan yang ada pada manusia. Diharapkan dengan diketahuinya protein SHP-2 pada ayam pedaging akan menjadi dasar untuk mengetahui sejara jelas mekanisme *growth hormone* dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh.

## SUMMARY

Growth hormone known to activate STAT 1, 3, 5A and 5B. Active STAT proteins will affect the pattern of expression of the target gene. To end the STAT signaling proteins that are activated GH apparently required a protein phosphatase SHP-1 and SHP-2. Two of these phosphatases play an important role as a negative regulator of GH signaling is activated. The purpose of this study was to determine the molecular weight of the protein SHP 2 as a basis to determine the amino acid composition of the protein phosphatase SHP in broilers that are experiencing growth due to increased growth hormone (GH).

Chickens kept in cages from age 1-21 days, the chicken gets feed twice a day ie 06.00 am and 18.00 pm with a total of 10% smaller than standard. At the age of 21 days the chicken was cut to form liver tissue sampled for examination as follows (1) Isolation of protein phosphatase SHP-2 from liver tissue broiler, (2) Analysis of protein phosphatase SHP-2 from the broiler liver tissues using SDS -PAGE (sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses), (3) Identification of the molecular weight of the protein phosphatase SHP-2 with the blotting method using the Western blot technique described in elektrophoreses proteins from polyacrylamide gels.

The results showed that the molecular weight of the protein SHP-2 is 72 kDa, this suggests that broiler growth phase protein SHP-2 allegedly similar to that in humans. Expected to know the protein SHP-2 in broilers will be the basis for knowing clearly address the mechanism of growth hormone in regulating growth and metabolism.

## **KATA PENGANTAR**

**Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan penelitian ini. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada :**

- 1. Rektor Universitas Airlangga melalui Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga yang telah mengizinkan dan membiayai penelitian ini melalui sumber dana DIPA Universitas Airlangga**
- 2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan penelitian.**
- 3. Semua pihak yang telah membantu kelancaran pelaksanaan penelitian.**

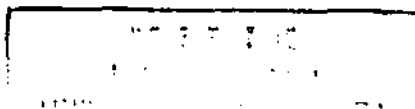
**Akhirnya penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.**

**Surabaya, Oktober 2012**

**Penulis**

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	iii
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
2.1 <i>Growth Hormone</i> (GH) .....	3
2.2 Reseptor <i>Growth Hormone</i> .....	4
2.3 Efek Metabolik <i>Growth Hormone</i> .....	5
2.4 Aktivasi Protein STAT oleh <i>Growth Hormone</i> .....	6
2.5 Peran Tirosin Fosfatase Dalam Terminasi Signaling Protein STAT Yang di Aktivasi <i>Growth Hormone</i> .....	8
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	12
3.1 Tujuan Penelitian .....	12
3.1.1 Tujuan jangka panjang .....	12
3.1.2 Tujuan khusus .....	12
3.2 Manfaat Penelitian .....	12
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	13
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	13
4.2 Sampel Penelitian .....	13
4.3 Prosedur Penelitian .....	13
4.4 Ekstraksi Protein Sampel .....	14
4.5 SDS-PAGE Protein SHP 1 .....	14
4.5.1 Persiapan gel .....	14
4.5.2 Injeksi sampel .....	15
4.6 Western Blot .....	15
4.7 Analisis Data .....	16
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	17
5.1 SDS-PAGE Protein SHP-2 .....	17
5.2 Western Blot Protein SHP-2 .....	20
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....	26
6.1 Kesimpulan .....	26
6.2 Saran .....	26
DAFTAR PUSTAKA .....	27



**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
5.1 Perhitungan Berat Molekul hasil SDS Page protein SHP pada jaringan hepar ayam pedaging .....	19
5.2 Perhitungan Berat Molekul hasil <i>Western Blot</i> protein SHP-2 pada jaringan hepar ayam pedaging.....	21



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Regulasi STATs oleh SH2-B dan SOC.....	10
5.1 SDS-PAGE protein SHP dari jaringan hepar ayam pedaging .....	17
5.2 <i>Western blot</i> protein SHP-2 dari hepar ayam pedaging .....	20

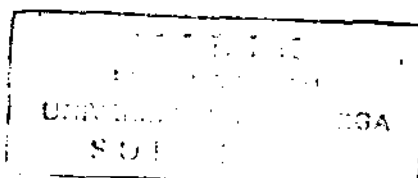
## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Sekresi *growth hormon* dibawah control neural dari hypothalamus melalui sedikitnya dua dan mungkin tiga faktor *hypophysiotropic* yaitu GHRH (*growth hormone realeasing hormone*), somatostatin, dan ghrelin (Becker,2001).

*Growth hormone* disekresi dalam suatu pola pulsatil, meningkat dan menurun. Mekanisme yang mengatur sekresi *growth hormone* secara tepat belum sepenuhnya dipahami , namun beberapa faktor yang berkaitan dengan nutrisi dan stress dapat merangsang sekresinya, yaitu (1) kelaparan, terutama pada difisiensi protein berat, (2) hipoglikemia atau juga rendahnya konsentrasi asam lemak dalam darah, (3) latihan atau olah raga (4) ketegangan dan (5) trauma. *Growth hormone* juga secara khas meningkat pada 2 jam pertama tidur lelap. Sebaliknya pada keadaan dimana terjadi peningkatan glukosa darah , peningkatan asam lemak bebas , hormon somatostatin merupakan faktor yang menghambat sekresi produksi *growth hormone*.

Hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) mempunyai arti penting dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh. Namun mekanisme regulasi transkripsi gen spesifik oleh GH yang diperlukan untuk proses tersebut masih belum jelas. Terikatnya GH dengan reseptornya dapat mengaktifkan *Janus Kinase 2* (JAK 2) dan selanjutnya memfosforilasi tirosin dalam kompleks GH-reseptor-JAK 2. Tirosin ini kemudian membentuk tempat ikatan untuk sejumlah protein *signaling*, seperti *signal transducers and activators of transcription* (STAT). *Growth hormone* diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5A dan 5B. Aktifnya protein STAT akan mempengaruhi pola ekspresi dari gen target. Untuk mengakiri *signaling* protein STAT yang diaktifkan



GH ternyata diperlukan suatu protein fosfatase SHP-1 dan SHP-2. Dua fosfatase tersebut sangat berperan sebagai regulator negatif signaling yang diaktifkan GH. Dengan mengetahui berat molekul SHP-1 dan SHP-2 maka ada peluang besar untuk membuat protein spesifik yang dapat memperlambat kerja SHP-1 dan SHP-2 sehingga efek metabolik GH menjadi lebih lama. Sayangnya penelitian tentang protein SHP banyak dilakukan pada tikus, mencit, domba dan manusia, sedangkan pada ayam pedaging belum banyak dilakukan.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Untuk itu dalam penelitian ini diajukan perumusan masalah berapa berat molekul protein SHP-2 yang ada pada jaringan hepar ayam pedaging ?

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Growth Hormone (GH)*

Hormon pertumbuhan adalah hormon peptida yang terdiri dari 191 asam amino yang disintesis, disimpan dan dilepaskan oleh sel somatotroph dari hipofisis anterior. Hormone pertumbuhan berfungsi untuk pertumbuhan tulang, otot dan organ serta mempengaruhi kecepatan pertumbuhan tubuh dengan memberikan rangsangan pada hepar untuk mensekresi somatomedin. Hormon pertumbuhan juga mempunyai arti penting dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh. Namun mekanisme regulasi transkripsi gen spesifik oleh GH yang diperlukan untuk proses tersebut masih belum jelas.

Reseptor GH adalah anggota famili reseptor sitokin yang diketahui berasosiasi dengan dan mengaktifkan tirosin kinase (Endo *et al.*, 1997). Terikatnya GH dengan reseptornya dapat mengaktifkan *Janus Kinase 2 (JAK 2)* dan selanjutnya memfosforilasi tirosin dalam kompleks GH- reseptor-JAK 2. Tirosin ini kemudian membentuk tempat ikatan untuk sejumlah protein *signaling*, seperti *signal transducers and activators of transcription (STAT)*.

Protein *signaling* lain yang dapat terikat pada kompleks reseptor JAK2/GH adalah (1) protein Shc yang dapat mengaktifasi jalur Ras-MAP kinase, (2) substrat reseptor insulin yang terlibat dalam aktivasi *phosphatidylinositol-3'-kinase* dan kinase AKT/PKB, (3) fosfolipase yang menyebabkan formasi diasilgliserol dan aktivasi protein kinase, (4) protein yang terlibat dalam regulasi sitoskeleton, termasuk *focal adhesion kinase* (Smit *et al.*, 1999), paxillin, tensin, CrkII, C-Src, c-Fyn, 10-M dan Nck

(Zhu, 1998). Diantara berbagai molekul *signaling* tersebut ternyata protein STAT berperan penting dalam regulasi dan transkripsi GH.

## 2.2 Reseptor *Growth Hormone*

*Growth Hormone Receptor* (GHR) adalah anggota famili reseptor membran termasuk reseptor berbagai sitokin (*interleukin* dan *interferon*) (Burnside, 1996). Penentuan letak seluler reseptor GH sangat penting untuk mengetahui target kerja GH (Hull, 1996). Pertama kali dideteksi mRNA reseptor GH dengan *northing blotting* pada limfa, bursa *fabricius* dan thymus unggas domestik. Analisis dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menunjukkan bahwa *sequence* mRNA yang mengkode domain intraseluler dan ekstraseluler reseptor GH ada pada semua jaringan dengan homologi tertinggi pada transkripsi hepatic.

Pada tikus GH akan mengikat reseptor pada plasma membran. Kompleks GH-GHR (*growth hormone reseptor*) adalah bagian dari *recycle* dimana reseptor selalu disintesis oleh *golgi apparatus* dan kemudian ditransfer ke plasma membran. Kadar GHR plasma meningkat sesuai dengan pulsatil GH plasma. Reseptor yang disekresi *golgi apparatus* dengan yang ada dalam plasma membran akan disesuaikan dengan pulsatil GH sehingga dapat disimpulkan bahwa GHR

banyak terdapat di *golgi apparatus* dan kemudian ditransfer ke plasma membran yang selnya peka terhadap GH (Vleurić, 1996).

Efek GH sangat dipengaruhi oleh terikat tidaknya GH dengan GHR. Mutasi gen GHR (*deletions, abnormal splicing, missense mutation*) akan menurunkan atau mencegah pengikatan GH ditempat target. Ayam *sex linked dwarf* (SLD) mengalami gangguan pertumbuhan padahal GH plasma normal dan bahkan berlebih. Ternyata serum

ayam SLD mengandung sejumlah besar *protein binding* yang homolog dengan GHR sehingga GH banyak yang tidak terikat pada reseptor dan akibatnya tidak ada efek pertumbuhan (Hull, 1996).

### 2.3 Efek Metabolik *Growth Hormone*

*Growth hormone* memainkan peran dalam mengatur pertumbuhan dan komposisi tubuh (Foster, 1998). *Growth hormone* secara nyata mempunyai efek biologik yang dipengaruhi oleh *insulin-like growth factor I* (IGF-I) dalam meningkatkan pertumbuhan otot skelet (Younken, 2000). Pemberian faktor pertumbuhan secara *in vivo* pada ayam pedaging menyebabkan peningkatan kecepatan pertumbuhan dan massa otot sebesar 15 % dan diperlukan pakan 6,5 % lebih sedikit dari pakan normal. Peningkatan pertumbuhan ini mempunyai implikasi dan daya tarik yang besar bagi dunia perunggasan. Tetapi pola ekspresi gen faktor pertumbuhan selama masa pertumbuhan sampai saat ini belum diketahui secara jelas (Killefer, 2000).

Daging yang berkualitas tinggi dapat diperoleh apabila sekresi GH dapat ditingkatkan. Peningkatan sekresi GH ayam pedaging dapat dilakukan dengan pemberian pakan dua kali sehari dengan jumlah 10 % di bawah jumlah pakan standar (Anwar, 2004; Anwar dan Sarmanu, 2004; Anwar dkk., 2003). Efek metabolik hormon pertumbuhan meliputi peningkatan kecepatan sintesis protein di seluruh tubuh, peningkatan pengangkutan asam lemak dari jaringan lemak dan peningkatan penggunaan asam lemak sebagai sumber energi (Ortiz *et al.*, 2001; Anwar dkk., 1999;). Hormon pertumbuhan juga dapat menyebabkan penurunan jaringan adiposa, penurunan kandungan lemak tubuh dan peningkatan *density* tulang (Anwar dkk., 2000; Savendhal, 1999).

#### 2.4 Aktivasi Protein STAT oleh *Growth Hormone*

Protein STAT berperan penting dalam regulasi transkripsi gen oleh GH dan sitokin lain yang mengaktifkan *Janus Kinase* (JAK). Protein STAT yang semula diidentifikasi dalam jalur *signaling* interferon (IFN) (Darnell *et al.*, 1994) adalah faktor sitoplasmik yang mengandung domain SH-2. Pada fosforilasi tirosil yang sering melalui kaskade berinisiasi JAK kinase, protein STAT sitoplasma membentuk suatu kompleks dengan protein STAT lain melalui interaksi tirosin yang mengalami fosforilasi pada domain SH-2, mengadakan translokasi menuju ke nukleus, berikatan dengan DNA dan selanjutnya mengaktifkan transkripsi pada gen sasaran (Ihle, 1996). *Growth hormone* diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5A dan 5B

Fosforilasi tirosil STATs 1, 3, 5A dan 5B yang tergantung GH dijumpai dalam fibroblas 3T3-F442A, hepar tikus yang mengalami hipofisektomi, biakan sel hati dan pada berbagai sistem overekspresi. Fosforilasi tirosil STATs 5A dan 5B juga dijumpai pada sel IM-9 manusia dan otot hepar serta otot rangka tikus normal (Smit *et al.*, 1999).

STAT1 yang juga disebut P91, diidentifikasi sebagai anggota kompleks gen faktor 3 yang dirangsang oleh IFN $\alpha$ . STAT3 diidentifikasi sebagai *acute phase response factor* (APRF) yang memperantarai regulasi transkripsi protein terhadap IL-6. STAT 5 atau *mammary gland factor* (MGF) diidentifikasi sebagai faktor transkripsi yang dirangsang oleh prolaktin (PRL), meskipun gen STAT5 awalnya tunggal yang ditemukan pada domba, saat ini ada 2 bentuk protein STAT yaitu STAT5A dan STAT5B yang ditemukan pada mencit, tikus dan manusia (Silva *et al.*, 1996). Gen yang mengkode STAT5A dan STAT5B sangat homolog dengan 90 % sekuens kode yang identik. Protein STAT5A dan STAT5B terutama berbeda pada domain aktivasi transkripsi COOH-terminal, spesifisitas ikatan DNA dan distribusinya dalam jaringan

(Verdier *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa protein STAT5A dan STAT5B mempunyai peran yang saling tumpang tindih dalam *signaling* GH.

Analisis *signaling* GH pada sel defisiensi JAK2 dan sel yang mengalami mutasi dalam mengekspresikan reseptor GH menunjukkan bahwa aktivasi STATs 1, 3, 5A dan 5B yang tergantung GH memerlukan aktivasi JAK2 (Smit *et al.*, 1997). Hal ini sesuai dengan temuan bahwa aktivasi JAKs diperlukan untuk aktivasi STAT. JAK1 atau JAK2 yang diekspresikan berlebih secara aktif dalam sel COS akan merangsang terikatnya STAT1 ke DNA (Silvennoinen, 1993).

Aktivasi JAK2 yang diekspresikan berlebih tampaknya cukup untuk fosforilasi STAT1 dan STAT3 dan pengikatan DNA, namun tidak cukup untuk aktivasi STAT5. Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi STAT5 oleh GH memerlukan fosforilasi residu tirosin spesifik dalam reseptor GH sehingga menghasilkan tempat ikatan berafinitas tinggi untuk domain SH2 dalam protein STAT. Tirosin spesifik pada reseptor GH babi (Y534, Y566 dan Y627 ekuivalen dengan Y534, Y566 dan Y626 pada reseptor GH tikus) diketahui diperlukan untuk fosforilasi tirosil STATs tergantung GH dan transkripsi promotor Spi 2.1 (Wang *et al.*, 1996).

Bentuk reseptor GH yang kekurangan sebagian besar tirosin terfosforilasi dapat memperantarai fosforilasi tirosil STATs 1 dan 3 yang diinduksi GH dan ikatan STATs 1 dan 3 pada *Sis inducible element* (SIE) dari *c-fos*. Meskipun demikian tirosin terfosforilasi dalam reseptor G H dapat menyebabkan aktivasi maksimal STAT1 dan STAT3 (Smit *et al.*, 1996).

Fosforilasi tirosil diperlukan untuk aktivasi pengikatan DNA STAT. Penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa fosforilasi juga berperan dalam regulasi protein STAT. Pada pemeriksaan *Western Blots* terbukti bahwa *band* STAT3 dan STAT5



terfosforilasi tirosil akibat respon dari GH (Ram *et al.*, 1996). Protein STAT terfosforilasi pada residu serin dan tirosin.

Penelitian tidak langsung menunjukkan bahwa GH menstimulasi fosforilasi STATs 1, 3 dan 5 pada serin atau treonin dalam hepar. Fosforilasi ini akan meningkatkan pengikatan DNA STAT1, DNA STAT3 dan mengubah secara substansial pengikatan DNA STAT5 (Ram *et al.*, 1996). STAT 1, 3, dan 5A mengandung *conserved consensus sequence* untuk fosforilasi yaitu MAP kinase dan penelitian awal menunjukkan bahwa MAP kinase bertanggung jawab atas fosforilasi seril STAT1, STAT3 dan STAT5A. Sedangkan STAT5B karena tidak mengandung *conserved consensus sequence* maka fosforilasi dilakukan oleh kinase lain selain MAP kinase. Protein STAT 1, 3, 5A dan 5B juga mengandung protein kinase C dan kasein kinase untuk proses fosforilasi. Hal ini menunjukkan bahwa jalur *signaling* ganda dapat menyatu pada protein STAT untuk aktivasi transkripsi oleh GH.

### **2.5 Peran Tirosin Fosfatase dalam Terminasi *Signaling* Protein STAT yang Diaktifkan GH**

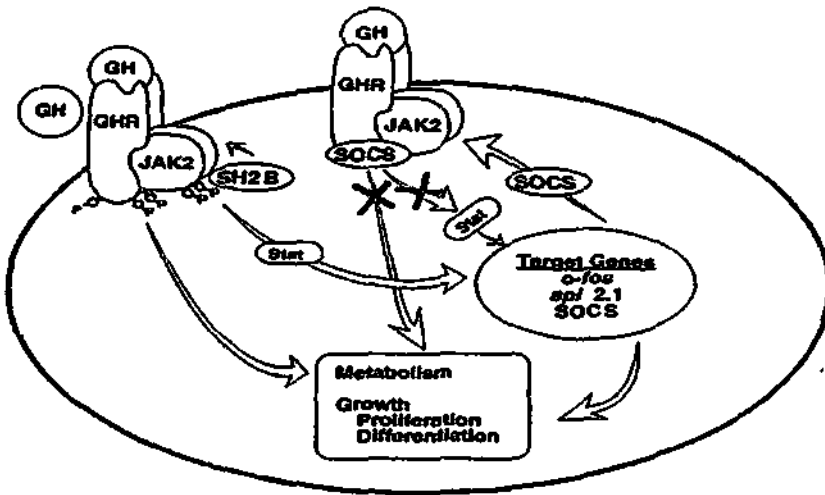
Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH melibatkan dua jenis peristiwa *signaling* : (1) defosforilasi tirosin pada GHR, JAK2 dan STATs oleh fosfatase, (2) ekspresi protein *suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH memerlukan aktivasi tirosin fosfatase pada kompleks GHR/JAK2. Fosfatase ini selanjutnya akan mendefosforilasi GHR, JAK2 dan STAT untuk mengadakan *down-regulate signaling*. Karena STAT memerlukan GHR terfosforilasi untuk *docking* dan aktivasi selanjutnya oleh JAK2 maka defosforilasi GHR diduga akan mengakhiri aktivasi STAT. Defosforilasi GHR juga

menandai terjadinya degradasi (Gebert *et al.*, 1999). Defosforilasi tirosin dalam domain kinase JAK2 diduga akan menginaktifkan JAK2, sedangkan defosforilasi tirosin dalam STAT akan menghambat pengikatan DNA sehingga akan mengakhiri *signaling*.

Fosfatase yang berperan sebagai *regulator* negatif *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH adalah SHP-1 dan SHP-2 yang mengandung domain SH2. SHP-1 diketahui sebagai *regulator* negatif *signaling* JAK/STAT yang diperantarai reseptor sitokin dalam sel hematopoietik. SHP-1 akan berasosiasi dengan JAK2 untuk mendefosforilasi JAK2 pada hepar. SHP-1 dan SHP-2 dianggap sebagai fosfatase potensial untuk STAT 5 (Yu *et al.*, 2000). SHP-2 berasosiasi dengan GHR sebagai respon terhadap GH, mutasi residu tirosin dalam GHR yang berfungsi sebagai tempat pengikatan SHP-2 akan memperpanjang fosforilasi tirosil GHR, JAK2 dan STAT5B sehingga efek metabolik GH semakin lama (Stofega *et al.*, 2000). Anwar dkk (2011) mengatakan bahwa berat molekul protein SHP1 ayam pedaging sebesar 68 kDa.

Fosfatase lain yang diduga terlibat dalam defosforilasi GHR, JAK2 dan STAT adalah serine / threonine inhibitor H-7 dan sikloheksamida yang akan memperlambat inaktifnya JAK2 (Gebert *et al.*, 1999).

Protein SOCS berperan sebagai *negative feedback* dalam sel, ekspresinya diinduksi oleh sitokin ataupun hormon dan bekerja menghambat *signaling* kompleks reseptor yang diaktifkan (Naka *et al.*, 1997). GH menginduksi ekspresi SOCS-1, -2, -3 dan CiS dalam hepar tikus dengan derajat yang berbeda (Ram dan Waxinan, 1999). Jalur *signaling* yang terlibat dalam induksi ekspresi SOCS sebagai respon terhadap Gii masih belum jelas, namun diperkirakan memerlukan *signaling* protein STAT (Naka *et al.*, 1997).



**Gambar 2.1. Regulasi STATs oleh SH2-B dan SOCs. P: Phosphotyrosines. JAK: Janus kinase, Spi: Serine protease inhibitor, SOCS: uppressor of cytokine signaling (Herrington *et al.*, 2000).**

SOCS-1 dapat berinteraksi langsung dengan JAK (Endo *et al.*, 1997). Inhibisi SOCS-1 terhadap aktivitas JAK2 memerlukan interaksi antara *domain* SH2 SOCS-1 dan JAK2 (Yasukawa *et al.*, 1999). Diperkirakan regio N-terminal pada *domain* SH2 bekerja sebagai pseudosubstrat inhibitor JAK2. SOCS-1 akan menghambat fosforilasi tirosil JAK2 dan selanjutnya secara konstitutif akan menghentikan fosforilasi tirosil STAT5B, pengikatan DNA dan ekspresi gen yang diperantarai STAT5B (Ram dan Waxman, 1999).

Kerja SOCS-2 terhadap *signaling* protein STAT yang diinduksi GH belum diketahui secara jelas. Sedangkan untuk SOCS-3 ternyata diinduksi dengan cepat di dalam hepar oleh GH (Tollet-Egnell *et al.*, 1999). Hal ini menunjukkan bahwa SOCS-3 berperan penting dalam terminasi *signaling* protein STAT. Berbeda dengan SOCS-1, SOCS-3 menghambat JAK2 melalui mekanisme yang memerlukan GHR (Hansen *et al.*, 1999). Namun mekanisme terjadinya proses ini belum jelas. Penelitian menggunakan domain sitoplasma tirosil GHR yang terfosforilasi pada bakteri oleh kinase selain JAK2

menunjukkan bahwa SOCS-3 dan SOCS lain dapat berikatan langsung dengan GHR. Hal ini menunjukkan arti penting penggunaan GHR yang difosforilasi JAK2 dalam menentukan mekanisme penghambatan JAK2 oleh SOCS.

Seperti halnya SOCS-3, CIS terutama diinduksi dalam hepar oleh GH dan juga memerlukan GHR untuk menghambat JAK2 (Ram dan Waxman, 1999). Sesuai dengan peran penting fisiologis CIS dalam *signaling* GH, mencit *transgenic* yang mengekspresikan CIS mengalami penurunan berat badan dan kadar *major urinary protein* (MUP) rendah pada urinnya (Matsumoto *et al.*, 1999). Hal ini merupakan ciri mencit yang defisiensi STAT5.

### **BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1 Tujuan Penelitian**

##### **3.1.1 Tujuan Jangka Panjang**

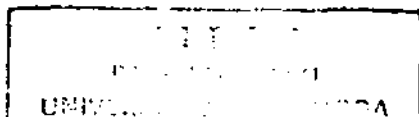
Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk mengetahui susunan asam amino protein fosfatase SHP pada ayam pedaging yang sedang mengalami pertumbuhan akibat meningkatnya *growth hormone* (GH).

##### **3.1.2 Tujuan Khusus**

Mengetahui berat molekul protein fosfatase SHP-2 yang ada pada jaringan hepar ayam pedaging

#### **3.2 Manfaat Penelitian**

Dengan diketahuinya berat molekul protein SHP-2 ayam pedaging maka menjadi dasar untuk mencari anti protein SHP yang dapat memperlambat terminasi signaling protein STAT yang diaktifkan GH, sehingga efek metabolik GH dapat menjadi lebih lama dan akhirnya pertumbuhan semakin tinggi.



## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan kandang hewan coba yang ada di wilayah Surabaya.

### 4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa hepar ayam pedaging jantan galur *Lohman* (MB 202 P) yang dipelihara mulai umur 1 hari sampai dengan 21 hari.

### 4.3 Prosedur Penelitian

Ayam dipelihara dalam kandang mulai umur 1-21 hari, ayam mendapat pakan dua kali sehari yaitu pukul 06.00 WIB dan 18.00 WIB dengan jumlah 10 % lebih kecil dari standar. Pada umur 21 hari ayam dipotong untuk diambil sampelnya berupa jaringan hepar untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

1. Isolasi protein fosfatase SHP-2 dari jaringan hepar ayam pedaging
2. Analisis protein fosfatase SHP-2 dari jaringan hepar ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*)
3. Identifikasi berat molekul protein fosfatase SHP-2 dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari *gel polyacrylamide*.

#### 4.4 Ekstraksi Protein Sampel

0,5 gram sampel di larutkan pada 1 mL *buffer lysis* pH 8 (50 mM *Tris Buffer*, pH 8,0 yang mengandung 0,1% SDS, 0,5% *Nonidet P-40*, 120 mM NaCl, 100  $\mu$ M PMSF). Kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan mortal dingin, inkubasi dan *sacking* dalam es selama 30 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 20 menit 4°C. Setelah itu diambil supernatan untuk dilakukan analisis

#### 4.5 SDS-PAGE Protein SHP2

##### 4.5.1 Persiapan Gel

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis, yakni gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* 12% (1 plat) dibuat dengan menambahkan akuades 1700  $\mu$ L, LGB (*lower gel buffer*) 1300  $\mu$ L, dan *T-acyl* 30% sebanyak 2000  $\mu$ L, kemudian didegas selama 10 menit. Selanjutnya APS (amoniumpersulfat) 10% sebanyak 70  $\mu$ L dan TEMED 7  $\mu$ L secara berurutan, kemudian gelas beker digoyang perlahan-lahan untuk meratakan semua larutan. Segera larutan dituangkan kedalam plate menggunakan pipet sampai  $\frac{3}{4}$  tinggi *plate*. Secara perlahan dituangkan air diatas larutan gel agar permukaan gel tidak bergelombang. Sementara menunggu *separating gel* memadat, *stacking gel* 3% (1 *plate*) disiapkan dengan cara: akuades 975  $\mu$ L, UGB (*upper gel buffer*) 415  $\mu$ L, *T-acyl* 30% sebanyak 267  $\mu$ L, dan secara berurutan APS 10% 20  $\mu$ L dan TEMED 2  $\mu$ L. Gelas beker digoyang perlahan dan segera larutan dituang kedalam *plate*. Secara perlahan diselipkan sisir pembentuk sampel. Setelah gel memadat sisir diangkat dan selanjutnya dilakukan pengisian sampel pada sumur gel.

#### 4.5.2 Injeksi Sampel Protein

Sebanyak 20  $\mu$ L larutan protein dan protein *standard* masing-masing ditambah dengan 20  $\mu$ L *buffer* sampel (RSB atau *reducing sample buffer*) kemudian dipanaskan kedalam pemanas air pada suhu 100 $^{\circ}$  C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel siap dimasukkan kedalam sumur gel dalam volume 24  $\mu$ L untuk setiap sumur. Protein *standard* yang digunakan adalah protein *standard broad range* (BioRad).

#### 4.6 Western Blotting SHP1 dan SHP2

Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas nitroselulosa menggunakan alat *semi dry blotter* buatan *Biorad* ditranfer pada nitroselulose dengan 300 mA selama 30 menit. Kemudian diwarnai dengan *ponco* 2% yang mengandung TCA sampai konsentrasi mencapai 3%. Lakukan bloking *unspecific* protein pada BSA 3% dalam larutan TBE pH 7,4 dan *Tween* 20 konsentrasi 0,05%, inkubasi semalam. Cuci pada TBE pH 7,4 yang ditambah *Tween* 20 konsentrasi 0,05% sampai 2 kali, selama masing-masing 5 menit. Inkubasi pada *phosphor-* SHP-2 (Tyr542) antibody. (Cell Signaling Technology, Inc) dengan konsentrasi 5 $\mu$ g/mL dalam TBE pH 7,4 yang mengandung larutan BSA konsentrasi 1%, kemudian digoyang selama 2 jam. Cuci pada TBE pH 7,4 yang mengandung *Twen* 20 konsentrasi 0,05%. Inkubasi pada antibodi sekunder berlabel biotin konsentrasi 1/1000 dalam TBE pH 7,4 dengan 1%BSA. Cuci dengan TBE pH 7,4 *Tween* 20 konsentrasi 0,05%, kemudian diinkubasi dengan SA-HRP selama 40 menit dan dicuci dengan TBE pH 7,4 *Tween* 20 konsentrasi 0,05% 2 kali selama 5 menit. Visualisasi pada Tetra methyl bensidine (TMB), selama 30 menit. Bilas dengan H<sub>2</sub>O 2 kali selama masing-masing 5 menit.



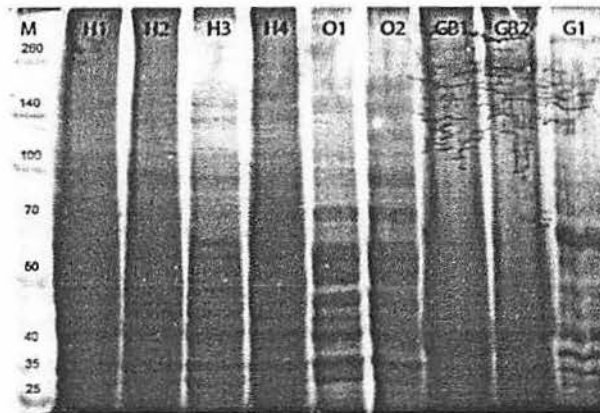
#### **4.7 Analisis Data**

Data hasil penelitian berupa protein fosfatase SHP-2 dianalisis untuk menentukan berat molekul protein fosfatase SHP-2 yang berperan dalam menimbulkan terminasi efek metabolik GH pada ayam pedaging yang mengalami pertumbuhan.

## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 SDS Page Protein SHP dari Hepar Ayam Pedaging

Hasil SDS-PAGE protein SHP pada jaringan hepar ayam pedaging menunjukkan adanya protein SHP seperti pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 SDS Page protein SHP dari hepar ayam pedaging

Berdasarkan hasil SDS-PAGE pada jaringan hepar ayam pedaging ditemukan adanya protein SHP. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat beberapa pita yang tampak pada marker 260 dengan 140 kDa terdapat satu pita protein, marker 140 dengan 100 kDa terdapat satu pita protein dan marker 100 kDa dengan 70 kDa juga terdapat satu pita protein.

Pita protein yang terbentuk antara marker 100 kDa dengan 70 kDa diduga protein SHP. Pita protein yang terbentuk pada hepar sangat jelas, hal ini menunjukkan bahwa pada jaringan hepar tampak terjadi reaksi antigen antibodi paling kuat.

Hasil SDS-PAGE protein jaringan hepar yang menunjukkan adanya pita protein antara marker 100 kDa dengan 70 kDa adalah protein dengan berat molekul 72 kDa.

Protein berat molekul 72 kDa hasil SDS-PAGE belum bisa menunjukkan secara pasti apakah itu protein SHP2 atau tidak. Untuk membuktikan bahwa terbentuknya pita protein dengan berat molekul 72 kDa adalah protein SHP-2 maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan *Western blot*.

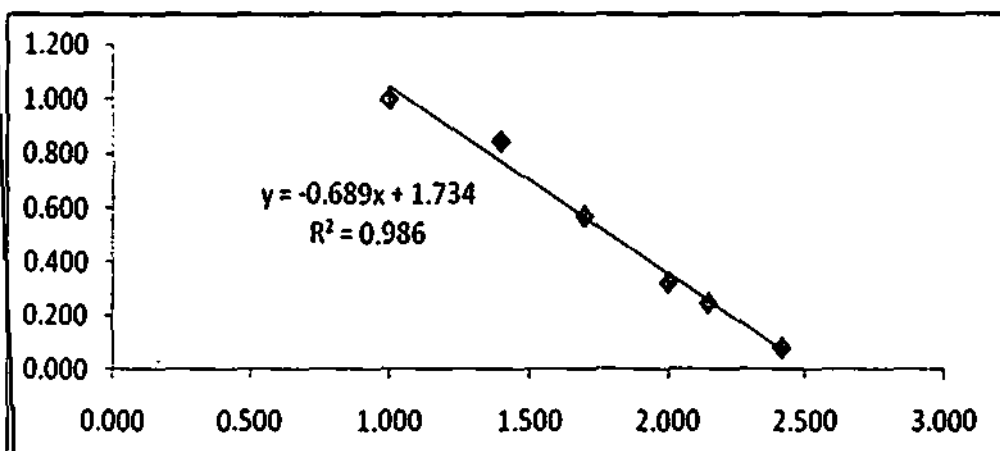
**Tabel 5.1 Perhitungan Berat Molekul hasil SDS Page protein SHP pada jaringan hepar ayam pedaging**

**Fermentas Low Protein Marker**

BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
260	5	2.415	0.077
140	16	2.146	0.246
100	21	2.000	0.323
50	37	1.699	0.569
25	55	1.398	0.846
10	65	1.000	1.000

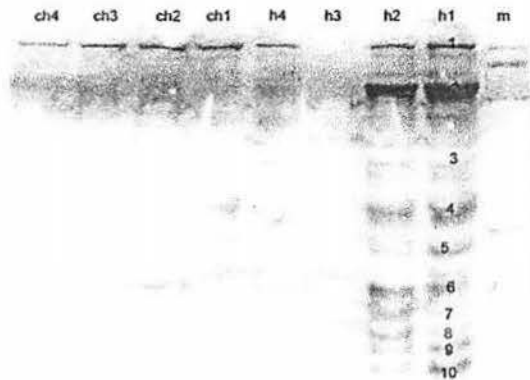
**Sampel**

Kode	BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
1	118	15	2.073	0.231
2	98	20	1.991	0.308
3	70	29	1.843	0.446
4	55	35	1.744	0.538
5	46	40	1.662	0.615
6	41	43	1.613	0.662
7	38	45	1.580	0.692
8	31	50	1.498	0.769
9	29	52	1.465	0.800
10	25	56	1.399	0.862
11	19	63	1.284	0.969



## 5.2 Western Blott Protein SHP-2 dari Hepar Ayam Pedaging

Hasil *Western blot* protein SHP pada jaringan hepar menunjukkan adanya protein SHP-2 dengan berat molekul 72 kDa, seperti pada Gambar 5.2



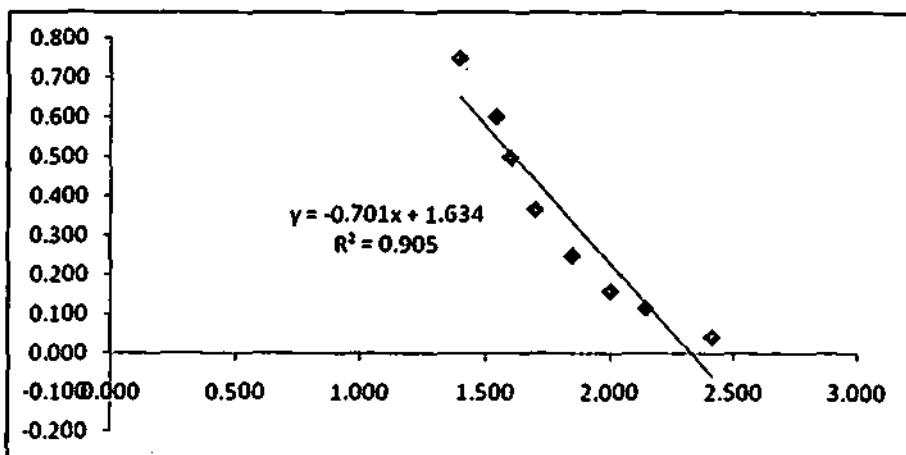
Gambar 5.2 Western Blott protein SHP-2 dari hepar ayam pedaging.

Hasil perhitungan berat molekul protein SHP-2 seperti Tabel 5.2 menunjukkan bahwa berat molekul protein SHP-2 adalah 72 kDa. Terbentuknya pita protein antara marker 100 kDa dengan 70 kDa setelah dilakukan perhitungan (Tabel 5.2) ternyata berat molekulnya adalah 72 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah protein SHP-2 ayam pedaging fase pertumbuhan dengan berat molekul 72 kDa.. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 72 kDa yang sangat jelas karena terjadi ikatan antara protein SHP-2 hasil SDS-PAGE dengan *phosphor*- SHP-2 (Tyr542) antibody.

**Tabel 5.2 Perhitungan Berat Molekul hasil *Western Blot* protein SHP-2 pada jaringan hepar ayam pedaging**

BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
260	3	2.415	0.044
140	8	2.146	0.118
100	11	2.000	0.162
70	17	1.845	0.250
50	25	1.699	0.368
40	34	1.602	0.500
35	41	1.544	0.603
25	51	1.398	0.750
10	68	1.000	1.000

Kode	BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
1	145	8	2.161255	0.117647
2	103	15	2.014553	0.220588
3	50	30	1.700190	0.441176
4	38	36	1.574445	0.529412
5	24	45	1.385828	0.661765
6	19	50	1.281040	0.735294
7	15	55	1.176253	0.808824
8	12	60	1.071465	0.882353
9	10	63	1.008593	0.926471
10	8	67	0.924763	0.985294



Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein dengan SDS-PAGE adalah protein SHP-2 maka dilakukan *Western blot* dengan menggunakan *phosphor-SHP-2* (Tyr542) antibody. Pada Gambar 5.2 tampak terbentuk satu pita protein dengan berat molekul 72 kDa. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 72 kDa menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah benar protein SHP-2. Hal ini karena terjadi ikatan antara protein SHP-2 hasil SDS-PAGE dengan *phosphor-SHP-2* (Tyr542) antibody.

Protein SHP-2 dengan berat molekul 72 kDa pada jaringan hepar menunjukkan bahwa pada ayam pedaging fase pertumbuhan protein SHP-2 diduga sama dengan yang ada pada manusia. Diharapkan dengan diketahuinya protein SHP-2 pada ayam pedaging akan menjadi dasar untuk mengetahui sejara jelas mekanisme *growth hormone* dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh.

*Growth hormone* memainkan peran dalam mengatur pertumbuhan dan komposisi tubuh (Foster, 1998). *Growth hormone* secara nyata mempunyai efek biologik yang dipengaruhi oleh *insulin-like growth factor I* (IGF-I) dalam meningkatkan pertumbuhan otot skelet (Younken, 2000). Pemberian faktor pertumbuhan secara *in vivo* pada ayam pedaging menyebabkan peningkatan kecepatan pertumbuhan dan massa otot sebesar 15 % dan diperlukan pakan 6,5 % lebih sedikit dari pakan normal. Peningkatan pertumbuhan ini mempunyai implikasi dan daya tarik yang besar bagi dunia perunggasan. Tetapi pola ekspresi gen faktor pertumbuhan selama masa pertumbuhan sampai saat ini belum diketahui secara jelas (Killefer, 2000).

Protein STAT berperan penting dalam regulasi transkripsi gen oleh GH dan sitokin lain

yang mengaktifkan *Janus Kinase* (JAK). Protein STAT yang semula diidentifikasi dalam jalur *signaling* interferon (IFN) (Darnell *et al.*, 1994) adalah faktor sitoplasmik yang mengandung domain SH-2. Pada fosforilasi tirosil yang sering melalui kaskade berinisiasi JAK kinase, protein STAT sitoplasma membentuk suatu kompleks dengan protein STAT lain melalui interaksi tirosin yang mengalami fosforilasi pada domain SH-2, mengadakan translokasi menuju ke nukleus, berikatan dengan DNA dan selanjutnya mengaktifkan transkripsi pada gen sasaran (Ihle, 1996).

*Growth hormone* diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5a dan 5b. Fosforilasi tirosil STATs 1, 3, 5a dan 5b yang tergantung GH dijumpai dalam fibroblas 3T3-F442A, hepar tikus yang mengalami hipofisektomi, biakan sel hati dan pada berbagai sistem overekspresi. Fosforilasi tirosil STATs 5a dan 5b juga dijumpai pada sel IM-9 manusia dan otot hepar serta otot rangka tikus normal (Smit *et al.*, 1999).

STAT1 yang juga disebut P91, diidentifikasi sebagai anggota kompleks gen faktor 3 yang dirangsang oleh IFN $\alpha$  (FU, 1992). Analisis *signaling* GH pada sel defisiensi JAK2 dan sel yang mengalami mutasi dalam mengekspresikan reseptor GH menunjukkan bahwa aktivasi STATs 1, 3, 5a dan 5b yang tergantung GH memerlukan aktivasi JAK2 (Smit *et al.*, 1997). Hal ini sesuai dengan temuan bahwa aktivasi JAKs diperlukan untuk aktivasi STAT (Muller *et al.*, 1993). JAK1 atau JAK2 yang diekspresikan berlebih secara aktif dalam sel COS akan merangsang terikatnya STAT1 ke DNA (Silvennoinen, 1993).

Penelitian tidak langsung menunjukkan bahwa GH menstimulasi fosforilasi STATs 1, 3 dan 5 pada serin atau treonin dalam hepar. Fosforilasi ini akan meningkatkan pengikatan DNA STAT1, DNA STAT3 dan mengubah secara substansial pengikatan DNA STAT5 (Ram *et al.*, 1996). STAT 1, 3, dan 5a mengandung *conserved*



*consensus sequence* untuk fosforilasi yaitu MAP kinase dan penelitian awal menunjukkan bahwa MAP kinase bertanggung jawab atas fosforilasi seril STAT1, STAT3 dan STAT5a. Sedangkan STAT5b karena tidak mengandung *conserved consensus sequence* maka fosforilasi dilakukan oleh kinase lain selain MAP kinase. Protein STAT 1, 3, 5a dan 5b juga mengandung protein kinase C dan kasein kinase untuk proses fosforilasi. Hal ini menunjukkan bahwa jalur *signaling* ganda dapat menyatu pada protein STAT untuk aktivasi transkripsi oleh GH.

Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH melibatkan dua jenis peristiwa *signaling* : (1) defosforilasi tirosin pada GHR, JAK2 dan STATs oleh fosfatase, (2) ekspresi protein *suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH memerlukan aktivasi tirosin fosfatase pada kompleks GHR/JAK2. Fosfatase ini selanjutnya akan mendefosforilasi GHR, JAK2 dan STAT untuk mengadakan *down-regulate signaling*. Karena STAT memerlukan GHR terfosforilasi untuk *docking* dan aktivasi selanjutnya oleh JAK2 maka defosforilasi GHR diduga akan mengakhiri aktivasi STAT. Defosforilasi GHR juga menandai terjadinya degradasi (Gebert *et al.*, 1999). Defosforilasi tirosin dalam domain kinase JAK2 diduga akan menginaktifkan JAK2, sedangkan defosforilasi tirosin dalam STAT akan menghambat pengikatan DNA sehingga akan mengakhiri *signaling*.

Fosfatase yang berperan sebagai *regulator negatif signaling* protein STAT yang diaktifkan GH adalah SHP-1 dan SHP-2 yang mengandung domain SH2 (Feng *et al.*, 1993). SHP-1 diketahui sebagai *regulator negatif signaling* JAK/STAT yang diperantarai reseptor sitokin dalam sel hematopoietik (Haque *et al.*, 1998). SHP-1 akan berasosiasi dengan JAK2 untuk mendefosforilasi JAK2 pada hepar (Heckett *et al.*, 1997). SHP-1 dan SHP-2 dianggap sebagai fosfatase potensial untuk STAT 5 (Yu *et al.*,

2000). SHP-2 berasosiasi dengan GHR sebagai respon terhadap GH, mutasi residu tirosin dalam GHR yang berfungsi sebagai tempat pengikatan SHP-2 akan memperpanjang fosforilasi tirosil GHR, JAK2 dan STAT5b sehingga efek metabolik GH semakin lama (Stofega *et al.*, 2000).

## **BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berat molekul protein SHP2 dalam jaringan hepar ayam pedaging adalah 72 kDa

### **6.2 Saran**

Dengan diketahuinya berat molekul protein SHP-1 dan SHP-2 dalam jaringan hepar ayam pedaging maka dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan susunan asam amino protein SHP sehingga nantinya bisa dibuat anti protein SHP yang berfungsi menghambat peran SHP dalam inhibitor signaling protein STAT. Hambatan peran SHP dalam inhibitor signaling protein STAT akan meningkatkan fungsi hormone pertumbuhan sehingga pertumbuhan ternak akan meningkat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar M dan Sarmanu, 2004. Fisiendokrinologi sekresi *growth hormone* (GH) dan *insulin-like growth factor I* (IGF-I) sebagai dasar peningkatan kualitas daging. Lembaga Penelitian, Unair, Surabaya.
- Anwar M, 1999. Pengaruh waktu dan jumlah pemberian pakan terhadap kadar lemak dan protein daging ayam pedaging. Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Anwar M, 2004. Peran pengaturan waktu dan jumlah pemberian pakan terhadap sekresi *growth hormone* (GH) dan *insulin-like growth factor I* (IGF-I) dalam mempengaruhi sintesis lemak dan protein daging ayam pedaging. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Anwar M, Sarmanu dan Hidajati N, 2003. Studi sekresi leptin sebagai dasar diet penurunan berat badan. Lembaga Penelitian, Unair, Surabaya.
- Anwar M, Widjaja NMR, Hidajati N, 2000. Efektivitas pengurangan jumlah pakan dalam upaya menciptakan ayam pedaging yang langsing. Lembaga Penelitian, Unair, Surabaya.
- Burnside J. 1996. Intracellular mechanism of GH action. In (Bent M). *Livestock Productivity Enhancers : An Economic assessment*. CAB International, p 13
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D., 1990. *Molecular cell biology*. 2<sup>nd</sup> Edition, New York : Scientific America Books, p 715
- Endo TA, Masuhara M, Yokuuchi M, *et al.*, 1997. *Nature* 387: 921-924
- Feng GS, Hui CC and Pawson T., 1993. *Science* 259:1607-1611
- Foster DN, Froudman JA, Harmon SA, Foster LK., 1998. *Baculovirus-mediated expression of chicken GH*. *Tektran* p 14
- Gebert CA, Park S-H and Waxman DJ., 1999. *Mol. Endocrinol.* 13:38-56
- Hackett RH, Wang YD, Sweitzer S *et al.*, 1997. *J. Biol. Chem.* 272:11128-11132
- Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ *et al.*, 1999. *Mol. Endocrinol.* 13:1832-1843
- Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M *et al.*, 1998. *J. Biol. Chem.* 273:33893-33896
- Herrington J, Smit LS, Schwartz L and Carter-Su C., 2000. *Oncogen* 19:2585-2597
- Hull KI, Harvey S., 1996. GH receptor in the avian immune system. In *Abstract Form : International Symposium on Avian Endocrinology*. Chateau Lake Louise, Alberta, p 30
- Ihle JN., 1996. *Cell* 84 : 331-334
- Killefer K, Kenny PB., 2000. *Anim Vet Sci* 1877.
- Matsumoto A, Seki Y, Kubo M *et al.*, 1999. *Mol. Cell. Biol.* 19:6396-6407
- Naka T, Narazaki M, Hirata M *et al.*, 1997. *Nature* 387:924-929
- Ortiz R, Wade CE, and Ortiz CL, 2001. Effect of prolonged fasting on plasma cortisol and TH in postweaned northern elephant seal pups. *Am J Physiol* 280:R790-795
- Ram PA and Waxman DJ., 1999. *J. Biol. Chem.* 274:35553-35561
- Ram PA, Park SH, Choi HK and Waxman DJ., 1996. *J. Biol. Chem.* 271:5929-5940
- Savendahl L, 1999. Fasting increases serum total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B in healthy, nonobese human, *J Nutr* 129:2005-2008
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J and Levy DE., 1993. *Nature* 366:583-585
- Siva CM, Lu H and Day RN., 1996. *Mol. Endocrinol.* 10:508-518

- Smit LS, Meyer DJ, Argetsinger LS *et al.*, 1999 *Handbooks of Physiology*. Oxford University Press : New York, pp445-480.
- Stofega MR, Wang H, Ullrich A and Carter-Sue C., 2000. *J. Biol. Chem.* Submitted
- Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A *et al.*, 1999. *Endocrinology* 140:3693-3704
- Verdier F, Chretien S, Muller O *et al.*, 1998. *J. Biol. Chem.*, 273:28185-28190
- Vleuic L, Van Veldhoven PP, Decuypera E, Khun ER., 1996. Distribution of GH receptors in chicken liver. In Abstract Form : International Symposium on Avian Endocrinology. Chateau Lake Louise, Alberta, p 30
- Wang X, Darius CJ, Xu BC and Kopchick JJ., 1996. *Mol. Endocrinol* 10:1249-1260
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H *et al.*, 1999. *EMBO J* 18:1309-1320
- Younken RV, Zaou Y, Wang X *et al.*, 2001. Altered chicken thyroid hormone metabolism with chronic growth hormone (GH) enhancement *in vitro* : consequences for skeletal muscle growth. *J Endocrinol* 166:620-690.
- Yu C-L, Jin Y-J and Burakoff SJ., 2000. *J. Biol. Chem.* 275:599-604
- Zhu T, Goh EL and Lubie PE., 1998. *J. Biol. Chem* 273 : 1062-10689