

**LAPORAN
HASIL PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2012**



**POTENSI PROTEIN GHRELIN DAN NEUROPEPTIDE Y
SEBAGAI BAHAN PENGATURAN KESEIMBANGAN ENERGI
UNTUK EFESIENSI PAKAN AYAM BROILER**

Peneliti :

**Nove Hidajati, M.Kes., drh
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D, drh
Ratna Damayanti, 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**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

RINGKASAN

Pengetahuan yang menunjukkan antara hubungan ghrelin , lambung, hipotalamus dan implikasi dari ghrelin pada kontrol fungsi gastrointestinal, keseimbangan energi, pertumbuhan saat ini masih belum seluruhnya terlalu jelas.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y sebagai dasar untuk mengetahui susunan asam amino protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) dan selanjutnya untuk membuat protein ghrelin sintetis yang berfungsi untuk pengatur keseimbangan energi pada ayam pedaging.

Ayam umur sehari (*day old chick*) ditempatkan dalam kandang *letter* sampai umur 21 hari dengan pakan dan minum secara *ad libitum*. Setelah mencapai umur 21 hari ayam dipotong untuk diambil sampelnya berupa jaringan saluran pencernaan dan otak untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut (1) Isolasi protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) dari jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging, (2) Identifikasi protein ghrelin dan neuropeptide (NPY) dari jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*), (3) Analisis berat molekul protein ghrelin dan reseptor ghrelin dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari *gel polyacrylamide*.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y ayam broiler adalah 44 kDa dan 11 kDa. Dengan diketahuinya berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y pada ayam broiler maka dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan susunan asam amino protein ghrelin dan neuropeptide Y sehingga diharapkan dapat dibuat protein ghrelin sintetis untuk mengatur keseimbangan energi ayam broiler.

SUMMARY

Our knowledge demonstrate the relationship between ghrelin, stomach, hypothalamus, and the implications of ghrelin in the control of gastrointestinal function, energy balance, growth, but it is still not entirely too clear.

The purpose of this study was to determine the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y as a basis to determine the amino acid composition of the protein ghrelin and neuropeptide Y (NPY) and subsequently to make synthetic ghrelin protein whose function is to control the energy balance in broilers.

Day old chickens were placed in litter pen until 21 day old, and each of subject were given feed, water ad libitum, respectively. Twenty one day old chickens were cut for gastrointestinal tract and brain tissue collecting samples. The samples were examined as follows (1) Isolating of ghrelin protein and neuropeptide Y (NPY) from the gastrointestinal tract and brain tissue broiler, (2) Identifying of the protein ghrelin and neuropeptide (NPY) from the gastrointestinal tract and brain tissues of chicken broilers by using SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreses), (3) Analysing of the molecular weight of the protein ghrelin blotting methods, namely Western Blot technique using proteins expressed at electrophoreses from polyacrylamide gels.

Based on these results it can be concluded that the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y broilers is 44 kDa and 11 kDa. By knowing the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y on the broiler can be used as a basis for determining the amino acid composition of the protein ghrelin and neuropeptide Y that is expected to be made of synthetic ghrelin protein to regulate energy balance in broiler chickens.

**POTENSI PROTEIN GHRELIN DAN NEUROPEPTIDE Y
SEBAGAI BAHAN PENGATURAN KESEIMBANGAN ENERGI UNTUK
EFESIENSI PAKAN AYAM BROILER**

Nove Hidajati ¹⁾

Romziah Sidik ²⁾

Ratna Damayanti ¹⁾

¹⁾ Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya

²⁾ Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya

³⁾

ABSTRACT

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y sebagai dasar untuk mengetahui susunan asam amino protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) dan selanjutnya untuk membuat protein ghrelin sintetis yang berfungsi untuk pengatur keseimbangan energi pada ayam pedaging. Sampel diisolasi dari jaringan saluran pencernaan dan otak diambil dari ayam pedaging dan kemudian diperiksa dengan SDS Page dan Western Blott. Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y ayam broiler adalah 44 kDa dan 11 kDa. Dengan diketahuinya berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y pada ayam broiler maka dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan susunan asam amino protein ghrelin dan neuropeptide Y sehingga diharapkan dapat dibuat protein ghrelin sintetis untuk mengatur keseimbangan energi ayam broiler.

Keywords : ghrelin, neuropeptide Y, broiler, energi

**POTENTIAL PROTEIN GHRELIN AND NEUROPEPTIDE Y
AS MATERIALS FOR ENERGY BALANCE SETTINGS FEED EFFICIENCY OF
BROILER CHICKEN**

Nove Hidajati ¹⁾

Romziah Sidik ²⁾

Ratna Damayanti ¹⁾

¹⁾ Department of Basic Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University Surabaya

²⁾ Department of Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University Surabaya

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y as a basis to determine the amino acid composition of the protein ghrelin and neuropeptide Y (NPY) and subsequently to make synthetic ghrelin protein whose function is to control the energy balance in broilers. Samples isolated from the digestive tract and brain tissue taken from the broiler and then examined by SDS Page and Western blott. Based on these results it can be concluded that the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y broiler chickens was 44 kDa and 11 kDa. By knowing the molecular weight of the protein ghrelin and neuropeptide Y on the broiler can be used as a basis for determining the amino acid composition of the protein ghrelin and neuropeptide Y that is expected to be made of synthetic ghrelin protein to regulate energy balance in broiler chickens.

Keywords : ghrelin, neuropeptide Y, broiler, energy

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 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan penelitian.
3. Kepala Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
4. Semua pihak yang telah membantu kelancaran pelaksanaan penelitian.

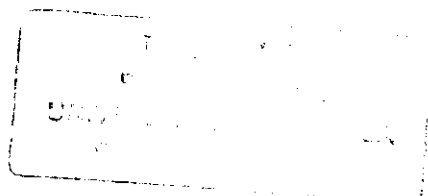
Akhirnya penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Oktober 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Ghrelin.....	3
2.2 Multipotensi Ghrelin.....	7
2.3 Potensi Ghrelin sebagai Pengatur Nafsu Makan.....	10
2.4 Pengaturan Jumlah Pakan yang Dimakan	10
2.5 Metabolisme Dan Penyimpanan Bahan Bakar Metabolisme.....	12
2.6 Alur Yang Memproses Produk Utama Dari Pencernaan.....	14
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	16
3.1 Tujuan Penelitian.....	16
3.1.1 Tujuan umum.....	16
3.1.2 Tujuan khusus.....	16
3.2 Manfaat Penelitian.....	16
BAB 4. METODE PENELITIAN	18
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18
4.2 Rancangan Riset.....	18
4.3 Sampel dan besar sampel Penelitian.....	18
4.4 Prosedur Penelitian.....	18
4.5 SDS-PAGE Protein ghrelin dan NPY	18
4.5.1 Persiapan gel	19
4.5.2 Injeksi sampel Protein Ghrelin	19
4.6 Western Blot Protein Ghrelin.....	20
4.7 Western Blot Protein Neuropeptide Y.....	20
4.8 Analisis Data.....	21
4.9 Bagan Operasional Penelitian.....	22
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
5.1 SDS Page Protein ghrelin dan NPY dari Saluran Pencernaan dan otak ayam Broiler.....	23
5.2 Western Blot Protein Ghrelin dari Saluran Pencernaan Ayam Broiler.....	26
5.3 Western Blot Protein Protein NPY dari Otak Ayam Broiler.....	28
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	32
6.1 Kesimpulan.....	32
6.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA	33



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1. Perhitungan Berat Molekul hasil SDS PAGE protein ghrelin dan NPY pada jaringan hepar ayam broiler.....	25
5.2. Perhitungan Berat Molekul hasil <i>Western Blot</i> protein ghrelin pada jaringan saluran pencernaan ayam broiler.....	27
5.3. Perhitungan Berat Molekul hasil <i>Western Blot</i> protein NPY pada jaringan hepar ayam broiler.....	29

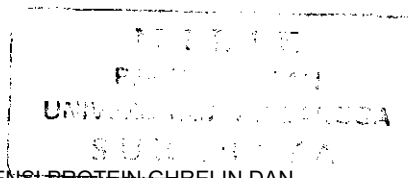
BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahn

Ghrelin adalah sebuah sinyal neuroendokrin yang memproses aktivitas biologis secara luas yang menggambarkan pentingnya bahwa lambung akan memberikan sinyal yang berpengaruh pada otak. (Inui *et al.*, 2004). Ghrelin peptida lambung berperan penting pada pengaturan makanan yang masuk ke dalam tubuh (*food intake*). Sebelum makan konsentrasi ghrelin plasma naik secara bertahap dan segera turun setelah makan. Penambahan ghrelin secara intravenous meningkatkan pemasukan makanan (*food intake*) dan memicu nafsu makan (*appetite*), hal ini membuktikan bahwa ghrelin berperan pada rasa lapar dan awal dari keinginan untuk makan (*meal initiation*). Ghrelin juga terlibat pada kontrol berat badan karena indeks massa badan (*body mass index*) secara negatif dikontrol oleh konsentrasi ghrelin plasma pada saat puasa (Bloom, 2005). Kelainan sinyal yang berasal dari lambung akan berkaitan dengan kelainan keseimbangan energi, pertumbuhan, dan hal ini berkaitan dengan fungsi gastrointestinal dan neuroendokrine. (Inui dkk, 2004).

Ghrelin dan leptin adalah komplementer namun bekerja secara antagonis, sinyalnya merefleksikan perubahan keseimbangan energi yang akut atau kronis dan efeknya diperantarai oleh neuropeptida hipotalamus seperti *neuropeptide Y* (NPY) dan *agouti related peptide* (AgRP). (Inui dkk, 2004).

Distensi lambung dan kemosensitisation lambung tidak cukup untuk merangsang respon ghrelin. Kemungkinan ini adalah postgastric process terlibat sekresi insulin baik langsung maupun tak langsung melalui stimulasi incretin hormon glucagon like peptide 1 dan *gastric inhibitory peptida*. Kebanyakan penelitian menyatakan bahwa insulin akan menurunkan konsentrasi ghrelin tidak tergantung pada glukosa. Mekanisme insulin menghambat efek konsentrasi ghrelin belum sepenuhnya diketahui. Efek insulin ini



mungkin diperantarai oleh efek langsung sel yang mensekresi ghrelin atau efek dari mekanisme humoral atau mekanisme central (Bloom, 2005).

Pengetahuan yang menunjukkan antara hubungan ghrelin , lambung, hipotalamus dan implikasi dari ghrelin pada kontrol fungsi gastrointestinal, keseimbangan energi , pertumbuhan saat ini masih belum seluruhnya terlalu jelas. Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui protein ghrelin ayam broiler sehingga dapat dibentuk protein ghrelin sintetis yang dapat digunakan untuk mengatur keseimbangan energi dan pertumbuhan ternak.

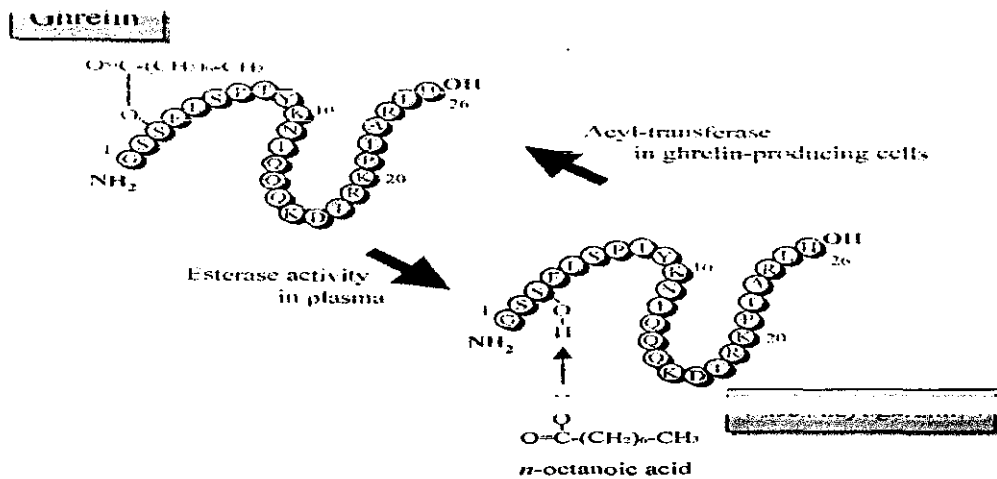
1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas maka rumusan masalah yang diajukan adalah berapakah berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) ?

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Ghrelin

Ghrelin adalah peptida yang tersusun dari 28 asam amino yang mempunyai gugus serine pada posisi ke 3, pertamakali ditemukan pada lambung tikus tepatnya di mukosa oxyntic enteroendocrine X/A-like sel. Ghrelin juga ditemukan jumlah kecil pada usus besar, pancreas, ginjal, sistim imunitas, placenta, testes, pituitary, paru, dan hypothalamus manusia. Disamping itu juga merupakan ligan endogen dari receptor GHS-R 1a (*Growth Hormone Secretagogue- Receptor type 1a*). Selain itu untuk menghasilkan efek biologis, maka ghrelin dapat bekerja secara langsung maupun tak langsung dan mekanisme kerjanya tergantung dimana lokasi hormone itu berada. Mekanisme kerjanya antara lain endokrin, parakrin, atau autokrine (Lely *et. al.*, 2004). Bentuk ghrelin yang khas dari *mature* ghrelin ini pada sisi N terminus pada asam amino urutan ke tiga terdapat serin yang dimodifikasi dengan asam lemak n-oktanoat, dan proses asetilasi ini penting bagi pengikatan ghrelin pada reseptornya dan aktivitasnya (Muccioli *et al*, 2001). Pada sisi N-terminal peptida ghrelin terdapat asam amino GSSF dengan asetilasi pada asam amino urutan ke tiga yaitu serin, dan sisi tersebut tadi penting untuk pengikatan ghrelin pada reseptornya disebut sebagai "*active core*" ghrelin (Bednarek *et al*, 2000; Matsumoto *et al*, 2001).



Gambar 2.1 Modifikasi ghrelin posttranslasi (Kaiya *et al*, 2007)

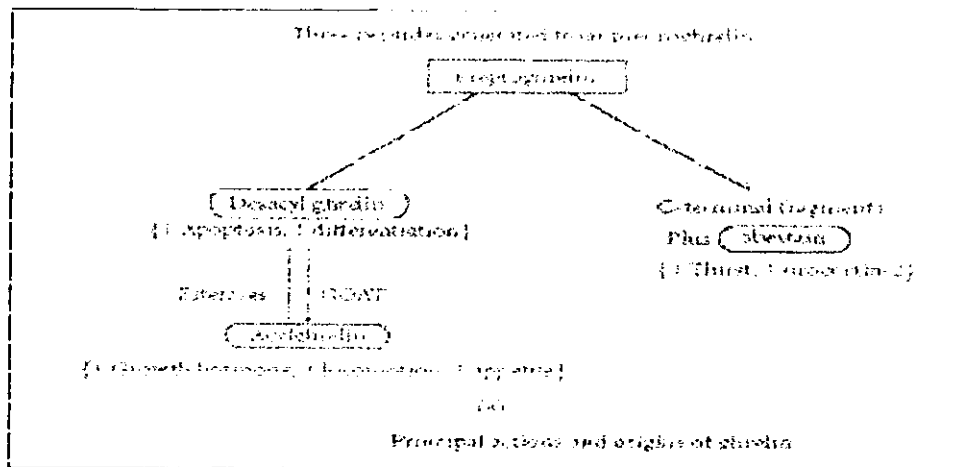
Kadar ghrelin dalam darah meningkat selama puasa, meningkat sesaat sebelum makan, dan menurun drastis setelah makan, yang mengisyaratkan bahwa hormon ini berperan untuk merangsang perilaku makan. Pemberian ghrelin secara eksogen juga meningkatkan asupan makanan pada hewan percobaan, yang lebih lanjut memperkuat dugaan bahwa hormon ini bersifat oreksigenik (Guyton, 2006).

Pada manusia sekresi ghrelin menurun bersamaan dengan bertambahnya usia selama masa anak-anak (Bellone *et al*, 2002). Peningkatan tingkat sirkulasi ghrelin pada tikus meningkat bersama dengan bertambahnya umur lebih dari 90 hari (Gualillo *et al*, 2001). Pada keadaan patofisiologi terjadi peningkatan sirkulasi ghrelin yang disebabkan oleh produksi ghrelin oleh jaringan endokrin yang terkena tumor lambung atau usus (Papotti *et al*, 2001).

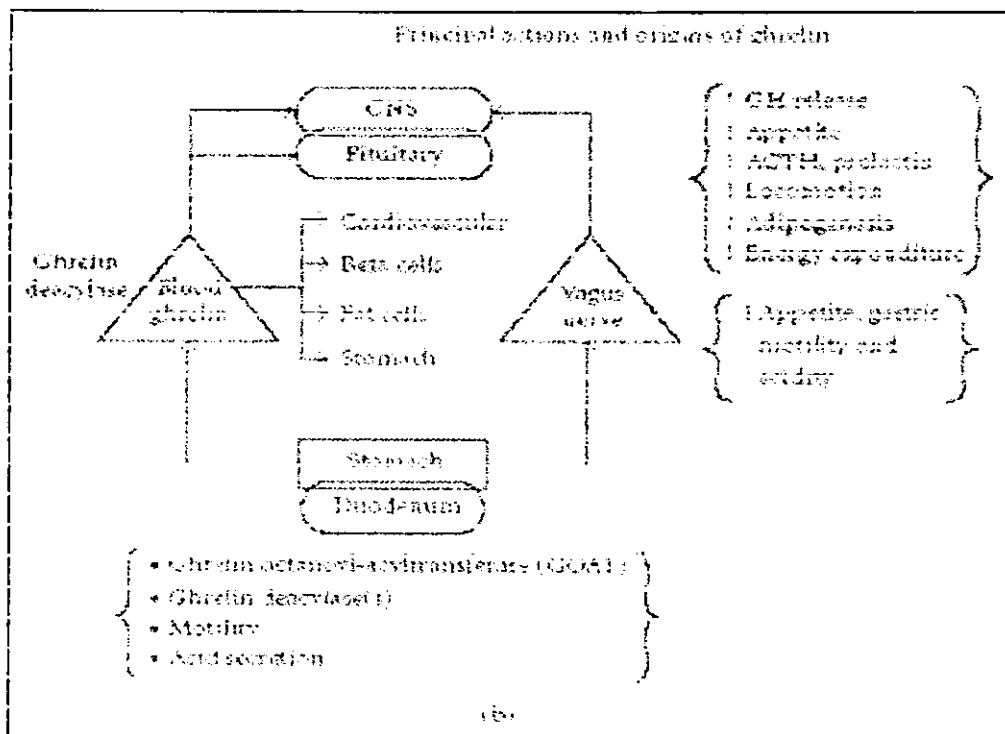
Ghrelin juga merefleksikan keadaan akut keseimbangan energi dalam tubuh untuk diteruskan ke dalam system syaraf pusat (CNS) (Tschop *et al*, 2000 ; Horvath *et al*, 2001). Salah satu kegunaan biologis ghrelin dari adalah untuk memenuhi kalori yang diperlukan oleh GH untuk pertumbuhan dan perbaikan jaringan (Lely *et al*, 2004).

Pada ayam ghrelin terdiri dari 26 asam amino dan produksi paling banyak terdapat pada proventrikulus, dalam jumlah lebih sedikit terdapat pada otak, paru, ginjal, intestinum, tetapi tidak terdapat pada gizzard (Kaiya *et al*, 2002). Ada kemungkinan bahwa ekspresi ghrelin menunjukkan perkembangan yang berbeda pada organ tertentu selama masa penetasan (*hatching*) dan pertumbuhan (*growing*). Hal ini berdasar hasil laporan Richard *et al*, pada tahun 2006 yang menyatakan bahwa ayam pedaging umur 3 minggu menunjukkan ekspresi ghrelin paling tinggi pada organ proventrikulus, dan kemudian diikuti berturut-turut dalam kadar yang lebih rendah pada organ pankreas, otak, intestine. Namun Ayam Leghorn yang baru menetas ekspresi ini terdeteksi hanya pada proventrikulus dan setelah dewasa terdeteksi juga pada pilorus dan duodenum seperti pada proventrikulus (Wada *et al*, 2003).

Ghrelin yang diberikan intra vena akan mengurangi *respiratory quotient (RQ)* sampai sampai 16 jam post-injeksi pada ayam umur 7 hari. Hal ini menggambarkan pengurangan aktivitas sintesis pembentukan lemak, yaitu sintesa *de novo*, tetapi efek sebaliknya terjadi pada rodensia yang diinjeksi ghrelin secara subcutan (Tschop *et al*, 2000).



Gambar 2.2 Prinsip produksi peptida preproghelin (Veldhuis and Bowers, 2009)



Gambar 2.3 Kerja Ghrelin (Veldhuis and Bowers, 2009)

Ghrelin dalam darah secara prinsip terdiri dari desacyl-ghrelin (85%-90%) dan (10%-15%) acylghrelin, C-terminal preproghrelin dalam jumlah yang sangat sedikit (Pemberton and Richards, 2007 ; Pemberton *et al*, 2003). Pada penelitian kohort dilaporkan bahwa wanita kadarnya lebih tinggi daripada pria dan menurun dengan

bertambahnya usia, *body mass index (BMI)*, hipertensi (Ingelsson *et al*, 2008). Hubungan yang bertolak belakang antara ghrelin dan BMI, konsentrasi insulin tampaknya menjelaskan banyak tentang efek bertambahnya usia (Purnell *et al*, 2003).

Ghrelin total akan meningkat kadarnya dalam darah dan lambung pada keadaan antara waktu makan, puasa, cachexia, anoreksia, malnutrisi, diabetes mellitus tipe 1, setelah terpapar endotoksin secara akut, malam hari ketika awal tidur yang dalam, respon estradiol (E2), hipoglicemia akut, infuse glucagon, stimulasi vagal, ingesti oktanoat kronik (Broglia *et al*, 2004 ; Dong *et al*, 2006). Pada mencit selama puasa ghrelin plasma dalam bentuk bioaktif *decanoyleated* meningkat dan bentuk *octanoyleated* menurun (Hiejima *et al*, 2009), yang menggambarkan control posttranslational (Hosoda *et al*, 2003). Ghrelin hypothalamus tak seperti ghrelin lambung pada keadaan puasa dalam waktu pendek maka transkripsi gene dan kadar peptidanya turun (Saito *et al*, 2005).

2.2. Multipotensi Ghrelin

Efek ghrelin menyebabkan meningkatnya pelepasan beberapa hormone antara lain GH, ACTH, cortisol, prolaktin, insulin. Ghrelin juga berdampak pada anabolic (*anabolic effect*) yaitu peningkatan nafsu makan (*appetite*), peningkatan pembentukan lemak (*adiposity*), glucose darah. Terhadap fungsi gaster pengaruh ghrelin adalah peningkatan sekresi asam lambung, pergerakan gaster, keluar masuk isi (*turn over*) gaster dan mukosa intestinum. Pengaruh ghrelin pada fungsi kardio vaskuler adalah peningkatan *cardiac output* dan penurunan tekanan darah. Nervus vagus juga berperan pada transmisi ghrelin (Kojima and Kangawa, 2004). Ghrelin juga dapat digunakan antiapoptosis yang merupakan antagonis dengan kematian endotelial, neural, dan cardiomyocyte (Veldhuis and Bowers, 2009).

Ghrelin berpengaruh kuat pada aktivitas *Growth Hormone (GH)* yang diperantarai oleh *Growth Hormon Secretagogue Receptor type 1a (GHS-R1a)*. Selain itu, ghrelin juga memiliki banyak potensi antara lain, berpengaruh pada aktivitas hypothalamus yang menghasilkan stimulasi prolaktin (PRL) dan sekresi ACTH (adenocorticotropin hormone), berpengaruh secara negative pada pituitary-gonadal axis baik pada tingkat central maupun perifer, meningkatkan nafsu makan dan keseimbangan energi, mempengaruhi tidur dan tingkah laku, mengontrol motilitas lambung dan sekresi asam lambung, mengatur kelenjar eksokrin pancreas, fungsi endokrin yang berpengaruh pada kadar glucose (Lely *et. al.*, 2004).

Ghrelin juga berpengaruh pada kardiovaskuler dan pengaturan proliferasi sel neoplasma, dan system imun (Lely *et. al.*, 2004). Terhadap fungsi kardiovaskuler ghrelin meningkatkan ekspresi mRNA yang mengkode ghrelin sekaligus reseptornya yang telah teramati pada jantung dan aorta. Injeksi ghrelin menginduksi penurunan tekanan darah (Nagaya *et al*, 2001; Gnana Payan *et al*, 2002; Kojima and Kangawa, 2004).

Ghrelin merupakan hormon peptide yang mempunyai banyak peran. Salah satunya bekerja pada *GHSR* untuk meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} melalui IP3 yang bertujuan menstimulasi pelepasan *GH*. Efek ghrelin 3 kali lipat efek *GHRH*. Pada ayam ghrelin juga menyebabkan pelepasan *GH*. Juga pada manusia menyebabkan peningkatan ACTH, prolaktin dan cortisol. Injeksi ghrelin secara intracerebroventrikular menyebabkan peningkatan c-Fos (Kojima and Kangawa, 2004).

Ghrelin pada *knock out mice* menunjukkan ukuran tubuh, tingkat pertumbuhan, asupan makan, komposisi tubuh, reproduksi dan perilaku yang normal, tanpa ada perubahan patologis. Hal tersebut didasari bahwa kelaparan lebih mengancam daripada kegemukan, maka tidak mengherankan bahwa tikus yang tidak mempunyai peptida orexigenik (*orexigenik null mouse*) menunjukkan tidak ada perubahan pada asupan

makan dan berat badan. Tambahan pula tikus yang tidak mempunyai peptida orexigenik (*orexigenik null mouse*) menunjukkan pengurangan pada *respiratory quotient* dan cenderung memiliki massa lemak tubuh yang rendah bila diberi diet makanan tinggi lemak. Hal ini menunjukkan bahwa ghrelin tidak diperlukan sebagai faktor orexigenik saja tetapi berfungsi sebagai sensor nutrien dan pemutar atau pengarah substrat metabolik (Wortley *et al*, 2004).

Ghrelin berperan pula pada metabolisme glukosa dan lemak. Ghrelin berperan pada adipogenesis dengan cara menekan oksidasi lemak (Veldhuis and Bowers, 2009). Beberapa laporan yang dapat menunjang hubungan kadar ghrelin dan kecukupan energi di dalam tubuh adalah pernyataan yang mengatakan bahwa kadar ghrelin plasma menunjukkan peningkatan pada saat awal tidur dan konsentrasi ghrelin lebih rendah pada orang gemuk dan pada orang kurus lebih tinggi konsentrasinya (Bellone *et al*, 2002; Haqq *et al*, 2003; Rosicka *et al*, 2003). Berhubungan dengan hal tersebut maka tingkat ghrelin plasma sangat tinggi pada penderita anorexia nervosa dan akan kembali normal bila dalam masa penyembuhan dan pengembalian berat badan (Soriano *et al*, 2004 ; Tanaka *et al*, 2003). Laporan tentang tingginya kadar ghrelin pada keadaan patologis menunjukkan bahwa konsentrasi ghrelin juga menunjukkan data kadar yang tinggi pada penderita bulimia nervosa (Tanaka *et al*, 2003). Penderita dengan *bypass* lambung dilaporkan kehilangan berat badan dan terjadi penurunan tingkat kadar ghrelin (Geloneze *et al*, 2003; Leonetti *et al*, 2003). Perubahan konsentrasi ghrelin tersebut dihubungkan dengan berkurangnya asupan makan berkaitan dengan lambung yang merupakan tempat utama produksi ghrelin. Konsentrasi ghrelin plasma juga berkurang pada penderita *short bowel syndrome* (Krsek *et al*, 2003), keadaan ini disebabkan kehilangan jaringan yang memproduksi ghrelin.

Perlakuan eksogen dengan somatostatin dan analognya seperti octreotide juga infusi urocortin-1 yang merupakan peptida anorexigenik yang poten akan mensupresi konsentrasi plasma ghrelin (Davis *et al*, 2004; Tan *et al*, 2004). Meskipun begitu pemberian leptin tidak akan memodifikasi tingkat ghrelin (Chan *et al*, 2004).

2.3. Potensi Ghrelin Sebagai Pengatur Nafsu Makan

Makan adalah dasar perilaku yang sangat penting bagi kehidupan. Kekurangan makan dalam waktu lama dapat menyebabkan kematian. Ghrelin merupakan hormon gastrointestinal yang dapat meningkatkan perilaku makan. Hal tersebut didasari oleh peningkatan sirkulasi ghrelin sebelum makan, yang kemudian diteruskan untuk mengawali keinginan untuk memenuhi asupan makanan (Cummings *et al*, 2001). Meskipun tingkat sirkulasi ghrelin secara kuat diatur oleh status nutrisi atau obesitas, tetapi mutasi gene ghrelin dan reseptor ghrelin tidak umum terjadi pada individu gemuk (Wang *et al*, 2004).

Shosha dan kawan-kawan, 2005 melaporkan bahwa burung puyuh dewasa yang diinjeksi ghrelin dosis rendah secara intra perifer akan meningkatkan nafsu makan tetapi bila diberikan dengan dosis tinggi akan menghambat nafsu makan . Namun pada anak ayam yang diberikan ghrelin langsung pada otak (inta cerebro vaskular) akan menghambat nafsu makan (Saito *et al.*, 2002). Begitu pula bila ghrelin diinjeksikan intra vaskular pada anak ayam tidak akan menimbulkan nafsu makan (Kaiya *et al.*, 2007).

2.4 Pengaturan Jumlah Pakan yang Dimakan (*Food Intake*)

Pengaturan jumlah pakan yang dimakan tergantung pada makanan yang tersedia dan kecepatan pemanfaatannya. Hal ini sebaliknya dipengaruhi oleh tersedianya makanan, palabilitas (daya suka) , macam makanan dan ada atau tidak adanya penyakit.

Makanan yang dimakan (*food intake*) dikendalikan oleh rasa lapar (keinginan untuk makan) dan selera makan atau nafsu makan (keinginan pada makanan tertentu). (Baynes *et al.*, 2005)

Otak adalah regulator utama pada homeostasis energi dan juga merupakan regulator dasar terhadap berat badan. Menurut model lipostatik dari homeostasis energi bahwa sinyal yang mengontrol penggunaan energi (*energy intake*) yang berasal dari jaringan lemak akan dikirim ke sistem syaraf pusat kemudian sebagai respon maka otak mengirim sinyal efferent yang diperantarai oleh serangkaian kompleks neuropeptida. Sinyal ini mengatur nafsu makan dan rasa lapar. Sinyal utama yang diterima sistem syaraf pusat (*central nervous system*) diperantarai oleh adipokine leptin dan hormon insulin pankreatik. (Baynes *et al.*, 2005)

Leptin dan insulin bertindak secara langsung pada pusat neuron (*central neuron*) pada bagian otak yang mengatur nafsu makan dan penggunaan energi. Neuron-neuron tersebut terletak pada nukleus arcuate hipotalamus (*hypothalamic arcuate nucleus*) dan ditanggapi secara teliti oleh hipotalamus. Tanggapan hipotalamus tersebut kemudian mengekspresikan dua neuropeptida yaitu Propiomelatocortin Katabolik (POMC) dan *Neuropeptide Y anabolik (NPY)* atau *Agouti-related protein (AgRP)*. POMC dipecah menghasilkan melanocortin (seperti alpha MSH) yang akan mengurangi *food intake* (makanan yang dimakan).

NPY/AgRP akan bergabung dengan neuron kemudian mengekspresikan *melanin concentrating hormon (MCH)* dan orexins A dan B. *Melanin concentrating hormon (MCH)*, orexins A dan B akan bekerja pada neuron batang otak (*brain stem neurones*) kemudian terlibat pada pengendalian *food intake* (makanan yang dimakan). Neuron-neuron yang terlibat tadi berhubungan dengan bagian cortex otak (*brain cortex/ satiety center*) untuk meningkatkan rasa lapar dan merangsang serangkaian hormon yang lain

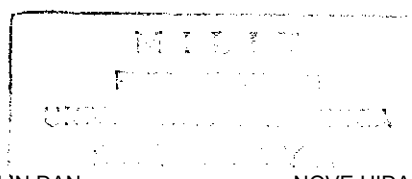
seperti thyreoliberin (TRH), corticoliberin (CRH) dan oxytocin. Thyreoliberin meningkatkan thermogenesis dan food intake (makanan yang dimakan), sebaliknya corticoliberin mengurangi *food intake* dan meningkatkan penggunaan energi melalui aktivitas simpatetik. (Baynes *et al* .,2005).

Sinyal selanjutnya yang terlibat pada pengaturan *food intake* (makanan yang dimakan) berasal dari saluran cerna dan diperantarai peptida gastrointestinal seperti glukagon, cholestikinin , *glucagon like peptide* , amylin dan *bombesin like peptide*. Ghrelin yang disekresi oleh lambung dan merangsang ekspresi neuron NPY/AgRP diketahui satu-satunya peptida perangsang nafsu makan. Peregangan lambung sendiri juga mempengaruhi *food intake*. Hipoglikemia akan menurunkan aktivitas *satiety center*. (Baynes *et al* ., 2005)

Ghrelin , insulin , leptin disekresi di jaringan peripheral dan bekerja pada sistem syaraf pusat. Ghrelin menstimulasi ekspresi *neuropeptide Y* (NPY) dan *augoti related protein* (AgRP) pada hipotalamus dan ekspresi ini menstimulasi pemasukan makanan ke dalam tubuh (*food intake*). Leptin dan insulin keduanya menekan pemasukan makanan ke dalam tubuh (*food intake*) sebagian melalui supresi atau penekanan *neuropeptide Y* (NPY) dan *augoti related protein* (AgRP) dan sebagian melalui aktivasi sistem melanocortin hipotalamus (Bloom, 2005).

2.5 Metabolisme Dan Penyimpanan Bahan Bakar Metabolisme

Metabolisme adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan interkonversi bahan kimia di dalam tubuh , yang alurnya dilakukan oleh molekul-molekul yang ada dalam tubuh. Molekul-molekul tersebut akan menghubungkan dan mengatur alur mekanisme jalur metabolit. Alur metabolisme terbagi menjadi tiga kategori, yang pertama yaitu alur anabolime yang melibatkan sintesa molekul yang lebih besar dan



lebih kompleks dari bahan dasar yang lebih kecil contohnya adalah sintesa protein dari asam amino, dan sintesa bahan cadangan triasilgliserol dan glikogen. Alur anabolisme ini adalah endothermik. Alur yang kedua adalah alur katabolisme yaitu alur yang terlibat pemecahan molekul-molekul besar dan pada umumnya reaksi oksidasi. Alur ini merupakan reaksi eksotermik dimana dihasilkan *reducing equivalents*, dan terutama dihasilkan ATP melalui rantai respirasi. Alur yang ketiga adalah Alur amphibolik yang merupakan persimpangan jalur yang menghubungkan katabolisme dan anabolisme contohnya adalah siklus asam sitrat (Murray *et al.*, 2007).

Pengetahuan mengenai metabolisme yang normal sangat penting untuk mengetahui kelainan yang mendasari penyakit. Metabolisme yang normal termasuk adaptasi terhadap keadaan kelaparan, latihan, kehamilan dan laktasi. Kelainan atau abnormalitas metabolisme dapat berasal dari defisiensi nutrisi, defisiensi hormon, dapat juga berasal dari hasil kerja obat atau toxin.

Karbohidrat, lemak, dan protein akan dioksidasi secara beragam tergantung keadaan, yaitu keadaan puasa atau pada keadaan melakukan aktivitas fisik secara terus menerus.

Bila *intake* bahan bakar metabolisme secara terus menerus lebih besar dari pada pengeluaran energi maka kelebihan akan disimpan sebagai triasilgliserol pada jaringan lemak yang akan menjadi kegemukan atau obesitas dan ini akan mengakibatkan pada bahaya bagi kesehatan. Sebaliknya bila *intake* bahan bakar lebih rendah dari pada pengeluaran energi secara terus menerus maka tidak ada lemak dan karbohidrat cadangan, juga protein yang berasal dari asam amino digunakan sebagai perputaran sumber energi metabolisme daripada digunakan untuk sintesis protein. Keadaan ini akan mengakibatkan kekurangan, banyak pengeluaran atau pembuangan zat-zat yang ada dalam tubuh saja akhirnya terjadilah kematian.

Pada keadaan setelah makan dimana asupan karbohidrat sangat banyak maka bahan bakar metabolisme pada jaringan kebanyakan adalah glukosa. Pada keadaan puasa maka glukosa akan dibagi untuk digunakan pada sistem syaraf pusat (*central nervous system*) yang sebagian besar sangat tergantung hanya pada glukosa dan sel darah merah yang seluruhnya mengandalkan glukosa. Oleh karena itu jaringan yang dapat menggunakan bahan bakar selain glukosa seperti otot dan hati, akan mengoksidasi asam lemak dan hati mensintesa badan keton dari asam lemak untuk didistribusikan pada otot dan jaringan lain. Ketika cadangan glikogen berkurang maka asam amino yang berasal dari perputaran protein digunakan untuk glukoneogenesis.

Pembentukan dan penyimpanan triasilgliserol dan glikogen sebagai bahan cadangan, dikendalikan oleh hormon insulin dan glukagon dimana jaringan akan mengumpulkan atau mengoksidasinya (Murray *et al.*, 2007).

2.6 Alur Yang Memproses Produk Utama Dari Pencernaan

Secara alamiah diet makanan yang dimakan ditentukan oleh pola dasar metabolisme. Dalam hal ini diperlukan proses pencernaan karbohidrat, lemak dan protein yang berasal dari makanan yang terutama akan menghasilkan glukosa, asam lemak dan gliserol, dan asam amino (Ganong, 2006).

Metabolisme karbohidrat adalah pusat dari persediaan glukosa. Glukosa adalah bahan utama pada hampir sebagian besar jaringan. Glukosa dimetabolisme menjadi piruvat pada alur glikolisis. Jaringan aerobik memetabolisme piruvat menjadi asetil-koa kemudian menuju siklus asam sitrat untuk dioksidasi menjadi CO_2 dan H_2O , yang berkaitan dengan pembentukan ATP pada proses fosforilasi oksidatif. Glikolisis dapat juga terjadi secara anerobik dimana oksigen tidak ada maka hasil akhir dari glikolisis ini adalah laktat.

Glukose dan hasil metabolisemenya berperan pada proses-proses yang lain yaitu (1) sintesa dan penyimpanan glikogen pada otot dan hati, (2) Alur Pentose Phosphat sebagai bagian alur alternatif glikolisis. Alur ini juga sebagai sumber senyawa pereduksi NADPH (Nikotinamid Adenin Dinukleotida Phosphat tereduksi) untuk sintesa asam lemak dan sumber ribosa yang berguna untuk sintesa nukleotida dan asam nukleat. (3) Triose Phosphat (Murray *et al.*, 2007).

Tikus yang mendapat pembatasan pakan akan mengalami penurunan ekspresi gen leptin pada jaringan adiposa dan hepar serta peningkatan sekresi hormon pertumbuhan yang hanya menginduksi ekspresi gen leptin pada hepar dan tidak pada jaringan adiposa (Nove dkk., 2003). Tikus yang mendapat pakan *ad libitum* ternyata mempunyai densitas tulang yang lebih besar dibanding dengan yang mendapat pembatasan pakan (Nove dkk., 2006). Hal ini sesuai dengan penelitian Zhou (1998) yang menyebutkan bahwa tikus yang diberi pakan berlebih ternyata rata-rata kadar leptin ($24,3 \mu\text{l} \pm 3,8$) lebih tinggi dibanding kontrol ($7,5 \mu\text{l} \pm 0,5$).

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 ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) sebagai dasar dalam pembuatan protein ghrelin sintesis yang berfungsi untuk pengatur keseimbangan energi pada ayam broiler.

3.1.2 Tujuan Khusus

Mengetahui berat molekul protei ghrelin dan neuropeptide Y yang ada pada jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging

3.2. Manfaat Penelitian

Diketahuinya berat molekul dan susunan asam amino protein Ghrelin dan neuropeptide Y, maka dapat digunakan sebagai dasar membuat ghrelin sintesis yang berfungsi untuk mengatur keseimbangan energi sehingga pakan lebih efisien. Hasil protein sintesis tersebut maka diharapkan dapat dipakai sebagai bahan untuk mengatur keseimbangan energi sehingga pakan ayam broiler lebih efisien.

Kebutuhan biaya akan pakan pada peternakan ayam mencapai 70 persen dari total biaya yang dibutuhkan. Pakan ayam sampai saat ini memainkan peran yang sangat menentukan terhadap keuntungan peternak, sehingga harga pakan sangat berpengaruh terhadap keuntungan. Tinggi dan tidak menentunya harga pakan karena sumber bahan pakan masih banyak diimport, padahal Indonesia adalah negara sebagai sumber bahan pakan yang berlimpah. Ghrelin ternyata sangat mempengaruhi keseimbangan energi bersama dengan neuropeptide Y. Dengan mengetahui protein ghrelin dan neuropeptide

Y ayam broiler diharapkan nantinya dapat digunakan untuk membuat ghrelin sintesis yang berfungsi untuk mengatur keseimbangan energi sehingga dapat meningkatkan efisiensi pakan ayam broiler.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal , Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan April sampai dengan September 2012.

4.2. Rancangan (*Design*) Riset

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen murni (*true experimental post test control design*).

4.3 Sampel dan Besar Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa ayam broiler jantan galur *Lohman* (MB 202 P) yang dipelihara mulai umur 1 hari sampai dengan 21 hari pada kandang *letter* sebanyak 25 ekor

4.4 Prosedur Penelitian

Ayam umur sehari (*day old chick*) ditempatkan dalam kandang *letter* sampai umur 21 hari dengan pakan dan minum secara *ad libitum*. Setelah mencapai umur 21 hari ayam dipotong untuk diambil sampelnya berupa jaringan saluran pencernaan dan otak untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

- 1 Isolasi protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) dari jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging
- 2 Identifikasi protein ghrelin dan neuropeptide (NPY) dari jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*)

- 3 Analisis berat molekul protein ghrelin dan reseptor ghrelin dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari gel *polyacrylamide*.

4.5 SDS PAGE Protein Ghrelin dan Reseptor Ghrelin

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 μL , LGB (*lower gel buffer*) 1300 μL , dan *T-acyl* 30% sebanyak 2000 μL , kemudian didegas selama 10 menit. Selanjutnya APS (amoniumpersulfat) 10% sebanyak 70 μL dan TEMED 7 μL 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 μL , UGB (*upper gel buffer*) 415 μL , *T-acyl* 30% sebanyak 267 μL , dan secara berurutan APS 10% 20 μL dan TEMED 2 μL . 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 μL larutan protein dan protein *standard* masing-masing ditambah dengan 20 μL *buffer* sampel (RSB atau *reducing sample buffer*) kemudian dipanaskan

kedalam pemanas air pada suhu 100° C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel siap dimasukkan kedalam sumur gel dalam volume 24 µL untuk setiap sumur. Protein *standard* yang digunakan adalah protein *standard broad range* (BioRad).

4.6 Western Blott Protein Ghrelin

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 rabbit pAb ghrelin (data Sheet Rev. 102203F) untuk protein ghrelin dengan konsentrasi 5µg/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 *Tween* 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 benzidine (TMB),selama 30 menit. Bilas dengan H₂O 2 kali selama masing-masing 5 menit.

4.7 Western Blott Protein Neuropeptide Y

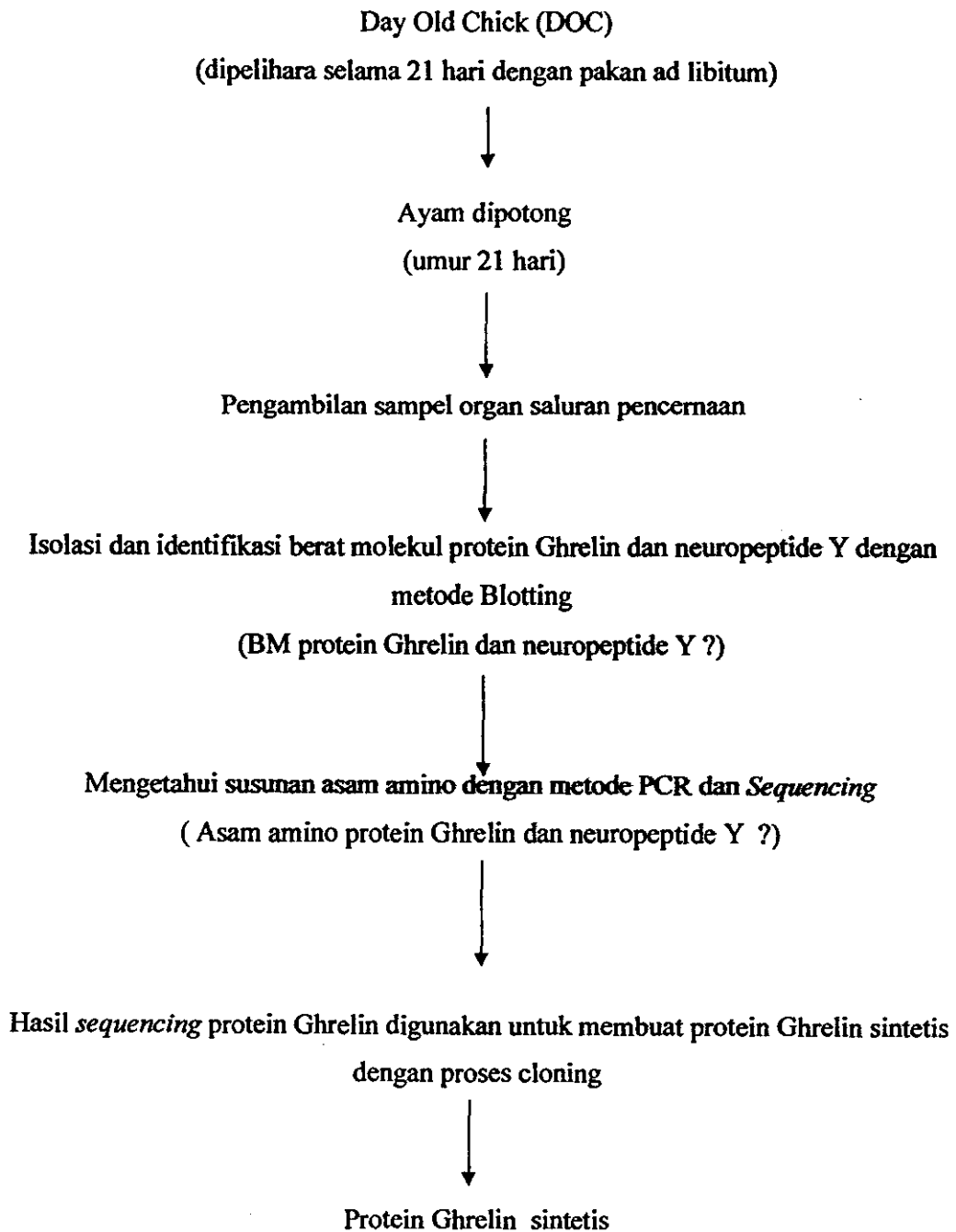
Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas nitroselulosa menggunakan alat *semi dry blotter* buatan *Biorad* ditranfer pada nitroselulose dengan 300 mA selama 30 menit. Kemudian diwarnai dengan *ponco* 2%

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 neuropeptide Y antibody (data Sheet ab30914) untuk protein NPY dengan konsentrasi 5 μ 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 *Tween* 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 benzidine (TMB), selama 30 menit. Bilas dengan H₂O 2 kali selama masing-masing 5 menit.

4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis untuk menentukan berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y, sebagai dasar untuk menentukan susunan asam aminonya sehingga dapat menjelaskan mekanisme kerja ghrelin dalam mengatur keseimbangan energi dan pertumbuhan ternak.

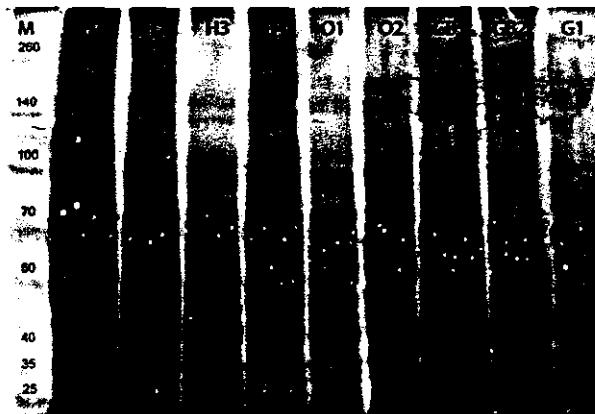
4.9 Bagan Operasional Penelitian



BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 SDS Page Protein Ghrelin dan NPY dari Saluran Pencernaan dan Otak Ayam Broiler

Hasil SDS-PAGE protein ghrelin dan neuropeptide Y (NPY) pada jaringan saluran pencernaan dan otak ayam broiler menunjukkan adanya protein ghrelin dan neuropeptide Y seperti pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 SDS Page protein Ghrelin dan NPY dari saluran pencernaan dan otak ayam broiler

Berdasarkan hasil SDS-PAGE pada jaringan saluran pencernaan dan otak ayam pedaging ditemukan adanya protein ghrelin dan neuropeptide Y. 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, marker 100 kDa dengan 50 kDa terdapat satu pita protein, marker 50 kDa dengan 40 kDa terdapat satu pita protein, marker 25 kDa dengan 10 kDa terdapat satu pita protein.

Pita protein yang terbentuk antara marker 50 kDa dengan 40 kDa dan 25 kDa dengan 10 kDa diduga protein ghrelin dan neuropeptide Y. Pita protein yang terbentuk pada jaringan saluran pencernaan dan otak ayam broiler sangat jelas, hal ini

menunjukkan bahwa pada jaringan jaringan tersebut tampak terjadi reaksi antigen antibodi paling kuat.

Hasil SDS-PAGE protein jaringan saluran pencernaan dan otak ayam broiler yang menunjukkan adanya pita protein antara marker 50 kDa dengan 40 kDa dan 25 kDa dengan 10 kDa adalah protein dengan berat molekul 44 kDa dan 11 kDa. Protein berat molekul 44 kDa dan 11 kDa hasil SDS-PAGE belum bisa menunjukkan secara pasti apakah itu protein ghrelin dan neuropeptide Y atau tidak . Hal ini dikarenakan diantara marker tersebut juga terbentuk beberapa pita protein yang lain. Untuk membuktikan bahwa terbentuknya pita protein dengan berat molekul 44 kDa dan 11 kDa adalah protein ghrelin dan neuropeptide Y maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan *Western blot*.

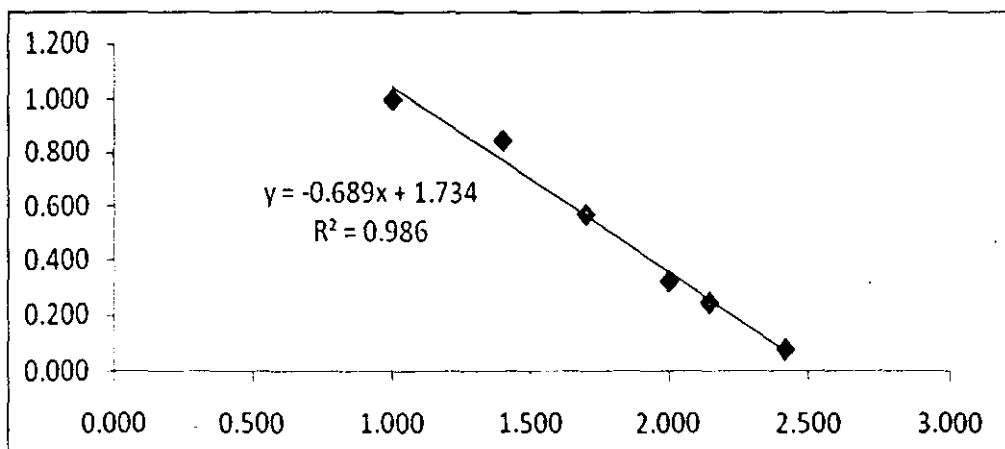
Tabel 5.1 Perhitungan Berat Molekul hasil SDS Page protein ghrelin dan NPY pada jaringan ayam broiler

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

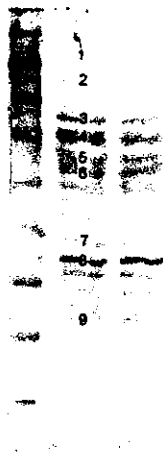
Sampel

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 Blot Protein Ghrelin dari Saluran Pencernaan Ayam Broiler

Hasil *Western blot* protein ghrelin pada jaringan saluran pencernaan menunjukkan adanya protein ghrelin dengan berat molekul 44 kDa, seperti pada Gambar 5.2



Gambar 5.2. *Western Blot* Protein Ghrelin dari Saluran Pencernaan Ayam Broiler

Hasil perhitungan berat molekul protein ghrelin seperti Tabel 5.2 menunjukkan bahwa berat molekul protein ghrelin adalah 44 kDa. Terbentuknya pita protein antara marker 50 kDa dengan 40 kDa setelah dilakukan perhitungan (Tabel 5.2) ternyata berat molekulnya adalah 44 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah protein ghrelin ayam broiler fase pertumbuhan dengan berat molekul 44 kDa.. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 44 kDa yang sangat jelas karena terjadi ikatan antara protein ghrelin hasil SDS-PAGE dengan rabbit pAb ghrelin (data Sheet Rev. 102203F).

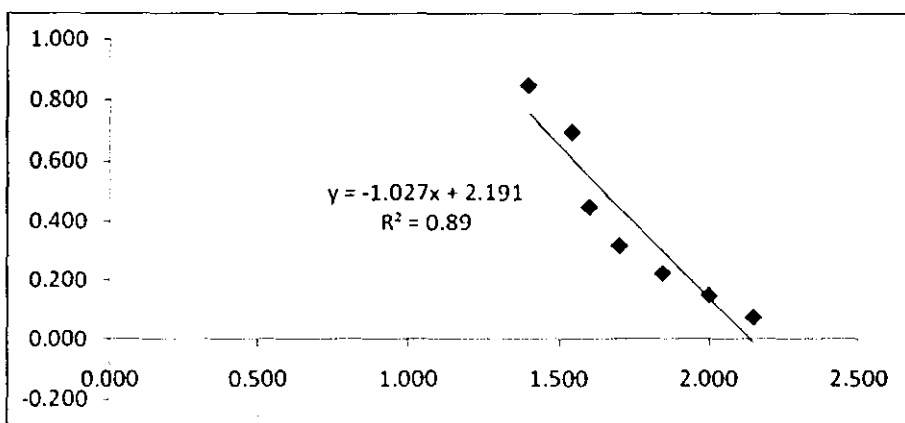
Gambar 5.2 Perhitungan berat molekul hasil *Western Blot* protein Ghrelin pada jaringan saluran pencernaan ayam broiler

Fermentas Low Protein Marker

BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
140	4	2.146	0.075
100	8	2.000	0.151
70	12	1.845	0.226
50	17	1.699	0.321
40	24	1.602	0.453
35	37	1.544	0.698
25	45	1.398	0.849
10	53	1.000	1.000

Sampel

Kode	BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
1	152	6	2.181773	0.113208
2	121	10	2.083707	0.188679
3	91	15	1.961124	0.283019
4	82	17	1.912091	0.320755
5	69	20	1.838541	0.377358
6	62	22	1.789508	0.415094
7	37	31	1.568860	0.584906
8	33	33	1.519827	0.622642
9	21	41	1.323694	0.773585



5.3. Western Blot Protein NPY dari Otak Ayam Broiler

Hasil *Western blot* protein neuropeptide Y pada jaringan otak menunjukkan adanya protein neuropeptide Y dengan berat molekul 11 kDa, seperti pada Gambar 5.3



Gambar 5.3 *Western Blot* Protein neuropeptide Y dari Otak Ayam Broiler

Hasil perhitungan berat molekul protein neuropeptide Y seperti Tabel 5.3 menunjukkan bahwa berat molekul protein neuropeptide Y adalah 11 kDa. Terbentuknya pita protein antara marker 25 kDa dengan 10 kDa setelah dilakukan perhitungan (Tabel 5.3) ternyata berat molekulnya adalah 11 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah protein neuropeptide Y ayam broiler fase pertumbuhan dengan berat molekul 11 kDa. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 11 kDa yang sangat jelas karena terjadi ikatan antara protein ghrelin hasil SDS-PAGE dengan neuropeptide Y antibody (data Sheet ab30914).

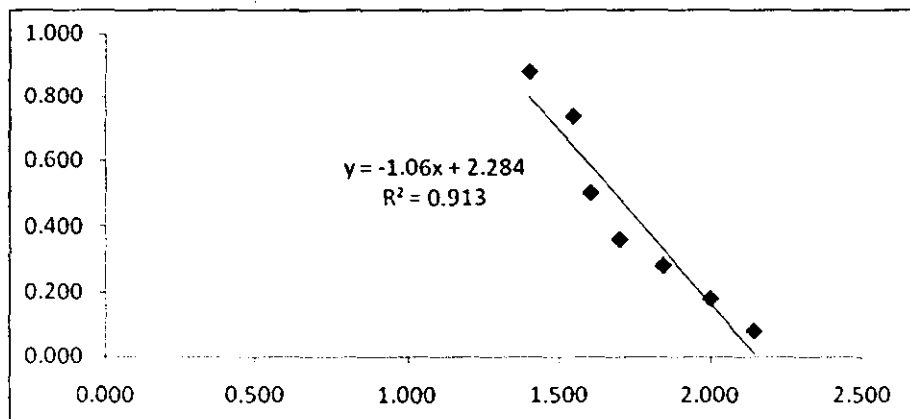
Tabel 5.3 Perhitungan Berat Molekul hasil *Western Blot* protein NPY pada jaringan otak ayam broiler

Fermentas Low Protein Marker

BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
140	4	2.146	0.080
100	9	2.000	0.180
70	14	1.845	0.280
50	18	1.699	0.360
40	25	1.602	0.500
35	37	1.544	0.740
25	44	1.398	0.880
10	50	1.000	1.000

Sampel

Kode	BM(kDa)	Jarak Tracking (mm)	Log BM	Rf
1	97	9	1.985000	0.180
2	74	15	1.871792	0.300
3	65	18	1.815189	0.360
4	55	22	1.739717	0.440
5	39	30	1.588774	0.600
6	41	29	1.607642	0.580
7	37	31	1.569906	0.620
8	22	43	1.343491	0.860
9	20	45	1.305755	0.900
10	16	50	1.211415	1.000



Ghrelin adalah peptida lambung berperan penting pada pengaturan makanan yang masuk ke dalam tubuh (*food intake*). Sebelum makan konsentrasi ghrelin plasma naik secara bertahap dan segera turun setelah makan. Penambahan ghrelin secara intravenous meningkatkan pemasukan makanan (*food intake*) dan memicu nafsu makan (*appetite*), hal ini membuktikan bahwa ghrelin berperan pada rasa lapar dan awal dari keinginan untuk makan (*meal initiation*). Ghrelin juga terlibat pada kontrol berat badan karena indeks massa badan (*body mass index*) secara negatif dikontrol oleh konsentrasi ghrelin plasma pada saat puasa. Kelainan sinyal yang berasal dari lambung akan berkaitan dengan kelainan keseimbangan energi, pertumbuhan dan hal ini berkaitan dengan fungsi gastrointestinal dan neuroendokrine.

Ghrelin dan leptin adalah komplementer namun bekerja secara antagonis, sinyalnya merefleksikan perubahan keseimbangan energi yang akut atau kronis dan efeknya diperantarai oleh neuropeptida hipotalamus seperti *neuropeptide Y* (NPY) dan *agouti related peptide* (AgRP).

Makan adalah dasar perilaku yang sangat penting bagi kehidupan. Kekurangan makan dalam waktu lama dapat menyebabkan kematian. Ghrelin merupakan hormon gastrointestinal yang dapat meningkatkan perilaku makan. Hal tersebut didasari oleh peningkatan sirkulasi ghrelin sebelum makan, yang kemudian diteruskan untuk mengawali keinginan untuk memenuhi asupan makanan (Cummings *et al*, 2001). Meskipun tingkat sirkulasi ghrelin secara kuat diatur oleh status nutrisi atau obesitas, tetapi mutasi gene ghrelin dan reseptor ghrelin tidak umum terjadi pada individu gemuk (Hinney *et al* 2002 ; Wang *et al*, 2004 ; Korbonits *et al*, 2002).

Shosha dan kawan-kawan, 2005 melaporkan bahwa burung puyuh dewasa yang diinjeksi ghrelin dosis rendah secara intra perifer akan meningkatkan nafsu makan tetapi bila diberikan dengan dosis tinggi akan menghambat nafsu makan. Namun pada anak

ayam yang diberikan ghrelin langsung pada otak (inta cerebro vaskular) akan menghambat nafsu makan (Furuse *et al.*, 2001 ; Saito *et al.*, 2002). Begitu pula bila ghrelin diinjeksikan intra vaskular pada anak ayam tidak akan menimbulkan nafsu makan (Kaiya *et al.*, 2007).

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y ayam broiler adalah 44 kDa dan 11 kDa.

6.2 Saran

Dengan diketahuinya berat molekul protein ghrelin dan neuropeptide Y pada ayam broiler maka dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan susunan asam amino protein ghrelin dan neuropeptide Y sehingga diharapkan dapat dibuat protein ghrelin sintesis untuk mengatur keseimbangan energi ayam broiler. Apabila keseimbangan energi semakin baik maka efisiensi pakan semakin meningkat sehingga kebutuhan pakan akan menurun.

DAFTAR PUSTAKA

- Baynes JW and Dominickzak MH, 2005. *Medical Biochemistry*. 2nd. Edition. Mosby International Limited.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Haward AD, Van Der Ploeg LH and Heck JV. 2000. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor. *Journal of Medical Chemistry*, 43: 4370-4376
- Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodani F, Ghigo E, Bona G. 2002 . Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 25:RC13-RC15.
- Blom WAM, Stafleu A, Graf CD, Kok FJ, Schaafsma G, and Hendriks FJ, 2005. Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *Am J Clin Nutr* 81:367-375
- Broglio F, L Gianotti, S Destefanis. 2004. The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clinical Endocrinology*, vol 60, no 5, pp 592-599.
- Chan CB & Cheng CH (2004) Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Mol Cell Endocrinol* 214, 81-95.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE and Weigle DS. Apreprandial rise in plasma ghrelin level suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001.50. 1714-1719.
- Dong J, Peeters TL, Smet B De. 2006. Role of endogenous ghrelin in hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*, vol 147, no 6, pp 2634-2642.
- Ganong WF, 2006. *Review of medical physiology*. 20th.Ed, USA: Appleton & Lange, pp 365-375
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. 2002. The tissue distribution of mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in human. *J. Clin Endocrinol Metab* 87:2988
- Gualillo O, Lago F, Reino JG, Casanueva FF, Dieguez C, 2003. Ghrelin, a widespread hormone : insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS letters* 552:105-109
- Guyton AC and Hall JE. 2006. *Fisiologi Kedokteran. Textbook of medical Physiology*. Edisi 11. Penerbit buku Kedokteran ECG. Alih bahasa Irawati dkk. 832-859.
- Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, LaFranchi SH, Purnell JQ. 2003. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:174-178.
- Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H. 2009. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regulatory Peptides*, vol 156, no 1-3, pp 47-56.

- Horvart TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. 2001. Minireview : ghrelin and the regulation energy balance – a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142 : 4163-4169.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, and Kangawa K. 2003. Structural divergence of human ghrelin : identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *Journal of Biology Chemistry*, vol 278, no 1, pp 64-70.
- Ingelsson E, Larson MG, Yin. 2008. Circulating ghrelin, leptin, and soluble leptin receptor concentrations and cardiometabolic risk factors in a community-based sample. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, vol 93 no 8 pp 3149-3157.
- Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM and Fujimiya M, 2004. Ghrelin, appetite, and gastric motility : the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *The FASEB Journal* 18:439-456
- Kaiya Hiroyuki, Saito Ei-Suke, Tachibana Tetsuya, Furuse Mitsuhiro, Kangawa Kenji. 2007. Changes in ghrelin levels of plasma and proventriculus and ghrelin mRNA of proventriculus in fasted and refeed layer chicks. *Domestic Animal Endocrinology*. Elsevier. 32 (2007) 247-259.
- Krsek M, Roshica M, Haluzik M, Svobodova J, Kortlikova E, Justova V, Lacinova Z, and Jarkovska z. 2002. Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr. Res.* 28:27-33
- Kojima M, Hosoda H & Kangawa K .2004. *Clinical endocrinology and metabolism*. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18, 517–530.
- Lely Aart Van Der J, Tschop Matthias, Heiman, Mark L and Ghigo Ezio. 2004. Biological, Pathophysiological, and Pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine review* 25(3):426-457.
- Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, Minamitake Y, Hosoda H, Kojima M, Matsuo H and Kangawa K. 2001. Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284 : 655-659.
- Muccioli G, Papotti M, Locatelli V, Ghigo E and Deghenghi R. 2001. Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *Journal of human hypothalamus and pituitary gland. Journal of endocrinological investigation*, 24 : RC7-9.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW, 2003. *Harper's Biochemistry*. 27th. Edition. Prentice-Hall International, Inc
- Nagaya, MN, Uematsu, M. Kojima,. "Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors," *Circulation*, vol. 104, no. 17, pp. 2034–2038, 2001.
- Nove H, Sarmanu dan Anwar M. 2003. Peran fisiologis sekresi leptin sebagai dasar pencegahan obesitas. *Majalah Ilmu Faal Indonesia* 5(1): 18-23, Surabaya.
- Nove H, Anwar M dan Tri Martini. 2006. Peran Leptin dalam meningkatkan densitas tulang. *Majalah Ilmu Faal Indonesia* 5 (2): 60-66, Surabaya.
- Papotti M, Cassoni P, Volante M, Dghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. 2001. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 5052-5059.
- Pemberton CJ and Richards AM 2007. *Biochemistry of ghrelin precursor peptides*. *Vitamins & Hormone*, vol 77, pp13-30.

- Purnell Q, Weigle DS, Breen P, and Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol 88, no 12, pp 5747-5752, 2003.
- Rosicka M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Sreiber V, 2002. Ghrelin a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res* 52:61-66
- Saito E, Kaiya H, Takagi T, Yamasaki I, Denbow DM, Kanagawa K, and Furuse M. 2002. Chicken ghrelin and growth hormone-releasing peptide-2 inhibit feed intake of neonatal chicks. *Eur. J. Pharmacol.* 453:75-79.
- Saito E, Kaiya H, Tachibana T, Tomonaga S, DM Denbow DM, Kanagawa K and Furuse M. 2005. Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotrophin releasing factor system in neonatal chicks. *Reg. Pept.* 125 : 201-208.
- Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A & Argente J 2004. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 144, 36-42.
- Tanaka M, Miyazaki T, Yamamoto I, Nakai N, Ohta Y, Tsushima N, Wakita M, Shimada K. 2003. Molecular characterization of chicken growth hormone secretagogue receptor gene, *Gen. Comp. Endocrinol.* 134:198-202.
- Tschoop M, Smiley DL, Heiman ML. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407 :908-913.
- Wada R, Sakata I, Kaiya H, Nakamura K, Hayashi Y, Kangawa K and Sakai T. 2003. Existence of ghrelin-immunopositive and -expressing cells in proventriculus of the hatching and adult chicken. *Regulatory Peptides*, 111: 123-128.
- Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Friedel S, Litchner P, fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schafer H, Hebebrand J and Hinney A, Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004.89.157-162
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K. 2004. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8227-8232.
- Zhou X, De Schepper J, Hooghe-Peters EI, 1998. Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet induced obese rats. *J Endocrine* 159:165-172.
