

**LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING TAHUN ANGGARAN 2010**



**POTENSI PROTEIN STAT
(Signal Transducers and Activators of Transcription)
SEBAGAI KANDIDAT BAHAN PEMACU PERTUMBUHAN
TERNAK**

Oleh :
Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D. Drh
Ratna Damayanti, M.Kes, Drh

Diblayai oleh DIPA Universitas Airlangga, Sesuai dengan Surat Keputusan
Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun
Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR//2010
Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2010

LAPORAN
PENELITIAN HIBAH BERSAING TAHUN ANGGARAN 2010



KR
KFC
LP-64/11
Mar
P

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

POTENSI PROTEIN STAT
(Signal Transducers and Activators of Transcription)
SEBAGAI KANDIDAT BAHAN PEMACU PERTUMBUHAN
TERNAK

Oleh :

Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D. Drh
Ratna Damayanti, M.Kes, Drh

Diblayai oleh DIPA Universitas Airlangga, Sesuai dengan Surat Keputusan
Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun
Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR//2010
Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2010

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Potensi Protein STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) Sebagai Kandidat Bahan Pemacu Pertumbuhan Ternak
2. Ketua Penelitian :
- a. Nama Lengkap : Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 196509051993031004
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : Wakil Dekan I FKH Unair
- f. Bidang Keahlian : Fisiologi Veteriner
- g. Fakultas/Jurusan : Departemen Kedokteran Dasar Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Fisiologi
- Tim Peneliti :

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh	Fisiologi Veteriner (Endokrinologi)	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2	Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D	Peternakan	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
3	Ratna Damayanti, M.Kes, Drh	Fisiologi Veteriner	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 6 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp 267.500.000;
- c. Biaya yang disetujui tahun pertama : Rp 35.000.000;
- d. Biaya yang disetujui tahun kedua : Rp 32.500.000;

Surabaya, 26 Oktober 2010

Mengetahui :
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

(Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh)
NIP. 130687305

Ketua Peneliti

(Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes, Drh)
NIP.196509051993031004

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

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

RINGKASAN

POTENSI PROTEIN STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) SEBAGAI KANDIDAT BAHAN PEMACU PERTUMBUHAN TERNAK

Anwar Ma'ruf Romziah Sidik Ratna Damayanti

(2010, 23)

Pertumbuhan dan proses metabolisme tubuh ternak sangat dipengaruhi oleh *growth hormone* (GH). Efek metabolik GH terjadi bila reseptor GH berasosiasi dengan dan mengaktifkan tirosin kinase. 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) untuk menimbulkan efek pertumbuhan. Peningkatan pertumbuhan ini mempunyai implikasi dan daya tarik yang besar bagi dunia perunggasan. Tetapi protein *signaling* STAT dan pola ekspresinya pada ayam pedaging selama masa pertumbuhan sampai saat ini belum diketahui secara jelas. Jadi dengan diketahuinya protein *signaling* STAT yaitu STAT 1, STAT 3, STAT 5a dan STAT 5b maka dapat menjadi landasan ilmiah produksi protein STAT sintesis sebagai bahan pemacu pertumbuhan ternak.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat protein STAT sintesis dari ayam pedaging yang sedang mengalami pertumbuhan akibat meningkatnya *growth hormone* (GH) sebagai bahan pemacu pertumbuhan.

Penelitian ini menggunakan ayam pedaging *Lohman* (MB 202 P) dari PT. Multibreeder Indonesia Tbk berjenis kelamin jantan sebanyak 10 ekor. Ayam ditempatkan dalam kandang baterai dengan kapasitas satu ekor satu kandang dengan 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 adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut (1) Isolasi protein *signaling* STAT dari jaringan adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) ayam pedaging, (2) Analisis protein *signaling* STAT 3 dari jaringan adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*), (3) Identifikasi protein *signaling* STAT 3 dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari *gel polyacrylamide*.

Hasil pemeriksaan protein jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan dengan dot blot menunjukkan bahwa pada jaringan tersebut positif terdapat protein STAT. Adanya protein STAT pada jaringan adiposa, otot dan hepar kemudian dilakukan pemeriksaan SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat pita protein antara marker 116 dengan 14,4 kDa. Pita protein tersebut diduga protein STAT 3. Untuk membuktikan pita protein yang terbentuk antara marker 116 kDa dengan 14,4 kDa adalah protein STAT 3 maka dilakukan pemeriksaan *Western blot* dengan menggunakan *rabbit polyclonal antibody* STAT 3. Hasil *Western blot* menunjukkan bahwa terbentuk pita protein yang berarti bahwa ada reaksi antara antigen (protein STAT 3) dengan antibodi protein STAT 3, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein STAT 3 terdapat pada jaringan hepar, otot dan adiposa dengan berat molekul STAT 3 sebesar 59,4 kDa.

Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya. Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, Sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR//2010 Tanggal 11 Maret 2010

SUMMARY**THE POTENCY OF STAT (signal transducers and activators of transcription) PROTEIN AS THE CANDIDATE OF GROWTH PROMOTOR FOR BREEDS**

Anwar Ma'ruf Romziah Sidik Ratna Damayanti

(2010, 23)

Growth hormone (GH) has an important role in regulating growth and metabolism of the body. Metabolic effect of GH is induced if GH receptor associates with and activates tyrosin kinase. The binding of GH to its receptors may activate Janus Kinase 2 (JAK 2) and, furthermore, it phosphorylates tyrosine in GH-receptor-JAK 2 complex. The tyrosine subsequently forms a binding site for several signaling proteins, such as signal transducers and activators of transcription (STAT), to induce growth effect. The increasing growth has remarkable implication and interests in poultry. However, the STAT signaling protein and its expression pattern in broiler during growth period remains unclear. Therefore, the identification of STAT signaling protein, particularly STAT-1, STAT-3, STAT-5a and STAT-5b can be used as scientific base for the production of bioactive materials in tissue cultivation and culture.

The long-term objective of this study was to produce STAT synthetic protein in broiler during growth period resulting from the increase of growth hormone (GH) as growth promoter.

This study used ten male broiler Lohman (MB 202 P) from PT. Multibreeder Indonesia Tbk. Broilers were kept within battery cage, with a capacity of one broiler in each cage. The broilers were fed twice a day, at 6 a.m. and 6 p.m. with the amount of feed 10% less than standard. At day 21 the broilers were sacrificed to obtain the samples, i.e., adipose tissue, liver and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) for the following examinations: (1) isolation of STAT-1 signaling protein from adipose tissue, liver, and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) of the broiler, (2) analysis of STAT 3 signaling protein from adipose tissue, liver, and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) of the broiler using SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreses) method, and (3) identification of STAT-3 signaling protein using Western blot method by means of protein detection using electrophoresis with polyacrylamide gels.

Results of examination on protein in hepatic tissue, muscle and adipose tissue of broilers in growth period using dot blot revealed that STAT protein was positively present in those tissues. This finding was followed-up with SDS-PAGE examination, from which we found the presence of protein band between the markers of 116 kDa and 14.4 kDa. The protein band was supposedly the STAT-3 protein. To prove that protein band formed between marker 116 kDa and 14.4 kDa was the STAT 3, Western blot examination was conducted using rabbit polyclonal antibody STAT-3. The result showed the formation of the protein band, indicating

the presence of reaction between antigen (STAT-3 protein) and STAT-3 protein antibody. In conclusion, STAT-3 protein is present in hepatic, muscular, and adipose tissues, with molecular weight of 59.4 kDa

Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya. Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, Sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR/2010 Tanggal 11 Maret 2010

ABSTRACT

The long-term objective of this study was to produce STAT synthetic protein in broiler during growth period resulting from the increase of growth hormone (GH) as growth promoter. This study used ten male broiler Lohman (MB 202 P) from PT. Multibreeder Indonesia Tbk. Broilers were kept within battery cage, with a capacity of one broiler in each cage. The broilers were fed twice a day, at 6 a.m. and 6 p.m. with the amount of feed 10% less than standard. At day 21 the broilers were sacrificed to obtain the samples, i.e., adipose tissue, liver and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) for the following examinations: (1) isolation of STAT-3 signaling protein from adipose tissue, liver, and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) of the broiler, (2) analysis of STAT-3 signaling protein from adipose tissue, liver, and muscles (m. femoralis and m. pectoralis) of the broiler using SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreses) method, and (3) identification of STAT-3 signaling protein using Western blot method by means of protein detection using electrophoresis with polyacrylamide gels. Results of examination on protein in hepatic tissue, muscle and adipose tissue of broilers in growth period using dot blot revealed that STAT protein was positively present in those tissues. This finding was followed-up with SDS-PAGE examination, from which we found the presence of protein band between the markers of 116 kDa and 14.4 kDa. The protein band was supposedly the STAT-3 protein. To prove that protein band formed was the STAT-3, Western blot examination was conducted using rabbit polyclonal antibody STAT 3. The result showed the formation of the protein band, indicating the presence of reaction between antigen (STAT-3 protein) and STAT-3 protein antibody. In conclusion, STAT-3 protein is present in hepatic, muscular, and adipose tissues, with molecular weight of 59.4 kDa.

Keywords : STAT-3 protein, broiler, growth promoter, molecular weight.

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuat protein STAT sintetis dari ayam pedaging yang sedang mengalami pertumbuhan akibat meningkatnya *growth hormone* (GH) sebagai bahan pemacu pertumbuhan. Penelitian ini menggunakan ayam pedaging *Lohman* (MB 202 P) dari PT. Multibreeder Indonesia Tbk berjenis kelamin jantan sebanyak 10 ekor. Ayam di tempatkan dalam kandang baterai dengan kapasitas satu ekor satu kandang dengan 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 adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut (1) Isolasi protein *signaling* STAT dari jaringan adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) ayam pedaging, (2) Analisis protein *signaling* STAT 3 dari jaringan adiposa, hepar dan otot (*m. femoralis* dan *m. pectoralis*) ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*), (3) Identifikasi protein *signaling* STAT 3 dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari *gel polyacrylamide*. Hasil pemeriksaan protein jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan dengan dot blot menunjukkan bahwa pada jaringan tersebut positif terdapat protein STAT. Adanya protein STAT pada jaringan adiposa, otot dan hepar kemudian dilakukan pemeriksaan SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat pita protein antara marker 116 dengan 14,4 kDa. Pita protein tersebut diduga protein STAT 3. Untuk membuktikan pita protein yang terbentuk antara marker 116 kDa dengan 14,4 kDa adalah protein STAT 3 maka dilakukan pemeriksaan *Western blot* dengan menggunakan *rabbit polyclonal antibody* STAT 3. Hasil *Western blot* menunjukkan bahwa terbentuk pita protein yang berarti bahwa ada reaksi antara antigen (protein STAT 3) dengan antibodi protein STAT 3, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein STAT 3 terdapat pada jaringan hepar, otot dan adiposa dengan berat molekul STAT 3 sebesar 59,4 kDa.

Keywords. protein STAT-3 , ayam broiler, pemacu pertumbuhan, berat molekul.

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. Kepala Laboratorium Biomedik 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 2010

Penulis

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Growth Hormone	3
2.2 Reseptor Growth Hormone	3
2.3 Efek Metabolik Growth Hormone	4
2.4 Mekanisme Aktivasi Protein STAT oleh Growth Hormone	4
2.5 Peran Tirosin Fosfatase Dalam Terminasi Signaling Protein STAT Yang di- Aktivasi Growth Hormone	7
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat Penelitian	10
BAB 4. METODE PENELITIAN	11
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
4.2 Sampel Penelitian	11
4.3 Prosedur Penelitian	11
4.4 Ekstraksi Protein Sampel	11
4.5 SDS-PAGE Protein STAT	12
4.5.1 Persiapan gel	12
4.5.2 Injeksi sampel	12
4.6 Western Blot STAT 3	13
4.7 Analisis Data	13
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
5.1 Hasil Dot Blot Protein STAT	14

5.2 Hasil SDS-PAGE Protein STAT	14
5.3 Hasil Western Blot Protein STAT 3.....	17
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	20
6.1 Kesimpulan.....	20
6.2 Saran.....	20
DAFTAR PUSTAKA	21

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1 Perhitungan Berat Molekul hasil SDS Page protein STAT pada jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan.....		16
5.2 Perhitungan Berat Molekul hasil Western Blott protein STAT 1 pada jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan.....		17
5.3 Perhitungan Berat Molekul hasil Western Blott protein STAT 3 pada jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan.....		19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur protein STAT	5
2.2 Protein STAT dan faktor yang menginduksi terjadinya fosforilasi	6
2.3 Growth hormone receptor	7
2.4 Regulasi STATs oleh SH2-B dan SOCs.....	9
5.1 Hasil dot blot jaringan otot, hepar dan adiposa ayam pedaging fase pertumbuhan	14
5.2 Hasil SDS-PAGE protein STAT jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan.....	15
5.3 Hasil <i>Western blot</i> protein STAT 1 jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase Pertumbuhan.....	17
5.4 Hasil <i>Western blot</i> protein STAT 3 jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan.....	18

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Personalia tenaga peneliti	26
2. Peralatan yang tersedia di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair.....	27

BAB 1 PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Penelitian

Growth hormone (GH) mempunyai arti penting dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh (Waters, 2006). Efek metabolik GH terjadi bila reseptor GH berasosiasi dengan dan mengaktifkan tirosin kinase. 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) untuk menimbulkan efek pertumbuhan (Lodige, 2005). *Growth hormone* diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5A dan 5B (Ortmann, 2000). Peningkatan pertumbuhan ini mempunyai implikasi dan daya tarik yang besar bagi dunia perunggasan. Tetapi protein *signaling* STAT dan pola ekspresinya pada ayam pedaging selama masa pertumbuhan sampai saat ini belum diketahui secara jelas. Jadi dengan diketahuinya struktur, bentuk dan susunan asam amino protein *signaling* STAT maka dapat digunakan untuk membuat protein STAT sintesis.

Peran *Growth hormone* dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh sudah diketahui dengan jelas (Shadid dan Jensen, 2003). Namun mekanisme regulasi transkripsi gen spesifik oleh GH yang diperlukan untuk mengatur pertumbuhan dan metabolisme masih belum jelas (Herrington, 2000). Hal ini karena penelitian tentang protein STAT banyak dilakukan pada tikus, mencit, domba dan manusia (Baeg, 2005), sedangkan pada ayam pedaging belum banyak dilakukan.

Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui berat molekul dan susunan asam amino dari protein STAT sehingga nantinya dapat digunakan sebagai dasar untuk membuat protein sintesis STAT.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka diajukan perumusan masalah sebagai berikut :

1. Berapakah berat molekul protein *signaling* STAT1, STAT3, STAT5A dan STAT5B yang ada pada jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging ?
2. Bagimanakah urutan asam amino STAT1, STAT3, STAT5A dan STAT5B yang ada pada jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging ?

3. Apakah asam amino STAT1, STAT3, STAT5A dan STAT5B yang ada pada jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging dapat dibuat protein STAT sintetis ?

~
~

...

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Growth Hormone* (GH)

Hormon pertumbuhan (*somatotropin, somatotropic hormone*) sebagaimana hormon protein lainnya sangat berbeda susunan kimianya pada setiap spesies. Hormon pertumbuhan manusia terdiri dari rantai polipeptida tunggal yang tersusun atas 191 asam amino dengan berat molekul 21-22 kD. (Guyton dan Hall, 2005; Murray, 2003).

Sintesis GH sebagaimana sintesis protein terletak pada gen yang terdapat di kromosom 17 (Murray, 2003). Bagian intron dari DNA akan ditranskripsi menjadi *precursor mRNA*. *Precursor mRNA* kemudian mengalami *excision* dan *splicing* membentuk *mature mRNA*. *Matur mRNA* inilah yang kemudian ditranslasi menjadi preprohormon. Selanjutnya preprohormon diproses menjadi prohormon dan kemudian menjadi GH yang siap untuk disekresi.

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 (Vleuric, 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*

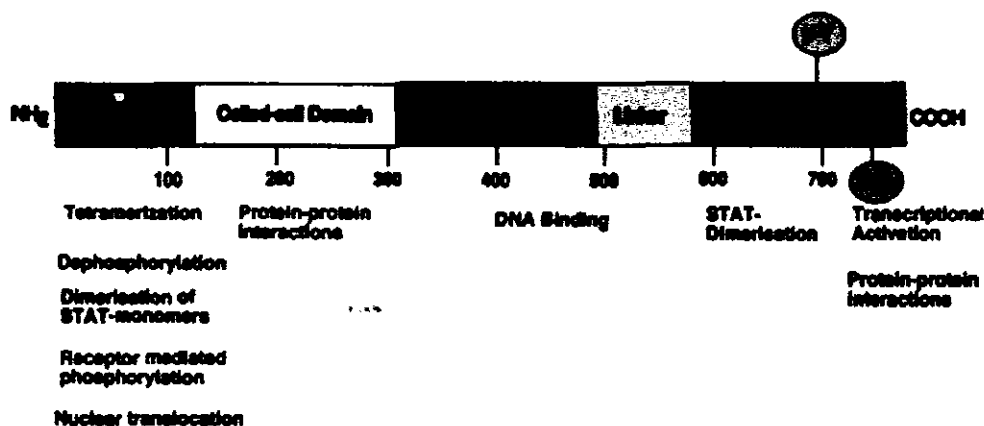
Growth hormone memainkan peran dalam mengatur pertumbuhan dan komposisi tubuh (Foster, 1998). *Growth hormone* secara nyata mempunyai efek biologik yang dipengaruhi oleh *insulin-like growth factor I* (IGF-I) dalam meningkatkan pertumbuhan otot skelet (Younken, 2000). Pemberian faktor pertumbuhan secara *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).

Untuk meningkatkan pertumbuhan maka perlu adanya peningkatan sekresi GH. 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 (Anwar dkk., 1999;). Hormon pertumbuhan juga dapat menyebabkan penurunan jaringan adiposa, penurunan kandungan lemak tubuh dan peningkatan *density* tulang (Anwar dkk., 2000)

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 seperti Gambar 2.1. 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 seperti Gambar 2.2.

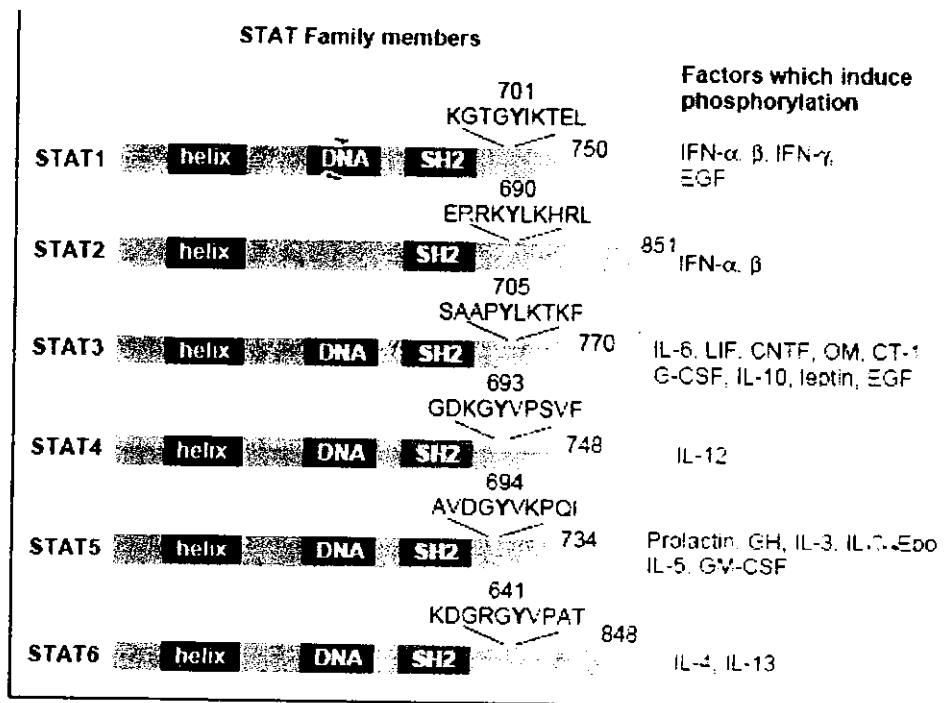
Fosforilasi tirosil STATs 1, 3, 5A dan 5B yang tergantung GH dijumpai dalam fibroblas 3T3-F442A, hepar tikus yang mengalami hipofisektomi, biakan sel hati dan pada berbagai sistem overekspresi. Fosforilasi tirosil STATs 5A dan 5B juga dijumpai pada sel IM-9 manusia dan otot, hepar serta otot rangka tikus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



Gambar 2.1 Struktur protein STAT (Hendry dan John, 2004)

STAT1 yang juga disebut P91, diidentifikasi sebagai anggota kompleks gen faktor 3 yang yang dirangsang oleh IFN α . Protein STAT3 diidentifikasi sebagai *acute phase response factor* (APRF) yang memperantarai regulasi transkripsi protein terhadap IL-6. Protein STAT1 ayam pedaging mempunyai berat molekul 91 kD (Anwar dkk., 2006). 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. 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 (Smit *et al.*, 1999).

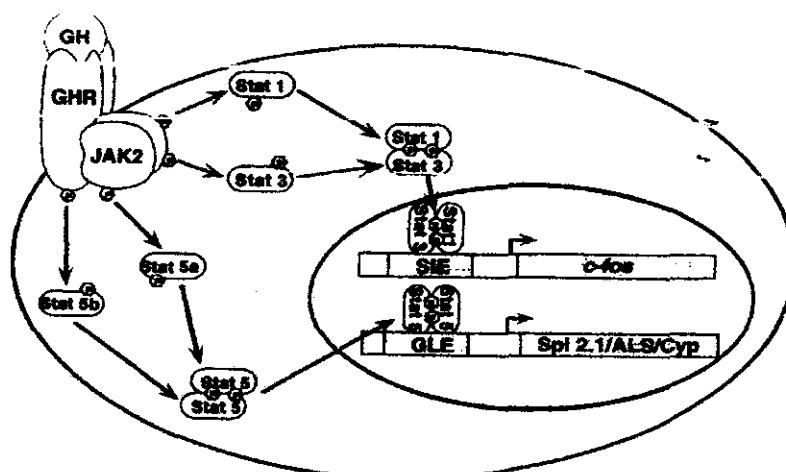


Gambar 2.2 Protein STAT dan faktor yang menginduksi terjadinya fosforilasi (Akira, 1999)

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 GH dapat menyebabkan aktivasi maksimal STAT1 dan STAT3 (Smit *et al.*, 1999).

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 seperti Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Growth hormone receptor (GHR) signaling melalui protein STAT. P: phosphotyrosines; JAK : Janus kinase; SIE : site-inducible element; GLE : interferon- γ activated sequence-like element; Spi : serine protease inhibitor ALS : acid labile subunit; Cyp : cytochrome p450. (Smit *et al.*, 1999).

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* seperti Gambar 2.4. 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

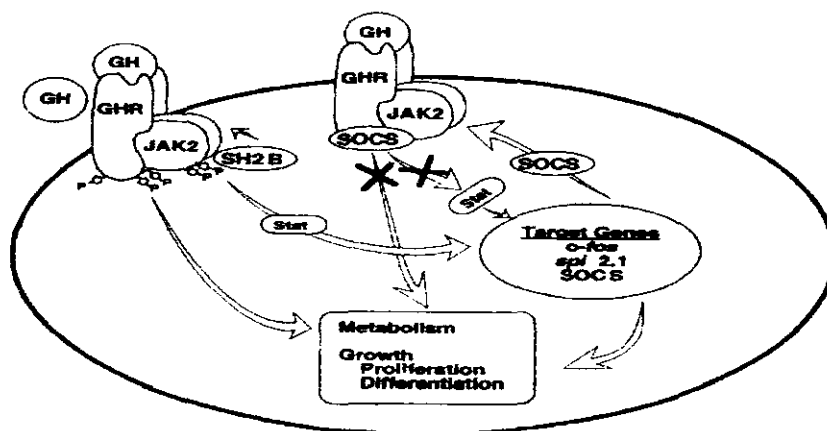
tirosin dalam domain kinase JAK2 diduga akan menginaktifkan JAK2, sedangkan defosforilasi tirosin dalam STAT akan menghambat pengikatan DNA sehingga akan mengakhiri *signaling*.

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).

Fosfatase lain yang diduga terlibat dalam defosforilasi GHR, JAK2 dan STAT adalah serine / threonine inhibitor H-7 dan siklohaksamida 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 GH masih belum jelas, namun diperkirakan memerlukan *signaling* protein STAT (Naka *et al.*, 1997).

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).



Gambar 2.4. Regulasi STAT oleh SH2-B dan SOCS. P: Phosphotyrosines, JAK: Janus kinase, Spl: Serine protease inhibitor, SOCS: suppressor of cytokine signaling (Herrington *et al.*, 2000).

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).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui berat molekul protein signaling STAT 1, STAT 3, STAT 5A dan STAT 5B ayam pedaging fase pertumbuhan (tahun 2008, 2010, 2011, 2012)
2. Mengetahui susunan asam amino protein signaling STAT 1, STAT 3, STAT 5A dan STAT 5B ayam pedaging fase pertumbuhan (tahun 2013)
3. Membuat protein signaling STAT sintetis yang dapat digunakan sebagai bahan pemacu pertumbuhan temak (tahun 2014)

3.2 Manfaat Penelitian

Dengan diketahuinya berat molekul dan susunan asam amino protein signaling STAT 1 dan STAT 3, STAT 5A dan STAT 5B maka dapat menjadi dasar dalam pembuatan protein STAT sintetis yang berfungsi sebagai bahan pemacu pertumbuhan temak.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian tahun pertama (2008) dilakukan selama 6 bulan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan kandang hewan coba Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Agustus-Oktober 2008, untuk mengetahui berat molekul protein STAT 1. Penelitian tahun ke dua (2010) untuk mengetahui berat molekul protein STAT 3 juga dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus-Oktober 2010. Tahun ke tiga (2011) untuk mengetahui berat molekul protein STAT 5A (2012), tahun ke empat (2012) untuk mengetahui berat molekul protein STAT 5B, tahun ke lima (2013) untuk mengetahui susunan asam amino protein STAT, dan tahun ke enam (2014) untuk membuat protein STAT sintesis.

4.2 Sampel Penelitian

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

4.3 Prosedur Penelitian

Ayam ditempatkan dalam kandang baterai dengan kapasitas satu ekor satu kandang dengan 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 adipose, otot dan hepar untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut :

1. Isolasi protein signaling STAT dari jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging
2. Analisis protein signaling STAT 3 dari jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphat polyacrylamide gel electrophoreses*)
3. Identifikasi berat molekul protein STAT 3 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 μ 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 STAT

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 μ L, LGB (*lower gel buffer*) 1300 μ L, dan *T-acyl* 30% sebanyak 2000 μ L, kemudian didegas selama 10 menit. Selanjutnya APS (amoniumpersulfat) 10% sebanyak 70 μ L dan TEMED 7 μ 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 μ L, UGB (*upper gel buffer*) 415 μ L, *T-acyl* 30% sebanyak 267 μ L, dan secara berurutan APS 10% 20 μ L dan TEMED 2 μ 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 μ L larutan protein dan protein *standard* masing-masing ditambah dengan 20 μ L *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 μ L untuk setiap sumur. Protein *standard* yang digunakan adalah protein *standard broad range* (BioRad).

4.6 Western Blotting STAT 3

Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas nitroselulosa menggunakan alat *semi dry bloter* 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 Stat-1 untuk protein STAT 1 dan rabbit pAb Stat 3 Ab-1 (data Sheet Rev. 102203F) untuk protein STAT 3 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 bensidine (TMB),selama 30 menit. Bilas dengan H₂O 2 kali selama masing-masing 5 menit.

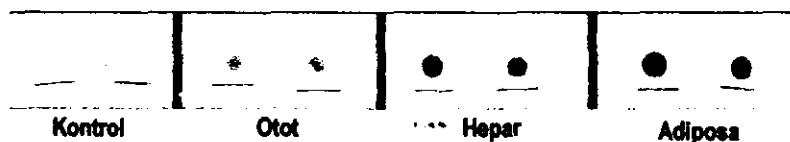
4.7 Analisis Data

Data hasil penelitian berupa protein STAT 3 dianalisis untuk menentukan berat molekul protein STAT 3 yang berperan dalam signaling efek metabolik GH pada ayam pedaging yang mengalami pertumbuhan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Dot Blot Protein STAT

Hasil pemeriksaan protein STAT dengan *dot blot* menunjukkan bahwa pada jaringan otot, hepar dan adiposa positif adanya protein STAT, seperti pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil dot blot jaringan otot, hepar dan adiposa ayam pedaging fase pertumbuhan

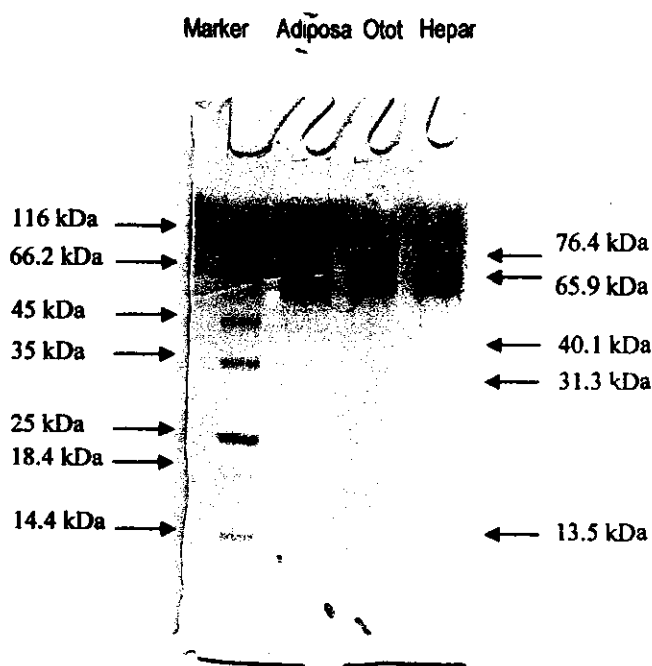
Hasil *dot blot* menunjukkan bahwa protein STAT ditemukan pada jaringan otot, hepar dan adiposa ayam pedaging fase pertumbuhan. Protein STAT yang ada pada otot terlihat paling rendah kemudian meningkat pada hepar dan paling banyak tampak pada jaringan adiposa. Hal ini menunjukkan bahwa protein STAT terdapat pada jaringan otot, hepar dan adipose (Anwar, 2006).

Protein STAT yang ada pada otot, hepar dan adiposa diduga ada kaitannya dengan fungsi dan peran *growth hormone* dalam menimbulkan efek metabolik. Efek metabolik *growth hormone* diantaranya adalah meningkatkan sintesis protein, menurunkan penggunaan karbohidrat sebagai sumber energi dan meningkatkan penggunaan lemak sebagai sumber energi. Dengan demikian maka protein STAT tampak lebih banyak pada jaringan adiposa dibanding dengan hepar dan otot.

Tingginya protein STAT pada jaringan adiposa diduga karena untuk terjadinya efek metabolik *growth hormone* diperlukan suatu proses signaling yang memerlukan protein STAT. Peningkatan penggunaan lemak sebagai sumber energi jelas memerlukan adanya protein STAT yang sangat besar sehingga pada jaringan adiposa ditemukan protein STAT paling jelas.

5.2 Hasil SDS-PAGE Protein STAT

Hasil SDS-PAGE protein STAT pada jaringan otot, hepar dan adiposa menunjukkan adanya protein STAT, seperti pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Hasil SDS Page protein STAT pada jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan

Berdasarkan hasil dot blot bahwa pada jaringan adiposa, otot dan hepar terdapat protein STAT. Kemudian dilanjutkan uji analisis protein STAT yang ada pada jaringan adiposa, otot dan hepar dengan SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat lima pita protein yang tampak antara marker 116 kDa dan 14,4 kDa baik pada jaringan adiposa, otot dan hepar.

Pita protein yang terbentuk antara marker 116 kDa dengan 14,4 kDa dari hasil perhitungan (Tabel 5.1) mempunyai berat molekul 76,4 kDa, 65,9 kDa, 40,1 kDa, 31,3 kDa dan 13,5 kDa. Pita protein yang terbentuk pada jaringan adiposa, otot dan hepar tampak begitu jelas pada berat molekul 65,9 kDa. Hal ini sesuai dengan hasil dot blot yang juga menunjukkan bahwa pada jaringan adiposa tampak terjadi reaksi antigen antibodi protein STAT.

Hasil SDS-PAGE protein jaringan adiposa, otot dan hepar yang tampak pada pita protein yang paling jelas antara marker 66,2 kDa dengan 45 kDa diduga protein STAT 1,

STAT 3, STAT 5a dan STAT 5b. Protein hasil SDS-PAGE belum bisa menunjukkan secara pasti apakah itu protein STAT 1, STAT 3, STAT 5a dan STAT 5b. Untuk membuktikan bahwa terbentuknya pita protein itu adalah protein STAT 3 maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan *Western blot*.

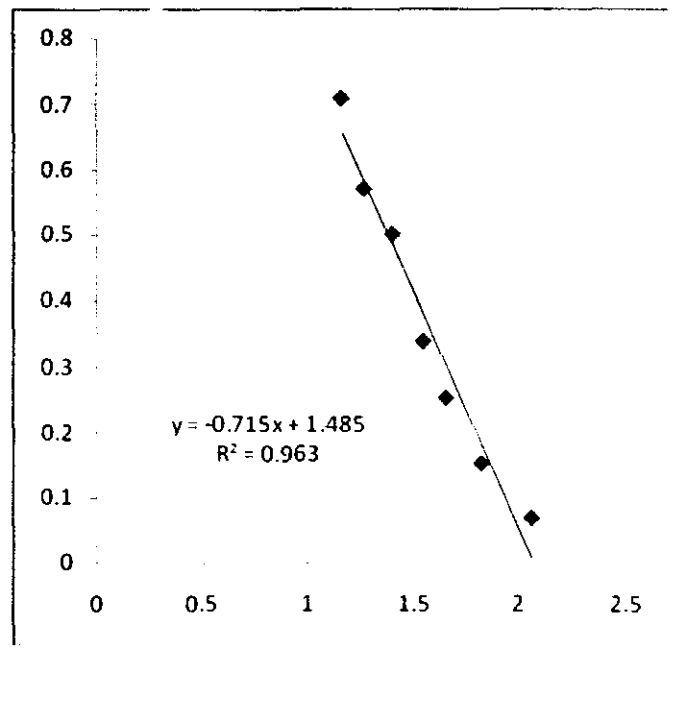
Tabel 5.1 Perhitungan Berat Molekul hasil SDS Page protein STAT pada jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan

Fermentas Low Protein Marker

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
116	0.45	2.0645	0.0692
66.2	1	1.8209	0.1538
45	1.65	1.6532	0.2538
35	2.2	1.5441	0.3385
25	3.25	1.3979	0.5
18.4	3.7	1.2648	0.5692
14.4	4.6	1.1584	0.7077

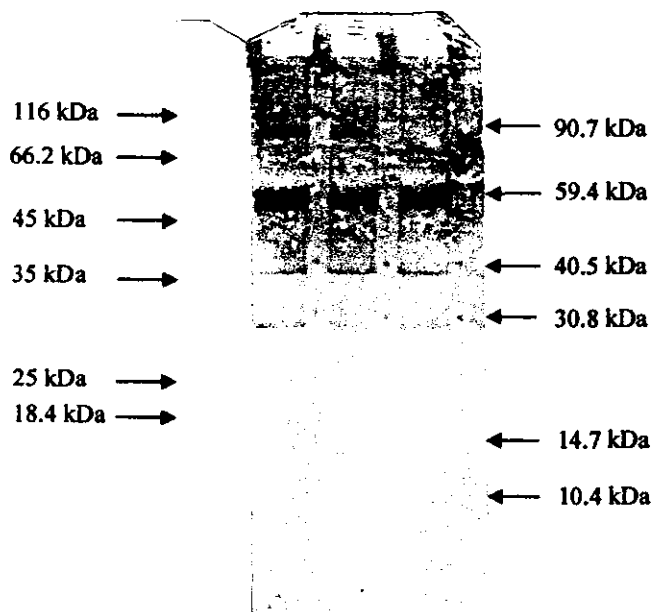
Sampel

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
76.4312	0.9	1.8833	0.1385
65.8749	1.2	1.8187	0.1846
40.1375	2.2	1.6036	0.3385
31.3304	2.7	1.496	0.4154
13.4951	4.4	1.1302	0.6769



5.3 Hasil *Western Blot* Protein STAT 3

Hasil *Western blot* protein STAT3 pada jaringan otot, hepar dan adiposa menunjukkan adanya protein STAT 3 dengan berat molekul 59,4 kDa, seperti pada Gambar 5.3



Gambar 5.3 Hasil *Western blot* protein STAT 3 jaringan adiposa, otot dan hepar ayam pedaging fase Pertumbuhan

Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein dengan SDS-PAGE adalah protein STAT 3 maka dilakukan *Western blot* dengan menggunakan *rabbit polyclonal antibody* STAT 3 Ab-1 (*Labvision*). Pada Gambar 5.4 tampak terbentuk satu pita protein yang paling jelas diantara marker 66,2 kDa dengan 44 kDa, baik protein yang terbentuk pada jaringan adiposa, otot dan hepar. Pita protein yang terbentuk antara marker 116 kDa dengan 66,2 kDa, 45 kDa dengan 35 kDa dan 35 kDa dengan 25 kDa tidak begitu jelas

Terbentuknya pita protein antara marker 66,2 kDa dengan 44 kDa setelah dilakukan perhitungan (Tabel 5.3) ternyata berat molekulnya adalah 59,4 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah protein STAT 3 ayam pedaging fase pertumbuhan dengan berat molekul 59,4 kDa. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 59,4 kDa yang sangat jelas karena terjadi ikatan antara protein STAT 3 hasil SDS-PAGE dengan *rabbit polyclonal antibody* STAT 3

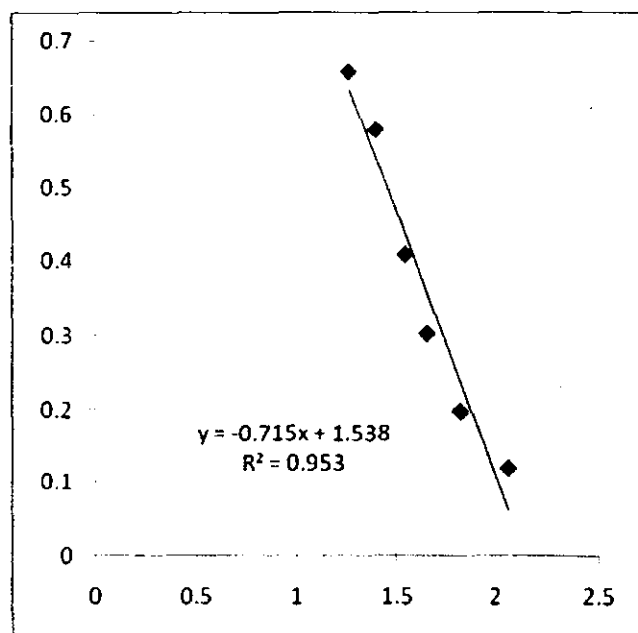
Tabel 5.2 Perhitungan Berat Molekul hasil Western Blott protein STAT 3 pada jaringan adipose, otot dan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan

Fermentas Low Protein Marker

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
116	0.9	2.0645	0.1184
66.2	1.5	1.8209	0.1974
45	2.3	1.6532	0.3026
35	3.1	1.5441	0.4079
25	4.4	1.3979	0.5789
18.4	5	1.2648	0.6579

Sampel

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
90.7447	1.05	1.9578	0.1382
59.4011	2.05	1.7738	0.2697
40.5668	2.95	1.6082	0.3882
30.8002	3.6	1.4886	0.4737
14.6726	5.35	1.1665	0.7039
10.4541	6.15	1.0193	0.8092



Protein STAT 1 dengan berat molekul 59,3 kDa dan STAT 3 berat molekul 59,4 kDa pada jaringan adiposa, otot dan hepar menunjukkan bahwa pada ayam pedaging fase pertumbuhan protein STAT 1 dan STAT 3 mempunyai berat molekul hampir sama. Diharapkan dengan diketahuinya berat molekul protein STAT 1, STAT 3, STAT 5a dan STAT 5b pada ayam pedaging akan menjadi dasar untuk mengetahui secara 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 over ekspresi. 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 α (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 (Mulle: *et al.*, 1993). JAK1 atau JAK2 yang diekspresikan berlebih secara aktif dalam sel COS akan merangsang terikatnya STAT1 ke DNA (Sihvenoinen, 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 STAT 5a. Sedangkan STAT 5b 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.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berat molekul protein STAT 3 ayam pedaging fase pertumbuhan sebesar 59,4 kDa

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian pada tahun ke tiga (2011) tentang berat molekul protein STAT 5A, tahun ke empat (2012) tentang berat molekul protein STAT 5B, tahun ke lima (2013) tentang susunan asam amino protein STAT dan tahun enam (2014) untuk membuat protein sintesis. Protein STAT sintetis inilah nantinya dapat digunakan sebagai bahan pemacu pertumbuhan pada ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar M, Sidik R, Hariadi M dan Damayanti R, 2008. Potensi Protein Stat (Signal Transducers And Activators Of Transcription) Sebagai Kandidat Bahan Pemacu Pertumbuhan Ternak. Lembaga Penelitian, Unair, Surabaya.
- Anwar M, Tri Martini, Hidajati N, 2006. studi protein signaling stat (*signal transducers and activators of transcription*) pada ayam pedaging selama masa pertumbuhan melalui teknik blotting. Lembaga Penelitian, Unair, Surabaya.
- Anwar M dan Sarmanu, 2004. Fisiologi 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.
- Baeg G, Zhou R and Perrimon N, 2005. Genome-wide RNAi analysis of JAK/STAT signaling components in drosophila. *Genes & Dev.* 19:1861-1870
- 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.* 2nd Edition, New York : Scientific America Books, p 715
- Endo TA, Masuhara M, Yokuuchi M, *et al.*, 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-924
- Foster DN, Froudman JA, Harmon SA, Foster LK., 1998. Baculovirus-mediated expression of chicken GH. *Tektran* p 14
- Fu XY., 1992. Transcription factor p91 interacts with the EGF receptor and mediates activation of the c-fos gene. *Cell* 70, 323-335
- Gebert CA, Park S-H and Waxman DJ., 1999. Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling. *Mol. Endocrinol.* 13:38-56

- Guyton AC, Hall JE, 2005. *Textbook of medical physiology*, 11th ed. WB Saunder Company, pp 933-942
- Hansen JA, Lindberg K, Hilton DJ et al., 1999. Mechanism of Inhibition of Growth Hormone Receptor Signaling by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. *Mol. Endocrinol.* 13:1832-1843
- Hendry I and John S, 2004. Regulation of STAT signaling by proteolytic processing. *Eur. J. Biochem* 271:4613-4620
- 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. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84 : 331-334
- Killefer K, Kenny PB., 2000. *Anim Vet Sci* 1877.
- Lodige I, Marg A, Weisner B, Malecova B, Oelgeschlager and Vinkemeier V, 2005. Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 280:43087-44000
- Matsumoto A, Seki Y, Kubo M et al., 1999. Suppression of STAT5 Functions in Liver, Mammary Glands, and T Cells in Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein 1 Transgenic Mice . *Mol. Cell. Biol.* 19:6396-6407
- Murrey RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW., 2003. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th Edition. McGraw-Hill Companies, Inc, pp524-526
- Muller M, Briscoe J, Laxton C et al., 1993. The state of the STATs : recent developments in the study of signal transductions to the nucleus. *Nature* 366:129-135
- Naka T, Narazaki M, Hirata M et al., 1997. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Nature* 387:924-929
- Ortmann RA, Cheng T, Visconti R, Frucht DM and O'Shea JJ, 2000. Janus kinases and signal transducers and activators of transcription : their role in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Ros* 2:16-32
- Ram PA and Waxman DJ., 1999 SOCS/CIS Protein Inhibition of Growth Hormone-stimulated STAT5 Signaling by Multiple Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274:35553-35561
- Ram PA, Park SH, Choi HK and Waxman DJ., 1996. Growth hormone activation of Stat 1, Stat 3 and Stat 5 in rat liver. Differential kinetics of hormone desensitization and GH-stimulation of both tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271:5929-5940

- Shadid S and Jensen DM, 2003. Effects of growth hormone administration in human obesity. *Obesity Research* 11(2):170-175
- Silva 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.
- Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N et al., 1996 The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1,3, and 5 by GH. *Mol. Endocrinol* 10:519-533
- Smit LS, VanderKuur JA, Stimage et al., 1997. Growth Hormone-Induced Tyrosyl Phosphorylation and Deoxyribonucleic Acid Binding Activity of Stat5A and Stat5B. *Endocrinology* 138:3426-3434
- 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. Proteasomes Regulate Erythropoietin Receptor and Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) Activation *J. Biol. Chem.* 273:28185-28190
- Vleuric 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, Darus CJ, Xu BC and Kopchick JJ., 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation *Mol. Endocrinol* 10:1249-1260
- Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA and Brown RJ, 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endo.* 36:1-7
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H et al., 1999. *EMBO J* 18:1309-1320
- Younken RV, Zaou Y, Wang X et al., 2000. *J Endocrinol* 166:620-690
- Yu C-L, Jin Y-J and Burakoff SJ., 2000. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J. Biol. Chem.* 275:599-604

Lampiran 1. Personalia tenaga peneliti

No	Nama dan gelar akademik	Bidang keahlian	Instansi	Alokasi waktu	
				Jam/mg	Bulan
1	Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh	Fisiologi Veteriner (Endokrinologi)	Departemen Ked. Dasar Veteriner	20	10
2	Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D	Peternakan	Departemen Produksi Ternak FKH Unair	15	10
3	Ratna Damayanti, M.Kes, Drh	Fisiologi Veteriner	Departemen Ked. Dasar Veteriner FKH Unair	20	10

Lampiran 2. Peralatan yang tersedia di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair

No	Lokasi	Alat	Kegunaan	Kemampuan
1	Lab. Biomedik Unibraw	Electrophoresis	Mengetahui BM protein STAT, SOCS, JAK dan analisis protein	Optimal
		PCR	Amplifikasi asam amino	Optimal
		Sequencing	Menentukan urutan aa	Optimal
		Refrigerator	Menyimpan media dan bahan aus	Optimal
		Spektrofotometer	Membaca konsentrasi protein	Optimal
2	Lab. Biologi Molekuler FKH Unair	Inkubator	Inkubasi bahan	Optimal
		Ultracentrifuge	Pemurnian isolat	Optimal
		Autoclave	Sterilasi peralatan	Optimal
		Deep Freezer	Menyimpan sample penelitian	Optimal
		Spektrofotometer	Membaca konsentrasi protein	Optimal