

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



**PRODUKSI *equine* CHORIONIC GONADOTROPIN (cCG)
FROZEN DRY DARI SERUM KUDA BUNTING LOKAL
UNTUK PENINGKATAN KEBUNTINGAN
SAPI MADURA**

**Ketua Peneliti :
Dr. HERRY AGOES HERMADI, Drh, M.Si
Prof. Dr. LABA MAHAPUTRA, Drh, M.Sc**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor tentang Kegiatan penelitian Unggulan
Perguruan Tinggi tahun Anggaran 2012
Nomor : 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2012

Produksi Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Frozen Dry dari Serum Kuda Bunting Lokal untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura

Ketua Peneliti :

- * Nama lengkap dan gelar : Dr.Herry Agoes Hermadi, MSi, drh
- * Jenis Kelamin : Laki - Laki
- * Bidang Keahlian : Reproduksi Ternak – Kemajiran
- * Jabatan : Lektor Kepala IVB
- * Unit Kerja : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
- * Alamat Surat : Jl. Gunungsari Indah AZ-21

Surabaya

Telepon : (031) 7661219 HP. 081 23249563

- Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (2012- 2013)

1. Tim Peneliti

	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Perguruan Tinggi
1.	Dr.Herry Agoes Hi, drh, MSi	Kemajiran	FKH Unair	Unair
2.	Prof Dr, Laba Mahaputra drh, MSc.	Kebidanaan dan hormonal	FKH Unair	Unair

- Pembiayaan :
- a. Tahun pertama : Rp. 60.000.000,-
 - b. Tahun kedua : Rp. 60.000.000,-
 - c. Biaya dari instansi lain : Rp. -

Surabaya, 31 Oktober 2012

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Ketua Peneliti

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD.
NIP.195312161978062001

Dr. Herry Agoes Hermadi Drh MSi
NIP 195908231987031003

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Airlangga

Dr. Joko Agus Purwanto, Apt., M.Si.
NIP. 195908051987011001

Produksi Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Frozen Dry dari Serum Kuda Bunting Lokal untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura (Herry Agoes Hermadi, Laba Mahaputra, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga 2012)

RINGKASAN

Hormon Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) yang didapatkan dari serum kuda bunting merupakan hormon *non pituitary gonadotropin* yang dapat digunakan sebagai sumber hormon karena eCG mempunyai efek biologis seperti FSH dan sedikit LH. Pertimbangan lain karena mudah didapatkan di pasaran dengan harga lebih murah dari pada preparat gonadotropin seperti FSH dan LH (Restiadi, 1999).

Penelitian ini akan melakukan Isolasi protein eCG dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dalam ultra sentrifus 4°C dan dtambahkan etanol absolute 1 : 1 dan dimurnikan dengan teknik coloums chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein eCG menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan kemudian dibuat sediaan *Frozen Dry* kering beku.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka perlu ekstrak serum kuda bunting lokal yang diseparasi dengan sephadex G-100 terhadap produksi Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) *Frozen Dry* dari serum kuda bunting lokal untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura Hingga 90% Separasi dengan sephadex G-100 dimaksudkan untuk mendapatkan kandungan hormon eCG dalam serum kuda. Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka perlu ekstrak serum kuda bunting lokal yang diseparasi dengan sephadex G-100 terhadap produksi Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) kemudian dibentuk sediaan *Frozen Dry* atau kering beku yang siap diedarkan dan diaplikasikan untuk meningkatkan kebuntingan sapi Madura hingga 90% Separasi dengan sephadex G-100 dimaksudkan untuk mendapatkan kandungan hormon eCG dalam serum kuda bunting sehingga diharapkan dapat digunakan untuk peningkatan populasi sapi Madura di Indonesia.

Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah.

- a. Melakukan Isolasi protein eCG dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dan etanolabsolut 1 : 1 dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik coloums chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein eCG menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan dibuat bentuk sediaan *Frozen Dry*.

Pembuatan eCG

Serum darah kuda lokal bunting 3 -4 bulan yang diambil dari vena yugularis sebanyak 10 ml per ekor dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C (Rifkind *et al.*, 1967). Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit dan bagian endapan dibuang. dilakukan sentrifugasi 3000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit (Hermadi, 2001). Hasil supernatan disaring hingga jernih dan dimasukkan ke dalam tabung

Erlenmeyer dengan menggunakan kertas saring. Prosedur di atas dilakukan hingga mendapatkan supernatan sebanyak 50 ml (Hinselwood *et al.*, 1991). Selanjutnya sampel digunakan untuk prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein. Dibutuhkan 200 μ l sampel dibuat homogen dengan penambahan PBST-PMSF 5 kali sampel kemudian supernatan dimasukkan kedalam mikrotube disonifikasi selama 10 menit kemudian divortex dan disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit ditambahkan etanol absolut dingin 1: 1 diinkubasi dalam refrigator selama 1 jam atau semalam. Kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit kemudian endapan dikeringanginkan hingga bau etanol hilang dan ditambahkan *buffer tris Cl* 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2005). Sebelum pemeriksaan SDS-PAGE dilakukan pemurnian dengan tehnik coloums chromatographi G-100.

Metode Identifikasi Protein eCG Dengan SDS-PAGE

Persiapan gel, *plate gel* dibuat dengan merangkai dua *plate kaca* dengan jarak antar plat \pm 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*) (Aulani'am, 2005).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulphate* (APS) dan N, N, N', N'-*tetramethylethylendiamina* (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi sampel, sampel yang berisi 12,5 μ l sampel hMG dan 12,5 μ l *Iodoacetamida* dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 μ l untuk tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik dengan arus listrik sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda \pm 0,5 cm dari batas bawah *plate gel*.

Perlakuan setelah running, gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 ml asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan *massa moleculae relative* protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Penentuan berat molekul glikoprotein dilakukan dengan menghitung *retardation factor* (Rf) dari masing-masing pita dengan menggunakan rumus (Aulani'am, 2005) sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan *massa molecule relative* sampel. Nilai Rf dan berat molekul protein standar tertera pada Tabel 4.1.

HASIL PENELITIAN

Bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan kerangka konseptual. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu: 1) Konfirmasi, isolasi dan karakterisasi biokimiawi glikoprotein eCG dari; 2) Karakterisasi anti- eCG melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode *indirect* ELISA dan *Dot Blot*.

Hasil Penelitian

Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengkonfirmasi profil protein yang ada pada eCG. Identifikasi protein berdasarkan pita protein yang muncul pada elektroforegram. Terdapat delapan pita yang teridentifikasi pada eCG yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE yaitu mempunyai BM diantara **65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa**.

Dari Gambar 4.2 diyakini ada pita yang merupakan molekul PMSG. maka dilanjutkan metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi terhadap PMSG (Catalog CSA 614 stress Gen Bioreagen).

Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa pita pada Gambar 4.1 ada yang merupakan molekul eCG karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap eCG.

Karakterisasi anti-hMG dengan metode ELISA

Produksi anti- eCG dilakukan dengan induksi eCG hasil penelitian. Bukti imunogenesitas dibuktikan dengan penghitungan OD (Optical Density) ELISA Kosentrasi eCG hasil analisis dengan rata rata absorbansi 0,2565 pada sampel 1.0,252 dan sampel 2.0,251 dengan kosentrasi **5.12501 mIU/ml**.

Karakterisasi anti- eCG dengan metode *dot blot*

Antibodi hasil induksi eCG hasil penelitian ini juga dikonfirmasi menggunakan isolat dari 4 sampel serum Kuda, didapatkan hasil dengan spesifitas seperti pada Gambar 4.3.

Hasil pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa antibodi- eCG hasil penelitian ini merupakan respon induksi eCG hasil elektroelusi, bersifat spesifik dengan eCG yang terkandung dalam serum kuda bunting.

PEMBAHASAN

Pembahasan hasil penelitian berurutan berdasarkan tahapan penelitian meliputi konfirmasi, isolasi dan karakterisasi biokimiawi glikoprotein eCG dari serum kuda bunting, meliputi :

Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui profil protein yang ada pada serum kuda bunting lokal. Identifikasi protein berdasarkan pita-pita protein yang muncul pada elektroforegram. Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan bantuan protein standar (BIO-RAD). Berat molekul isolat protein dari serum kuda bunting ditentukan dengan mengplotkan harga *retardation factor*

(RF) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -18933X + 2.2756$. Kurva hubungan antara RF(X) dengan log BM protein standar (Y) dan hasil perhitungan berat molekul pita protein yang terdapat pada serum kuda bunting dapat dilihat pada gambar 4.1 Ada 3 pita yang teridentifikasi pada serum kuda bunting lokal yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE 12% setelah dibandingkan dengan protein marker berat molekul protein tersebut terletak diantara dari 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa.

Isolasi protein eCG dilakukan, setelah itu didiamkan dalam lemari es selama 24 jam pada suhu 4°C. Penambahan larutan tersebut disesuaikan dengan volume endapan (1 : 1). Selanjutnya, dilakukan sentrifusi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam freezer selama lima menit. Pelet yang terbentuk kemudian ditambah 200 µl buffer Tris-Cl. Setelah isolat protein didapatkan, dilakukan *running* SDS-PAGE 12% sampai tampak pita-pita protein eCG yang terdapat pada gel (Aulanni'am, 2004).

Penelitian tahap awal untuk mengetahui karakteristik atau identitas protein eCG berdasarkan berat molekulnya. Metode yang digunakan adalah teknik SDS-PAGE 12% dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan marker protein. Berat molekul yang tepat dapat diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara **65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa**. Gambar 4.1 tentang profil fraksi protein, tampak adanya 3 kolom yaitu kolom M yang merupakan marker, berat molekul diperoleh dengan cara perhitungan regresi linear antara nilai Rf dari marker protein maupun sampel hasil *running* SDS-PAGE 12%. Perhitungan menggunakan regresi linear akan menimbulkan kemungkinan adanya perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan penelitian yang lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama (Rantam, 2003).

Pita protein eCG dengan berat molekul berbeda dengan ketebalan yang berbeda pula bila dibandingkan dengan pita protein satu dengan lainnya. Ketebalan pita protein yang terwarnai pada gel merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut, semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi gen penyandi protein. Kemungkinan besar hal ini disebabkan oleh tingkat kebersihan (kejernihan) isolat yang baik, serta konsentrasi protein yang cukup (Kusnoto, 2003).

Gambaran pita protein serum kuda bunting yang tampak pada gel, belum bisa dikatakan sebagai berat molekul spesifik yang menjadi karakteristik dari protein eCG tetapi hanya sebagai gambaran awal mengenai berat molekul yang dimiliki oleh protein eCG, untuk itu harus dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui berat molekul spesifik yang menjadi karakteristik protein eCG. Kelemahan dari SDS-PAGE yaitu protein yang dideteksi banyak yang tidak spesifik, karena SDS-PAGE menampilkan profil protein antigenik dalam bentuk umum, baik protein spesifik maupun protein yang tidak spesifik. Konfirmasi pita protein yang merupakan eCG dilakukan pewarnaan glikoprotein untuk menentukan bahwa eCG adalah molekul glikoprotein. Hasil konfirmasi sebagai molekul glikoprotein seperti pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa bahwa dari beberapa pita protein pada Gambar 4.1, hanya satu pita dengan BM 55 kDa yang

merupakan glikoprotein. Pembuktian molekul dengan BM 55 kDa ini adalah suatu eCG maka dikonfirmasi dengan metode *Western Blot*.

Identifikasi protein eCG

Metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi PMSG (CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa pita glikoprotein pada Gambar 4.2 adalah molekul eCG karena dikenali oleh monoklonal antibodi. Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui molekul protein eCG adalah molekul yang bereaksi spesifik dengan anti-eCG. Setelah protein ditransfer ke membran nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi primer (anti-eCG) dan sekunder (anti *rabbit* IgG berlabel AP) maka pita protein dengan menambahkan substrat DAB. Pita protein yang muncul merupakan protein eCG dengan berat molekul 55 kDa. Molekul protein yang terlihat pada membran nitroselulose melalui metode SDS-PAGE masih belum spesifik. Karena itu diperlukan uji spesifisitas secara kimia sehingga didapatkan molekul protein yang spesifik sesuai dengan keinginan. Salah satu uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah *Western Blot* (Aulani'am, 2005).

Hasil *Western blot* dapat dilihat pada gambar 4.2. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal antibodi eCG diyakini adalah protein eCG dengan berat molekul 55 kDa. Pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul berkisar 55 kDa selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar dalam mIU/ml.

Western blot bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks protein-antibodi-antibodi *sandwich*. Antibodi sekunder berikatan dengan enzim *horse radish peroxydase* yang dapat merubah substrat luminal menjadi substansi berwarna terang. Substansi ini dapat diukur kadar protein dan ukuran molekul relatif dengan dibandingkan protein marker. Hasil *Western blot* ini mengindikasikan bahwa molekul eCG berikatan secara spesifik dengan antibodi eCG sebagai antibodi primer dan anti *rabbit* IgG sebagai antibodi sekunder. Antibodi eCG dan anti *rabbit* IgG dapat mengenali protein eCG sebagai pita dengan berat molekul 55 kDa. Karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul eCG dengan BM sebesar 55 kDa.

Pengenalan protein spesifik eCG oleh antibody eCG melibatkan ikatan nonkovalen dan reversibel. Kekuatan ikatan antara protein eCG dengan antibodi tergantung faktor elektrostatis, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan jumlah epitop (Baratawidjaja, 2004).

Protein eCG dengan berat molekul 55 kDa termasuk dalam antigen berpotensi yang mampu menginduksi respon imun. Protein makromolekul dapat bersifat multideterminan, univalen dengan mempunyai banyak epitop tetapi hanya satu dari setiap macamnya. Jumlah epitop ini menentukan kekuatan afinitas dan aviditas dari antibodi (Baratawijaya, 2004). Seperti halnya dengan protein eCG yang merupakan protein makromolekul mempunyai epitop multideterminan univalen. Karena itu ikatan protein eCG dengan antibodi eCG menghasilkan afinitas dan aviditas tinggi sehingga terbentuk ikatan yang kuat dan bersifat stabil.

Pengukuran kadar eCG

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein isolat eCG. Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah eCG melalui uji *western blot*, maka pengukuran kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dilakukan dengan menggunakan *Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit 23260*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai absorbansi protein eCG.

Molekul protein eCG dengan BM 55 kDa merupakan antigen yang poten. Menurut Baratawijaya (2004) immunogen poten adalah protein besar dengan BM lebih dari 10.000 Dalton, mempunyai banyak macam determinan dan univalen.

Menurut Sousa *et al.* (2006) yang mengatakan bahwa eCG termasuk dalam golongan *aspartic proteinase* dengan kandungan asam amino lebih dari 50% identik dengan pepsin, cathepsin D dan cathepsin E. Protein eCG dalam penelitian ini terbukti mampu menginduksi terbentuknya antibodi eCG sehingga dapat dikatakan sebagai antigen atau immunogen.

Gambar 4.3. menunjukkan bahwa eCG hasil isolasi mampu menginduksi anti- eCG. Anti- eCG yang diperoleh diuji spesifitasnya dengan urin eCG (4 sampel) dengan teknik *Dot blot*. *Dot* biru menunjukkan sampel positif dikenali oleh anti- eCG.

KESIMPULAN.

1. Hasil pemeriksaan SDS-PAGE diperoleh berat molekul PMSG 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa.
2. Uji *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi terhadap PMSG (Catalog CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil merupakan molekul Glykoprotein PMSG karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap PMSG. Dengan berat molekul 55 kDa
3. Kosentrasi PMSG hasil analisis dengan rata rata absorbansi 0,2565 pada sampel 1.0,252 dan sampel 2.0,251 dengan kosentrasi 5.12501 mIU/ml.
4. PMSG hasil isolasi mampu menginduksi anti-PMSG. Anti-PMSG yang diperoleh diuji spesifitasnya dengan (4 sampel) dengan teknik *Dot blot*. *Dot* biru menunjukkan sampel positif dikenali oleh anti PMSG
5. Hasil produk *frozen dry eCG* disajikan dalam bentuk kering beku.

SARAN

Akurasi penelitian ini akan lebih baik jika digunakan sampel yang banyak.

**Production of *equine* Chorionic Gonadotrophin (eCG) Frozen Dry
from Horses Pregnant Mares Sera.**

**Herry Agoes Hermadi
Laba Mahaputra**

Department of Reproduction

**Faculty of Veterinary Medicine
Airlangga University
Herrypro59@yahoo.com**

ABSTRACT

The aim of this research was to produce eCG from the pregnant mares sera. This study identified eCG by conformation of the glycoprotein characteristic. the pregnant mares sera were collected from 4 horses. The protein filtrated by using sephadex G-100. The result of SDS-PAGE with protein bands ranged between 65, 55 and 28 kDa and continued of western blot and dot blot revealed immunoreactivity by monoclonal antibody of eCG of the 55 kDa bands. The cocentration of eCG 5.12501 mIU/ml by indirect elisa

The result of product *eCG* it can be *frozen dry eCG*.

Key word : Pregnant mares sera, eCG and *frozen dry eCG*.

Out Put : International seminar on June 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberi kesempatan kepada peneliti untuk menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul: “Produksi *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Frozen Dry* dari Serum Kuda Bunting Lokal untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura”.

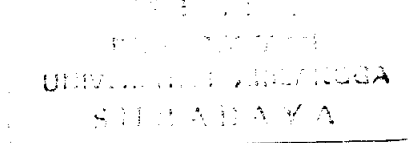
Bersama ini saya ucapkan terima kasih kepada :

1. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan
2. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Atas terselesaikannya laporan penelitian ini dengan baik. Atas segala budi baik beliau diucapkan banyak terima kasih.

Surabaya, Oktober 2012

Peneliti



DAFTAR ISI

Halaman Depan	i
Halaman Persetujuan.....	ii
Ringkasan	iii
Abstract	ix
Kata Pengantar	x
Daftar Isi.....	xi
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar.....	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Penelitian	3
1.1.1. Program Intensifikasi Sapi Madura.....	3
1.1.2. Dasar Pertimbangan	3
1.2. Tujuan Khusus	6
1.2.1 Tujuan jangka pendek	6
1.2.2 Tujuan Jangka Panjang.....	6
1.3. URGENSI (KEUTAMAAN)	7
 BAB II STUDI PUSTAKA	
2.1 Hasil yang Sudah Dicapai dan Studi Pendahuluan yang Sudah Dilaksanakan.....	8
2.2 Hasil yang sudah dicapai Beberapa Penelitian Pendahuluan	9
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Kerangka Umum Pemecahan Masalah	11
3.2. Bahan dan Peralatan Penelitian.....	11
3.2.1. Bahan dan Peralatan untuk penelitian I.....	11
3.2.2. Bahan dan Peralatan Penelitian II	11
3.3. Metode Penelitian	12
3.3.1. Metode Penelitian Tahun Pertama 2012	13
3.3.1.1 Pembuatan eCG	13
3.4. Rancangan dan Analisis Statistik	15
 BAB IV HASIL PENELITIAN	
4.1 Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG.....	16
4.2 Karakterisasi dengan Metode ELISA.....	17
4.3 Karakterisasi anti-eCG dengan metode <i>dot blot</i>	19

BAB V PEMBAHASAN

5.1. Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG	20
5.2. Identifikasi protein eCG	22
5.3. Pengukuran kadar eCG	23

BAB VI KESIMPULAN

6.1. Kesimpulan	25
6.2. Saran.....	25

Daftar Pustaka

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Nilai Protein Standar Produksi Biorad	15
Tabel 4.1	Kurva Standar eCG	18
Tabel 4.2.	Konsentrasi eCG.....	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1	Profil Protein dengan SDS-PAGE eCG M = Marker (kDa) Kolom 1-4.....	16
Gambar 4.2	Glikoprotein Staining eCG hasil Penelitian Dengan BM Sekitar 55 kDa	17
Gambar 4.3	Spesifitas eCG dengan anti eCG Dot Biru = eCG dikenali oleh anti eCG	19
Gambar 5.1	Major bands were observed at approximately 65 kDa and 28 kDa eCG Sumber My Bio Source Reserves (2010)	24



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG PENELITIAN

1.1.1. Program Intensifikasi Sapi Madura

Sapi Madura merupakan plasma nuftah Indonesia khususnya Jawa Timur di Pulau Madura yang sampai sekarang eksistensinya tetap di pertahankan. Karakteristik budaya dan keunggulan mutu daging sapi Madura tidaklah diragukan, tetapi kita harus waspada bahwa peningkatan kualitas dan kuantitas jumlah sapi potong Madura ini merupakan kekayaan alam (Natural resources) asli Indonesia.

Peningkatan mutu ternak merupakan salah satu aspek utama dalam pengembangan peternakan sapi potong di Indonesia. Beberapa teknologi mutakhir yang telah diciptakan telah digunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak adalah induksi birahi, penanganan kasus infertilitas atau gangguan reproduksi inseminasi buatan, super ovulasi dan transfer embrio. Jenis sapi potong Madura mempunyai kemampuan adaptasi, produksi daging dan reproduksi yang cukup baik di Indonesia. Produksi daging sapi Madura mencapai 50% keatas lebih tinggi dari produksi karkas sapi potong lainnya. Dengan pengelolaan sapi Madura selama 305 hari dan 60 hari masa kering diharapkan akan tercapai jarak beranak (calving interval) 12 bulan sehingga sapi Madura tersebut dapat beranak setahun sekali.

Selain masih rendahnya populasi sapi Madura dan produksi dagingnya, yang sering menjadi masalah adalah gangguan reproduksi pada ternak tersebut yaitu, seringnya terjadi gangguan reproduksi dalam bentuk :

- Hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pakan.
- Sering terjadi kawin berulang diikuti dengan servis menunggu birahi 21 hari berikutnya.
- Calving interval yang jauh lebih dari 12 bulan.
- Angka kelahiran dan kebuntingan yang rendah.
- Sering dijumpai penggunaan pejantan untuk kawin alami.

- Inseminasi buatan hanya dilakukan bila terjadi birahi secara alamiah. Teknologi sinkronisasi birahi dan induksi birahi belum dilakukan.

Usaha ternak sapi madura yang dilakukan petani peternak di Indonesia masih dalam taraf berkembang, nampaknya banyak hal mengenai tata laksana beternak sapi perah khususnya dalam mengelola pengetahuan reproduksi dengan pendekatan secara benar antara paramedis, ATR, inseminator dan peternak itu sendiri perlu ditingkatkan.

Untuk meningkatkan efisiensi reproduksi serta peningkatan populasi dan produksi susu sapi Madura, perlu dilakukan upaya penanganan gangguan reproduksi, upaya gertak birahi yang dipadukan dengan IB.

Penggunaan beberapa preparat hormonal. Seperti *eCG* untuk tujuan perbaikan reproduksi belum banyak dilakukan di lapangan. Salah satu adalah untuk induksi birahi, penanganan infertilitas karena hypofungsi ovarium.

eCG merupakan hormon gonadotropin dengan berat molekul antara 28.000-30.000 dengan dua rantai yaitu sub unit alfa dan sub unit beta, *eCG* tersusun dari glicoprotein dengan kandungan karbohidrat sebesar 40% dan asam sialat yang kadarnya tinggi sebesar 10,4%. Adanya kandungan asam sialat yang tinggi ini dapat memperpanjang waktu paruh *eCG* dalam plasma darah sehingga *eCG* mempunyai daya kerja yang lebih kuat. Asam sialat mempunyai fungsi melindungi *eCG* dari degradasi oleh hati sehingga berpengaruh pada waktu paruhnya (Hafez, 1993). Sulitnya memperoleh preparat FSH menyebabkan hormon *eCG* merupakan alternatif untuk teknik superovulasi dan terapi hypofungsi ovarium (Ismudiono, 1992). Madyawati dkk (1994) dalam penelitiannya menggunakan *eCG* pada sapi perah untuk induksi birahi dan terjadi kebuntingan. Srianto (1995), dalam penelitian induksi kebuntingan kembar dengan menggunakan hormon *eCG* dosis rendah pada sapi perah dan terjadi perubahan hormon steroid di dalam darah. Mustofa (1995), menyebutkan bahwa pemberian *eCG* dengan berbagai variasi dosis akan menyebabkan terjadinya perubahan kadar hormon estrogen. *eCG* sangat potensial dalam menstimulasi fungsi ovarium, waktu paruhnya panjang memungkinkan untuk menginduksi perubahan folikel dan sering terjadi efek samping sistik folikel (Moor, et al, 1984).

Induksi birahi atau gertak birahi atau sinkronisasi birahi bila dilakukan bersamaan adalah upaya untuk memperoleh birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGf2 α pada fase luteal bertujuan untuk melisiskan korpus luteum berfungsi dan dikombinasikan dengan penyuntikan eCG untuk menumbuhkan folikel (Ismudiono, 1992).

1.1.2. Dasar Pertimbangan

Upaya meningkatkan mutu genetik dan produktivitas ternak, pemerintah telah memilih bioteknologi untuk mencapai tujuan tersebut, hal ini didukung dengan keluarnya keputusan menteri riset dan teknologi atau ketua BPPT No. 542 / KPIM/ VII/ 1992 yang menetapkan program unggulan bidang bioteknologi peternakan yang meliputi :

- (1) Meningkatkan mutu genetik ternak dengan prioritas pada sapi potong
- (2) Peningkatan kemampuan reproduksi dan populasi ternak secara cepat dengan prioritas pada sapi potong.
- (3) Koordinasi produksi bahan biologi dan diagnosa dini penyakit ternak.

Berdasarkan pertimbangan di atas dapat disimpulkan bahwa peranan faktor reproduksi sangat besar dalam upaya meningkatkan mutu genetik dan produktivitas ternak. Teknik IB untuk produksi bibit unggul dan peningkatan populasi sapi Madura merupakan pilihan tepat karena memiliki beberapa keunggulan disamping sarana Balai Inseminasi Buatan yang tersedia. Salah satu dari banyak faktor penghambat dari teknik induksi birahi adalah sering terjadinya gangguan reproduksi pada sapi perah, ketidakmampuan peternak untuk mengamati birahi, kurangnya ketrampilan inseminator, belum tersosialisasinya teknik induksi birahi atau gertak birahi sehingga untuk pelaksanaan induksi birahi harus menunggu siklus terjadinya birahi 21 hari kemudian atau birahi alam.

Sesuai dengan kondisi usaha peternakan sapi Madura rakyat nampaknya dijumpai beberapa kendala di dalam pengembangannya yaitu :

- Kondisi peternak sapi Madura masih dalam tahap berkembang sehingga masih perlu peningkatan pengetahuan mengenai pemeliharaan ternak. Khususnya

reproduksi, recording, peningkatan mutu genetik sapi pada generasi pedet berikutnya.

- Adanya gangguan reproduksi seperti korpus luteum persisten dengan infeksi pasca lahir dalam bentuk dan endometitis, birahi tenang *hypofungsi ovarium* karena manajemen pakan.
- Belum diperkenalkannya teknik induksi birahi secara menyeluruh sehingga bila terjadi kawin berulang harus menunggu 21 hari kemudian.

Atas dasar pertimbangan di atas nampaknya perlu pemecahannya. Diperlukan penanganan terpadu terhadap gangguan reproduksi khususnya hypofungsi ovarium.

Telah dilakukan studi pendahuluan injeksi trans ovari dengan menggunakan PGF2 α dosis rendah dan *eCG* pada sapi perah. Dosis perlakuan adalah kelompok kontrol diinjeksi 25 mg IM sedangkan kelompok perlakuan dengan dosis rendah trans ovari masing-masing 1 mg, 0,75 mg/ekor dan 0,5 mg/ekor (Malik, 2000). Hasilnya, tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan perlakuan terhadap timbulnya birahi dan kebuntingan pada sapi perah

Hermadi (2003), telah mencoba 25 IU *eCG* trans ovari pada sapi perah penderita telah memperoleh perbaikan manajemen pakan selama 2 minggu, hasilnya 3 ekor menunjukkan birahi dan terjadi kebuntingan.

Efek super ovulasi yang ditimbulkan oleh *eCG* sebaliknya menimbulkan efek kebuntingan pasca penyuntikan sehingga dibutuhkan dosis yang seimbang saat penyuntikan. Oleh sebab itu perlu dicarikan alternatif dosis hormon *eCG* (Harjopranyoto, 1995).

eCG (*equine Chorionic Gonadotropin*) pada hewan domestik yang sampai saat ini masih hangat diperbincangkan adalah *eCG* yang berasal dari kuda yaitu *eCG* atau oleh penemunya Harold Cole diberi nama *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (Stabenfeldt and Davidson, 2002). Sampai saat ini penelitian yang berupaya mengkaji kadar *eCG* didalam serum kuda Indonesia (sandel, *CBG2* dan *CBG4*) jarang dilakukan (Wijaya, 2008).

Indonesia memiliki ras kuda asli yaitu sandel. Disamping itu menurut terminologi PORDASI (Persatuan Olahraga Berkuda Seluruh Indonesia) yang dimaksudkan sebagai kuda Indonesia selain kuda sandel adalah juga kuda *crossbred* (*CB*)*G1* sampai dengan *G4*. Kuda *CBG4* ini merupakan hasil persilangan antara kuda sandel (betina) dengan kuda *thoroughbred* (jantan) sampai menghasilkan generasi ke 4 yang penampilan fisik dan prestasi pacunya sudah mendekati (97%) kuda *thoroughbred*. Oleh karena itu oleh PORDASI kuda *CBG4* ditetapkan sebagai kuda pacu Indonesia terbaik (Anonimus, 2000). Fenomena tersebut menyiratkan adanya kemungkinan bahwa kandungan *eCG* didalam serum kuda Indonesia *CBG4* akan mirip atau menyamai kandungan *eCG* didalam serum kuda *thorouhgbred* (Wijaya, 2008).

Hormon Equine Chorionic Gonadotropin (*eCG*) yang didapatkan dari serum kuda bunting merupakan hormon *non pituitary gonadotropin* yang dapat digunakan sebagai sumber hormon karena *eCG* mempunyai efek biologis seperti FSH dan sedikit LH. Pertimbangan lain karena mudah didapatkan di pasaran dengan harga lebih murah dari pada preparat gonadotropin seperti FSH dan LH (Restiadi, 1999).

Penelitian ini akan melakukan Isolasi protein *eCG* dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dalam ultra sentrifus 4°C dan dtambahkan etanol absolute 1 : 1 dan dimurnikan dengan teknik coloums chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein *eCG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan kemudian dibuat sediaan *Frozen Dry* kering beku.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka perlu ekstrak serum kuda bunting lokal yang diseparasi dengan sephadex G-100 terhadap produksi

Equine Chorionic Gonadotropin (*eCG*) *Frozen Dry* dari serum kuda bunting lokal untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura Hingga 90% Separasi dengan sephadex G-100 dimaksudkan untuk mendapatkan kandungan hormon *eCG* dalam serum kuda. Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka perlu ekstrak serum kuda bunting lokal yang dipisahkan dengan sephadex G-100 terhadap produksi Equine Chorionic Gonadotropin (*eCG*) kemudian dibentuk sediaan *Frozen Dry* atau kering beku yang siap diedarkan dan diaplikasikan untuk meningkatkan kebuntingan sapi Madura hingga 90% Separasi dengan sephadex G-100 dimaksudkan untuk mendapatkan kandungan hormon *eCG* dalam serum kuda bunting sehingga diharapkan dapat digunakan untuk peningkatan populasi sapi Madura di Indonesia.

1.2. TUJUAN KHUSUS

Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut :

1.2.1. Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah.

- a. Melakukan Isolasi protein *eCG* dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dan etanolabsolut 1 : 1 dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik columns chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein *eCG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan dibuat bentuk sediaan *Frozen Dry*.

1.2.2. Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah : Menentukan suatu model teknologi penanganan infertilitas dan induksi birahi dengan *eCG* pada hewan coba lainnya dan ternak komersial pada khususnya sapi Madura dengan menunjukkan keberhasilan yang tinggi.

1.3. URGENSI (KEUTAMAAN)

Harapan dari hasil penelitian ini sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan ekstrak serum kuda bunting lokal yang diseparasi dengan sephadex G-100 terhadap untuk Meningkatkan Kebuntingan Sapi Madura. untuk terapi induksi dan sinkronasi birahi untuk tujuan peningkatan populasi ternak.

- Berupaya untuk menentukan suatu model teknologi penanganan induksi birahi

pada hewan ternak khususnya sapi Madura

- Bahan informasi Bagi peternak sapi dan kambing bahwa efektifitas penggunaan Gonadotropin (*eCG*) dalam bentuk *Frozen Dry* hasil ekstraksi kuda lokal Indonesia yang sangat murah bila dibandingkan dengan penggunaan bahan import sejenis *eCG* Intervet Holland dengan merk Folligon lainnya untuk gertak birahi sinkronasi dan superovulasi.
- Pemerintah sebagai pelaku kebijakan, sebagai bahan pertimbangan dalam pengembangan populasi ternak sapi, kambing dan domba melalui teknologi Gonadotropin (*eCG*) dalam bentuk *Frozen Dry* hasil ekstraksi kuda lokal Indonesia untuk gertak birahi dan sinkronasi birahi.
- Penyuluh peternakan, sebagai masukan dan bahan tambahan informasi atau materi penyuluhan, khususnya dalam memasyarakatkan program pembangunan peternakan sapi dan kambing melalui teknologi induksi birahi dengan Gonadotropin (*eCG*) dalam bentuk *Frozen Dry* - Pengelola proyek pembangunan pertanian/peternakan, sebagai bahan informasi yang dapat digunakan untuk mendukung implementasi kebijaksanaan yang telah ada.

Penelitian ini merupakan yang mendukung program unggulan pemerintah di bidang sapi perah, sapi potong, kambing dan dombayang menitik beratkan pada peningkatan mutu genetic dan produktivitas melalui penerapan teknologi Gonadotropin (*eCG*) dalam bentuk *Frozen Dry* - ekstraksi dari kuda lokal Indonesia untuk penanganan induksi birahi dan sinkronasi birahi.

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Hasil yang Sudah Dicapai dan Studi Pendahuluan yang Sudah Dilaksanakan

Bangsa *equidae* (kuda, kuldi zebra) pada saat kebuntingan menghasilkan *eCG* (*equine Chorionic Gonadotropin*) yang disebut sebagai hormon *non puititary gonadotropin*. Gonadotropin ini sumbernya bukan berasal dari kelenjar hipofisa. Dibentuk oleh mangkok-mangkok endometrium di kornua uteri bunting yang memproduksi hormon *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG)* (Arthur *et al.*, 1989).

eCG merupakan hormon gonadotropin dengan berat molekul antara 28.000-30.000 dalton. Struktur *eCG* sama dengan hormon gonadotropin pada umumnya, yaitu struktur *sub unit α* dan *β* . *eCG* tersusun dari glikoprotein dengan kandungan karbohidrat sebesar 40% dan asam sialat sebesar 10,4%. Adanya kandungan asam sialat yang tinggi dapat memperpanjang waktu paruh *eCG* dalam plasma darah sehingga mempunyai daya kerja yang lebih kuat. Asam sialat berfungsi untuk melindungi dari degradasi yang dilakukan oleh sel-sel hati (Hafez, 2000).

eCG tidak terdapat dalam urine, menunjukkan bahwa molekul-molekul *eCG* jauh lebih besar dan tidak dapat melampaui sistem filtrasi ginjal. Secara biologik mempunyai fungsi dan daya kerja serupa dengan campuran FSH dan LH dari kelenjar hipofisa anterior tetapi pengaruh utamanya lebih menyerupai FSH (Hardjopranjoto, 198:). Seperti FSH, hormon *eCG* dapat merangsang pertumbuhan folikel ovarium serta meningkatkan kadar estrogen dalam darah, sedangkan seperti LH, hormon *eCG* dapat mendorong terjadinya ovulasi dan merangsang pertumbuhan sel-sel luteum (Hardjopranjoto, 1984), sehingga hormon ini secara komersial dapat digunakan untuk mendorong terjadinya superovulasi pada transfer embrio, menggertak birahi dan mendorong terjadinya superovulasi pada hewan-hewan yang mengalami gangguan reproduksi, serta dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovulasikan (Bindon dan Piper, 1981).

Hoppen, (1994) menjelaskan bahwa *eCG* mulai disintesis oleh sel trofoblas khusus yang mengorganisasikan diri kedalam *embryonic girdle*. Sel *girdle* ini kemudian melakukan invasi ke endometrium yang terus berlanjut hingga bagian stroma. Dibagian stroma endometrium inilah kemudian terbentuk *endometrial cups*. Bersamaan dengan proses perjalanan invasi sel *girdle* ini terjadi transformasi morfologis sel *girdle* kedalam bentuk seperti sel desidua yang besar ukurannya. Disamping itu didalam sirkulasi darah kuda bunting tersebut sudah mulai bisa dideteksi hormon gonadotropik. Hormon gonadotropik ini sudah dibuktikan berasal dari bagian korion embrio kuda yang sampai saat ini disebut sebagai *eCG (equine Chorionic Gonadotropin)*. Awal proses invasi sel *girdle* ini berlangsung sejak konseptus berumur 35 hingga 38 hari (Stabenfeldt dan Edqvist; 1993). Selanjutnya konsentrasi *eCG* dalam darah kuda mencapai 100 IU/ml pada saat umur kebuntingan 40 hari dan semakin meningkat menjadi 150 IU/ml setelah umur kebuntingan 130 hari. Puncak konsentrasi *eCG* didalam darah terjadi pada umur kebuntingan kuda antara 110 -130 hari (Stabenfeldt and Davidson, 2002).

2.2 Hasil yang sudah dicapai Beberapa Penelitian Pendahuluan

Mahaputra dan Mustofa (2002), melakukan ekstraksi whole serum kuda pacu bunting thoroughbred dapat digunakan untuk tujuan suplementasi invitro fertilisasi hasilnya sangat signifikan terjadi maturasi dan cleavage. Dilanjutkan dengan penelitian restiadi (1999) dan Trisnaati (2004) menunjukkan keberhasilan yang sama dalam menyebabkan pertumbuhan secara invitro. Wijaja (2006), telah berhasil melakukan pemisahan equine Chorionic gonadotropin dengan mengaplikasikan pada tikus putih untuk tujuan kebuntingan.

Telah dilakukan studi pendahuluan injeksi trans ovari dengan menggunakan PGF2 α dan *eCG* dosis rendah pada sapi perah. Dosis perlakuan adalah kelompok kontrol diinjeksi 25 mg IM sedangkan kelompok perlakuan dengan dosis rendah trans ovari masing-masing 1 mg, 0,75 mg/ekor dan 0,5 mg/ekor (Malik, 2000). Hasilnya, tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan perlakuan terhadap timbulnya birahi dan kebuntingan pada sapi perah.

Hermadi (2003), telah mencoba 25 IU *eCG* trans ovarium pada sapi perah penderita telah memperoleh perbaikan manajemen pakan selama 2 minggu, hasilnya 3 ekor menunjukkan birahi dan terjadi kebuntingan dan beberapa kasus menunjukkan banyak keberhasilan.

Pada penelitian pendahuluan pada kambing dengan menggunakan *eCG* 75 IU secara intra muscular 2 hari setelah penyuntikan terjadi proses birahi dan setelah inseminasi buatan menunjukkan angka kebuntingan 100% (Ratnani dan Hermadi, 1992).

Gelombang Pertumbuhan Folikel pada sapi di FKH Unair pertama kali dipaparkan tahun 1999. Dengan penyuntikan $PGf2\alpha$, *eCG* dan HCG dengan pantauan USG Sonovet (Hariadi et al, 1997; Bintara S, 1999). Pengetahuan mengenai perkembangan folikel pada mamalia semakin meningkat dengan digunakannya peralatan Ultrasonografi (USG). Ultrasonografi dapat memonitor fungsi ovarium dan menambah pengetahuan kita mengenai gelombang folikel. Pada ternak sapi ultrasonografi dapat mendeteksi gelombang folikel selama siklus birahi, dan dekade terakhir ini telah ditemukan pada sapi adanya 2 - 3 pergantian gelombang folikel selama siklus birahi yang lamanya 22 hari, dengan folikel tunggal pada tiap gelombangnya. Jadi, dua atau tiga pergantian folikel dominan terjadi selama satu siklus birahi.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Umum Pemecahan Masalah

Untuk memecahkan masalah dalam penelitian ini maka dibuat kerangka umum pemecahan masalah yang nantinya akan dijabarkan kedalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri atas dua tahap sebagai berikut :

Tahap Penelitian Pertama Tahun 2012: Isolasi protein *eCG* dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dan etanol absolut 1 : 1 dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik coloums chromatography CM Sephadex G-200. Identifikasi protein *eCG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan dibuat bentuk sediaan *Frozen Dry*.

3.2. Bahan dan Peralatan Penelitian

3.2.1. Bahan dan Peralatan untuk penelitian I

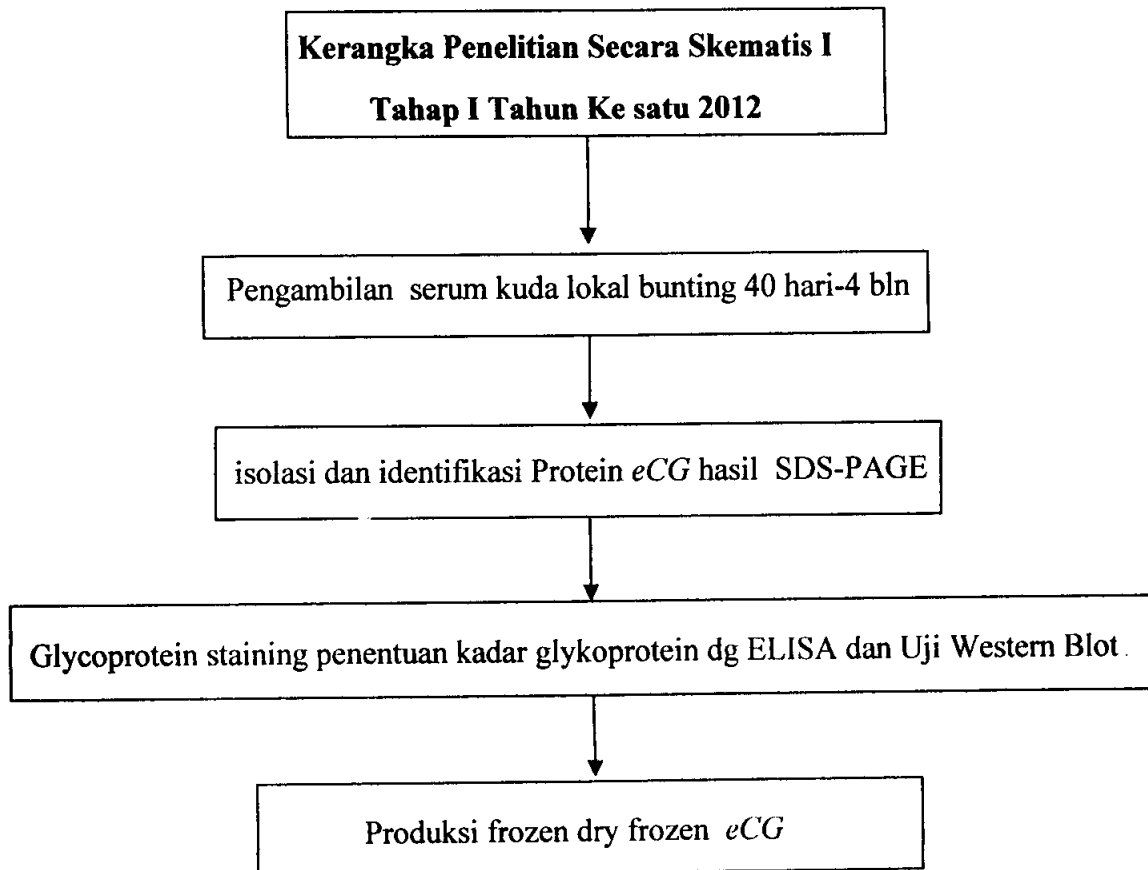
Serum darah kuda lokal yang diambil dari vena yugularis sebanyak 10 ml per ekor dengan Venoject 10 ml. sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein. Dibutuhkan 200 µl sampel, PBST-PMSF, mikrotube disonifikasi, vortex, etanol absolut dingin 1: 1 diinkubasi dalam refrigator. *buffer tris* Cl 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2005).

3.2.2. Bahan dan Peralatan Penelitian II

Pada penelitian ke II dibutuhkan hewan coba sapi Madura betina 20 ekor dengan BSC (Body Score Condition) 2 (dua) untuk diterapi sinkronisasi birahi dengan *eCG frozen dry* hasil penelitian.

3.3. Metode Penelitian

Digambarkan dalam kerangka penelitian secara skematis tiga tahap dari tahun 2012 s/d 2013 adalah sebagai berikut :



3.3.1. Metode Penelitian Tahun Pertama 2012

3.3.1.1 Pembuatan *eCG*

Serum darah kuda lokal bunting 3 -4 bulan yang diambil dari vena yugularis sebanyak 10 ml per ekor dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C (Rifkind *et al.*, 1967). Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit dan bagian endapan dibuang. dilakukan sentrifugasi 3000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit (Hermadi, 2001). Hasil supernatan disaring hingga jernih dan dimasukkan ke dalam tabung *Erlenmeyer* dengan menggunakan kertas saring. Prosedur di atas dilakukan hingga mendapatkan supernatan sebanyak 50 ml (Hinselwood *et al.*, 1991). Selanjutnya sampel digunakan untuk prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein. Dibutuhkan 200 µl sampel dibuat homogen dengan penambahan PBST-PMSF 5 kali sampel kemudian supernatan dimasukkan kedalam mikrotube disonifikasi selama 10 menit kemudian divortex dan disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit ditambahkan etanol absolut dingin 1: 1 diinkubasi dalam refrigator selama 1 jam atau semalam. Kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit kemudian endapan dikeringanginkan hingga bau etanol hilang dan ditambah *buffer tris Cl* 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2005). Sebelum pemeriksaan SDS-PAGE dilakukan pemurnian dengan tehnik coloums chromatographi G-100.

Metode Identifikasi Protein *eCG* Dengan SDS-PAGE

Persiapan gel, *plate gel* dibuat dengan merangkai dua *plate* kaca dengan jarak antar plat \pm 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*) (Aulani'am, 2005).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulphate* (APS) dan N, N, N', N'-*tetramethylethylenediamina* (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* dan dibiarkan 10-30 menit

sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegar dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi sampel, sampel yang berisi 12,5 µl sampel hMG dan 12,5 µl *Iodoacetamida* dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 µl untuk tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik dengan arus listrik sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda ± 0,5 cm dari batas bawah *plate gel*.

Perlakuan setelah *running*, gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 ml asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan *massa moleculae relative* protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Penentuan berat molekul glikoprotein dilakukan dengan menghitung *retardation factor* (Rf) dari masing-masing pita dengan menggunakan rumus (Aulani'am, 2005) sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan *massa moleculae relative* sampel. Nilai Rf dan berat molekul protein standar tertera pada Tabel 4.1.

Tabel 3.1 Nilai Protein Standar Produksi Biorad

Rf (Sb X)	BM (kDa)
0,064	200
0,177	116,25
0,223	97,4
0,371	66,2
0,564	45
0,887	31

3.3.4. Rancangan dan Analisis Statistik

Data hasil ekstraksi, identifikasi, isolasi dan karakterisasi *eCG* diolah secara deskriptif.

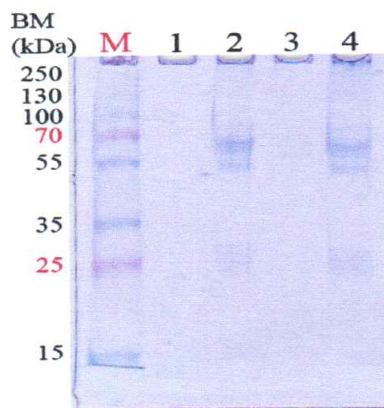
BAB IV

HASIL PENELITIAN

Bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan kerangka konseptual. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu: 1) Konfirmasi, isolasi dan karakterisasi biokimiawi glikoprotein eCG dari; 2) Karakterisasi anti- eCG melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode *indirect* ELISA dan *Dot Blot*.

Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG

Penggunaan Separasi dengan sephadex G-100 untuk filtrasi protein serum kuda bunting sebelum perlakuan. Pada penelitian yang sama (Trisnaati, M. 2004; Widjaja N.M.R. 2006 dan William et al, 1980). Menggunakan variasi filtrasi G-25, G-100 dan G – 200. Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengkonfirmasi profil protein yang ada pada eCG. Identifikasi protein berdasarkan pita protein yang muncul pada elektroforegram. Terdapat delapan pita yang teridentifikasi pada eCG yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE yaitu mempunyai BM diantara 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa.



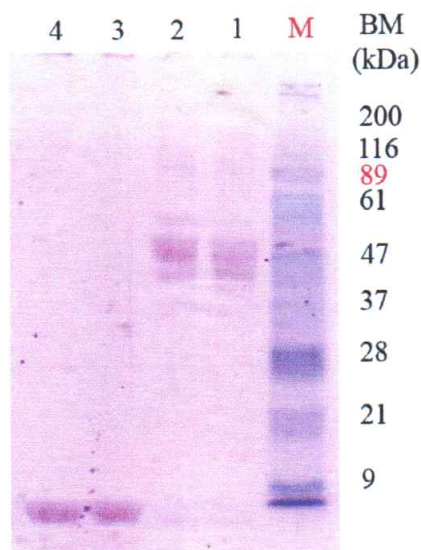
Keterangan:

M : Marker Protein
 BM : Berat Molekul
 1 dan 3: Sampel Lama
 2 dan 4: Sampel Baru

Gambar 4.1. Profil protein dengan SDS-PAGE eCG. M = marker (kDa), kolom 1-4 .

Dari Gambar 4.2 diyakini ada pita yang merupakan molekul PMSG. maka dilanjutkan metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi terhadap PMSG (Catalog CSA 614 stress Gen Bioreagen).

Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 4.2. menunjukkan bahwa pita pada Gambar 4.1 ada yang merupakan molekul eCG karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap eCG.



Keterangan:

M : Marker Protein

BM : Berat Molekul

1 dan 2: Sampel Baru

3 dan 4: Sampel Lama

Gambar 4.2. Glikoprotein Staining eCG hasil Penelitian dengan BM Sekitar 55 kDa

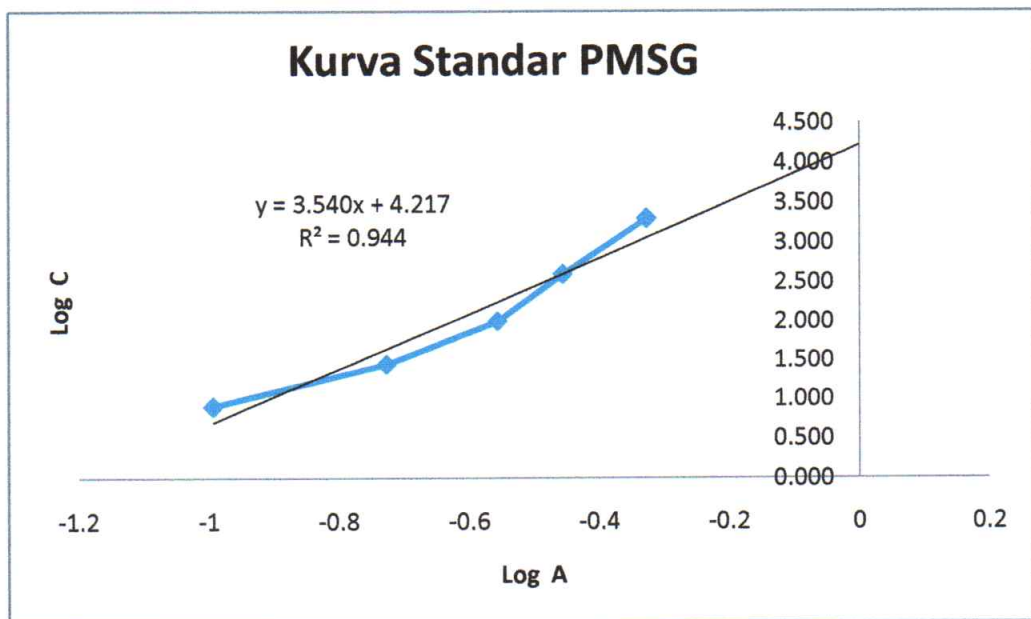
Karakterisasi dengan metode ELISA

Produksi anti- eCG dilakukan dengan induksi eCG hasil penelitian. Bukti imunogenesitas dibuktikan dengan penghitungan OD (Optical Density) ELISA Kosentrasi eCG hasil analisis dengan rata rata absorbansi 0,2565 pada sampel 1.0,252 dan sampel 2.0,251 dengan kosentrasi **5.12501 mIU/ml**.

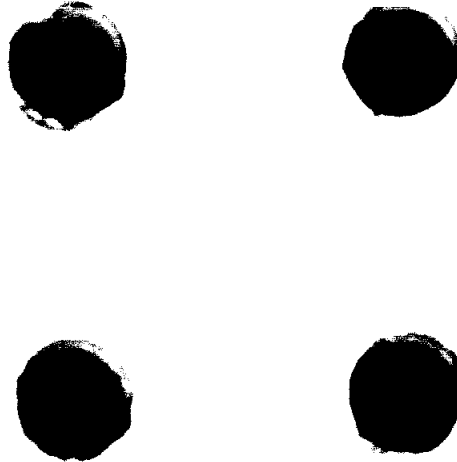
Tabel 4.1 Kurva Standar eCG

NO	Konsentrasi	Absorbansi		Rata-rata	Absorbansi real	log konsentrasi	log Absorbansi
		1	2				
1	0	0.048	0.041	0.0445	0		
2	8	0.144	0.148	0.146	0.1015	0.903	-0.993533958
3	28	0.231	0.233	0.232	0.1875	1.447	-0.726998728
4	100	0.315	0.329	0.322	0.2775	2.000	-0.556737013
5	400	0.404	0.385	0.3945	0.35	2.602	-0.455931956
6	2000	0.513	0.518	0.5155	0.471	3.301	-0.326979093

Keterangan : konsentrasi 0 merupakan blanko.

**Tabel 4.2. Kosentrasi eCG**

Absorbansi sampel		Rata-rata	Konsentrasi (mIU/ml)
1	2		
0.252	0.261	0.2565	5.12501

Karakterisasi anti- eCG dengan metode *dot blot*

**Gambar 4.3. Spesifitas eCG dengan anti eCG
Dot biru = eCG dikenali oleh anti- eCG**

Antibodi hasil induksi eCG hasil penelitian ini juga dikonfirmasi menggunakan isolat dari 4 sampel serum Kuda, didapatkan hasil dengan spesifitas seperti pada Gambar 3.

Hasil pada Gambar 3 menunjukkan bahwa antibodi- eCG hasil penelitian ini merupakan respon induksi eCG hasil elektroelusi, bersifat spesifik dengan eCG yang terkandung dalam serum kuda bunting.

BAB V PEMBAHASAN

Pembahasan hasil penelitian berurutan berdasarkan tahapan penelitian meliputi konfirmasi, isolasi dan karakterisasi biokimiawi glikoprotein eCG dari serum kuda bunting, meliputi :

Konfirmasi, Isolasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein eCG

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui profil protein yang ada pada serum kuda bunting lokal. Identifikasi protein berdasarkan pita-pita protein yang muncul pada elektroforegram. Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan bantuan protein standar (BIO-RAD). Berat molekul isolat protein dari serum kuda bunting ditentukan dengan mengplotkan harga *retardation factor* (RF) yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -18933X + 2.2756$. Kurva hubungan antara RF(X) dengan log BM protein standar (Y) dan hasil perhitungan berat molekul pita protein yang terdapat pada serum kuda bunting dapat dilihat pada gambar 1. Ada 3 pita yang teridentifikasi pada serum kuda bunting lokal yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE 12% setelah dibandingkan dengan protein marker berat molekul protein tersebut terletak diantara dari 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa. Menurut Acris Antibody company (2010), bahwa eCG hasil tera laboratoris mempunyai spesifikasi dengan berat molekul 53 kDa. Analysis by RP-HPLC, UV spectroscopy at 280 nm. Lyophilized PMSG hanya stabil pada temperatur kamar selama 3 minggu seterusnya harus disimpan direfrigator 2-8°C. Serum kuda bunting mempunyai kandungan 46.7% eCG dan mempunyai kaya akan molekul Sialic Acid (13.5%)(Gospodarowicz 1972).

Isolasi protein eCG dilakukan, setelah itu didiamkan dalam lemari es selama 24 jam pada suhu 4°C. Penambahan larutan tersebut disesuaikan dengan volume endapan (1 : 1). Selanjutnya, dilakukan sentrifusi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam *freezer* selama lima menit. Pelet yang terbentuk kemudian ditambah 200 µl *buffer Tris-Cl*. Setelah isolat

protein didapatkan, dilakukan *running* SDS-PAGE 12% sampai tampak pita-pita protein eCG yang terdapat pada gel (Aulanni'am, 2005).

Penelitian tahap awal untuk mengetahui karakteristik atau identitas protein eCG berdasarkan berat molekulnya. Metode yang digunakan adalah teknik SDS-PAGE 12% dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan marker protein. Berat molekul yang tepat dapat diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara **65 kDa**, **55 kDa** dan **28 kDa**. Gambar 1 tentang profil fraksi protein, tampak adanya 3 kolom yaitu kolom M yang merupakan marker, berat molekul diperoleh dengan cara perhitungan regresi linear antara nilai Rf dari marker protein maupun sampel hasil *running* SDS-PAGE 12%. Perhitungan menggunakan regresi linear akan menimbulkan kemungkinan adanya perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan penelitian yang lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama (Aulanni'am, 2005).

Pita protein eCG dengan berat molekul berbeda dengan ketebalan yang berbeda pula bila dibandingkan dengan pita protein satu dengan lainnya. Ketebalan pita protein yang terwarnai pada gel merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut, semakin tebal pita protein yang terlihat semakin banyak ekspresi gen penyandi protein. Kemungkinan besar hal ini disebabkan oleh tingkat kebersihan (kejernihan) isolat yang baik, serta konsentrasi protein yang cukup ((Aulanni'am, 2005).

Gambaran pita protein serum kuda bunting yang tampak pada gel, belum bisa dikatakan sebagai berat molekul spesifik yang menjadi karakteristik dari protein eCG tetapi hanya sebagai gambaran awal mengenai berat molekul yang dimiliki oleh protein eCG, untuk itu harus dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui berat molekul spesifik yang menjadi karakteristik protein eCG. Kelemahan dari SDS-PAGE yaitu protein yang dideteksi banyak yang tidak spesifik, karena SDS-PAGE menampilkan profil protein antigenik dalam bentuk umum, baik protein spesifik maupun protein yang tidak spesifik. Konfirmasi pita protein yang merupakan eCG dilakukan pewarnaan glikoprotein untuk menentukan bahwa eCG adalah molekul glikoprotein. Hasil konfirmasi sebagai

molekul glikoprotein seperti pada Gambar .2 menunjukkan bahwa bahwa dari beberapa pita protein pada Gambar 1, hanya satu pita dengan BM 55 kDa yang merupakan glikoprotein. Pembuktian molekul dengan BM 55 kDa ini adalah suatu eCG maka dikonfirmasi dengan metode *Western Blot*.

Identifikasi protein eCG

Metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi PMSG (CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 2. menunjukkan bahwa pita glikoprotein pada Gambar 2 adalah molekul eCG karena dikenali oleh monoklonal antibodi . Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui molekul protein eCG adalah molekul yang bereaksi spesifik dengan anti- eCG. Setelah protein ditransfer ke membran nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi primer (anti- eCG) dan sekunder (anti *rabbit* IgG berlabel AP) maka pita protein dengan menambahkan substrat DAB. Pita protein yang muncul merupakan protein eCG dengan berat molekul 55 kDa Molekul protein yang terlihat pada membran nitroselulose melalui metode SDS-PAGE masih belum spesifik. Karena itu diperlukan uji spesifisitas secara kimia sehingga didapatkan molekul protein yang spesifik sesuai dengan keinginan. Salah satu uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah *Western Blot* (Aulani'am, 2005).

Hasil *Western blot* dapat dilihat pada gambar 2. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal antibodi eCG diyakini adalah protein eCG dengan berat molekul 55 kDa. Pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul berkisar 55 kDa selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar dalam mIU/ml.

Western blot bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks protein-antibodi-antibodi *sandwich*. Antibodi sekunder berikatan dengan enzim *horse radish peroxydase* yang dapat merubah substrat luminal menjadi substansi berwarna terang. Substansi ini dapat diukur kadar protein dan ukuran molekul relatif dengan dibandingkan protein marker. Hasil *Western blot* ini mengindikasikan bahwa molekul eCG berikatan secara spesifik dengan antibodi eCG sebagai antibodi primer dan anti rabbit IgG sebagai antibodi sekunder.

Antibodi eCG dan anti rabbit IgG dapat mengenali protein eCG sebagai pita dengan berat molekul 55 kDa. Karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul eCG dengan BM sebesar 55 kDa.

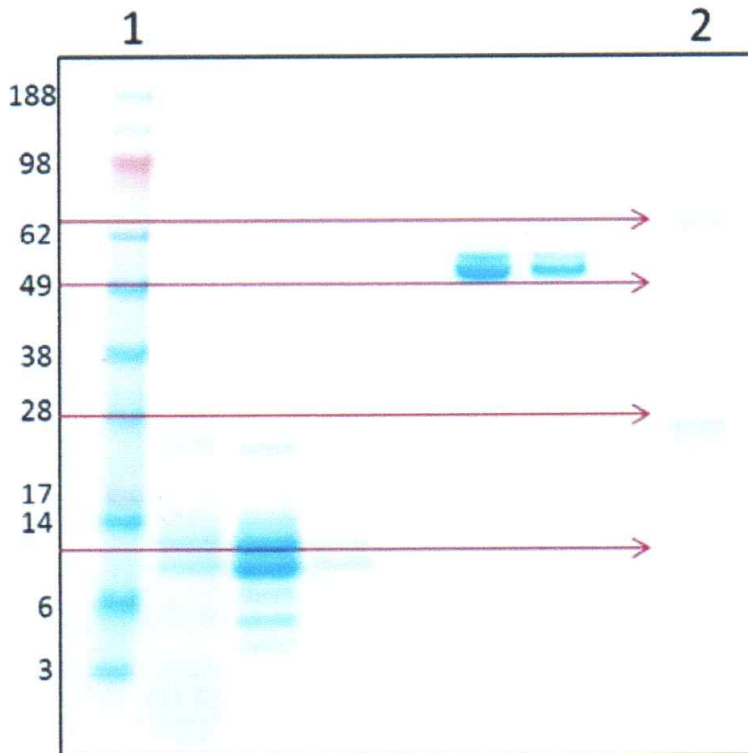
Pengenalan protein spesifik eCG oleh antibody eCG melibatkan ikatan nonkovalen dan reversibel. Kekuatan ikatan antara protein eCG dengan antibodi tergantung faktor elektrostatis, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan jumlah epitop (Baratawidjaja, 2004).

Protein eCG dengan berat molekul 55 kDa termasuk dalam antigen berpotensi yang mampu menginduksi respon imun. Protein makromolekul dapat bersifat multideterminan, univalen dengan mempunyai banyak epitop tetapi hanya satu dari setiap macamnya. Jumlah epitop ini menentukan kekuatan afinitas dan aviditas dari antibodi (Baratawijaya, 2004). Seperti halnya dengan protein eCG yang merupakan protein makromolekul mempunyai epitop multideterminan univalen. Karena itu ikatan protein eCG dengan antibodi eCG menghasilkan afinitas dan aviditas tinggi sehingga terbentuk ikatan yang kuat dan bersifat stabil.

Pengukuran kadar eCG

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein isolat eCG. Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah eCG melalui uji *western blot*, maka pengukuran kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dilakukan dengan menggunakan *Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit 23260*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai absorbansi protein eCG rata-rata absorbansi 0,2565 pada sampel 1.0,252 dan sampel 2.0,251 dengan konsentrasi **5.12501 mIU/ml**. William et al (1980), dengan menggunakan filtrasi sephadex G – 200 diperoleh konsentrasi 2.500 IU/ml.

MyBioSource reserves (2010) menggunakan 4-12% SDS-PAGE (1 µg protein per lane) adapun hasil dari MyBioSource reserves adalah sebagai berikut:



Gambar 5.1. Major bands were observed at approximately 65 kDa and 28 kDa eCG Sumber MyBioSource reserves.(2010)

Molekul protein eCG dengan BM 55 kDa merupakan antigen yang poten. Menurut Baratawijaya (2004) immunogen poten adalah protein besar dengan BM lebih dari 10.000 Dalton, mempunyai banyak macam determinan dan univalen.

Menurut Sousa *et al.* (2006) yang mengatakan bahwa eCG termasuk dalam golongan *aspartic proteinase* dengan kandungan asam amino lebih dari 50% identik dengan pepsin, cathepsin D dan cathepsin E. Protein eCG dalam penelitian ini terbukti mampu menginduksi terbentuknya antibodi eCG sehingga dapat dikatakan sebagai antigen atau immunogen.

Gambar .3. menunjukkan bahwa eCG hasil isolasi mampu menginduksi anti- eCG. Anti- eCG yang diperoleh diuji spesifitasnya dengan urin eCG (4 sampel) dengan teknik *Dot blot*. *Dot* biru menunjukkan sampel positif dikenali oleh anti- eCG.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 KESIMPULAN.

1. Hasil pemeriksaan SDS-PAGE diperoleh berat molekul PMSG **65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa.**
2. Uji *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi terhadap PMSG (Catalog CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil merupakan molekul Glykoprotein PMSG karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap PMSG. Dengan berat molekul **55 kDa**
3. Kosentrasi PMSG hasil analisis dengan rata rata absorbansi 0,2565 pada sampel 1.0,252 dan sampel 2.0,251 dengan kosentrasi **5.12501 mIU/ml.**
4. PMSG hasil isolasi mampu menginduksi anti-PMSG. Anti-PMSG yang diperoleh diuji spesifitasnya dengan (4 sampel) dengan teknik *Dot blot*. *Dot* biru menunjukkan sampel positif dikenali oleh anti PMSG
5. Hasil produk *frozen dry eCG* disajikan dalam bentuk kering beku.

6.2. SARAN

Akurasi penelitian ini akan lebih baik jika digunakan sampel yang banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Acris Antibodies .2010.Manual of Pregnant Mares Serum Gonadotrophin, Inc.SanDiego, CA.United State.
- Baratawidjaja. KG.2004. Imunologi Dasar. Edisi keenam.Penerbit Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.hal 51 – 78.
- Gospodarowic,D. 1972 Pregnant Mares Serum Gonadotrophin. The Salk Institute for Biological Studies Post Office Box 1809, San Diego, California 92112
- Hermadi HA, 2003. *Ujicoba PMSG Trans Ovari untuk Kasus Hypofungsi Ovarium Sapi Perah*. Hibah Bersaing 2003 Universitas Airlangga.
- Hinshelwood M.M., F. Kamel, D.J. Dierschke and E.R. Hauser. 1991. *Effect of charcoal extracts follicular fluid on reproductive function in post partum cows*. J. Endocrinology. 8 (1) : 37-54.
- Madyawati, S.P., Ismudiono, P. Srianto, A. Samik dan T. Sadjito. 1994. *Waktu Timbulnya Birahi dan Angka Kebuntingan pada Sapi Perah yang diberi Hormon PMSG*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mahaputra, I., dan I. Mustafa. 2002. Kinerja Serum Sapi Birahi dan Kuda Birahi Sebagai Suplemen Media Maturasi Oosit Pada Fertilisasi *In Vitro* Sapi Madura. Jurnal Biosains Pasca Sarjana Vol.4 no.3. September. 113-117.
- MyBioSource reserves.2010. Manual of Pregnant Mares Serum Gonadotrophin.
- Restiadi, T. I. 1999. Suplementasi Serum Kuda Bunting pada Media Maturasi dan Fertilisasi *In Vitro* Oosit Kambing Lokal. Tesis. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. 1: 3-4.
- Srianto, P. 1995. *Profil Progesteron pada Induksi Kembar Dengan Menggunakan Hormon PMSG*. Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Trisnaati, M. 2004. Separasi Ekstrak Serum Kuda Bunting Dengan Sephadex G25 Untuk Superovulasi Pada Mencit. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 11-12 ; 23-26.
- Widjaja N.M.R. 2006. Pemisahan Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) dari serum kuda bunting serta uji Potensi Biologisnya. Desertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlsngga Airlangga.
- William T. Moore, Jr. and Darrell N. Ward.1980. Pregnant Mare Serum Gonadotropin Rapid Chromatographyc procedures for the Purification of intact hormone and Isolation of Subunit From the Department of

Biochemistv, The University of Texas System Cancer Center, M. D. Anderson Hospital and TumorInstitute, and The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, Teras

Lampiran 2c. Surat Pernyataan



SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dr. Herry Agoes Hermadi, drh., MSi.
NIP : 195908231987031003
Pangkat/Golongan : Pembina TK 1 / IV-B
Alamat : Jl. Gunung Sari Indah AZ- 21 Surabaya

Dengan ini menyatakan bahwa proposal penelitian saya yang berjudul :
**PRODUKSI *equine* CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) FROZEN DRY DARI
SERUM KUDA BUNTING LOKAL UNTUK PENINGKATAN KEBUNTINGAN SAPI
MADURA** yang diusulkan dalam skim Penelitian Strategis Nasional 2012-2013
bersifat original dan belum pernah dibiayai oleh lembaga/sumber dana lain.

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidak sesuaian dengan pernyataan ini,
maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku
dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas negara.
Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dengan sebenar-
benarnya.

Surabaya, 19 Oktober 2012

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga

Yang menyatakan,

Dr. Joko Purwanto, Drs. Apt. MS.

NIP. 195908051987011001

Dr. Herry Agoes Hermadi, MSi. drh.

NIP. 195908231987031003