

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI DAN ISOLASI *equine Chorionic Gonadotropin*
(eCG) DARI SERUM KUDA BUNTING DALAM RANGKA
UNTUK DIAGNOSIS KEBUNTINGAN PADA KUDA**



Oleh

RENDI PRIHATMANTO
KEDIRI - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2006

**IDENTIFIKASI DAN ISOLASI *equine Chorionic Gonadotropin*
(eCG) DARI SERUM KUDA BUNTING DALAM RANGKA
UNTUK DIAGNOSIS KEBUNTINGAN PADA KUDA**

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

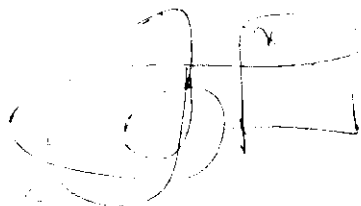
Oleh:

RENDI PRIHATMANTO

NIM. 060213087

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Prof. Mas'ud Hariadi, PhD, MPhil, Drh.)

Pembimbing Pertama



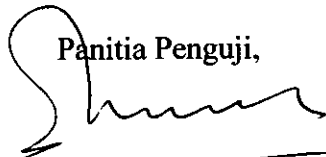
(Sulistyaningwati Guntoro, Drh.)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh – sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

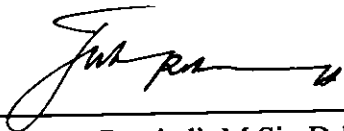
Menyetujui

Panitia Penguji,



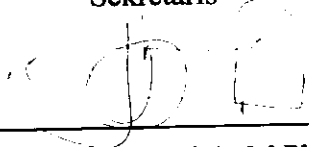
Dr. Garry Cores De Vries, M.S, M.Sc., Drh

Ketua



Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh

Sekretaris



Prof. Mas'ud Hariadi, PhD, M.Phill., Drh

Anggota



Hermin Ratnani, M.Kes., Drh

Anggota



Sulistyaningwati Guntoro., Drh

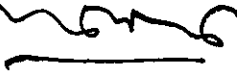
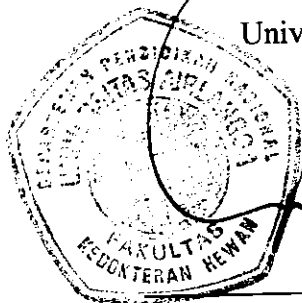
Anggota

Surabaya, Juli 2006

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh

NIP 130687297

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Identifikasi dan Isolasi equine Chorionic Gonadotropin (eCG) dari Serum

Kuda Bunting Dalam Rangka untuk Diagnosis Kebuntingan pada Kuda

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 12 Juli 2006

Rendi Prihatmanto

NIM. 060213087

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 12 Juli 2006

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Garry Cores de Vries, M.S, M.Sc., Drh.

Sekretaris : Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh.

Anggota : Hermin Ratnani, M.Kes., Drh.

Pembimbing I : Prof. Mas'ud Hariadi, PhD, M.Phil, Drh.

Pembimbing II : Sulistyaningwati Guntoro, Drh.

IDENTIFICATION AND ISOLATION *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) FROM PREGNANT MARE SERUM FOR MARE PREGNANT DIAGNOSTIC TOOL

RENDI PRIHATMANTO

ABSTRACT

This research was aimed to identify and to isolate equine Chorionic Gonadotropin (eCG) from serum of 7-19 weeks pregnancy in mares. The result of the research can be made for reference to detect pregnancy of mare's serologically. Blood samples (50 ml) was taken from jugular vein by using disposable spuit. Serum was separated from blood sample by putting the tubes at oblique position (45°) for 2 hours then sentrifuged 3000 rpm for 10 minutes. The serum then stored frozen for -20° C until assayed. equine Chorionic Gonadotropin was identified as protein with molecular weight (MW) 45 kDa up to 65 kDa by using SDS-PAGE method, then the bands resulted from SDS-PAGE was isolated according their molecular weight (MW) in order to obtain eCG by Electroelusion method. After that the protein contains in eCG was measured by using Biuret method. At last protein was transfered to nitrocellulose membran by using Western blot technique. The result of the research indicated that there was four protein fraction of eCG by SDS-PAGE method with molecular weight : 63,3 kDa, 52,8 kDa, 45,5 kDa and 42,8 kDa. By using Western blot technique had been founded one specific protein band with molecular weight 63,9 kDa.

Key words : equine Chorionic Gonadotropin, SDS-PAGE, Electroelusi, Biuret, Western blot

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Melalui skripsi berjudul **“Identifikasi Dan Isolasi *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) Dari Serum Kuda Bunting Dalam Rangka Untuk Diagnosis Kebuntingan Pada Kuda ”** penulis mencoba untuk mengidentifikasi dan mengisolasi *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) dari serum kuda bunting menggunakan metode SDS – PAGE (*Sodium Dodecyle Sulfate Polyacrilamide Gel Elektrophoresis*) kemudian dilanjutkan sampai dengan menemukan berat molekul spesifik protein eCG melalui teknik *Western blot*.

Berkaitan dengan itu pula, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada yang terhormat:

- Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S, drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang diberikan.
- Bapak Prof. Mas’ud Hariadi, PhD, M.Phil, drh sebagai dosen pembimbing pertama yang memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian dan juga pembimbing penulis dalam penulisan skripsi ini. Semoga bapak selalu diberi kesehatan oleh Allah SWT.

- Ibu Sulistyaningwati Guntoro, drh yang selalu meluangkan waktunya untuk penulis, walau beliau sangat sibuk sehingga penulisan skripsi ini dapat selesai.
- Bapak Abdul Samik, M.Si. drh. yang telah membimbing penulis dalam melakukan proses penelitian ini. Terima kasih banyak penulis ucapkan atas kesabaran dan kebaikan hati bapak dalam membimbing penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
- Tim Penguji yang telah memberikan penulis sebuah pelajaran berharga selama ujian Seminar dan Skripsi.
- Keluarga yang sangat penulis cintai, Ayahanda Prajitno, Ibunda Citarina Darawerti, kakak dan adik tersayang: mbak Nita dan dek Rengga, serta adikku tercinta Sri Suwan Dini yang selalu memberi semangat, cinta dan harapan kepada penulis.
- Teman- teman KH angkatan 2002 (GENVETO) yang tak bisa penulis sebutkan satu persatu di sini. Terima kasih atas dukungan kalian semua.
- Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu di sini yang telah memberikan bantuan demi penyempurnaan tulisan ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan makalah ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan yang dimiliki penulis. Oleh karena itu kritik, masukan dan saran yang membangun sangat penulis harapkan dari para pembaca dan sebelumnya penulis ucapkan terima kasih.

Surabaya, Juli 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I: PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Hasil Penelitian.....	3
1.5 Landasan Teori.....	3
1.6 Hipotesis.....	4
BAB 2: TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Siklus Reproduksi.....	5
2.2 Kebuntingan.....	6
2.3 equine Chorionic Gonadotropin.....	7
2.4 Karakterisasi Protein eCG.....	10
2.4.1 SDS-PAGE.....	10
2.4.2 Western blot.....	12
2.4.3 Elektroelusi.....	14
BAB 3: METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Materi Penelitian.....	15
3.2.1 Bahan penelitian.....	15
3.2.2 Alat- alat penelitian.....	16
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.3.1 Pengambilan serum darah kuda bunting.....	16
3.3.2 Purifikasi serum.....	17
3.3.3 Identifikasi eCG dengan metode SDS-PAGE...	17
3.3.4 Isolasi eCG dengan teknik elektroelusi.....	19

3.3.5 Pengukuran kadar protein eCG dengan metode biuret.....	20
3.3.6 Uji spesifitas isolat eCG dengan teknik western blot.....	21
3.4 Analisis Data Penelitian.....	23
3.5 Bagan Metode Penelitian.....	24
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	25
4.1 Hasil Identifikasi Protein eCG Dengan Metode SDS-PAGE.....	25
4.2 Hasil Elektro Elusi Protein eCG.....	28
4.3 Hasil Pengukuran Kadar Protein eCG Dengan Metode Biuret.....	29
4.4 Hasil Analisis Protein Spesifik eCG Dengan Teknik Western Blot.....	32
BAB 5 PEMBAHASAN.....	34
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
6.1 Kesimpulan.....	38
6.2 Saran.....	38
RINGKASAN.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Nilai Absorbansi Rata-Rata Untuk Pengukuran Kadar Protein eCG.....	29
4.2 Hasil Penghitungan Kadar Protein eCG Menggunakan Metode Biuret.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
4.1 Pita-Pita Hasil Identifikasi Protein eCG Menggunakan Metode SDS-PAGE.....	25
4.2 Lanjutan Pita-Pita Hasil Identifikasi Protein eCG Menggunakan Metode SDS-PAGE.....	26
4.3 Kurva Regresi Linier Untuk Penghitungan Kadar Protein eCG.....	30
4.4 Pita-Pita Hasil Uji Spesifitas Protein eCG Dengan Antibodi Poliklonal Anti-eCG Menggunakan Teknik Western Blot.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Regresi Linier Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf Pada SDS-PAGE Dengan Berat Molekul Protein....	45
2. Regresi Linier Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf Pada <i>Western Blot</i> Dengan Berat Molekul Protein....	48
3. Penghitungan Anova (Uji F) Kadar Protein Hasil Biuret Dilanjutkan Uji Duncan (5 %).....	51
4. Kerangka Penelitian DUE-LIKE eCG.....	53
5. Gambar Prosedur Penelitian.....	54

DAFTAR SINGKATAN

1. AP : Alkaline Phospatase
2. BM : Berat Molekul
3. ECG : equine Chorionic Gonadotropin
4. FSH : Folicle Stimulating Hormone
5. kDa : Kilo Dalton
6. LGB : Lower Gel Buffer
7. LH : Luteinizing Hormone
8. NC : Nitrocellulose
9. SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
10. PAGE : Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
11. PBS : Phospat Buffer Saline
12. Rf : Retardation factor
13. UGB : Upper Gel Buffer

**BAB 1
PENDAHULUAN**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perkembangan populasi kuda di Indonesia belum mencapai keadaan yang mengembirakan bahkan di Jawa Timur pada tahun 2001 terjadi penurunan populasi ternak kuda sebesar 5,67 % (Anonimous, 2001).

Kendala yang sering dihadapi peternak kuda adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai. Beberapa faktor kendala yang menghambat perkembangan populasi kuda adalah waktu birahi yang panjang, kuda lebih sering mengalami keguguran dibanding ternak lain. Demikian pula pada diagnosa kebuntingan dini dengan melihat gejala birahi sulit dilakukan karena 15 % kuda bunting masih menunjukkan gejala birahi (Mahaputra, 1994).

Reproduksi atau perkembangbiakan merupakan suatu proses yang menghasilkan keturunan guna mempertahankan kelangsungan hidup suatu individu, meskipun gangguan reproduksi tidak vital bagi mahluk hidup itu sendiri. Dalam bidang peternakan, reproduksi penting artinya sehubungan dengan upaya peningkatan populasi dan penyediaan protein hewani bagi manusia. Proses reproduksi ini baru dapat berlangsung setelah hewan mencapai masa pubertas dan diatur oleh beberapa kelenjar endokrin yang dihasilkannya.

Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang akurat. Diagnosa kebuntingan diperlukan setelah terjadinya perkawinan agar kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Diagnosa kebuntingan secara hormonal pada kuda dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu (a) mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG), *early pregnancy factor* (EPF) dan (b) mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine serta air susu selama kebuntingan seperti *progesterone*, *estrone sulphate* (Hafez, 2000).

Selama ini cara yang telah dilakukan untuk mendiagnosa kebuntingan kuda adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dengan menggunakan substansi non spesifik seperti *progesterone* dan *estrone sulphate* dengan menggunakan teknik RIA (Nalbandov, 1990) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan. Hal ini disebabkan oleh adanya beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA (Anonymous, 1984).

Dengan melihat substansi spesifik eCG pada induk kuda bunting diharapkan bisa menjadi bahan acuan dalam mendiagnostik terjadinya kebuntingan pada kuda, sehingga diharapkan tidak ada lagi kesulitan dan hambatan dalam mendiagnosa kebuntingan pada kuda.

1.2. Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas maka masalah penelitian yang dapat dirumuskan adalah, apakah eCG dapat dideteksi keberadaannya di dalam serum darah kuda bunting ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi eCG dari serum kuda bunting.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan eCG serum darah kuda sebagai bahan tes diagnostik kebuntingan pada kuda.

1.5. Landasan Teori

Hormon eCG pertama kali ditemukan oleh Cole dan Hart pada tahun 1930 dalam serum darah kuda bunting (Hardjopranjoto, 1987 ; Mc.Donald, 1989). Hormon ini berasal dari endometrial cups uterus kuda bunting terdapat dalam aliran darah pada umur kebuntingan 40-120 hari dan menghilang dari aliran darah pada umur kebuntingan 180 hari (Toelihere, 1985 ; Hafez, 1993)

equine Chorionic Gonadotropin dapat ditemukan di dalam darah kuda bunting pada umur kebuntingan 40-150 hari. *equine Chorionic Gonadotropin* dihasilkan oleh endometrial cups dan diperlukan untuk pembentukan korpus

luteum sekunder selama kuda bunting dan dipertahankan sampai umur kebuntingan 150 hari. Setelah umur kebuntingan tersebut, eCG mulai menghilang seiring dengan berfungsinya plasenta dalam memproduksi progesteron yang berfungsi untuk memelihara kebuntingan (Hafez, 2000).

Menurut Knobill *et al.* (1988) eCG mulai muncul berada dalam peredaran darah induk pada umur kebuntingan 40 hari. Konsentrasi eCG meningkat terus sampai umur kebuntingan 55-65 hari dan kemudian menurun perlahan sampai menghilang pada umur kebuntingan 150 hari.

1.6. Hipotesis

equine Chorionic Gonadotropin dapat dideteksi keberadaannya di dalam serum darah kuda bunting.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Siklus Reproduksi

Siklus reproduksi adalah suatu rangkaian kejadian biologis hewan betina yang telah mencapai dewasa kelamin dimulai sejak hewan tersebut melahirkan sampai dengan melahirkan kembali berikutnya. Siklus birahi adalah perubahan-perubahan atau ritme fisiologis sistem reproduksi hewan betina secara teratur yang dikendalikan oleh kerja hormon hipofisa dan ovarium. Periode birahi merupakan perubahan terpenting di dalam siklus birahi, yaitu pada saat hewan betina bersedia dikawini oleh hewan jantan dan segera sesudah itu terjadi pelepasan telur dari indung telur. Sepanjang siklus birahi beberapa bagian dari saluran reproduksi betina mengalami perubahan-perubahan yang dikendalikan oleh hormon hipofisa dan hormon-hormon yang berasal dari ovarium. Hormon selain sebagai penyebab diawalinya periode perkawinan, juga mempersiapkan alat reproduksi untuk menerima spermatozoa, menghasilkan ova dan membantu terjadinya kebuntingan, implantasi dan pemberian makanan pada embrio serta fetus (Patodihardjo, 1992). Lamanya siklus birahi yang normal pada kuda rata-rata 21-22 hari (Frandsen, 1992). Pada minggu kelima setelah melahirkan kuda sehat dapat mulai dikawinkan kembali dan derajat fertilitas dalam perkawinan ini cukup tinggi (Partodihardjo, 1992).

2.2. Kebuntingan

Kehidupan baru dimulai pada waktu pembuahan, yaitu pada waktu bersatunya dua sel kelamin, yaitu sel telur dan sel spermatozoa. Pembuahan terjadi di dalam ampulla atau sepertiga proksimal dari tuba falopii. Pada umumnya peternak menganggap bahwa berhentinya tanda-tanda birahi sesudah perkawinan alam atau inseminasi buatan merupakan suatu tanda akan terjadinya kebuntingan, akan tetapi tidak berarti seratus persen akan terjadi kebuntingan.

Lama kebuntingan kuda berkisar 301-371 hari dengan rata-rata 366 hari. Lama kebuntingan ditentukan secara genetik walaupun dapat dipengaruhi faktor-faktor maternal, fetal dan lingkungan (Toelihere, 1985). Menurut Frandson (1992), periode kebuntingan pada kuda berlangsung selama 323-344 hari.

Umur induk mempengaruhi lama kebuntingan pada berbagai jenis hewan, fetus yang banyak pada hewan monotocus juga mempunyai lama kebuntingan yang lebih pendek. Kelamin fetus juga menentukan lama kebuntingan. Anak jantan dari kuda dikandung satu sampai dua hari lebih lama dari anak betina. Lingkungan fisik terutama yang berkaitan dengan suhu dan makanan sangat mempengaruhi lama kebuntingan kuda. Suhu yang dingin menyebabkan penundaan implantasi dan makanan yang kurang memperpanjang lama kebuntingan (Toelihere, 1985).

Selama masa kebuntingan plasenta bertambah besar melalui proses proliferasi aktif dari sel-sel trophoblast. Selama pertengahan kebuntingan plasenta

mencapai ukuran yang hampir maksimum, yang bertepatan dengan pertumbuhan cepat fetus dan sesudah itu akan menetap relatif konstan.

Kuda mempunyai tipe *placenta epitheliochorial* atau *placenta difusa*. Mangkok-mangkok endometrium (*endometrial cup*) pada uterus kuda terbentuk pada hari ke 40 masa kebuntingan. Mangkok-mangkok ini mengandung suatu koagulum yang kaya akan sel-sel epitel yang berdegenerasi, sel-sel darah merah, leukosit dan hormon gonadotropin. Hormon gonadotropin juga ditemukan di dalam serum darah pada waktu tersebut (Toelihere, 1985).

Hormon-hormon yang esensial untuk mempertahankan kebuntingan adalah progesteron dan estrogen dari ovarium, gonadotropin dan prolaktin yang disekresikan oleh adenohipofisa (Partodihardjo, 1992). Hormon-hormon tersebut dalam proporsi yang tepat diperlukan untuk mempertahankan kebuntingan yang normal. Setelah terbentuknya plasenta dan kelenjar-kelenjar endokrin fetal, maka akan terjadi suatu interaksi hormonal antara induk dan fetus.

2.3. *equine Chorionic Gonadotropin (eCG)*

Definisi hormon adalah zat organik yang dihasilkan oleh sekelompok sel atau organ tertentu dalam tubuh dan di bawa ke dalam aliran darah, dalam jumlah yang sangat sedikit dapat merangsang sel atau organ tertentu untuk berfungsi. Demikian pula halnya dengan hormon yang bekerja pada alat reproduksi dari suatu individu dikenal dengan hormon reproduksi (Hardjopranjoto, 1997)

Pada hewan betina, hormon reproduksi mengatur aktifitas dan siklus reproduksi. Normal tidaknya siklus reproduksi seekor hewan betina sangat dipengaruhi oleh keberadaan hormon reproduksi tersebut (Hardjopranjoto, 1997)

equine Chorionic Gonadotropin merupakan suatu hormon gonadotropin yang berfungsi merangsang aktifitas gonad, yang sangat mempengaruhi organ reproduksi jantan maupun betina. *equine Chorionic Gonadotropin* mempunyai pengaruh fisiologi yang sama dengan FSH (Folicle Stimulating Hormon) dan sedikit LH (Luteinizing Hormon).

Hormon eCG pertama kali ditemukan oleh Cole dan Hart pada tahun 1930 dalam serum darah kuda bunting (Hardjopranjoto, 1987 ; Mc.Donald, 1989). Hormon ini berasal dari endometrial cups uterus kuda bunting terdapat dalam aliran darah pada umur kebuntingan 40-120 hari dan menghilang dari aliran darah pada umur kebuntingan 180 hari (Toelihere, 1985 ; Hafez, 1993)

equine Chorionic Gonadotropin dihasilkan oleh endometrial cups dan diperlukan untuk pembentukan korpus luteum sekunder selama kuda bunting dan dipertahankan sampai umur kebuntingan 150 hari. Setelah umur kebuntingan tersebut eCG mulai menghilang seiring dengan berfungsinya plasenta dalam memproduksi progesteron yang berfungsi untuk memelihara kebuntingan (Hafez, 2000).

Menurut Knobill *et al.*, (1988) eCG mulai muncul berada dalam peredaran darah induk pada umur kebuntingan 40 hari. Konsentrasi eCG meningkat terus sampai umur kebuntingan 55-65 hari, kemudian menurun perlahan sampai menghilang pada umur kebuntingan 150 hari. *equine Chorionic Gonadotropin*

tetap berada di dalam darah dan limfa, tidak bisa didapatkan pada urin karena mempunyai berat molekul yang besar sehingga tidak bisa melalui sistem filter ginjal (Supriatna, 1998). Pada saat kadar eCG di dalam darah mencapai puncaknya, bersama itu pula terjadi perkembangan endometrial cups secara maksimum (Austin and Short, 1984).

Hormon eCG secara biologik mempunyai fungsi dan daya kerja yang serupa dengan FSH dan LH dari kelenjar hipofisa anterior, tetapi pengaruh yang paling utama adalah menyerupai hormon FSH (Turner dan Bagnara, 1984)

Korpus luteum yang berkembang sesudah proses ovulasi (korpus luteum primer) dipertahankan sampai umur kebuntingan 40-90 hari. Korpus luteum sekunder terbentuk pada umur kebuntingan 40-60 hari oleh pengaruh eCG. Korpus luteum sekunder ini dipertahankan sampai umur kebuntingan 4-5 bulan dimana fungsi untuk memproduksi progesteron telah diganti oleh plasenta (Cole and Cupps, 1977).

equine Chorionic Gonadotropin mempunyai berat molekul 45.000-65.000 Dalton dan molekulnya terdiri dari rantai *alpha* dan *beta*. Subunit *alpha* mengandung 96 asam amino dan subunit *beta* mengandung 145 asam amino dengan kandungan karbohidrat sebesar 43 % (Knobill *et al.*, 1988).

Peningkatan dan penurunan kadar hormon eCG ini tidak sama pada masing-masing kuda. Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi eCG adalah ukuran tubuh, paritas, jumlah fetus dan genetik. Kandungan eCG lebih banyak ditemukan pada kuda jenis Poni, bunting kembar dan sudah sering beranak (Cole and Cupps, 1977).

2.4. Karakterisasi Protein *equine Chorionic Gonadotropin*

2.4.1. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyle Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*)

Karakterisasi protein dapat dilakukan dengan teknik elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode pemisahan partikel- partikel yang mempunyai prinsip kerja menggunakan perbedaan kecepatan gerak partikel- partikel bermuatan listrik bila partikel tersebut terdapat dalam suatu medan listrik (Wongsosupantio, 1990)

Protein adalah molekul yang bersifat *amphoteric* karena mengandung dua grup dengan muatan listrik yang berlainan, yaitu grup karboksil negatif dan grup amino positif. Istilah elektroforesis menggambarkan migrasi muatan partikel dibawah pengaruh medan listrik. Elektro berarti energi listrik, phoresis berasal dari bahasa Yunani yaitu *phoros* yang berarti melintasi (Anonymous, 2005). Elektroforesis adalah gerakan partikel (koloid) yang bermuatan melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik. Elektroforesis ini dapat digunakan untuk menentukan titik isoelektrik dan berat molekul dari protein. Metode populer untuk menentukan massa molekul relatif protein disebut SDS-PAGE.

Beberapa macam elektroforesis yang digunakan untuk karakterisasi protein yaitu SDS- PAGE *Western blot*, *Dot blot* dan *electroelusi* atau preparasi protein. SDS-PAGE dianggap prosedur yang lebih baik dibanding metode analisis yang terdahulu, karena dapat digunakan untuk memisahkan jenis-jenis protein menurut ukuran serta dapat memperoleh informasi mengenai berat molekul dan komposisi subunit pada suatu kompleks protein (Alberts dkk., 1994)

Polyacrylamide Gel Electrophoresis merupakan standard metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. *Polyacrylamide* merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang berat molekulnya antara 500 - 250.000 Dalton. Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam detergen ionic yaitu *sodium dodecyle sulfate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrophobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS kompleks migrasi melalui poliacrilamid tergantung dari berat molekulnya.

Prinsip dasar metode ini adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis menggunakan *polyacrylamid gel*. *Polyacrylamid* berfungsi untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul antara 500 – 250.000 Dalton. Pori-pori pada PAGE dibentuk oleh rantai *cross – linking linear polyacrylamide* dengan *bis acrylamide*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total persentase *acrylamide* atau peningkatan derajat persentasi konsentrasi campuran dengan *bis acrylamide*, sehingga berpengaruh pada pergerakan protein. Apabila total persentase *acrylamide* dengan *bis acrylamide* rendah, maka akan mengakibatkan pergerakan protein melalui gel sangat cepat, sehingga diperoleh protein dengan spesifitas rendah. Selama elektroforesis migrasi protein SDS-komplek melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya. Protein yang terpisah akan terlihat seperti pita (Rantam, 2003)

SDS- PAGE mempunyai dua sistem yaitu *continue (webber and osbon)* dan *discontinue (Laemmli)*. Pada sistem *continue* SDS- PAGE menampilkan profil protein dalam bentuk umum atau campuran protein, sedang pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis yang tipis berupa pita atau *band* yang tipis. Pada penelitian ini menggunakan sistem *discontinue (Laemmli)*.

Keuntungan menggunakan PAGE adalah bersifat transparan sehingga dapat di *scan* baik memakai sinar tampak atau ultraviolet. Selain itu ukuran pori PAGE dapat diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik (Sutiman dkk.,1998). Manfaat dari penggunaan SDS-PAGE adalah melapisi polipeptida dengan muatan negatif sehingga semua elektroforesis bergerak menuju anoda dan menutupi muatan alami dari subunit sehingga semua terelektroforesis menurut berat molekulnya dan bukan berdasarkan muatan asalnya (Roberts, 2003). Meskipun dengan PAGE protein dapat dideteksi tetapi bukan protein yang spesifik, sehingga untuk mendeteksi protein yang spesifik diperlukan teknik *western blot*.

2.4.2. Western blot

Teknik *western blot* digunakan untuk mendeteksi protein antigenik yang spesifik. Singkatnya pada *western blot* yang tahap pertama dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE dan selanjutnya ditransfer ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *fast red* atau *coomassie Brilliant blue*

(Rantam, 2003), sehingga dapat diketahui informasi berat molekulnya dan jumlah protein yang spesifik (Harlaw and Lane, 1988). Keuntungan menggunakan *western blot* ini adalah membran nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksi dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan, selain itu juga metode ini mudah dilakukan pengecatan protein sehingga dapat digunakan acuan untuk melakukan preparasi protein (ELUSI). Membran *nitrocellulose* mempunyai keunggulan dari membran yang lain yaitu mudah digunakan dan mempunyai kapasitas ikatan yang tinggi. Membran *nitrocellulose* yang baru tahan terhadap aliran yang tinggi dan tidak mudah rapuh (Rantam, 2003)

Antibodi yang digunakan dalam teknik ini harus mempunyai spesifikasi tinggi dan memiliki daya ikat yang stabil, misalnya berupa antibodi poliklonal. Dalam penelitian ini menggunakan jenis antibodi poliklonal anti eCG dari hewan coba kelinci.

Metode ini dilakukan setelah semua protein yang terpisah-pisah dalam gel poliakrilamida dipindah pada sehelai kertas nitroselulosa (dengan cara blotting). Sebuah protein tertentu dapat diidentifikasi pada gel semacam itu dengan mencampur semua protein dengan suatu antibodi yang telah digandengkan dengan sebuah isotop radioaktif, dengan suatu enzim atau zat warna berpendar. Protein-protein yang besar dengan mudah dapat terdeteksi melalui pewarnaan gel dengan zat warna biru *coomassie*, sedangkan protein-protein kecil dideteksi melalui perlakuan dengan zat warna perak (Alberts dkk., 1994)

2.4.3. Elektroelusi

Selain SDS-PAGE dan *western blot* salah satu elektroforesis adalah preparasi protein menggunakan teknik elusi. Preparasi protein ini menghasilkan protein yang murni (*purified protein*). Dalam proses teknik elusi ini, gel hasil pemisahan SDS- PAGE dipotong dengan pita atau *band* yang spesifik kemudian potongan tersebut dielusi dengan cara digerus menggunakan pelarut yang cocok yang bertujuan agar protein terlepas dari gel. Pada metode ini digunakan *gel polyacrylamide* untuk menghindari pita yang cembung (Wongsosupantio, 1990).

BAB 3
METODE PENELITIAN

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan. Dimulai pada bulan Juli sampai dengan November 2005.

Tempat pelaksanaan penelitian di Fakultas MIPA Biologi, Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya Malang.

3.2. Materi Penelitian

3. 2.1. Bahan penelitian

Bahan utama yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah serum darah yang diperoleh dari tiga ekor kuda bunting dengan umur kebuntingan 7, 11, 15 dan 19 minggu, jadi total sebanyak 12 sampel dengan kandungan isi tiap sample adalah 10 ml darah. Bahan-bahan yang di gunakan untuk analisis protein dengan teknik SDS-PAGE adalah *Separating Gel* 12% yang terdiri dari LGB (*Lower Gel Buffer*) 2600 μ l, *T Acryl* 4000 μ l, *Aquadest* 3400 μ l, APS 140 μ l, *Temed* 14 μ l. *Stacking Gel* 3% yang terdiri dari UGB (*Upper Gel Buffer*) 830 μ l, *T.Acryl* 534 μ l, *Aquadest* 1950 μ l, APS 40 μ l, *Temed* 4 μ l.

Bahan-bahan untuk *Electroelusi* adalah *Buffer Phosphat* 0,05 M 2 ml dan 0,01 M 300 ml, Bahan untuk pengukuran kadar protein *Biuret* adalah Larutan standar protein (BSA) 9600 μ l, *Tris HCl* 1800 μ l. Bahan untuk *western blot* adalah Transfer buffer 1000 ml (*Tris base* 3,03 gr ; *glisin* 14,4 gr ; *methanol* 200 ml ;

aquadest sampai 1000 ml), *aquadest* secukupnya, *ponceau* 1 ml, PBS (*Phospat Buffer Saline*) skim 1,5 gr (5%) dalam 30 ml *aquadest*, *PBS- Tween* secukupnya, 30 µl Ab- primer ditambah 2970 µl *PBS-Skim* 1%, Ab sekunder-AP (*Alkaline Phospatase*) conjugated (*anti rabbit*) 1/2500 dalam *PBS- Tween*, substrat western blue 2 ml. Bahan lainnya adalah *Etanol* 10 ml, *Tris HCl* 10 ml, *Aquadest ad libitum*, *Pewarna staining* 100 ml, *RSB* 1 ml, air mendidih 500 ml.

3.2.2. Alat-alat penelitian

Alat- alat yang digunakan adalah SDS- PAGE 2 plate, *comb*, *biorad electroforesis* , *power supply* SDS- PAGE, wadah untuk menampung pita-pita hasil dari SDS-PAGE, *shaker*, *vortex*, *microtube*, sentrifus, pipet mikrotiter, *yellow tip*, *blue tip*, *freezer* -20 °C, gelas plate, label, tabung reaksi, vial, *sput disposable* 50 ml, *electro elusi*, *chamber elusi*, *power supply electroelusi*, *selofan*, kuvet spektrofotometer, spektrofotometer biuret, *membran Nitrocellulose*, spon, kertas saring, *chamber western blot*.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pengambilan serum darah kuda bunting

Darah diambil dari vena jugularis dengan menggunakan *sput disposable* 50 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan 45° dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat lalu disaring menggunakan *miliphore* 0,22µl. Serum yang didapat ditampung pada vial

dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C . Disini serum diambil dari tiga kuda dengan umur kebuntingan mulai 7, 11, 15 dan 19 minggu, jadi total seluruh sampel ada 12.

3.3.2 Purifikasi serum

12 sampel serum (1.1 s/d 4.1) diambil dengan menggunakan pipet mikrotiter, masing-masing sampel diambil sebanyak $50\ \mu\text{l}$ lalu ditambahkan $50\ \mu\text{l}$ etanol dingin (1:1), setelah itu semuanya dimasukkan ke dalam microtube yang telah dilabel menurut sampel. Selanjutnya semua microtube yang berisi sampel dan etanol dingin tersebut di *vortex* dan disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Setelah itu semua microtube dimasukkan ke dalam *freezer* -20°C . selama 5 – 10 menit, kemudian semua microtube diambil dari dalam *freezer* dan etanol dibuang dengan cara membalikkan tabung dan diangin-anginkan sampai tidak tercium lagi bau etanol. Endapan yang ada dalam semua microtube ditambahkan masing-masing Tris HCl $50\ \mu\text{l}$.

3.3.3. Identifikasi eCG dengan metode SDS-PAGE

Pada tahap SDS-PAGE ini, menggunakan dua plate. Bahan-bahan *Separating Gel* 12 % dan *Stacking Gel* 3 % dipersiapkan. Setelah alat SDS-PAGE telah siap, *separating gel* di masukkan ke dalam kedua plate masing-masing sampai kurang dari batas atas. Kemudian ditambahkan *aquadest ad libitum* sampai kedua plate penuh, sisa-sisa *aquadest* yang tumpah dibersihkan dengan menggunakan *tissue*. Setelah *separating gel* membentuk gel, *aquadest*

dibuang dengan cara memiringkan dan membalik alat SDS- PAGE sampai *aquadest* benar- benar hilang. Langkah selanjutnya adalah memasukkan *stacking gel* ke dalam kedua plate sampai penuh, selanjutnya *comb* dipasang dan ditunggu hingga membentuk gel.

Sambil menunggu terbentuknya gel dari *stacking gel*, sampel dimasukkan ke dalam microtube. Masing-masing microtube berisi 20 μ l sampel serum kuda bunting yang telah diberi label, kemudian ke dalam masing-masing microtube tadi ditambahkan RSB 20 μ l (1:1), kemudian divortex sebentar supaya homogen. Setelah itu masukkan semua microtube kedalam *freezer* selama 10 menit.

Setelah *stacking gel* sudah membentuk gel, microtube diambil dari dalam *freezer* dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 3 menit. *Comb* diambil dan alat SDS-PAGE dimasukkan ke dalam chamber SDS-PAGE yang mengandung buffer elektroforesis, kemudian sampel dimasukkan melalui sumuran secara berurutan mulai sampel 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, s/d 3.4 menggunakan Hamilton Syringe. Setelah semua sampel sudah masuk, *power supply* dihidupkan dengan tegangan 130 V ; 30mA. Setelah pita yang terbentuk turun sampai bawah, alat atau *power supply* dimatikan. Kemudian kedua plate dibuka dan gel dalam plate diambil dan direndam dalam wadah yang berisi pewarna *coomassie brilliant blue* sambil digoyang-goyang pada *shaker* sampai pita- pita terbentuk.

Berat molekul protein antigen ditentukan melalui persamaan regresi linier berdasarkan nilai Rf (*Retardation factor*) dari setiap pita yang terbentuk pada gel.

Berat molekul protein antigen sebagai fungsi Y sedangkan nilai Rf adalah fungsi X pada persamaan $Y = a + bX$. Nilai Rf didapatkan melalui pembagian

antara jarak pergerakan protein dari tempat awal dan jarak pergerakan warna dari tempat awal (Rantam, 2003; Sudjana, 2001 dikutip oleh Ulum, 2004).

3.3.4. Isolasi eCG dengan teknik elektroelusi

Pada proses elusi ini dimulai seperti proses SDS-PAGE, tetapi setelah hasil *running*, pita-pita yang telah terbentuk tidak diwarnai dengan pewarna staining, tapi langsung dipotong berdasarkan berat molekul protein dari eCG yaitu 45- 65 kDa. Potongan-potongan gel tersebut dimasukkan ke dalam membran *selofan* yang berisi 0,05 M *buffer phospat*.

Karena jumlah sample ada 12, maka dibutuhkan dua membran *selofan*. Membran *selofan* yang pertama diisi dengan potongan dari 10 pita yang terbentuk ditambah *buffer phospat* 0,05 M sebanyak 1 ml, sedangkan membran *selofan* kedua diisi dengan potongan dari dua pita yang terbentuk ditambahkan *buffer phospat* 0,05 M sebanyak 1,5 ml. Membran *selofan* yang telah berisi *buffer phospat* dan potongan pita-pita hasil SDS-PAGE diikat dan dimasukkan kedalam *chamber elektroelusi* yang berisi *buffer phospat* 0,01 M sebanyak 300 ml, kemudian *chamber elektroelusi* dimasukkan ke dalam *refrigator*. Nyalakan *power supply* dengan tegangan 250 V ; 20 mA selama 24 jam. Setelah 24 jam, masing-masing membran *selofan* diambil airnya dan ditampung dalam *microtube*.

3.3.5. Pengukuran kadar protein eCG dengan metode biuret

Satuan kadar protein Biuret dalam penelitian ini menggunakan satuan ppm atau mg/l. Langkah pertama, dengan membuat larutan standard protein (BSA) mulai dari konsentrasi 10000 ppm, 9000 ppm, 8000 ppm, 7000 ppm, 6000 ppm, 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 25 ppm, dan dibuat masing-masing 10 ml.

Setelah semua larutan standar telah disiapkan, masing-masing diambil 200 μ l BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan ditambahkan 800 μ l Biuret ke dalam kuvet Spektrofotometer mulai dari konsentrasi rendah (0 ppm) sampai konsentrasi tinggi (10000 ppm), kemudian dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan absorbansi rata-rata yang nantinya digunakan untuk penentuan kurva baku yang selanjutnya untuk penentuan rumus kurva regresi linear.

Selanjutnya masukan larutan standar, misalnya 2000 ppm ke dalam alat spektrofotometer dengan tujuan yaitu untuk menentukan panjang gelombang maksimal yang dipakai. Dalam penelitian ini menggunakan panjang gelombang (λ) 542 nm.

Sebelum semua sampel dimasukkan ke dalam spektrofotometer, masukkan terlebih dulu larutan Blanko, yaitu 200 μ l Tris Cl ditambah 800 μ l Biuret kedalam alat spektrofotometer. Hal ini bertujuan untuk menstabilkan spektrofotometer dari pengaruh bahan-bahan lain yang mungkin bisa mempengaruhi kerja dari alat spektrofotometer.

Berikutnya memasukkan 12 sampel serum kuda dengan komposisi tiap sampel yang telah ditentukan yaitu 50 μ l sampel serum kuda + 150 μ l Tris-Cl + 800 μ l biuret. Catat semua absorbansi tiap sampel dan masukkan ke dalam rumus yang telah dicari dari kurva regresi linear.

3.3.6. Uji spesifitas isolat eCG dengan *western blot*

Teknik *Western Blot* pada penelitian ini digunakan untuk penentuan berat molekul (BM) spesifik dari protein yang dimaksud. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan konfirmasi dari hasil *Western Blot*, SDS-PAGE dan *elektroelusi*, jika BM yang muncul dari ketiga metode itu sama, maka dapat dikatakan bahwa protein tersebut adalah benar-benar protein eCG yang dimaksud.

Berikut prosedur pengerjaan metode *Western blot* :

1. Melakukan proses pengerjaan SDS-PAGE, selanjutnya gel yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan berat molekulnya dilepas dari *glass plate* kemudian dicuci dengan *aquadest* dan direndam *transfer buffer*.
2. Membran NC (*Nitrocellulose*) direndam *aquadest* selama 1 menit kemudian direndam *transfer buffer*.
3. Spon dan kertas saring direndam *transfer buffer*.
4. Kemudian disusun dari *black side* (atas) sampai dengan *red side* (bawah) berurutan yaitu spon, kertas saring 6 lembar, gel, membran NC, kertas saring 9 lembar dan terakhir spon.

5. *Fastblot* ditutup, kemudian transfer pada 90 V pada suhu 4° C selama 24 jam (*over night*)
6. Setelah proses transfer *overnight* selesai, angkat *chamber* dari ruang pendingin kemudian gel di staining dan di *shaker*.
7. Membran *Nitrocellulose* direndam dalam *ponceau* selama 1 jam.
8. Setelah 1 jam, *ponceau* dibuang dan membran *nitrocellulose* dicuci dengan *aquadest* sampai warna merah dari *ponceau* hilang, maka akan terlihat adanya pita-pita dari gel pada membran NC
9. Membran *nitrocellulose* diblock dengan PBS-skim 5% selama 1 jam sambil di *shaker*, hal ini berguna untuk menutup pita-pita yang tidak spesifik.
10. Membran *nitrocellulose* dicuci dengan PBS-Tween tiga kali masing-masing selama tiga menit.
11. Selanjutnya membran *nitrocellulose* diblocking antibodi primer sebanyak 30 µl ditambah 2970 µl PBS-skim 1% dan diamkan selama semalam.
12. Setelah itu cuci membran *nitrocellulose* dengan PBS-Tween tiga kali masing-masing selama tiga menit sambil digoyang-goyang secara manual.
13. Diinkubasi antibodi sekunder AP Conjugated (*anti rabbit*) dengan pengenceran 1: 2500 dalam PBS-Tween selama 1 jam dengan suhu ruang.

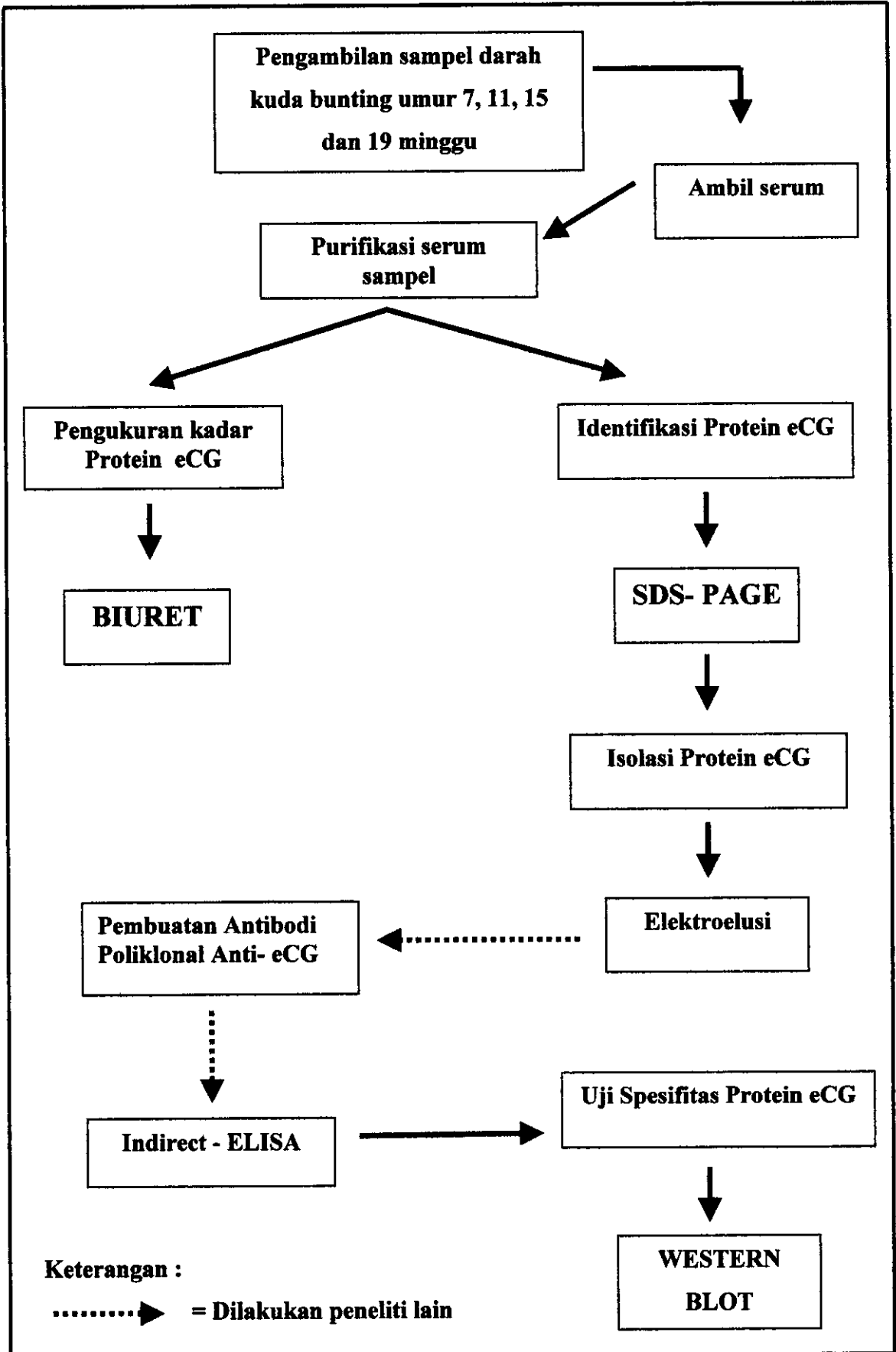
14. Cuci empat kali menggunakan PBS-Tween masing-masing selama lima menit.
15. Diinkubasi dengan *Western blue substrat solution* dalam ruang gelap sampai terlihat warna band (inkubasi selama semalam)
16. Cuci membran *nitrocellulose* dengan *aquadest* dan keringkan di udara.
17. Membran *nitrocellulose* memperlihatkan gambaran adanya ikatan antara protein antigenik dan antibodi berupa pita (*band*).

3.4. Analisis Data

Analisis data untuk SDS-PAGE dan *Western blot* menggunakan analisis regresi linier, sedangkan analisis data untuk penghitungan kadar protein dengan Biuret menggunakan Anova (Uji F) dan apabila hasilnya significant dilanjutkan dengan uji Duncan (5 %).

Uji statistik semua menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) rel 13 for Windows.

3.5. Bagan Metode Penelitian:



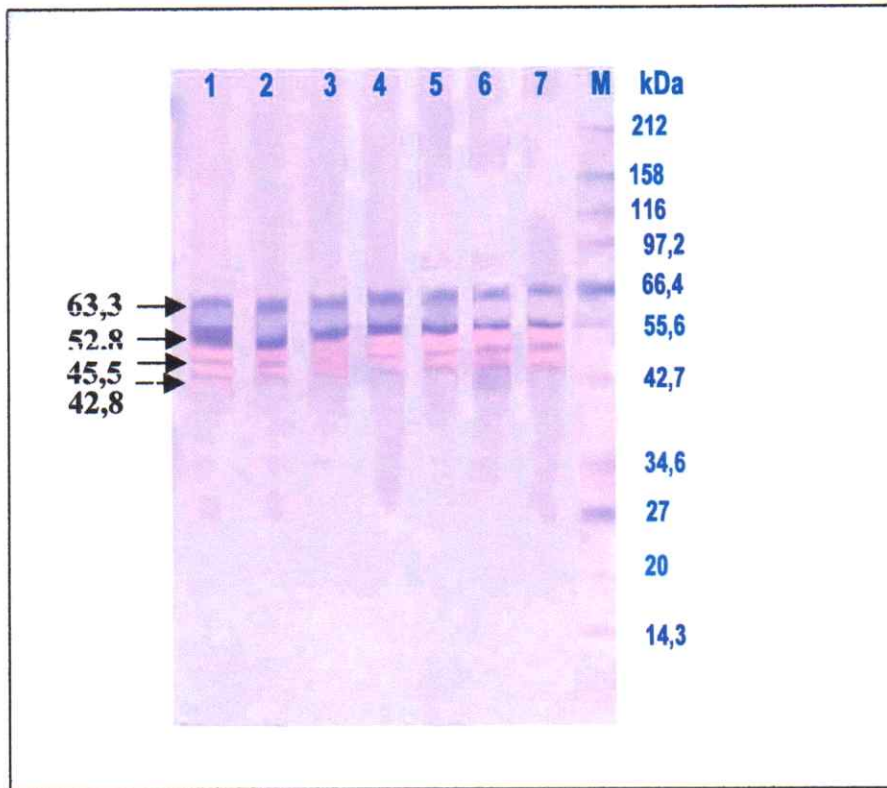
BAB 4
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Hasil Identifikasi Protein eCG dengan Metode SDS- PAGE

Identifikasi *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) menggunakan metode SDS-PAGE, diperoleh hasil berturut-turut dari atas kebawah berupa empat buah pita protein eCG. Gambaran selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2



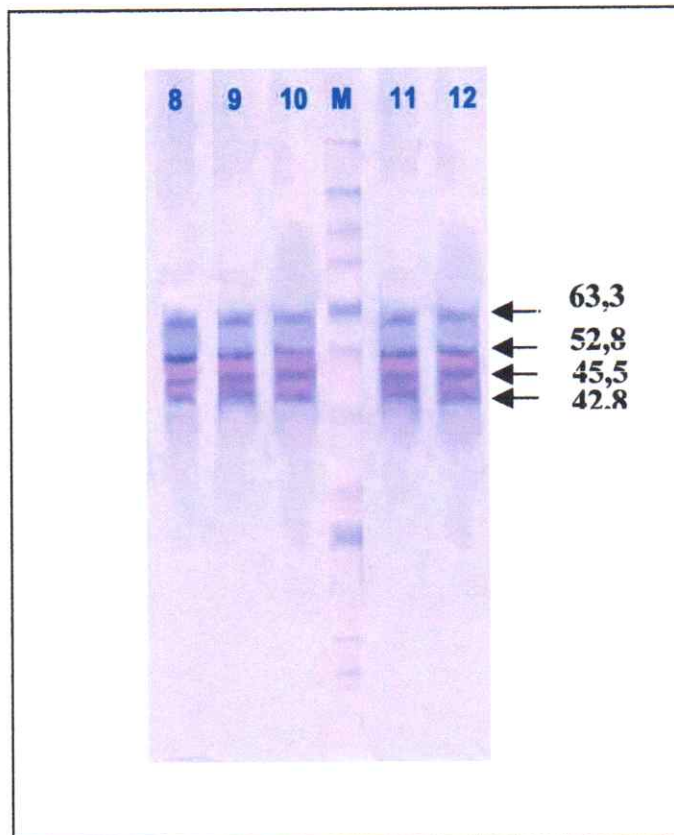
Gambar 4.1. Pita-pita protein eCG hasil SDS- PAGE

Keterangan : M : Marker

1, 2, 3 : Kuda bunting 7 minggu

4, 5, 6 : Kuda bunting 11 minggu

7 : Kuda bunting 15 minggu

***Lanjutan pita-pita hasil SDS-PAGE:**

Gambar 4.2. Lanjutan pita-pita protein eCG hasil SDS- PAGE
 M = marker; kolom 8, 9 = Kuda bunting 15 minggu
 Kolom 10,11,12 = Kuda bunting 19 minggu

Pada penelitian ini (menggunakan metode SDS-PAGE), pita- pita protein pada marker mempunyai persamaan $Y = 5,323 - 1,409x$. Penghitungan dilakukan melalui program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) rel 13 for Windows (Santoso, 2000), yang menunjukkan korelasi negatif dengan

nilai $r = -0,990$, a (*intercep*) = 5,323 dan b (*slope*) = -1,409. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hasil analisis protein eCG melalui metode SDS-PAGE didapatkan empat macam pita pita protein dengan BM 63,3 kDa , 52,8 kDa , 45,5 kDa dan 42,8 kDa.

Diantara empat fraksi protein tersebut pita protein dengan BM 63,3 kDa dan 52,8 kDa terlihat lebih tebal warna pita protein yang terbentuk, sedangkan protein lainnya terlihat lebih tipis dengan intensitas warna yang lebih rendah.

Adapun hasil analisis protein eCG difokuskan pada protein dengan berat molekul 63,3 kDa , 52,8 kDa , 45,5 kDa dan 42,8 kDa. Protein 63,3 kDa terletak antara marker dengan BM 66,4 kDa dan 55,6 kDa. Protein 52,8 kDa, 45,5 kDa dan 42,8 kDa terletak antara marker dengan BM 55,6 kDa dan 42,7 kDa.

4.2. Hasil *Electroelusi* Protein eCG

Setelah semua prosedur pengerjaan elektroelusi selesai, didapatkan 2000 μ l sampel eCG. Hasil tersebut dimasukkan ke dalam empat microtube, jadi masing-masing microtube berisi 500 μ l eCG.

Selanjutnya dari keempat microtube yang berisi sampel eCG ditambahkan etanol absolut dengan perbandingan 1:1, kemudian divortex sebentar sampai kelihatan homogen. Keempat microtube dimasukkan ke dalam *freezer* -20° C selama 24 jam atau *overnight*. Setelah 24 jam, sentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Keempat microtube dimasukkan kembali ke dalam *freezer* selama 5 – 10 menit, kemudian buang etanol dari dalam keempat microtube dengan cara membalik microtube dan diangin-anginkan. Setelah itu, endapan yang tersisa ditambahkan Tris Cl 20 μ l tiap microtube. Hasil dari Elusi ini selanjutnya digunakan oleh peneliti lain untuk disuntikkan ke kelinci guna mendapatkan antibodi poliklonal anti eCG.

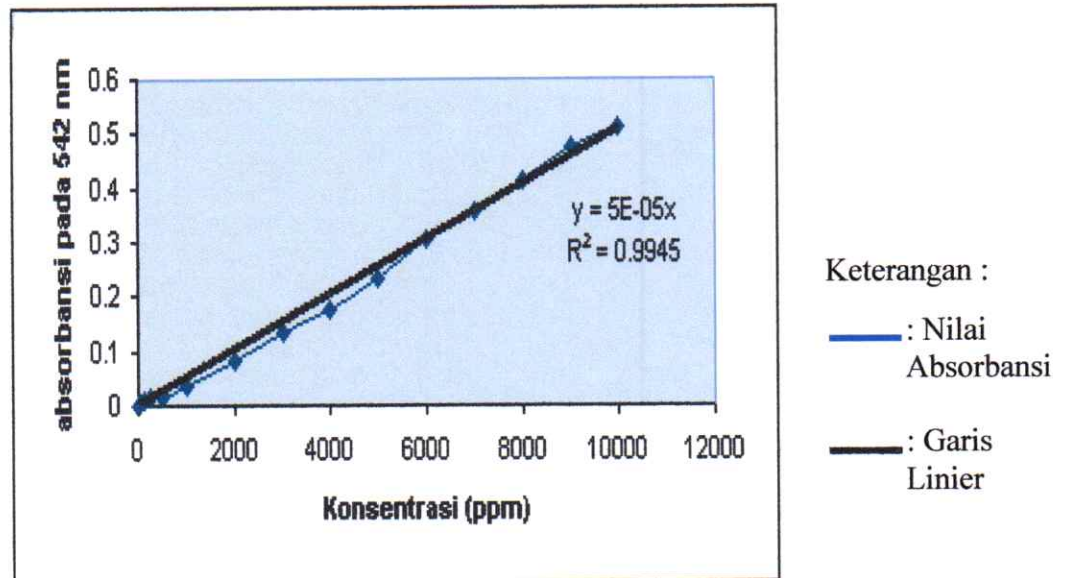
4.3. Hasil Pengukuran Kadar Protein eCG dengan metode BIURET

Setelah semua larutan standar dimasukkan ke dalam spektrofotometer, didapatkan nilai absorbansi rata-rata sebagai berikut:

Tabel 4.1 : Nilai Absorbansi rata-rata untuk Pengukuran Kadar Protein eCG.

Konsentrasi (X)	Abs 1	Abs 2	Abs rata-rata (Y)
0 ppm	0	0	0
25 ppm	0.002	0.005	0.0035
125 ppm	0.011	0.007	0.009
250 ppm	0.013	0.014	0.0135
500 ppm	0.015	0.019	0.017
1000 ppm	0.034	0.038	0.036
2000 ppm	0.081	0.082	0.0815
3000 ppm	0.133	0.136	0.1345
4000 ppm	0.174	0.175	0.1745
5000 ppm	0.239	0.229	0.234
6000 ppm	0.309	0.301	0.305
7000 ppm	0.358	0.358	0.358
8000 ppm	0.409	0.418	0.4135
9000 ppm	0.473	0.478	0.4755
10000 ppm	0.514	0.512	0.513

Selanjutnya dimasukkan dalam bentuk kurva regresi linier seperti gambar berikut:



Gambar 4.3 : Kurva Regresi Linier untuk Penghitungan Kadar Protein eCG

Dari kurva regresi linier tersebut diatas didapatkan persamaan :

$$Y = 5.10^{-5} X$$

$$X = \frac{Y}{5.10^{-5}}$$

Keterangan : Y → Absorbansi

X → Kadar Protein (ppm)

Setelah memasukkan 12 sampel (tiap sampel berisi 50 μ l serum + 800 μ l biuret),

Catat masing- masing angka absorbansinya (Y) dan masukkan kedalam persamaan :

$$Y = 5.10^{-5} X$$

Dan cari kadar protein (X) menggunakan rumus $X = \frac{Y}{5.10^{-5}}$

Hasil dari penghitungan Kadar Protein adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2 : Hasil Pengukuran Kadar Protein eCG sampel

Sampel		Abs	KP	KPS
Minggu ke-	Kuda	(Y)	(X)	(dikalikan 4)
7	1	0.332	6640 ppm	26560 ppm
7	2	0.257	5140 ppm	20560 ppm
7	3	0.504	10080 ppm	40320 ppm
11	1	0.407	8140 ppm	32560 ppm
11	2	0.526	10520 ppm	42080 ppm
11	3	0.346	6920 ppm	27680 ppm
15	1	0.956	19120 ppm	76480 ppm
15	2	0.436	8720 ppm	34880 ppm
15	3	0.834	16680 ppm	66720 ppm
19	1	0.860	17200 ppm	68800 ppm
19	2	0.831	16620 ppm	66480 ppm
19	3	0.708	14160 ppm	56640 ppm

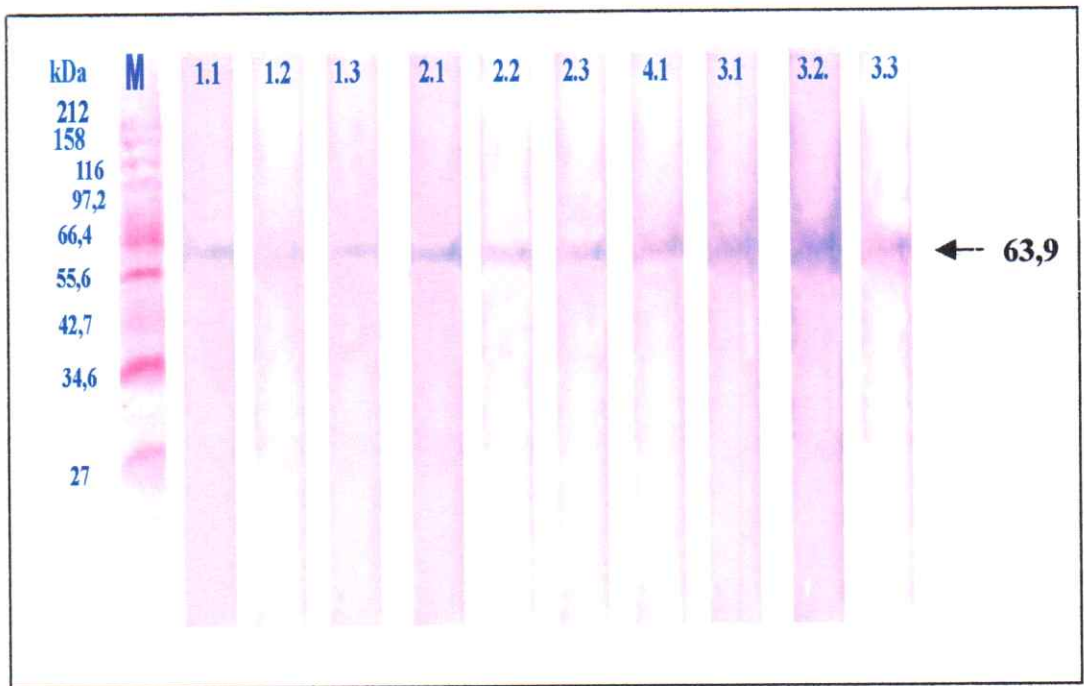
Keterangan : KP : Kadar Protein ($\mu\text{g/ml}$) atau ppm

KPS :Kadar Protein Sesungguhnya ($\mu\text{g/ml}$) atau ppm.

KPS dikalikan empat dari hasil KP yang tertera dalam Spektrofotometer, karena dalam pelaksanaannya dilakukan empat kali pengenceran.

4.4. Hasil Analisis Protein Spesifik eCG dengan Teknik *Western blot*

Analisis fraksi protein terhadap eCG yang direaksikan dengan antibodi anti eCG menggunakan teknik *Western blot*, diperoleh hasil berupa satu buah pita protein eCG. Gambaran selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Pita-pita hasil karakterisasi protein eCG dengan antibodi poliklonal anti- eCG menggunakan teknik *Western blot*.

Keterangan	:	M	:	Marker
		1.1. – 1.3.	:	Kuda bunting umur 7 minggu
		2.1. – 2.3.	:	Kuda bunting umur 11 minggu
		3.1. – 3.3.	:	Kuda bunting umur 15 minggu
		4.1	:	Kuda bunting umur 19 minggu

Pada penelitian ini (menggunakan teknik *Western blot*), pita- pita protein pada marker mempunyai persamaan $Y = 5,270 - 1,472x$. Penghitungan dilakukan melalui program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) rel 13 for Windows (Santoso, 2000), yang menunjukkan korelasi negatif dengan

nilai $r = -0,982$, a (*intercep*) = 5,270 dan b (*slope*) = -1,472. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2. Hasil analisis protein eCG melalui teknik *Western blot* didapatkan satu macam protein spesifik dengan berat molekul (BM) : 63,9 kDa.

BAB 5
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan identifikasi dan isolasi protein hormon *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) dari serum kuda bunting dalam rangka untuk diagnosis kebuntingan kuda. *equine Chorionic Gonadotropin* adalah suatu hormon gonadotropin yang berfungsi merangsang aktivitas gonad, yang mempunyai pengaruh fisiologi yang sama dengan FSH (Folicle Stimulating Hormon) dan sedikit LH (Luteinizing Hormon). Pada hewan betina, hormon eCG dapat menyebabkan berkembangnya folikel-folikel menjadi besar (Hardjopranto, 1996). Pada hari ke-40 s/d 150, folikel mulai tumbuh dan masak menjadi folikel de Graaf namun tidak diovulasikan kemudian terjadi luteinisasi karena pengaruh LH menjadi korpus luteum assesoris yang memproduksi progesteron dan menggantikan peran eCG dalam memelihara kebuntingan. Menurut Hafez (2000) eCG dihasilkan oleh endometrial cups dan diperlukan untuk pembentukan korpus luteum sekunder selama kuda bunting dan dipertahankan sampai umur kebuntingan 150 hari. Setelah umur kebuntingan tersebut eCG mulai menghilang seiring dengan berfungsinya plasenta dalam memproduksi progesteron yang berfungsi untuk memelihara kebuntingan.

Melalui teknik SDS-PAGE ditemukan empat macam pita protein, masing-masing dengan BM : 63,3 kDa , 52,8 kDa ,45,5 kDa dan 42,8 kDa. Kemudian dilakukan uji spesifitas protein eCG menggunakan teknik *Western blot* ditemukan satu macam pita protein dengan BM : 63,9 kDa. Menurut Hafez (1993), eCG mempunyai berat molekul kira-kira 64 kDa. Mengingat perhitungan

menggunakan regresi linier dan kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa pita protein telah memiliki sedikit perbedaan dengan peneliti lain tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama (Kusnoto, 2003)

Pada penelitian ini juga dilakukan isolasi eCG dari pita-pita yang terbentuk dari gel SDS-PAGE menggunakan teknik *Electroelusi*, yang mana hasil dari elusi ini berupa cairan yang mengandung hormon eCG sebanyak 2000 µl dan kemudian dimasukkan ke dalam microtube disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20° C. Hasil dari elusi ini juga digunakan penelitian selanjutnya oleh peneliti lain yaitu untuk mendapatkan antibodi poliklonal anti eCG dengan cara menyuntikkannya ke kelinci. Perlu diketahui bahwa eCG memenuhi syarat untuk menjadi protein yang bersifat imunogen karena mempunyai berat molekul 45.000 – 65.000 Dalton. Menurut Smith (1995), substansi dapat dikatakan bersifat imunogen jika mempunyai berat molekul > 5.000 Dalton, dan imunogen yang paling poten adalah makromolekul protein dengan berat molekul > 10.000 Dalton (Abbas *et al.*, 2000 dan Goodman, 1991). Selain itu dalam penelitian ini juga dilakukan penghitungan kadar protein melalui metode Biuret yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.2. Dari hasil penghitungan protein menggunakan metode Biuret, dapat dilihat adanya perbedaan kadar protein eCG tiap minggunya. Kadar protein eCG semakin meningkat pada umur kebuntingan 7 minggu sampai umur kebuntingan 15 minggu, namun setelah umur kebuntingan 19 minggu kadarnya mulai turun. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Knobill *et al.* (1988)

Pada penelitian ini tidak dilanjutkan dengan melakukan diagnosis kebuntingan, akan tetapi metode ini kedepannya berguna (sebagai alternatif) untuk pemeriksaan kebuntingan (PKB) pada kuda. Ada beberapa macam cara untuk mendiagnosis kebuntingan selain menggunakan hormon eCG, yaitu dengan menggunakan hormon progesteron melalui teknik RIA (*Radio Immuno Assay*), menggunakan USG (Ultrasonografi) dan eksplorasi rektal. Diagnosis kebuntingan menggunakan preparat hormon eCG bisa dikatakan mempunyai peluang yang lebih besar untuk menentukan keakuratan dalam mendiagnosa suatu kebuntingan pada kuda karena keberadaan eCG pada serum kuda betina bisa memastikan 100% kuda tersebut bunting, tetapi penggunaan diagnosa menggunakan eCG bisa dilakukan mulai umur 40 hari. Sedangkan dengan cara yang selama ini dilakukan dilapangan yang menggunakan hormon progesteron dalam serum darah melalui teknik RIA (*Radio Immuno Assay*), pemeriksaan kebuntingan menggunakan hormon progesteron bersifat kuantitatif yang berarti dalam pemeriksaan RIA, pasti akan ditemukan hormon progesteron pada hewan betina bunting, namun untuk membedakannya adalah kadar hormon progesteron itu sendiri di dalam darah induk yang diduga bunting. Ada juga different diagnosa yang harus diperhatikan yaitu penyakit dalam uterus kuda betina seperti pada kasus korpus luteum persisten. Selain itu diagnosa kebuntingan menggunakan hormon progesteron pada kuda mempunyai kecermatan 90% dan juga pemeriksaan menggunakan RIA tergolong mahal, namun diagnosa kebuntingan menggunakan hormon progesteron ini dapat dilakukan 22-24 hari setelah dikawinkan (Mahaputra, 2002)

Pemeriksaan kebuntingan menggunakan USG (Ultrasonografi), USG lebih peka dan dapat membedakan jenis kelamin fetus dalam kandungan. Alat ini bisa digunakan untuk diagnosa kebuntingan pada kuda dengan sangat dini, sebab dalam waktu 11-12 hari setelah kawin kantung embrio sudah tampak melayang di dalam lumen uterus. Pada kuda, kecermatan mendiagnosa menggunakan alat ini dengan melihat gelembung embrio pada umur 15 hari mencapai 99%, namun pemeriksaan menggunakan USG biayanya mahal. Sedangkan pemeriksaan kebuntingan pada kuda yang lain adalah dengan eksplorasi rektal. Hal ini sangat riskan bila dilakukan pada kuda, karena rektum kuda lebih tipis daripada sapi, sehingga perlu berhati-hati untuk mencegah pendarahan dan sobek (*rupture*) dan juga pemeriksaan eksplorasi rektal pada kuda memerlukan seseorang yang benar-benar ahli karena untuk meraba uterus kuda harus diingat bahwa permukaan konvek uterusnya berada dibagian ventral (kebalikan uterus sapi). Kecermatan diagnosa eksplorasi rektal tergantung dari umur kebuntingan, untuk kuda pada kebuntingan yang sangat dini yaitu 16-21 hari sudah dapat dirasakan adanya penonjolan tonus uterus, servik dan penebalan dinding uterus hingga tiga kali lipat daripada yang tidak bunting (Mahaputra, 2002)

Dari semua pembandingan diagnosa kebuntingan di atas dapat disimpulkan bahwa diagnosa kebuntingan menggunakan eCG lebih akurat, aman dan lebih murah walaupun tidak untuk diagnosa kebuntingan dini. Hal ini dikarenakan eCG sudah pasti berada dalam serum kuda bunting pada umur kebuntingan 40-150 hari, jadi apabila ditemukannya hormon ini pada serum kuda betina maka dapat dipastikan kuda tersebut bunting.

BAB 6
SIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terbukti bahwa eCG dapat dideteksi keberadaannya di dalam serum darah kuda bunting melalui metode SDS-PAGE dan *Western blot*, yaitu dengan didapatkannya empat fraksi protein eCG dengan berat molekul (BM) yaitu: 63,3 kDa , 52,8 kDa , 45,5 kDa dan 42,8 kDa melalui metode SDS-PAGE dan didapatkan satu macam fraksi protein spesifik eCG melalui teknik *Western blot* dengan berat molekul (BM) : 63,9 kDa .

6.2. Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk melakukan aplikasi eCG sebagai bahan tes diagnostik kebuntingan pada kuda di lapangan, sehingga diharapkan kedepannya tidak ada lagi kesulitan dalam mendeteksi kebuntingan pada kuda.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

RINGKASAN

RINGKASAN

Rendi Prihatmanto. "Identifikasi Dan Isolasi *equine Chorionic Gonadotropin (eCG)* Dari Serum Kuda Bunting Dalam Rangka Untuk Diagnosa Kebuntingan Pada Kuda". Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan Prof. Mas'ud Hariadi, PhD, M.Phil, Drh. Sebagai pembimbing pertama dan Sulistyaningwati Guntoro, Drh. Sebagai pembimbing kedua.

Diagnosa kebuntingan secara hormonal pada kuda dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu (a) mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *equine Chorionic Gonadotropin (eCG)*, *early pregnancy factor (EPF)* dan (b) mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine serta air susu selama kebuntingan seperti *progesterone*, *estrone sulphate* (Hafez, 2000).

Selama ini yang telah dilakukan untuk mendiagnosa kebuntingan kuda adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dengan menggunakan substansi non spesifik seperti *progesterone* dan *estrone sulphate* dengan menggunakan teknik RIA (Nalbandov, 1990) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA (Anonymous, 1984).

Dengan melihat substansi spesifik eCG pada induk kuda bunting diharapkan bisa menjadi bahan acuan dalam mendiagnostik terjadinya

kebuntingan pada kuda, sehingga diharapkan tidak ada lagi kesulitan dan hambatan dalam mendiagnosa kebuntingan pada kuda.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi eCG dari serum kuda bunting.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terbukti bahwa eCG dapat dideteksi keberadaannya di dalam serum darah kuda bunting melalui metode SDS-PAGE dan *Western blot*, yaitu dengan didapatkannya empat fraksi protein eCG dengan berat molekul (BM) yaitu: 63,3 kDa , 52,8 kDa , 45,5 kDa dan 42,8 kDa melalui metode SDS-PAGE dan didapatkan satu macam fraksi protein spesifik eCG melalui teknik *Western blot* dengan berat molekul (BM) : 63,9 kDa .

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disarankan untuk melakukan aplikasi eCG sebagai bahan tes diagnostik kebuntingan pada kuda di lapangan, sehingga diharapkan kedepannya tidak ada lagi kesulitan dalam mendeteksi kebuntingan pada kuda.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas. A. K., A. H. Lichman. and J. S. Pober. 2000. *Cellular and Molecular Immunology* 4th ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Alberts, B., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Robert., J. D. Watson. 1994. *Biologi Molekular Sel*. Edisi kedua. Gramedia Pustaka Umum. Jakarta.
- Anonimous. 1984. *Laboratory Training Manual on RIA in Animal Reproduction. Technical Reports*. Series No. 233. IAEA. Vienne, Austria.
- Anonimous. 2001. Jawa Timur Dalam Angka 2001. Badan Statistik Propinsi Jawa timur. Hal. 163.
- Anonimous, 2005, *What is Gel elektroforesis ?*, <http://www.bergen.org/AAST/projects/Gel/intro.htm>, 23 Mei 2005.
- Austin, C. R. and R. V. Short. 1984. *Reproduction in mammalia : Hormonal Control of Reproduction*. 2nd. Cambridge University Press. London. New York. New Rochelle. Melbourne. Sydney. 153-194.
- Cole, H.H. and P.T. Cupps. 1977. *Reproduction in Domestic Animals*. 3rd Ed. Academic Press, New York. P. 415-417.
- Franson, R. D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi keempat. Terj. B. Srigandono, Koen Praseno. Penerbit Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Goodman, J. W. 1991. *Immunogenecity and Antigen Specivity*. In : Stites DP and Terr AI (eds) *Basic and Clinical Immunology* 7th ed. Appleton and Lange. Norwalk. Connecticut.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. 5th ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincutt Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Hardjopranjoto, S. 1987. *Fisiologi Pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjopranjoto, S. 1996. *Endokrinologi Umum*. Edisi pertama. Program Pasca Sarjana. Unair. Surabaya.

- Hardjopranjoto, S. 1997. *Fisiologi reproduksi*. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Harlow, E. And D. Lane. 1988. *Antibodies*. A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Knobil, E., D. Neill, L.L. Ewing, C.L. Market, G.S. Greenwald and D.W. Pfaff. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2. Reven Press New York. p. 2122-2124.
- Kusnoto. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II Toxocara caty Isolat Lokal*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3: 11-13: 14
- Mahaputra, L. 1994. *Ilmu Kebidanan Veteriner*. Edisi Lima. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mahaputra, L. 2002. *Teknik Diagnosis Reproduksi*. Edisi Satu. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mc. Donald, L.E. 1989. *Veterinary Endokrinologi and Reproduction*. fourth Edition, Lea and Febiger. Philadelphia.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Reproduction Physiology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, London.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. Hal.79-84.
- Robert F. W. 2003. *Molecular Biology 2nd ed*. International Edition. Mc Graw-Hill.
- Santoso, S. 2000. *SPSS Statistik Parametrik*. PT Alex Media Komputindo. Kelompok Gramedia – Jakarta.
- Smith, J.R. 1995. *Produksi Serum Hiperimun*, Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. G.W. Burgess Ed. James Cook University of North Queensland.
- Supriatna, I., T. L. Yusuf., B. Purwantara., G. Moekti dan L. P. Hermoadi. 1998. *Uji Antibodi Anti Pregnant Mare's Serum Gonadotropin pada Sapi Perah*. Hayati. 5 (3) : 73-78.

- Sutiman B., Sumitro, Sri Rahayu, Fatiyah, Sri Widyarti, Esti. 1989. *Diktat Kuliah dan Praktikum. Kursus Teknik- teknik Dasar Analisis Protein dan DNA*, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang, hal. 25-26.
- Toelihere, M .R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa Bandung.
- Turner, C.D. and J.T Bagnara. 1988. *Endokrinologi umum* diterjemahkan oleh Harsyoga dan Edi Mulyono penerbit Airlangga University Press. Surabaya.
- Ulum, M. A. 2004. *Gambaran Protein Larva Kedua (L₂) Telur Infektif dan Cacing Dewasa Toxocara cati*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wongsosupantio S. 1990. *Pedoman Kuliah Elektroforesis Gel Protein*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi UGM. Yogyakarta.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

LAMPIRAN

Lampiran 1. Regresi Linier untuk menentukan hubungan antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Berat Molekul Protein

Tabel Jarak antara gel preparasi dan pita yang terbentuk pada SDS-PAGE

jarak	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
5,5	0,051	212,0	212000	5,326
13,0	0,120	158,0	158000	5,199
19,0	0,176	116,0	116000	5,064
26,0	0,241	97,2	97200	4,988
33,0	0,306	66,4	66400	4,822
38,5	0,356	55,6	55600	4,745
47,0	0,435	42,7	42700	4,630
63,0	0,583	34,6	34600	4,539
71,0	0,657	27,0	27000	4,431
81,0	0,750	20,0	20000	4,301
91,0	0,843	14,3	14300	4,155

Panjang Gel
108

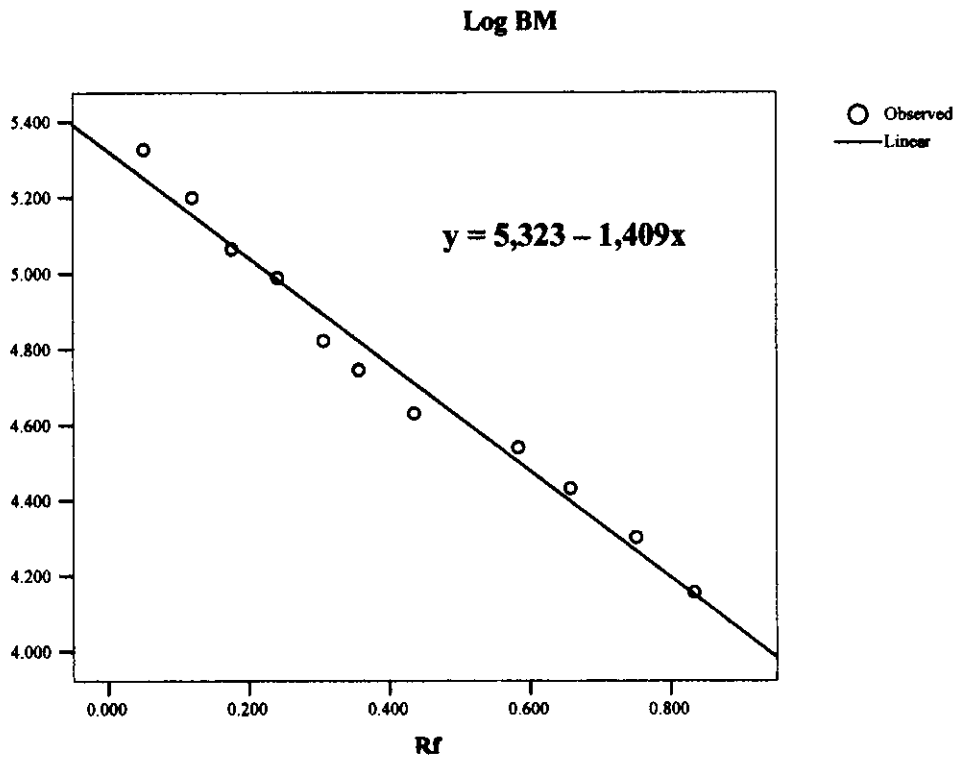
Summarize

Case Summaries^a

	Rf	Rf
1	,097	,051
2	,168	,120
3	,221	,176
4	,265	,241
5	,336	,306
6	,385	,356
7	,465	,435
8	,611	,583
9	,681	,657
10	,770	,750
11	,858	,833
Total	N	11
	Sum	4,857
	Mean	,44155
	Std. Deviation	,256048

a. Limited to first 100 cases.

Curve Fit



Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Log BM

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,990 ^a	,980	,977	,056456

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1,381	1	1,381	433,357	,000 ^a
	Residual	,029	9	,003		
	Total	1,410	10			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: Log BM

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,323	,033		163,584	,000
	Rf	-1,409	,068	-,990	-20,817	,000

a. Dependent Variable: Log BM

Berdasarkan perhitungan regresi linier diketahui bahwa terdapat hubungan negatif yang sangat erat antara nilai Rf dengan BM protein pada *marker*, koefisien korelasi (r) sebesar -0,990 dengan persamaan garis regresi :
 $(y) = a + b x$ sehingga diperoleh $(y) = 5,323 - 1,409x$

Persamaan ini digunakan untuk menghitung BM pada sampel yaitu sebagai berikut:

Tabel Berat Molekul Sampel

Jarak	Rf	Log y Da	BM Da	BM kDa
40,0	0,370	4,8011	63255,7	63,3
46,0	0,426	4,7229	52832,4	52,8
51,0	0,472	4,6576	45456,9	45,5
53,0	0,491	4,6315	42805,5	42,8

Lampiran 2. Regresi Linier Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf pada *Western blotting* dengan Berat Molekul Protein

Tabel Jarak antara gel preparasi dan pita yang terbentuk pada *Western blotting*

jarak	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
2,0	0,026	212,0	212000	5,326
5,0	0,066	158,0	158000	5,199
10,0	0,132	116,0	116000	5,064
12,5	0,164	97,2	97200	4,988
20,0	0,263	66,4	66400	4,822
25,0	0,329	55,6	55600	4,745
31,0	0,408	42,7	42700	4,630
37,0	0,487	34,6	34600	4,539
48,0	0,632	27,0	27000	4,431

Panjang Gel
76

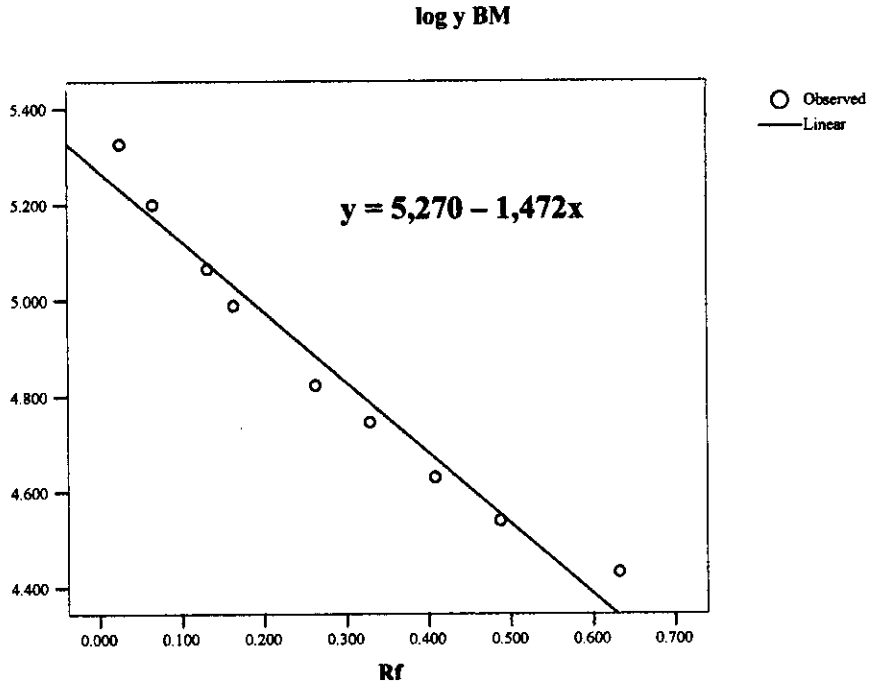
Summarize

Case Summaries^a

	log y BM	Rf
1	5,326	,026
2	5,199	,066
3	5,064	,132
4	4,988	,164
5	4,822	,263
6	4,745	,329
7	4,630	,408
8	4,539	,487
9	4,431	,632
Total	N	9
	Sum	43,744
	Mean	4,86044
	Std. Deviation	,305108

a. Limited to first 100 cases.

Curve Fit



Regression

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log y BM

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,982 ^a	,964	,959	,061882

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,718	1	,718	187,475	,000 ^a
	Residual	,027	7	,004		
	Total	,745	8			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y BM

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,270	,036		144,959	,000
	Rf	-1,472	,107	-,982	-13,692	,000

a. Dependent Variable: log y BM

Berdasarkan perhitungan regresi linier diketahui bahwa terdapat hubungan negatif yang sangat erat antara nilai Rf dengan BM protein pada *marker*, koefisien korelasi (r) sebesar -0,982 dengan persamaan garis regresi : (y) = a + b x sehingga diperoleh (y) = 5,270 -1,472x. Persamaan ini digunakan untuk menghitung BM pada sampel yaitu sebagai berikut:

Tabel Berat Molekul Sampel

Jarak	Rf	Log y Da	BM Da	BM kDa
24	0,316	4,8052	63855,7	63,9

**Lampiran 3. Penghitungan Anova (Uji F) Kadar Protein eCG
Hasil Biuret dilanjutkan dengan Uji Duncan (5 %)**

Summarize

Case Summaries^a

				Kadar Protein	
Waktu Pengamatan	7 minggu	1		26560	
		2		20560	
		3		40320	
		Total	N	3	
				Sum	87440
				Mean	29146,67
				Std. Deviation	10130,772
	11 minggu	1		32560	
		2		42080	
		3		27680	
		Total	N	3	
				Sum	102320
				Mean	34106,67
			Std. Deviation	7323,533	
15 minggu	1		76480		
	2		34880		
	3		66720		
	Total	N	3		
			Sum	178080	
			Mean	59360,00	
			Std. Deviation	21754,705	
19 minggu	1		68800		
	2		66480		
	3		56640		
	Total	N	3		
			Sum	191920	
			Mean	63973,33	
			Std. Deviation	6455,922	
Total	N		12		
	Sum		559760		
	Mean		46646,67		
	Std. Deviation		19349,553		

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

Kadar Protein

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
7 minggu	3	29146,67	10130,772	5849,004	20560	40320
11 minggu	3	34106,67	7323,533	4228,244	27680	42080
15 minggu	3	59360,00	21754,705	12560,085	34880	76480
19 minggu	3	63973,33	6455,922	3727,329	56640	68800
Total	12	46646,67	19349,553	5585,735	20560	76480

ANOVA

Kadar Protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2776031466,67	3	925343822,2	5,514	,024
Within Groups	1342425600,00	8	167803200,0		
Total	4118457066,67	11			

Bahwa keempat perlakuan pada serum kuda bunting menunjukkan perbedaan yang nyata atau "significant" dari tiap minggu pengambilan serum.

Sebab $F_{tabel} 0,01 < F_{hitung} > f_{tabel} 0,05$

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Kadar Protein

Duncan^a

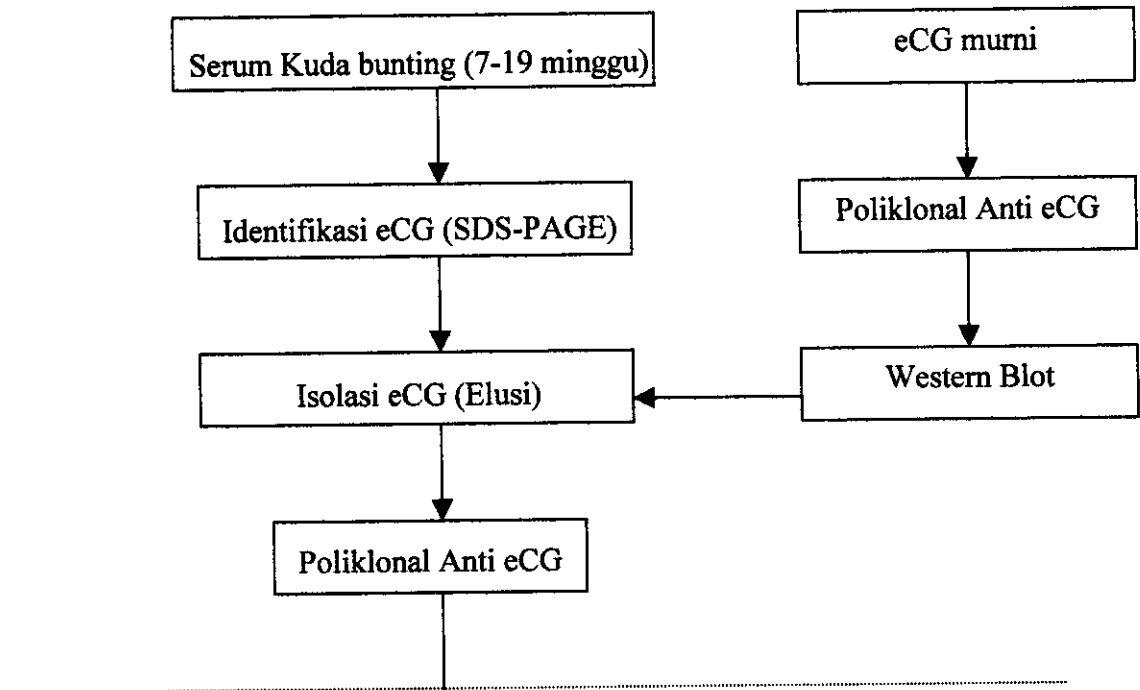
Waktu Pengamatan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
7 minggu	3	29146,67	
11 minggu	3	34106,67	
15 minggu	3		59360,00
19 minggu	3		63973,33
Sig.		,652	,674

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

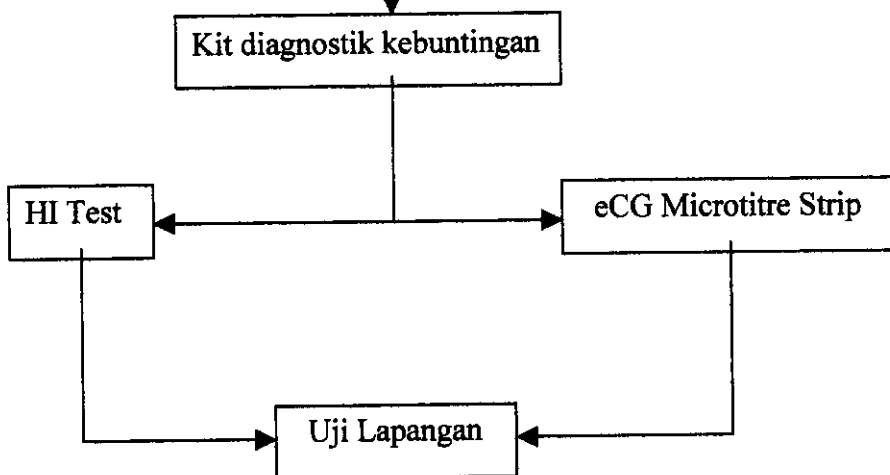
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 4 : Kerangka Penelitian Due – Like eCG

Tahap I



Tahap II



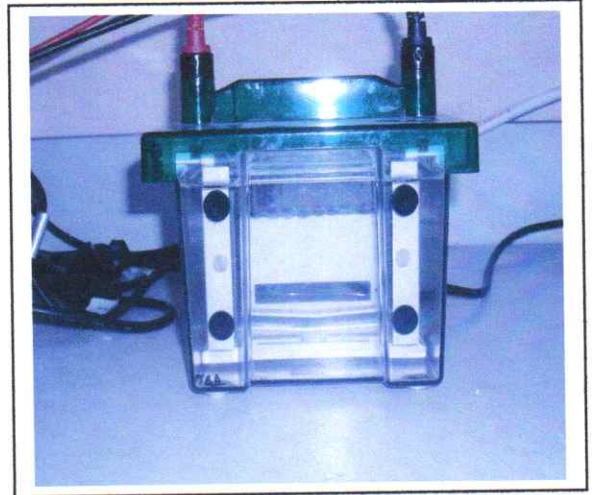
Lampiran 5 : Gambar Prosedur Penelitian



Power Supply SDS-PAGE

Keterangan :

- Sebagai sumber tegangan listrik untuk proses Elektroforesis



Chamber SDS-PAGE

Keterangan :

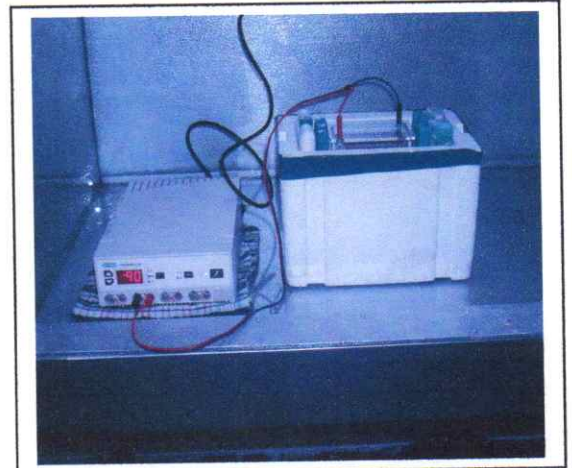
- Sebagai wadah untuk menampung alat SDS-PAGE dalam proses Elektroforesis



Chamber Western blot

Keterangan :

- Sebagai wadah untuk menampung alat *Western blot* dalam proses Elektroforesis



Electrophoresis Unit

Keterangan :

- Alat untuk proses pengerjaan Elektroforesis



Spektrofotometer

Keterangan:

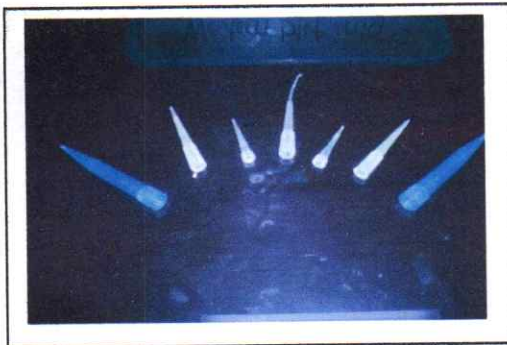
- Digunakan sebagai alat untuk pengukuran kadar protein eCG.



Power Supply ELUSI and Western blot

Keterangan :

- Sebagai sumber tegangan listrik untuk proses Elektroforesis



Microtip



Adjustable Micropipette

Keterangan :

- *Microtip* dan *Adjustable Micropipette* merupakan alat untuk pengambilan sampel dalam ukuran mikroliter.
- Dalam penggunaannya, *Microtip* dan *Adjustable Micropipette* selalu digunakan bersama (seperangkat), tergantung dari berapa μ l sampel yang akan diambil