

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN ESTROGEN TERHADAP
BERAT MOLEKUL DAN KONSENTRASI
PROTEIN SERUM DARAH AYAM**



OLEH :

DANNY SATRIA
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**PENGARUH PEMBERIAN ESTROGEN TERHADAP
BERAT MOLEKUL DAN KONSENTRASI
PROTEIN SERUM DARAH AYAM**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh:

DANNY SATRIA

NIM. 069812519

Menyetujui,

Komisi Pembimbing,



(Suryanie Sarudji, Drh., MKes.)

Pembimbing Pertama



(Rahayu Kusdarwati, Ir., MKes.)

Pembimbing Kedua

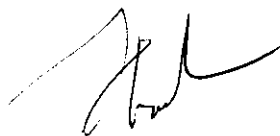
Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji



Ajik Azmijah, Drh., SU.
(Ketua)



Herry Agoes Hermadi, Drh., MSi.
Sekretaris



Kadek Rachmawati, Drh., MSi.
Anggota



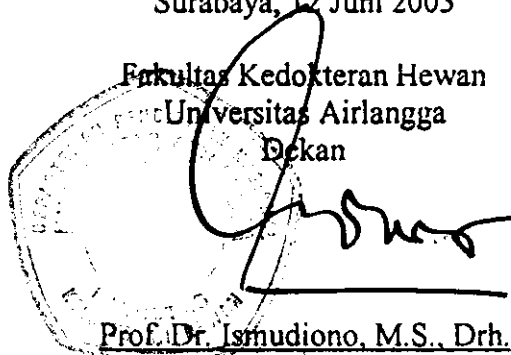
Suryanie Sarudji, Drh., MKes.
Anggota



Rahayu Kusdarwati, Ir., MKes.
Anggota

Surabaya, 12 Juni 2003

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.
NIP. 130687297

**PENGARUH PEMBERIAN ESTROGEN TERHADAP
BERAT MOLEKUL DAN KONSENTRASI
PROTEIN SERUM DARAH AYAM**

DANNY SATRIA

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya pengaruh estrogen terhadap berat molekul dan konsentrasi protein serum ayam.

Penelitian ini menggunakan dua kelompok ayam buras, yaitu kelompok umur 1,5 bulan berjumlah 4 ekor dan 4,5 bulan berjumlah 5 ekor. Kelompok pertama diberi estrogen satu kali sehari selama tiga hari, kelompok kedua tidak diberi estrogen.

Seluruh ayam ditempatkan ke dalam kandang selama tiga hari terlebih dulu untuk proses adaptasi. Kemudian selama tiga hari berturut-turut diberi perlakuan estrogen pada ayam perlakuan. Perlakuan selama tiga hari tersebut diharapkan pengaruh estrogen sudah benar-benar direspon oleh sel hepar.

Setelah perlakuan tersebut pada hari ketiga diambil sampel darah pada seluruh ayam untuk diisolasi serumnya. Kemudian serum diperiksa melalui elektroforesis dan spektrofotometri.

Hasil penelitian terhadap pemberian estrogen pada kelompok ayam umur 4,5 bulan dengan kelompok ayam umur 1,5 bulan menunjukkan perbedaan pada berat molekul dan konsentrasi protein dalam serum darahnya.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan penulisan makalah ini.

Rasa terima kasih penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Ismudiono selaku pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas fasilitas yang telah disediakan dalam penelitian ini.

Demikian pula penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada Bapak Suryanie Sarudji, MKes., Drh. selaku pembimbing pertama dan Ibu Rahayu Kusdarwati, MKes., Ir. selaku pembimbing kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan saran, bimbingan serta nasihat yang sangat berguna dalam penyusunan makalah ini.

Dengan ketulusan hati penulis menghaturkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Bapak, Ibu dan Semua pihak atas peran dan bantuannya.

Akhirnya penulis sebagai manusia biasa menyadari bahwa makalah ini kurang dari sempurna. Kritik dan saran yang berguna untuk penyempurnaan makalah ini penulis terima dengan lapang dada. Semoga makalah ini bermanfaat serta menambah wawasan dan informasi bagi dunia ilmu pengetahuan.

Surabaya, Juni 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Landasan Teori	2
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
1.6. Hipotesis Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Hormon Steroid	6
2.2. Estrogen	7
2.2.1. Struktur Kimia Estrogen	7
2.2.2. Sintesis Estrogen	8
2.2.3. Mekanisme Kerja Estrogen	10
2.2.4. Estrogen Sintetis	11
2.3. Protein	12
2.4. Elektroforesis	19
2.5. Spektrofotometri	21

BAB III	MATERI DAN METODE	29
3.1.	Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2.	Bahan dan Alat Penelitian	23
3.3.	Metode Penelitian	25
3.3.1.	Perlakuan Hewan Percobaan	25
3.3.2.	Elektroforesis	25
3.3.2.1.	Teknik Elektrofoesis	25
3.3.2.2.	Penghitungan Massa Molekul Relatif Protein	26
3.3.3.	Teknik Spektrofotometri	26
3.3.3.1.	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	27
3.3.3.2.	Penentuan Kurva Baku Standar	27
3.3.3.3.	Penentuan Kadar Protein Menurut Metode Biuret	27
BAB IV	HASIL PENELITIAN	29
4.1.	Elektroforesis	29
4.2.	Spektrofotometri	30
BAB V	PEMBAHASAN	32
5.1.	Elektroforesis	32
5.2.	Spektrofotometri	33
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	35
6.1.	Kesimpulan	35

6.2. Saran	35
RINGKASAN	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Bahan Gel	24
2. Hasil Spektrofotometri	30
3. Penentuan Massa Molekul Relatif dan Rf Protein Standar	39
4. Pembuatan Kurva Standar	40
5. Penentuan Panjang Gelombang	41
6. Pembuatan Kurva Standar	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Biosintesis estrogen	8
2. Skema aliran informasi genetik dari DNA ke protein	14
3. Struktur sekunder protein	15
4. Struktur tersier protein	15
5. Struktur kuarterner protein	16
6. Gambaran elektroforesis serum darah ayam perlakuan dan kontrol	29
7. Perbedaan Konsentrasi (ppm) Serum Ayam Kontrol Dan Perlakuan	30
8. Grafik Perbedaan Konsentrasi (ppml) Serum Ayam Kontrol dan Perlakuan	31
9. Grafik Kurva Standar	40
10. Grafik Kurva Standar	42
11. Pengambilan darah ayam	43
12. Peralatan elektroforesis	43

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Protein mempunyai peranan yang sangat penting sehingga hampir di setiap organ tubuh manusia dan hewan mengandung protein, baik di kulit, otot, jantung, hati, ginjal, paru-paru, enzim, hormon dan darah yang terdapat dalam hemoglobin. Protein juga merupakan sumber tenaga dan energi, pembangun tubuh, memelihara dan membantu proses penggantian sel-sel tubuh yang rusak. Protein paling erat hubungannya dengan proses-proses kehidupan. Semua hayat hidup sel berhubungan dengan zat gizi protein. Molekul protein mengandung unsur-unsur C, H, O dan unsur khusus yang tidak terdapat dalam molekul karbohidrat dan lemak yaitu Nitrogen (N) (Soeharto, 2002).

Protein adalah molekul organik yang terbanyak di dalam sel. Selain itu protein adalah biomolekul yang sesungguhnya, karena senyawa ini yang menjalankan berbagai fungsi dasar kehidupan, antara lain berperan dalam kontraksi melakukan gerakan pada otot. Protein juga berperan membawa informasi dari luar ke dalam sel dan di dalam bagian sel sendiri. Selain itu protein mengendalikan dapat tidaknya, serta waktu yang tepat untuk pengungkapan informasi yang terkandung di dalam DNA, yang diperlukan untuk sintesis protein itu sendiri. Jadi secara tidak langsung protein mengatur perbanyakannya sendiri dengan mengatur DNA, yang merupakan alat perekam informasi untuk protein, sehingga dengan demikian operasinya di bawah kendali protein (Ganong, 1999).

Beberapa protein disintesis di dalam hati atas pengaruh hormon estrogen, salah satunya adalah protein vitellogenin pada unggas dan hewan-hewan petelur lainnya. Hormon ini membentuk kompleks hormon-reseptor dan memberikan pengaruh yang selektif terhadap transkripsi gen serta produksi masing-masing mRNA dan pada akhirnya protein spesifik (vitellogenin) akan terbentuk (Murray *et al.*, 1999). Protein ini akan ditranspor melalui serum darah sebagai prekursor kuning telur (Mosconi *et al.*, 2000).

Adanya protein khusus (vitellogenin) dalam serum darah unggas akibat pemberian estrogen tentu akan menyebabkan kandungan protein dalam darah berbeda dibanding yang tidak diberi estrogen (Heppel *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2000).

Berdasarkan alasan tersebut di atas, penulis ingin melakukan penelitian bagaimana pengaruh pemberian estrogen terhadap kadar dan berat molekul dalam protein serum darah ayam.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka timbul permasalahan apakah ada pengaruh pemberian estrogen terhadap berat molekul dan konsentrasi protein serum darah ayam.

1.3. Landasan Teori

Estrogen merupakan hormon steroid yang berikatan dengan reseptor yang terdapat dalam nukleus, hal ini berakibat dimulainya sintesis m-RNA

spesifik yang akan ditransport ke sitoplasma sehingga terjadi sintesis protein spesifik pada ribosom. Estrogen menyebabkan sel epitel oviduk ayam (organ yang menghasilkan putih telur ayam) dan sel hepar (organ yang menghasilkan kuning telur) meningkat dalam jumlah dan ukurannya, dan mensekresikan protein. *Yolk protein* (protein kuning telur) tersebut secara normal dibentuk di hepar hewan betina dan ditranspor melalui serum ke oviduk, kemudian dari oviduk masuk ke dalam telur dan bergabung dengan putih telur yang dihasilkan oleh sel epitel oviduk (Lodish *et al.*, 1986).

Adanya protein spesifik akibat pengaruh estrogen dapat dideteksi kadarnya dalam darah. Apabila darah dibiarkan menjendal, maka beberapa protein plasma turut menyumbang pembentukan matriks penjendalan tersebut. Larutan yang dihasilkan, yang tidak mengandung fibrinogen, fibrin dan beberapa faktor penjendalan dinamakan serum (Montgomery *et al.*, 1993).

Teknik elektroforeis dapat membedakan protein-protein yang terdapat dalam serum darah. Suatu larutan dengan pH tertentu mengandung beberapa macam protein yang mempunyai muatan listrik yang berbeda-beda, karena susunan dan jumlah asam aminonya tidak sama. Bila campuran protein dalam larutan tersebut diletakan dalam suatu medan listrik, tiap protein akan bermigrasi pada kutub yang berlawanan sesuai dengan muatan protein yang bersangkutan. Makin besar nilai mutlak muatan protein itu, makin jauh jarak yang ditempuhnya, sehingga protein-protein tersebut akan terpisahkan sesuai dengan muatannya. Protein yang tidak bermuatan pada pH larutan (pH larutan = pH protein yang bersangkutan), tidak bergerak dalam medan listrik. Di sisi lain, bahan kimia

(termasuk protein) dapat menyerap dan menghantarkan cahaya. Selain itu suatu larutan mempunyai warna tertentu karena larutan ini dapat menyerap semua warna kecuali warna yang dapat ditangkap oleh mata. Dengan teknik spektrofotometri, cahaya dari sumber cahaya diuraikan dengan menggunakan prisma sehingga diperoleh cahaya monokromatis yang diserap oleh zat yang diperiksa (Soewoto dkk, 2001).

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini merupakan tahap awal untuk pembentukan antigen vitellogenin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian estrogen terhadap berat molekul dan konsentrasi protein serum darah ayam.

1.5. Manfaat Penelitian

Perbandingan analisis protein serum ayam muda kontrol dan perlakuan serta protein kuning telur ayam, dapat mengidentifikasi adanya protein vitellogenin dalam serum dan kuning telurnya. Protein ini nantinya akan digunakan sebagai antigen untuk berbagai keperluan. Pada penelitian yang lain diantaranya adalah sebagai penghasil antibodi untuk indikator protein vitellogenin hasil kloning pada kuman *Escherichia coli*.

1.6. Hipotesis Penelitian

Adanya perbedaan terhadap berat molekul dan konsentrasi protein darah antara ayam yang diberi perlakuan estrogen dengan ayam tanpa pemberian estrogen.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hormon Steroid

Hormon steroid termasuk hormon seks adalah sejenis molekul bersifat larut lemak yang dihasilkan prekursornya yaitu kolesterol (Anonimus^b, 2002). Menurut situs lain juga disebutkan bahwa sumber pembuatan hormon steroid sendiri berasal dari kolesterol, baik yang dibawa oleh *Low Density Lipid* dalam pembuluh darah dan dibuat oleh sel endokrin maupun yang disimpan dalam sel endokrin. Beberapa hormon steroid dibuat khusus untuk tujuan tertentu, misal untuk pengobatan pada Penyakit Pulmonari Obstruksi Kronis (PPOK) yaitu oxandrolone steroid (Anonimus, 1999; Anonimus^a, 2002).

Hormon steroid dihasilkan oleh ovarium bagian korteks, tepatnya dalam folikel de Graaf. Dari sini dapat diketahui bahwa fungsi bagian korteks ovarium adalah untuk menskresikan hormon, sedangkan bagian medula sendiri sebagai tempat masuk dan keluarnya pembuluh darah dan syaraf dari ovarium (Hardjopranjoto, 1995).

Sintesis hormon steroid oleh ovarium dimulai dari perkembangan folikel ovarium yang dipengaruhi oleh *Foliceal Stimulating Hormone* yang dihasilkan dalam *hipofisa anterior* hingga terbentuknya folikel de Graaf. Proses pembentukan hormon steroid ini melalui dua jalur, yaitu Hidroksilasi, enzim 17 α -hidroksilasi penenolone diubah menjadi 17-hidroksi penenolone, pada fase folikuler. Kedua adalah Dehidrogenasi, enzim β -HSD(Hidroksi Steroid

Dehidrogenasi) Progesterone diubah menjadi progesteron, pada fase luteal (Anonimus, 1999)

Menurut Mutschler (1991) yang diterjemahkan oleh Widiyanto dan Ranti menyatakan bahwa estrogen pada dasarnya dibedakan dari hormon steroid yang lain berdasarkan cincin A aromatiknya.

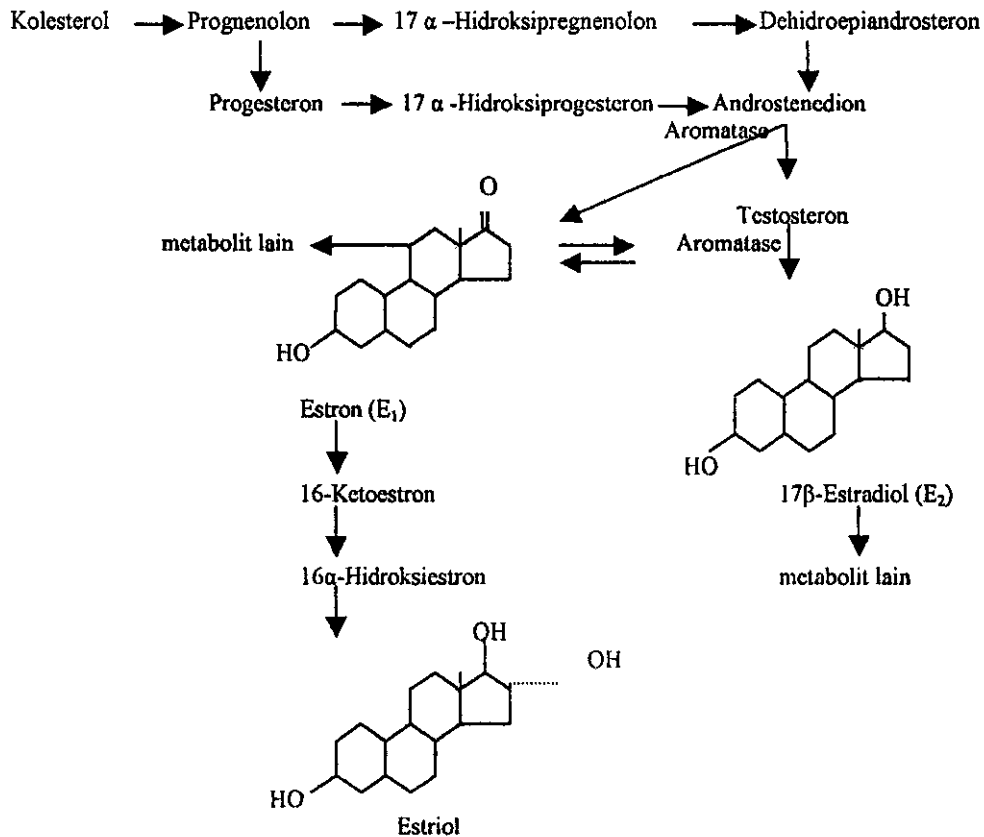
2.2. Estrogen

2.2.1. Struktur Kimia Estrogen

Estrogen yang terdapat secara alamiah adalah *17 β -estradiol*, *estron* dan *estriol*. Zat – zat ini adalah steroid C₁₈, yaitu tidak memiliki gugus metil angular yang melekat pada posisi 10 (Gambar. 1). Hormon – hormon ini disekresikan oleh teka interna dan sel granulosa folikel ovarium, korpus luteum dan plasenta. Jalur biosintesisnya melibatkan pembentukan dari androgen. Juga dibentuk melalui aromatisasi androstendion di dalam sirkulasi (Ganong, 1999; Hardjopranjoto, 1995).

Menurut Mutschler (1991) yang diterjemahkan oleh Widiyanto dan Ranti menyatakan bahwa estrogen pada dasarnya dibedakan dari hormon steroid yang lain berdasarkan cincin A aromatiknya. Tahun 1929, Doisy dan Butenandt dengan cara yang sama dan secara sendiri-sendiri berhasil mengisolasi hormon steroid pertama yaitu *estron*, dalam bentuk terkristalisasi. Tiga tahun kemudian susunan kimianya dapat dijelaskan oleh Butenandt. Estrogen dibentuk dari androgen, terutama dari testosteron dan androstendion. Langkah penting di sini adalah

penghilangan secara oksidasi gugus metil C₁₉ oleh kompleks metilenzim dengan aromatisasi cincin A (Gambar 1).



Gambar 1. Biosintesis Estrogen (Sumber : Hardjopranjoto, 1995)

2.2.2. Sintesis Estrogen

Sel-sel teka interna memiliki banyak reseptor untuk LH, dan LH bekerja melalui siklik AMP untuk meningkatkan perubahan kolesterol menjadi androstenedion. Sebagian androstenedion diubah menjadi estradiol yang masuk ke dalam sirkulasi. Sel-sel teka interna juga memberikan androstenedion kepada sel granulosa. Sel granulosa membuat estradiol bila mendapat androgen kemudian diskresikan ke dalam cairan folikel. Sel granulosa memiliki banyak reseptor FSH,

dan reseptor FSH meningkatkan sekresi estradiol dari sel granulosa dengan bekerja melalui siklik AMP untuk meningkatkan aktivitas aromatase. Sel granulosa matang juga memiliki reseptor LH, dan LH juga merangsang pembentukan estradiol (Ganong, 1999).

Menurut Hardjopranjoto (1995) estrogen dihasilkan oleh sel teka interna dari ovarium pada awal siklus. Di mana hormon ini dalam bidang reproduksi dapat berfungsi untuk perkembangan karakter sex sekunder betina, meningkatkan kontraksi uterus, merangsang atau menghambat GnRH dan lain-lain. Estrogen juga berfungsi untuk pengambilan kalsium dan osifikasi tulang. Itulah sebabnya defisiensi estrogen dapat mengakibatkan osteoporosis. Selain itu estrogen juga berfungsi untuk pertumbuhan dan anabolisme, serta berperan dalam proses pembekuan darah.

Barnes dan Kein (1998) dalam Tempointeraktif (2001) juga menyebutkan estrogen merupakan hormon yang diproduksi terutama oleh ovarium dan sebagian oleh ginjal pada bagian korteks adrenal. Secara normal fungsinya adalah untuk pertumbuhan, serta untuk memelihara kesehatan tubuh pada manusia dewasa, baik pada pria maupun wanita. Khusus pada wanita hormon ini sangat luas peranannya, tidak saja berfungsi sebagai sistem reproduksi, tapi juga untuk tulang, jantung dan mungkin juga untuk otak.

2.2.3. Mekanisme Kerja Estrogen

Menurut Mutschler (1991), estradiol yang diberikan secara oral tidak berkhasiat karena *first past effect* yang tinggi. Estradiol yang disuntikan mempunyai waktu paruh dalam plasma sekitar 50 menit. Hormon ini menuju aliran darah untuk disalurkan ke seluruh tubuh dan sebagian besar akan diikat oleh protein pengikat hormon yang dihasilkan dari *hepar*. SHBG (*Sex Hormone Binding Globuline*) à untuk sex hormon pada umumnya. CBG (*Corticosteroid Binding Globuline*) à untuk progesteron. Protein ini akan diedarkan oleh pembuluh darah akan menuju target organ, misalnya : uterus. Ikatan hormon protein akan putus setelah sampai pada target organ, masuk ke sel target menimbulkan aktivitas dalam sel target (Anonimus, 1999; Anonimus^b, 2002).

Aktivitas estrogen membutuhkan *Estrogen Reseptor* yang dapat dikendalikan oleh kromosom. Hormon steroid merembes melalui membran sel sasaran, lalu memasuki nukleus dan terikat pada protein reseptor yang hanya terdapat dalam nukleus sel sasaran. Kompleks reseptor-hormon ini kemudian menuju DNA dalam inti dan meningkatkan transkripsi mRNA yang dikode oleh gen tempat kompleks tersebut berikatan. Melalui cara ini, hormon steroid (termasuk estrogen) mampu mengawali pengekspresian gen yang dikehendaki. Molekul mRNA yang dihasilkan seterusnya diproses dan dipindah ke dalam sitoplasma, di situlah protein dihasilkan. Sebagai contoh estrogen mempengaruhi sel tertentu dalam perkembangbiakan burung betina untuk mensintesis sejumlah besar ovalbumin. Sementara itu protein yang berlainan yaitu vitellogenin

disintesis dalam hati hewan yang sama sebagai hasil pengaruh estrogen (Aninomus^b, 2002; Ganong, 1999).

Estrogen dapat menginduksi gen vitellogenin di hati untuk menghasilkan protein vitellogenin. Protein ini merupakan prekursor kuning telur yang akan ditranspor menuju oviduk melalui serum (Heppel *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2000). Hormon ini terikat pada protein pentranspor yang spesifik dalam plasma. Ganong (1999) dan Murray (1999) juga berpendapat bahwa estrogen berikatan dengan suatu reseptor protein intrasel, dan kompleks ini kemudian berikatan dengan DNA, mendorong pembentukan mRNA sehingga menyebabkan sintesis protein baru yang memodifikasi fungsi sel. Estradiol dan estrol mengalami beberapa kali metabolisme akibat hidrosilasi dan dehidrasi serta konjugasi dengan asam glukuronat yang aktif atau dengan sulfat aktif, terutama di hati. Suatu metabolit yang secara terapeutik masih dapat digunakan lagi dan digunakan terutama secara lokal pada perubahan-perubahan kelamin adalah estriol (Mutschler, 1991).

2.2.4. Estrogen Sintetis

Estrogen mempunyai jangka waktu masa kerja singkat dalam pemberian secara parenteral bahkan hormon ini tidak berkhasiat bila diberikan secara oral, maka saat ini telah dikembangkan turunan-turunan estradiol yang mempunyai waktu kerja lebih lama atau secara oral pun dapat berkhasiat. Misalnya Ester estradiol yang memiliki jangka waktu kerja lebih panjang dan diabsorpsi lebih

lambat serta diuraikan lebih lambat setelah penyuntikan dengan larutan minyak (Hardjopranjoto, 1995).

Etinil estradiol diperoleh jika suatu gugus etinil dimasukan pada C-17. Senyawa ini diinaktifasi dengan lambat dan dapat diberikan secara oral. *Etinil estradiol* dan 3-metil eternya (*mestranol*) termasuk dalam estrogen yang paling sering digunakan. Sediaan analognya adalah *kuinestrol* (*Estrovis*) (Hardjopranjoto, 1995; Mutschler, 1991).

Menurut Ganong (1999) turunan *etinil estradiol* adalah suatu estrogen kuat dan tidak seperti estrogen alami, turunan ini resisten terhadap metabolisme hati, oleh karena itu dapat diberikan secara peroral. Aktivitas hormon-hormon alami rendah bila diberikan secara oral karena dari usus melalui vena porta menuju ke hati dan dibuat tidak aktif sebelum mencapai sirkulasi umum.

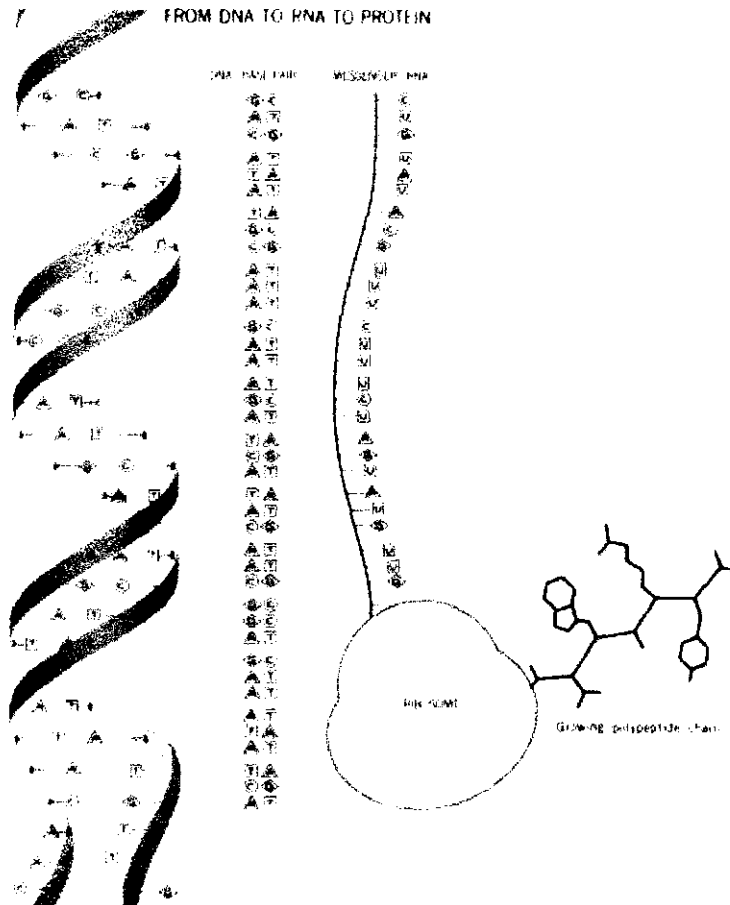
2.3. Protein

Protein dapat memerankan fungsi sebagai bahan struktural. Selain itu protein juga dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi-reaksi kimia dalam sistem makhluk hidup. Makromolekul ini mengendalikan jalur dan waktu metabolisme yang kompleks untuk menjaga kelangsungan hidup suatu organisme. Suatu sistem metabolisme akan terganggu apabila biokatalis yang berperan di dalamnya mengalami kerusakan (Hertadi, 2002).

Setiap protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas untuk protein tersebut dan berbeda dengan protein lain. Struktur ini dihubungkan oleh ikatan peptida yang merupakan ikatan kovalen sangat kuat dan sukar untuk

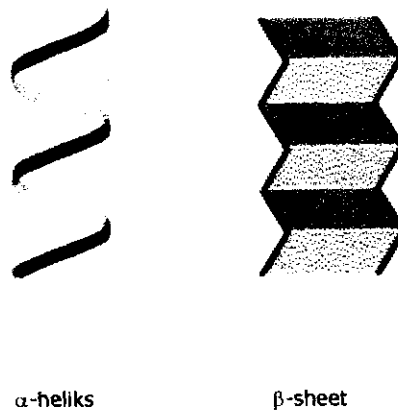
dirusak dan disebut sebagai struktur primer. Rantai peptida dari ikatan primer biasanya berbentuk spiral dan memiliki sifat-sifat geometrik yang khas (α heliks). Struktur ini merupakan struktur sekunder yang dipertahankan oleh ikatan hidrogen dan ikatan disulfida. α heliks tersebut meliuk-liuk sehingga terjadi bentukan bulat atau elipsoid yang merupakan bentuk molekul protein. Bentukan ini disebut struktur tersier protein. Struktur tersier ini dipertahankan oleh ikatan hidrogen dan gaya-gaya Van der Waals. Sejumlah protein lain memiliki ikatan kuartener, yaitu bila protein tersebut terdiri atas lebih dari satu rantai polipeptida yang ikatannya dipertahankan oleh ikatan hidrogen dan ikatan elektrostatik (Murray *et al.*, 1999).

Menurut Rukman Hertadi (2002), protein dapat memerankan berbagai fungsi dalam sistem makhluk hidup tergantung pada strukturnya. Struktur primer protein terdiri dari asam amino yang dihubungkan satu sama lain secara kovalen melalui ikatan peptida. Informasi yang menentukan urutan asam amino suatu protein tersimpan dalam molekul DNA dalam bentuk kode genetik. Mula-mula kode ini disalin ke dalam bentuk kode lain yang berpadanan dengan urutan kode genetik pada DNA, yaitu dalam bentuk molekul RNA, kemudian kode genetik ini diterjemahkan menjadi asam-asam amino yang membangun struktur primer protein. Urutan RNA ini yang kemudian diterjemahkan menjadi urutan asam amino (Gambar – 2) (Murray *et al.*, 1999).



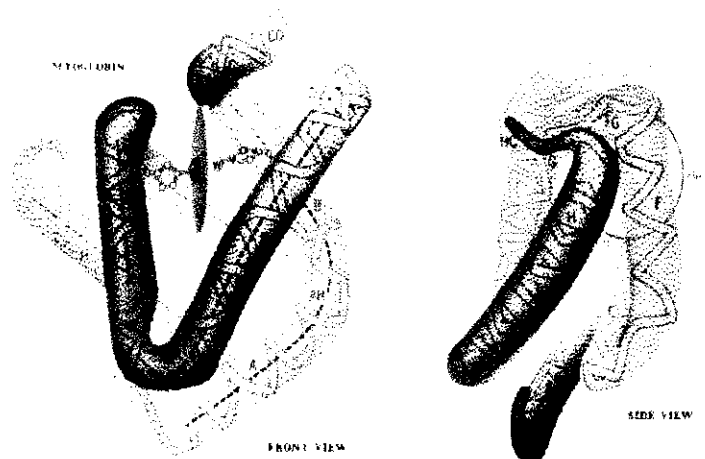
Gambar 2. Skema Aliran Informasi Genetik dari DNA ke Protein
(Sumber: Hertadi, 2002)

Struktur sekunder protein sudah mengalami interaksi intra molekuler, melalui rantai samping asam amino. Ikatan yang membentuk struktur ini didominasi oleh ikatan hidrogen antar rantai samping yang membentuk pola tertentu tergantung pada orientasi ikatan hidrogennya. Ada dua jenis ikatan sekunder, yaitu α -heliks dan β -sheet (Gambar – 3). β -sheet ada yang paralel dan ada juga yang anti paralel, bergantung pada orientasi kedua rantai polipeptida yang membentuk struktur sekunder tersebut (Hertadi, 2002).



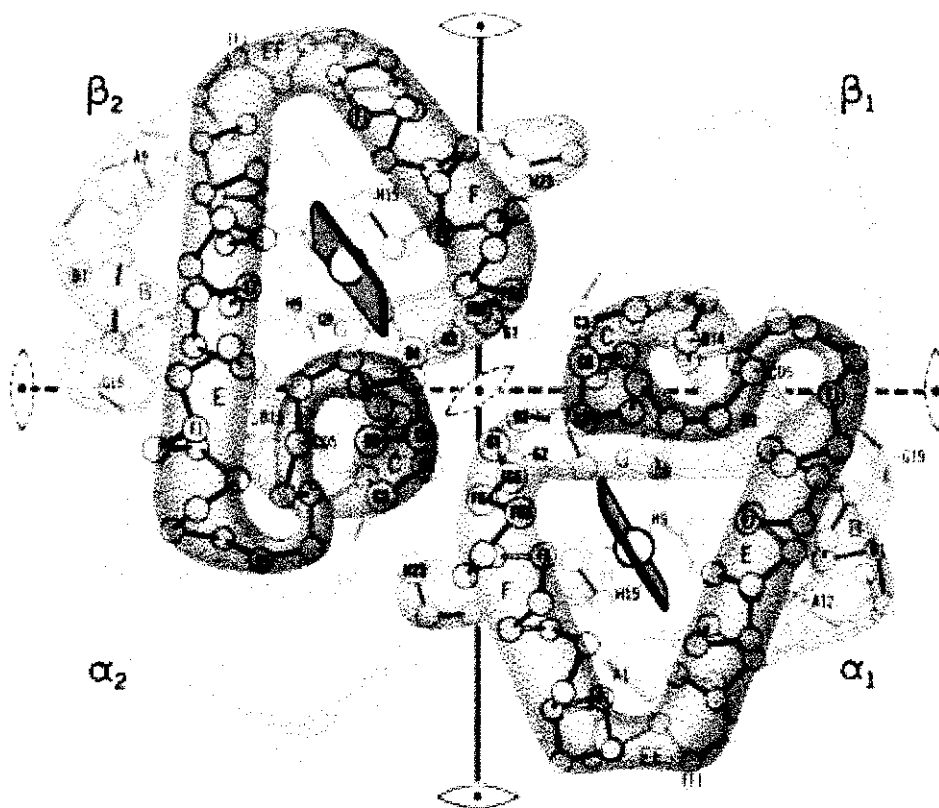
Gambar-3. Struktur Sekunder Protein (Sumber: Hertadi, 2002)

Struktur sekunder ini kemudian dikemas sedemikian rupa sehingga membentuk struktur tiga dimensi. Struktur ruang ini dinamakan struktur ketiga atau struktur tersier. Interaksi intra molekuler seperti ikatan hidrogen, ikatan ion, van der Waals, hidrofobik dan lain-lain turut menentukan orientasi struktur tiga dimensi dari protein pada struktur tersier ini (Gambar – 4).



Gambar-4. Struktur Tersier Protein (Sumber: Hertadi, 2002)

Banyak molekul protein yang memiliki lebih dari satu struktur tersier, dengan kata lain multi subunit. Interaksi intermolekul antar subunit protein ini membentuk struktur keempat/kuartener (Gambar – 5). Setiap subunit protein ini dapat melakukan komunikasi dan saling mempengaruhi satu sama lain melalui interaksi intermolekuler ini (Hertadi,2002).



Gambar-5. Struktur Kuartener Protein (Sumber: Hertadi, 2002)

Protein adalah molekul organik yang terbanyak di dalam sel. Selain itu protein adalah biomolekul yang sesungguhnya, karena senyawa ini yang menjalankan berbagai fungsi dasar kehidupan, antara lain protein berperan dalam

kontraksi melakukan gerakan pada otot. Protein juga berperan membawa informasi dari luar ke dalam sel dan di dalam bagian sel sendiri. Selain itu protein mengendalikan dapat tidaknya, serta waktu yang tepat untuk pengungkapan informasi yang terkandung di dalam DNA, yang diperlukan untuk sintesis protein itu sendiri. Jadi secara tidak langsung protein mengatur perbanyakannya sendiri dengan mengatur DNA, yang merupakan alat perekam informasi untuk protein, sehingga dengan demikian operasinya di bawah kendali protein (Ganong, 1999; Murray *et al.*, 1999).

Beberapa protein disintesis di dalam hati, salah satunya adalah protein vitellogenin. Protein ini disintesis atas pengaruh hormon estrogen dan merupakan prekursor kuning telur yang ditranspor menuju uterus melalui serum (Heppel *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2000).

Protein apapun dan berasal dari makhluk apapun juga ternyata hanya tersusun dari 20 macam asam amino saja. Perbedaan protein satu dengan yang lain disebabkan oleh jumlah dan kedudukan asam-asam amino tersebut di dalam tiap molekul. Keduapuluh asam amino tersebut mempunyai ciri umum sebagai berikut, pertama semua mempunyai konfigurasi L, kedua sama-sama mempunyai 1 gugus COOH dan 1 gugus NH₂ yang terikat ke atom C. Perbedaan individual dari asam amino ini disebabkan oleh rantai samping, yang menyebabkan perbedaan kimia antara asam-asam amino tersebut, pada gilirannya akan menyebabkan perbedaan sifat kimia dan biologis dari molekul protein yang disusunnya. Rantai samping R ini tidak ikut membentuk ikatan peptida. Muatan suatu protein dalam suatu larutan ditentukan oleh gugus NH₂ bebas di suatu ujung

dan gugus COOH bebas di ujung yang lain serta jumlah rantai yang bermuatan (Ganong, 1999).

Protein plasma dipisahkan dan diukur secara kimia dengan prosedur yang menggunakan elektroforesis, pewarnaan, dan skanning densitrometrik. Apabila darah dibiarkan menjendal, beberapa protein plasma turut menyumbang pembentukan matriks penjendalan tersebut. Larutan yang dihasilkan, yang mengandung fibrinogen, fibrin dan beberapa faktor penjendal dinamakan serum. Plasma darah adalah cairan supernatan yang diperoleh dengan mengendapkan secara sentrifugal sel-sel darah pada keadaan tidak terjadi penjendalan (Montgomery *et al.*, 1993).

Protein-protein yang terdapat dalam serum darah dapat dibedakan melalui elektroforeis. Selain itu bahan kimia (termasuk protein) dapat menyerap dan menghantarkan cahaya. Suatu larutan mempunyai warna tertentu karena larutan ini dapat menyerap semua warna kecuali warna yang dapat ditangkap oleh mata. Melalui teknik spektrofotometri, cahaya dari sumber cahaya diuraikan dengan menggunakan prisma sehingga diperoleh cahaya monokromatis yang diserap oleh zat yang diperiksa (Soewoto dkk, 2001).

2.4. Elektroforesis

Suatu larutan dengan pH tertentu yang mengandung protein-protein berbeda-beda dapat mempunyai muatan-muatan listrik yang berbeda pula, karena susunan dan jumlah asam amino yang tidak sama. Bila campuran protein dalam larutan tersebut diletakan dalam suatu medan listrik, tiap protein akan bermigrasi

ke kutub berlawanan dengan muatan protein yang bersangkutan. Makin besar nilai mutlak muatan protein itu, makin jauh jarak yang ditempuhnya. Dengan demikian protein – protein tersebut terpisahkan sesuai muatannya. Protein yang tidak bermuatan pada pH larutan ($\text{pH larutan} = \text{pH protein yang bersangkutan}$), tidak bergerak dalam medan listrik.

Pemisahan protein tersebut dilakukan dalam suatu medium berpori yang telah dibasahi larutan dengan pH tertentu. Medium berpori yang biasa digunakan adalah membran selulose asetat. Pemisahan protein dilakukan dengan meletakkan membran selulose asetat yang telah direndam dalam dapar tersebut dan telah dimuati dengan protein misalnya serum diantara dua elektroda. Setelah arus listrik dijalankan selama beberapa waktu dan pemisahan telah terjadi, protein yang berada di membran tersebut diwarnai dengan pewarna khusus. Pewarnaan yang lazim dipakai untuk mewarnai protein adalah hitam amido, biru Coomassie berlian atau Ponceau merah (Soewoto dkk, 2001).

Prinsip elektroforesis antara lain yaitu jika suatu larutan campuran protein ditempatkan diantara dua elektrode, molekul yang bermuatan akan berpindah ke salah satu elektrode dengan kecepatan tergantung pada muatan bersihnya, dan tergantung pada medium penyangga yang digunakan merupakan bahan padat seperti gel pasif, lembaran kertas atau selulose asetat, bagian – bagian dapat dipotong untuk memperoleh sampel–sampel masing–masing protein yang murni atau yang pekat yang membentuk campuran. Selain itu dapat juga keseluruhan gel atau lembaran diwarnai dengan reagen yang bereaksi dengan protein, sehingga memungkinkan peragaan visual pemisahannya. Teknik

pemisahan semacam ini tergantung dari pergerakan molekul yang bermuatan (Montgomery *et al.*, 1993).

Molekul protein merupakan molekul dengan tingkat kompleksitas atau kerumitan yang tinggi. Selain berbeda satu sama lain karena perbedaan muatan listriknya, protein mungkin pula berbeda karena berat molekul atau ukuran molekulnya. Perbedaan tersebut disebabkan oleh jumlah asam amino yang menyusun protein.

Berdasarkan perbedaan berat atau ukuran molekul ini, protein dapat dipisahkan satu sama lain dengan teknik elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid sebagai medium pemisah (*Poliakrilamid Gel Elektroforesis-Sodium Dodesil Sulfat / SDS-PAGE*). Melalui teknik ini mula-mula protein didenaturasi dengan pemanasan dalam larutan dapar yang mengandung Sodium Dodesil Sulfat (SDS). Denaturasi dalam SDS panas ini akan memberikan muatan negatif pada seluruh protein dalam larutan, karena terjadi interaksi hidrofobik antara molekul protein dengan molekul SDS. Interaksi ini sebanding dengan ukuran molekul protein. Jadi semakin besar ukuran molekul suatu protein, makin banyak muatan negatif hasil interaksi protein dengan SDS. Selanjutnya bila diberi medan listrik, kompleks protein terdenaturasi SDS di dalam gel poliakrilamid akan berjalan ke satu arah, yaitu kutub positif (anoda). Jarak yang ditempuh ditentukan oleh ukuran molekul dalam menembus pori – pori gel. Makin kecil molekul tersebut, makin jauh jarak yang ditempuh. Dengan demikian terjadilah pemisahan protein berdasarkan berat molekul. Pada umumnya teknik pemisahan protein dengan elektroforesis ini digunakan untuk tujuan analisis (Soewoto dkk, 2001).

2.5. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu teknik spektroskopik di mana pada spektrometernya dilengkapi dengan detektor yang bersifat foto elektrik. Teknik spektroskopik adalah salah satu teknik analisis fisiko-kimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Pada prinsipnya interaksi REM dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua macam dari ketiga kejadian yang mungkin terjadi. Ketiga macam kejadian yang mungkin terjadi sebagai akibat interaksi atom atau molekul dengan REM adalah hamburan (*scattering*), absorpsi (*absorption*), dan emisi (*emision*) REM oleh atom atau molekul yang diamati.

Hamburan REM oleh atom atau molekul melahirkan spektrofotometri Raman, absorpsi melahirkan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah, sedangkan absorpsi disertai emisi melahirkan fotoluminesensi yang kemudian lebih dikenal sebagai fluoresensi dan fosforesensi (Mulja dan Suharman, 1995).

Teknik spektrofotometri telah lama digunakan sebagai suatu teknik yang handal untuk deteksi, identifikasi dan pengukuran kadar senyawa kimia dalam larutan.

Dasar dari teknik spektrofotometri ini antara lain yang pertama adalah adanya bahan kimia dapat menyerap dan menghantarkan cahaya, kedua : suatu larutan mempunyai warna tertentu karena larutan ini dapat menyerap semua warna kecuali warna yang dapat ditangkap oleh mata. Misalnya suatu larutan warna merah, karena larutan ini menyerap cahaya pada daerah kuning – biru,

sedangkan cahaya pada panjang gelombang warna merah akan diteruskan sehingga dengan mata tampak berwarna merah.

Spektrum cahaya yang dapat dilihat oleh mata terentang anatar 400 nm sampai 800 nm. Pada teknik spektrofotometri, cahaya dari sumber cahaya diuraikan dengan menggunakan prisma sehingga diperoleh cahaya monokromatis yang diserap oleh zat yang akan diperiksa. Cahaya monokromatis merupakan cahaya satu warna dengan satu panjang gelombang, sehingga cahaya yang diserap oleh larutan dapat diukur (Soewoto dkk, 2001).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III
MATERI DAN METODE
PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang percobaan Laboratorium Produksi Ternak, kemudian dilanjutkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Sedangkan teknik pelaksanaan Spektrofotometri dan Elektroforesis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dimulai pada tanggal 11 Agustus sampai dengan 25 Agustus 2002.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian adalah 9 ekor ayam buras dengan jenis kelamin betina, terdiri dari empat ekor ayam muda berumur satu setengah bulan sebagai kontrol dan lima ekor ayam dewasa berumur empat setengah bulan sebagai perlakuan. Semua ayam ini dibeli dari peternak ayam semi intensif dari Gresik.

Bahan penelitian yang digunakan adalah estrogen sintetis *etinil estradiol* produksi Wonder Pharmaceutical Indonesia dengan nama dagang *Ovalumon*, dalam vial 60 ml, aquades steril, alkohol 70 %, spuit 1 ml untuk perlakuan estrogen.

Perlengkapan yang digunakan antara lain kandang ayam sistem battery untuk memisahkan ayam perlakuan dan kontrol. Untuk pengambilan serum darah ayam dengan menggunakan spuit 5 ml, tabung reaksi, tabung sentrifuge, alat sentrifugasi.

Peralatan untuk elektroforesis antara lain pipet volumetrik, pipet tetes, pipet Eppendorf + lips, tabung mikro 1,5 ml, sarung tangan, parafilm, klem, penangas air, sentrifuse mikro, vorteks, *power supply*, serta peralatan khusus elektroforesis (lempeng kaca, spacer, penjepit).

Bahan gel untuk proses elektroforosis antara lain diperlihatkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Bahan gel

No.		Separating gel	Stacking gel
1.	H ₂ O	3400 μ l	2950 μ l
2.	Gel Buffer	2600 μ l	1250 μ l
3.	T-acryl	4000 μ l	800 μ l
4.	APS	160 μ l	30 μ l
5.	TEMED	16 μ l	20 μ l

Bahan-bahan lain dalam teknik elektroforesis antara lain sampel protein serum, running buffer, Isobutanol, pewarna Commasie Brilliant Blue, campuran RSB (*Reducing Sample Buffer*) yaitu : Tris HCl pH 6,8, SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*), Gliserol atau sukrosa, Tracking dye : biru bromfenol (BPB) serta larutan pencuci terdiri dari : metanol, asam asetat, akuades.

Alat dan bahan untuk teknik spektrofotometri antara lain Spektrofotometer UV-Vis, kuvet, larutan standar (*Bovine Serum Albumin*), serum darah ayam, akuades, reagen Biuret.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Perlakuan Hewan Percobaan

Seluruh ayam ditempatkan ke dalam kandang selama tiga hari terlebih dulu untuk proses adaptasi. Kemudian selama tiga hari berturut-turut diberi perlakuan estrogen 0,2 ml pada ayam perlakuan. Perlakuan selama tiga hari tersebut diharapkan estrogen sudah direspon dengan baik oleh sel hati (Mosconi *et al.*, 2000).

Setelah perlakuan tersebut pada hari ketiga diambil sampel darah pada seluruh ayam untuk diisolasi serumnya. Serum yang didapat diperiksa dengan metode elektroforesis dan spektrofotometri

3.3.2. Elektroforesis

3.3.2.1. Teknik Elektroforesis

1. *Sparating gel (Lower Gel Buffer)* dibuat dengan mencampur semua bahan kecuali APS dan TEMED, lalu dihilangkan gelembungnya (degas).
2. Ditambahkan APS dan TEMED secara berurutan. Diaduk agar homogen tanpa divortek. Dimasukan dalam plate. Dibiarkan selama 10-30 menit sampai gel mengeras.
3. *Stacking gel (Upper gel)* dibuat dengan cara sama tapi tanpa degas.

4. Setelah *sparating gel* mengeras, *stacking gel* dituang di atasnya dan dipasang sisir sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran.
5. Plate dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel dan running buffer dituangkan pada alat tersebut
6. Sampel dipreparasi dengan RSB (Reducing Sampel Buffer), dipanaskan pada 95°C sampai dengan 100°C selama 1-3 menit.
7. Diambil 20 ml dan dimasukkan ke dalam sumuran
8. Hubungkan alat elektroforesis dengan *power supply*, jalankan elektroforesis pada 250 V, 40 mA, 1-2 jam.
9. Gel hasil running diwarnai dengan commasie brilliant blue selama 30 menit, kemudian dishaker
10. Dicuci dengan larutan pencuci, kemudian dishaker selama 24 jam.

3.3.2.2. Penghitungan Massa Molekul Relatif Protein

Massa molekul relatif protein ini dapat ditentukan dengan mengkonversi data nilai Rf sampel pada persamaan polinomial $y = 0,8943x^2 - 1,8784x + 2,3239$, yang diperoleh dari penghitungan Rf dan nilai logaritma Mr protein standar (Lampiran 1).

3.3.3. Teknik Spektrofotometri

3.3.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Mula-mula disediakan dua tabung kuvet, pada tabung pertama dimasukkan 5 ml akuades (sebagai blanko) pada tabung kedua 5 ml larutan standar 5000 ppm. Kemudian serapan larutan dibaca pada panjang gelombang antara 500 – 600 nm dengan interval 10 nm.

Pada panjang gelombang 550 nm (lampiran 2) terjadi absorbansi terbesar, yaitu 0,311. Oleh karena itu untuk seterusnya pengukuran konsentrasi sampel diukur pada panjang gelombang 550 nm.

3.3.3.2. Penentuan Kurva Baku Standar

Disiapkan 5 tabung yang kemudian diisi 1 ml larutan Standar dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800 ppm, ditambahkan masing-masing 4 ml reagen Biuret dan 0,5 ml akuades, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 550 (lampiran 2).

3.3.3.3. Penentuan Kadar Protein Menurut Metode Biuret

Sampel protein diambil dan ditambahkan masing-masing 200 μ l reagen Biuret serta akuades hingga volume larutan sampel 1000 μ l. Blanko yang digunakan dengan penambahan 200 μ l reagen Biuret serta akuades hingga 1000 μ l.

Kadar protein ditentukan dengan cara mengkonversi data absorbansi dengan menggunakan persamaan regresi linier kurva serum darah ayam $y = 1,3233 \cdot 10^{-3} \cdot x$, yang didapat dari penghitungan melalui kurva baku standar (Sumitro dkk, 1996)

BAB IV

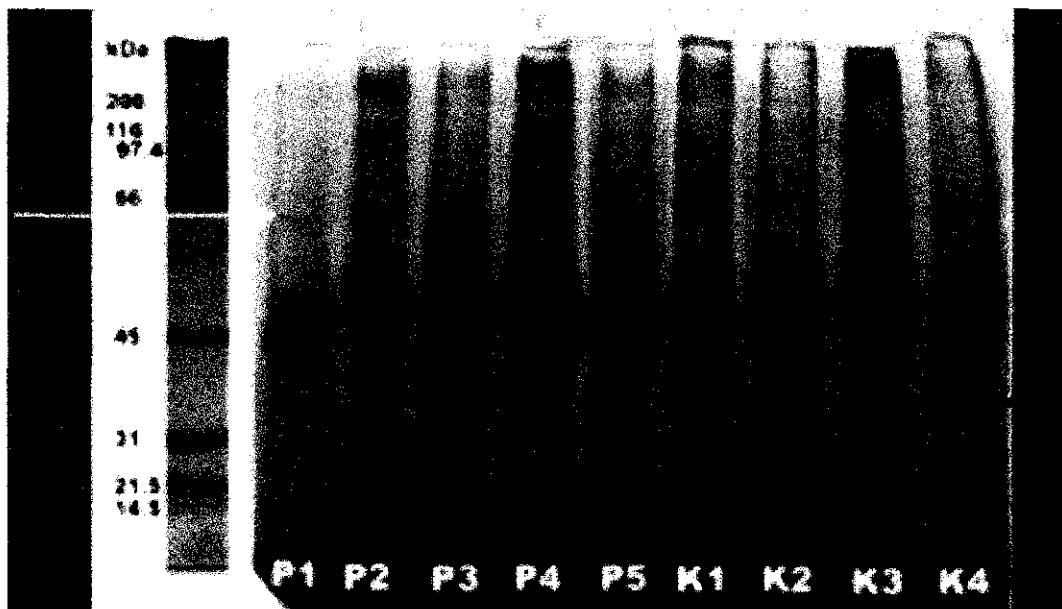
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Elektroforesis

Hasil pengamatan terhadap beberapa parameter serum darah ayam setelah pemberian estrogen selama 3 hari, yang telah diperiksa dengan metode elektroforesis dapat dilihat pada gambar 6 berikut :



Gambar 6. Gambaran Elektroforesis serum darah ayam perlakuan dan kontrol

Keterangan : Perlakuan = P1, P2, P3, P4, P5
Kontrol = K1, K2, K3, K4

Hasil Elektroforeis serum darah ayam menunjukkan perbedaan letak antara band-band serum darah ayam perlakuan dan serum darah ayam kontrol. Pada serum ayam perlakuan dan kontrol terlihat adanya persamaan garis pita pada

berat molekul 45 kD. Namun terdapat pula pita pada berat molekul 65 kD yang hanya dimiliki serum ayam perlakuan tapi tidak dimiliki serum ayam kontrol.

4.2. Spektrofotometri

Hasil spektrofotometri pada kesembilan tabung larutan sampel sekaligus penghitungan konsentrasi sampel ditunjukkan pada tabel 2.

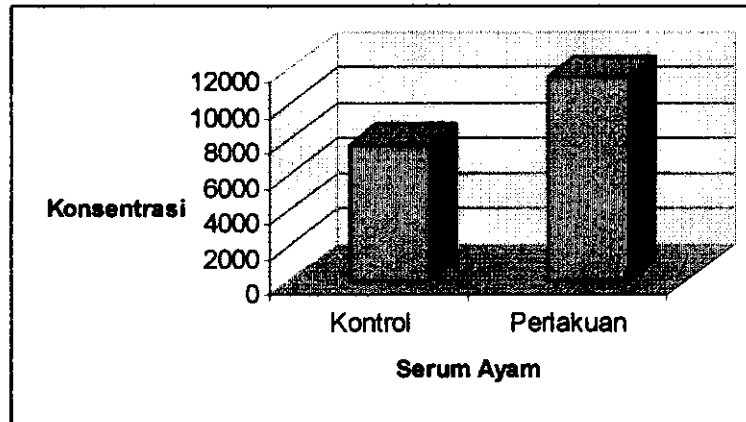
Tabel 2. Hasil spektrofotometri

Sampel	Jumlah Sampel ⁴ (μ l)	H ₂ O (μ l)	Biuret (μ l)	Absorpsi (y)	Konsentrasi ³ (ppm) (x)
¹ K ₂	300	500	200	0,391	9849
K ₃	350	450	200	0,349	7535
K ₄	450	350	200	0,335	5627
² P ₁	250	550	200	0,431	13028
P ₂	300	500	200	0,477	12015
P ₃	360	440	200	0,443	9299
P ₄	300	500	200	0,560	14106
P ₅	350	450	200	0,411	8874

Keterangan :

K : Kontrol

P : Perlakuan



Gambar 7. Perbedaan Konsentrasi (ppm) Serum Ayam Kontrol dan Perlakuan

Hasil spektrofotometri menunjukkan perbedaan secara rata-rata konsentrasi protein serum ayam perlakuan yaitu 11.464,4 ppm dan konsentrasi protein serum ayam kontrol yaitu 7.670,3 ppm.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Elektroforesis

Hasil Elektroforeis serum darah ayam menunjukkan perbedaan letak antara band-band serum darah ayam perlakuan dan serum darah ayam kontrol. Hormon estrogen yang diberikan akan ditranspor melalui pembuluh darah dan sebagian besar akan diikat oleh protein pengikat hormon yang dihasilkan dari *hepar*. Setelah diikat oleh protein dan diedarkan oleh pembuluh darah akan menuju target organ, kemudian ikatan hormon protein akan putus, masuk ke sel target menimbulkan aktivitas dalam sel target (Anonimus, 1999; Anonimus^b,2002).

Ganong (1999) juga menjelaskan bahwa sebagian estrogen berada dalam darah dan sisanya terikat dengan protein. Hal ini berarti kandungan protein dalam estrogen dapat diketahui dengan melihat perbedaan berat molekul protein yang dapat diketahui dari pemeriksaan elektroforesis.

Pemberian estrogen akan merangsang gen vitellogenin di hati untuk membentuk protein vitellogenin. Protein ini ditranspor menuju oviduk melalui serum. Hal inilah yang menyebabkan perbedaan band-band antara ayam perlakuan dengan pemberian estrogen dan ayam kontrol (Heppel *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2000).

Melalui pemeriksaan elektroforesis, protein-protein yang berbeda dapat mempunyai muatan-muatan listrik yang berbeda pula, karena susunan dan jumlah

asam amino yang tidak sama. Bila campuran protein dalam larutan tersebut diletakan dalam suatu medan listrik, tiap protein akan bermigrasi ke kutub berlawanan dengan muatan protein yang bersangkutan. Makin besar nilai mutlak muatan protein itu, makin jauh jarak yang ditempuhnya. Dengan demikian protein – protein tersebut terpisahkan sesuai muatannya. Protein yang tidak bermuatan pada pH larutan ($\text{pH larutan} = \text{pH protein yang bersangkutan}$), tidak bergerak dalam medan listrik. Pemisahan protein tersebut dilakukan dalam suatu medium berpori yang telah dibasahi larutan dengan pH tertentu. Medium berpori yang biasa digunakan adalah membran selulose asetat. Pemisahan protein dilakukan dengan meletakan membran selulose asetat yang telah direndam dalam dapar tersebut dan telah dimuati dengan protein misalnya serum di antara dua elektroda. Setelah arus listrik dijalankan selang beberapa waktu dan pemisahan telah terjadi (Soewoto dkk, 2001).

5.2. Spektrofotometri

Hasil spektrofotometri menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi antara serum darah kontrol dengan perlakuan. Menurut Ganong (1999) yang diterjemahkan oleh Djauhari menjelaskan bahwa dua persen estradiol dalam darah berada dalam keadaan bebas, dan sisanya terikat pada protein.

Adanya perbedaan konsentrasi yang cukup besar antara serum darah kontrol dengan perlakuan disebabkan oleh penambahan estrogen pada ayam perlakuan. Estrogen akan merangsang gen vitellogenin untuk membentuk protein vitellogenin yang merupakan prekursor kuning telur. Protein ini akan ditranspor

menuju oviduk melalui serum (Heppel *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2003; Mosconi *et al.*, 2000). Adanya bahan kimia (dalam hal ini adalah protein dalam serum) dapat menyerap dan menghantarkan cahaya, sehingga konsentrasi protein dalam serum dapat diketahui melalui spektrofotometri (Soewoto dkk, 2001).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan yaitu pada gambaran elektroforesis menunjukkan adanya protein yang terdapat pada ayam perlakuan tetapi tidak terdapat pada ayam kontrol, yaitu pada berat molekul 65 kD. Begitu juga pada pemeriksaan spektrofotometri menunjukkan konsentrasi protein serum ayam perlakuan secara rata-rata lebih tinggi dibanding serum ayam kontrol.

6.2. Saran

Saran yang diajukan dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi macam-macam protein pada serum ayam atas pengaruh estrogen berdasarkan berat molekul.

RINGKASAN

Penelitian tentang pengaruh pemberian estrogen terhadap gambaran protein serum darah ayam telah dilakukan pada tanggal 11 Agustus – 25 Agustus 2002 di bawah bimbingan Bapak Suryanie Sarudji, Mkes., Drh dan Ibu Rahayu Kusdarwati, Mkes., Ir.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian estrogen terhadap berat molekul dan konsentrasi protein serum darah ayam melalui pemeriksaan elektroforesis dan spektrofotometri.

Penelitian ini menggunakan empat ekor ayam buras umur 1,5 bulan sebagai kontrol dan lima ekor ayam buras umur 4,5 bulan sebagai perlakuan. Pemberian estrogen dilakukan setiap hari selama tiga hari pada ayam perlakuan, kemudian seluruh ayam diambil serum darahnya untuk diperiksa dengan teknik elektroforesis dan spektrofotometri.

Hasil pemeriksaan ditunjukkan secara diskriptif dengan visualisasi elektroforesis dan penghitungan massa molekul relatif protein serum. Penelitian ini menunjukkan perbedaan antara ayam perlakuan yang diberi estrogen dan ayam kontrol tanpa pemberian estrogen. Data yang diperoleh dari pemeriksaan spektrofotometri melalui penghitungan konsentrasi protein serum ayam perlakuan dan serum ayam kontrol juga menunjukkan perbedaan.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus^a. 2002. Anabolik Steroid Boleh Diberikan Asal... [.http://www.astaga.com/sehat/pria/artikel.php?article_id=46295](http://www.astaga.com/sehat/pria/artikel.php?article_id=46295).
- Anonimus^b. 2002. Pengaruh Hormon Dalam Perkembangan Kanser. Bab 5. <http://www.penerbit.ukm.my/kanser/bab5.html>.
- Anonimus. 1999. Hormon Steroid Ovarium. <http://www25.brinkster.com/kedokteran99/berita/fisio160102.htm>.
- Anonimus. 2001. Estrogen dan Osteoporosis. <http://www.tempointeraktif.com/medika/arsip/042001/index-isi.asp?file=pus-2>.
- Ganong, W.F. 1999. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 289-436.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. 43 – 53.
- Heppel, S.A., Denslow, N.D., Folmar, L.C., Sullivan, C.V. 1995. Universal Assay of Vitellogenin as a Biomarker for Environmental Estrogens. <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/1995/suppl-7/heppell.html>.
- Hertadi, R. 2002. Keajaiban Protein: Molekul Biomillennium. <http://wwwstd.ryu.titech.ac.jp/~indonesia/tokodai/aken/iken-rukman.htm>.
- Lodish H., J. Darnell and D. Baltimore. 1986. Molecular Cell Biology. Scientific American Books.53-68.
- Mills, L.J., Ruth E.G.G., Horowitz, D.C., Denslow, N.D., Chow, M.C., Zarogian, G.E. 2003. Relationship between Reproductive Success and Male Plasma Vitellogenin Concentrations in Cunner, *Tautoglabrus adspersus*. <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2003/5531/abstract.html>.
- Montgomery, R., Dryer, R.L., Conway, Thomas W., Spector, Arthur A. 1993. Biokomia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 110-113.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Habibi H.R., Polzonetti A.M. 2000. Mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead Sparus aurata. <http://www.nwfc.noaa.gov/Isfe/abstracts/ISFE-ab4.300.1184.html>.
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. Analisis Instrumental. Airlangga University Press. Surabaya. 75-101.

- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 1999. Biokimia Harper. Edisi 24. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 42 – 596.
- Mutschler, E. 1991. Dinamika Obat. Edisi 5. Penerbit ITB. Bandung. 369-371.
- Soeharto, I. 2002. Kolesterol dan Lemak Jahat Kolesterol dan Lemak Baik dan Proses Terjadinya. PT. Gramedia Pustaka Tama. Jakarta. 6-50.
- Soewoto, H., Sadikin, M., Kurniati, V., Wanandi, S.I., Dwirini, R., Abadi, P., Prijati, A.R., Harahap, I.P., Jusman, S.W.A. 2001. Biokimia Eksperimen Laboratorium. Bagian Biokimia FKUI. Jakarta. 8-66.
- Sumitro, S.B., Rahayu, S., Fatchiyah, Widyarti, S., Arumingtyas, E.L. 1996. Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya Malang. 11-36.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Massa Molekul Relatif Sampel Protein

Tabel 3. Penentuan Massa Molekul Relatif dan Rf Protein Standar

¹ Rf	² Mr (kDa)
0,0348	200
0,1310	116
0,1724	97,4
0,2103	66
0,4621	45
0,7172	31
0,9930	21,4

Keterangan :

Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal

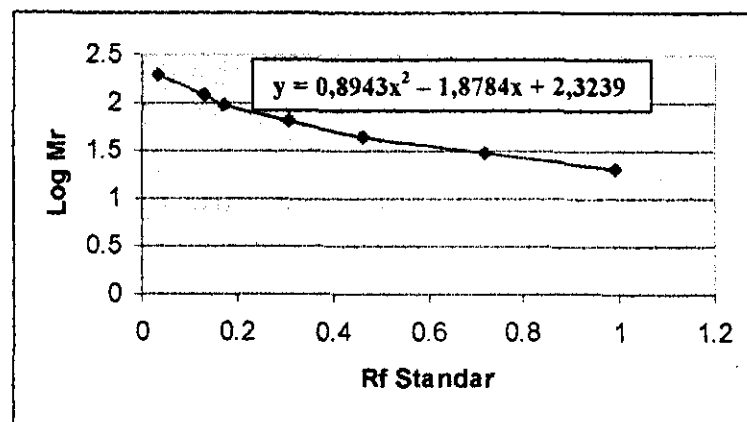
$${}^1Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal

²Mr (kDa) : Massa molekul relatif (kilo Dalton)

Tabel 4. Pembuatan Kurva Standar

Mr standar (kDa)	Log Mr (y)	Rf Standar (x)	y^2	x^2	xy
200	2,301	0,0348	5,2946	0,0012	0,0801
116	2,0792	0,1310	4,3231	0,0172	0,2724
97,4	1,9868	0,1724	3,9474	0,0297	0,3425
66	1,8209	0,3103	3,3157	0,0963	0,5650
45	1,6435	0,4621	2,7011	0,2135	0,7595
31	1,4771	0,7172	2,1818	0,5144	1,0594
21,4	1,3222	0,9930	1,7482	0,9860	1,3129
			23,5119	1,8583	4,3918



Gambar 9. Grafik Kurva Standar

Lampiran 2. Penentuan Konsentrasi Protein

Tabel 5. Penentuan Panjang Gelombang

λ (nm)	Absorbansi
500	0,260
510	0,270
520	0,285
530	0,299
540	0,303
550	0,311
560	0,303
570	0,301
580	0,299
590	0,289
600	0,280

Keterangan :

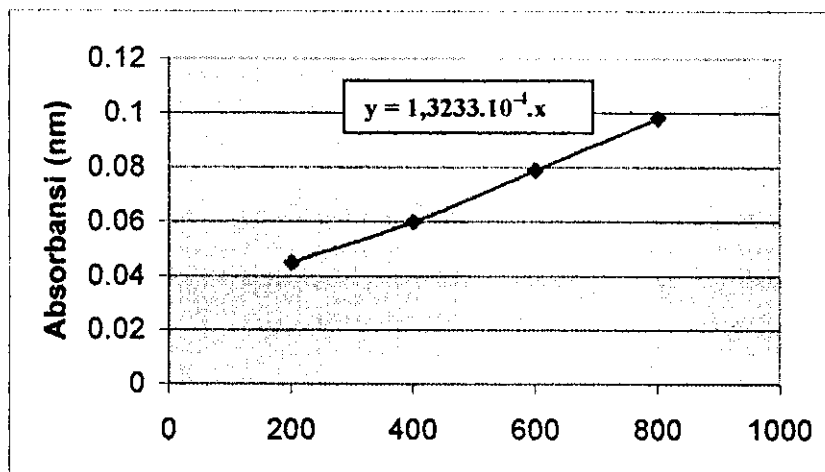
λ (nm) : panjang gelombang (nano meter)

Tabel 6. Pembuatan Kurva Standar

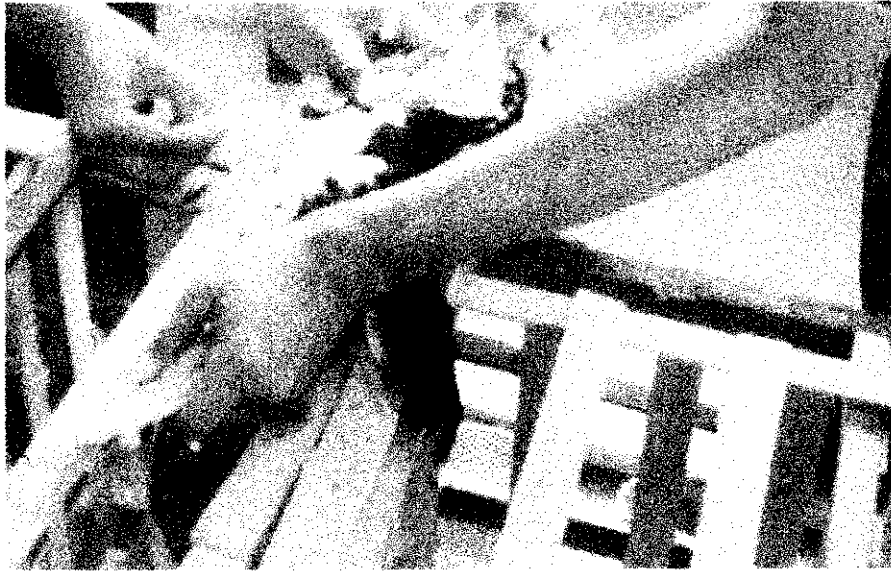
Absorbansi(nm) (y)	Konsentrasi (x)	X ²	Y ²	XY
0	0	0	0	0
0,045	200	4 . 10 ⁴	2,025 . 10 ⁻³	9
0,060	400	16 . 10 ⁴	3,600 . 10 ⁻³	24
0,079	600	36 . 10 ⁴	6,241 . 10 ⁻³	47,4
0,098	800	64 . 10 ⁴	9,604 . 10 ⁻³	78,4
		120 . 10 ⁴	21,47 . 10 ⁻³	158,8

$$a = \frac{\sum XY}{\sum X^2} = \frac{158,8}{120 \cdot 10^4} = 1,3233 \cdot 10^{-4}$$

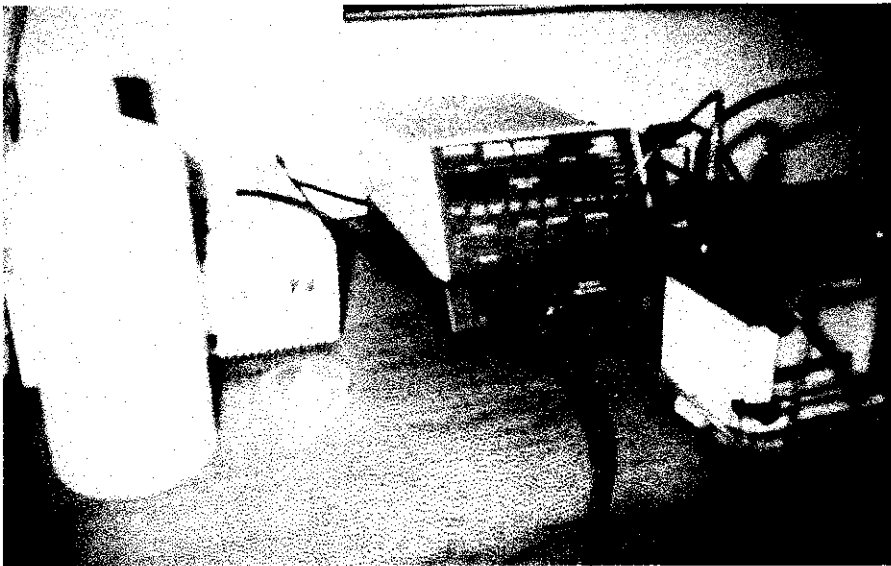
$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{\sum X^2 \sum Y^2}} = \frac{158,8}{\sqrt{(120 \cdot 10^4)(21,47 \cdot 10^{-3})}} = 0,99$$



Gambar 10. Grafik Kurva Standar



Gambar 11. Pengambilan darah ayam



Gambar 12. Peralatan elektroforesis