

SKRIPSI

DETEKSI PROTEIN SERUM DARAH AYAM YANG DISTIMULASI HORMON ESTROGEN DENGAN METODE DOT BLOT



Oleh :

KURNIADI DARMAWAN
SURABAYA-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

DETEKSI PROTEIN SERUM DARAH AYAM YANG DISTIMULASI HORMON ESTROGEN DENGAN METODE DOT BLOT

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

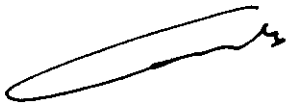
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh :

Kurniadi Darmawan
069812520

Menyetujui

Komisi pembimbing



Sri Chusniati M.Kes., Drh
Pembimbing Pertama

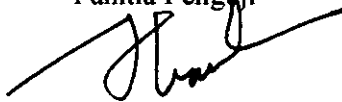


Wiwiek Tyasningsih M.Kes., Drh
Pembimbing Kedua

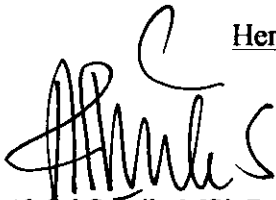
Setelah mempejalari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**.

Menyetujui

Panitia Penguji



Herry Agoes Hermadi, MSi., Drh.
Ketua



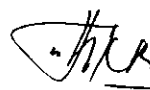
Abdul Samik, MSi., Drh.
Sekertaris



Suryanie Sarudji, M.Kes., Drh.
Anggota



Sri Chusniati, M.Kes., Drh.
Anggota



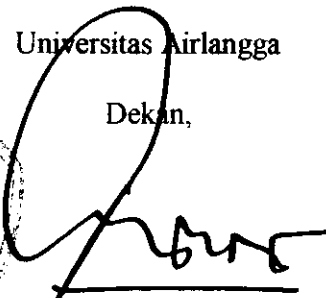
Wiwiek Tyasningsih, M.Kes., Drh.
Anggota

Surabaya 19 Mei 2003

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.
NIP. 130687297



DETEKSI PROTEIN SERUM DARAH AYAM YANG DISTIMULASI HORMON ESTROGEN DENGAN METODE DOT BLOT

KURNIADI DARMAWAN

ABSTRAK

Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat protein tertentu pada protein serum darah ayam yang dihasilkan dari pengaruh stimulasi hormon estrogen.

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok kelinci jantan, yaitu masing-masing kelompok terdiri dari dua ekor kelinci. Kelompok pertama disuntik dengan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, kelompok kedua disuntik dengan protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dan kelompok ketiga disuntik dengan protein kuning telur. Penyuntikan antigen satu kali pada kelinci sebanyak 0,2 ml dengan konsentrasi 100 μ l ditambahkan adjuvan komplit 100 μ l secara subcutan. Dua minggu kemudian diulang lagi setiap satu minggu sekali selama tiga minggu dengan dosis yang sama tetapi menggunakan adjuvan inkomplit. Kemudian dilakukan pengujian reaksi antibodi-antigen dengan metode Dot Blot

Hasil pemeriksaan imunoblotting dengan metode Dot Blot menunjukkan adanya reaksi positif Ag-Ab antara protein serum darah yang distimulasi hormon estrogen dengan protein kuning telur, adanya reaksi positif Ag-Ab antara protein serum darah ayam yang distimulasi dengan hormon estrogen dengan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, dan adanya reaksi negatif Ag-Ab antara protein kuning telur dengan protein serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen.

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan adanya persamaan antara protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan protein kuning telur, adanya persamaan antara protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan protein serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen, dan adanya perbedaan antara protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen dengan protein kuning telur

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan penulisan makalah ini.

Adanya kesamaan protein antara serum darah yang distimulasi hormon estrogen dengan kuning telur, tetapi tidak terdapat pada serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen yang dideteksi melalui metode Dot Blot

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada Ibu Sri Chusniati Mkes., Drh. Sebagai pembimbing pertama, Ibu Wiwiek Tyasningsih Mkes., Drh. Sebagai pembimbing kedua dan Bapak Suryanie Sarudji Mkes., Drh sebagai ketua peneliti DUE-LIKE BATCH III, yang telah banyak memberikan bimbingan, saran dan nasehat mulai dari penelitian sampai selesainya penulisan ini.

Selain itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada bapak Dekan dan staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah membimbing dan mendidik penulis selama menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Hewan ini.

Kepada ayah dan ibu tercinta serta adik tersayang dan teman saya Sony, Nanang, Priyadi, Ermawanto, Danny, Toto, Dini, Rini Duwi, Jenny, dan seluruh mahasiswa FKH'98 rasa terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan atas dorongan, semangat dan doa restunya selama ini.

Penulis menyadari bahwa isi penulisan makalah ini masih jauh dari sempurna, untuk itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga makalah dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya.

Semoga Allah SWT. selalu memberikan Ridho-Nya pada setiap langkah yang kita lakukan. Amin.

Surabaya Mei 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan Terhadap Protein	6
2.2 Tinjauan Terhadap Serum Darah Yang tidak Distimulasi Hormon estrogen.....	7
2.3 Tinjauan Terhadap Protein Kuning Telur.....	8
2.4 Tinjauan Terhadap Protein Serum Darah Yang Distimulasi Hormon Estrogen.....	9
2.5 Tinjauan Terhadap Hormon Estrogen.....	12
2.6 Tinjauan Terhadap Dot Blot.....	13

	Halaman
2.7 Tinjauan Terhadap Antigen.....	14
2.8 Tinjauan Terhadap Antibodi	16
BAB III. MATERI DAN METODE.....	18
3.1 Waktu Dan Tempat	18
3.2 Materi Penelitian.....	18
3.2.1 Bahan Penelitian.....	18
3.2.2 Alat Penelitian.....	19
3.3 Metode Perlakuan Estrogen pada Ayam.....	19
3.4 Metode Dot Blot.....	19
3.5 Metode Penelitian.....	20
3.5.1 Pengujian Reaksi Immunologis Antigen-Antibodi Dot Blot.....	21
3.6 Rancangan Penelitian.....	21
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	22
BAB V . PEMBAHASAN.....	26
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
6.1 Kesimpulan.....	30
6.2 Saran.....	30
RINGKASAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Reaksi Silang Antigen-Antibodi Protein Kuning Telur dengan Protein Serum Darah Ayam yang Distimulasi Hormon Estrogen.....	22
2. Reaksi Silang Antigen-Antibodi Protein Serum yang Distimulasi Hormon Estrogen dengan Protein Serum Ayam yang Tidak Distimulasi Hormon Estrogen	23
3. Reaksi Silang Antigen-Antibodi Protein Kuning Telur dengan Protein Serum Darah Ayam yang Tidak Distimulasi Hormon Estrogen.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Penentuan Kadar Protein Serum Darah dan Kuning Telur.....	38
1.1. Penentuan Kadar Protein menurut Biuret.....	38
1.2. Konsentrasi Massa Protein Serum perlakuan, Serun Kontrol dan Kuning Telur.....	38
2. Metode Penyuntikkan Estrogen Dan Isolasi Protein Serum.....	39
2.1. Metode Penyuntikan Estrogen Pada Ayam.....	39
2.2. Metode Isolasi Protein Serum.....	40
3. Metode Isolasi Protein Kuning Telur.....	41
4. Metode Dot Blot	42

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.

Pada mulanya antibodi di dunia kedokteran dipergunakan sebagai pembentuk imunitas atau kekebalan tubuh terhadap penyakit yang spesifik terhadap antigennya, akan tetapi dalam perkembangannya antibodi dapat dipergunakan untuk berbagai tujuan, sebagai contoh antibodi (Ab) *vitellogenin* dapat menganalisis protein kuning telur pada makanan, mendeteksi lingkungan biologis ikan dan pencemaran limbah industri, serta mengidentifikasi protein hasil kloning (Pichler, 1996).

Ayam betina yang sudah dewasa kelamin berumur 4-5 bulan mampu mengeluarkan hormon estrogen. Hormon estrogen menyebabkan saluran telur berkembang dan terjadi kenaikan kadar kalsium, protein, lemak, vitamin dan substansi lainnya dalam darah yang penting untuk pembentukan telur (Akoso, 1993).

Telur merupakan produk hewan yang kaya protein. Protein kuning telur dihasilkan oleh sel hepar dan protein putih telur dihasilkan oleh sel epitel oviduk karena ekspresi masing-masing gen *vitellogenin* dan *ovalbumin*. Ekspresi gen *vitellogenin* meningkat karena stimulasi hormon estrogen. Estrogen menyebabkan sel epitel yang terletak pada organ oviduk ayam (organ yang menghasilkan putih telur) dan sel hepar (organ yang menghasilkan kuning telur) meningkat dalam jumlah dan ukurannya, serta mensekresi protein. *Yolk protein* (protein kuning

telur) secara normal disintesis di hepar hewan betina dan ditranspot melalui serum ke oviduk, kemudian dari oviduk masuk kedalam telur dan bergabung dengan putih telur yang dihasilkan sel epitel oviduk (Lodish *et al.*, 1986).

Hormon estrogen yang terdapat di alam adalah steroid yang tidak mempunyai gugus metil. Estrogen disekresi oleh sel theca interna folikel ovarium dan plasenta. Estrogen mempunyai beberapa pengaruh antara lain : terhadap tingkah laku seksual, metabolisme tubuh, pertumbuhan tulang, kulit menjadi halus, dan estrogen juga menyebabkan pergerakan aktif rambut getar dan dinding tuba falopii. Hormon estrogen dihasilkan dari ovarium yang menyebabkan oviduk berkembang (Hardjoprandjo, 1995).

Imunoblotting merupakan suatu metode yang umum digunakan untuk mendeteksi adanya protein yang terdapat pada serum darah melalui pemeriksaan antibodi yang salah satunya dengan menggunakan metode Dot Blot (Sumitro dkk. 1998). Dot Blot dapat digunakan untuk mendeteksi adanya protein serum darah secara kualitatif, dan penggunaan Dot Blot didasari oleh caranya yang mudah dan sederhana, sedangkan untuk mengetahui hasilnya melalui timbulnya dot atau titik yang berwarna biru keunguan, serta biaya yang diperlukan lebih murah dibandingkan *Western Blot*.

Antigen (Ag) adalah substansi asing yang bila diperkenalkan pada hewan, dapat menimbulkan pembentukan antibodi pada spesies tersebut dan dapat bereaksi secara spesifik dengan antigen pembentuknya. Pada umumnya antigen lengkap adalah protein, tetapi beberapa polisakarida atau polipeptida dapat juga sebagai antigen (Tizard, 1987; Jawetz *et al.*, 1991).

Protein serum darah ayam yang distimulasi estrogen, protein serum darah ayam yang tidak distimulasi estrogen dan protein kuning telur sebagai substansi asing bagi kelinci, bila disuntikkan pada kelinci, maka kelinci akan membentuk antibodi terhadap protein tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Dari keterangan diatas dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat persamaan dan perbedaan antara serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, serta kuning telur.
2. Apakah metode Dot Blot dapat digunakan untuk mendeteksi adanya protein yang terdapat pada serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dan pada kuning telur tetapi tidak terdapat pada serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen.

1.3 Landasan Teori

Protein kuning telur dihasilkan oleh sel hepar karena adanya ekspresi gen *vitellogenin*. Ekspresi gen ini meningkat karena stimulasi hormon estrogen. mRNA gen *vitellogenin* didalam sitoplasma ditranslasi untuk membentuk kuning telur (Lodish *et al.*, 1986). Pengaruh hormon estrogen dalam meningkatkan transkripsi dan stabilisasi mRNA gen *vitellogenin* dalam sitoplasma telah dibuktikan oleh Suryanie dkk. (1999) yang dalam penelitiannya memperlihatkan bahwa pemberian hormon estrogen pada ayam dara menjelang berproduksi dapat

meningkatkan massa total RNA dan mRNA. Peningkatan translasi mRNA menjadi protein kuning dan putih telur telah dibuktikan oleh Mustafa dan Mahaputra (1997), dan Hermawan (1999). Langkah utama sintesis protein kuning telur didahului dengan sintesis gen *vitellogenin* pada sel hepar hewan dewasa. Sintesis distimulasi oleh hormon estrogen, hasil sintesis disekresi dalam darah dan ditranspot ke ovarium. Dalam ovarium protein tersebut secara selektif diambil *oocyt* lalu digabung menjadi kuning telur. (Freefelder, 1987).

Bila seekor binatang atau manusia disuntik protein asing dan hal tersebut merupakan kontak pertamanya dengan Ag-Ab akan terlihat kenaikan Ab dalam serum dalam beberapa hari, tergantung pada tempat suntikan, dosis, adjuvan dan sifat Ag. Konsentrasi Ab akan meningkat mencapai puncaknya dalam 1-10 minggu (Jawetz *et al.*, 1991; Karnen, 2001).

Protein dan polisakarida yang dinilai asing, bila di suntikkan pada binatang dapat menimbulkan pembentukan antibodi (Ab). Protein serum darah ayam yang distimulasi dengan hormon estrogen dan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen sebagai antigen disuntikkan pada kelinci, maka dapat menimbulkan antibodi protein serum darah ayam yang distimulasi estrogen dan antibodi protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat protein tertentu pada serum darah ayam yang stimulasi hormon estrogen.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya protein tertentu yang terdapat pada serum darah ayam sebagai akibat dari stimulasi hormon estrogen.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1. Tinjauan Terhadap Protein

Protein merupakan polipeptida dengan berat molekul berkisar antara 10^5 - 10^6 Dalton, beberapa protein larut dalam air sedangkan lainnya larut dalam garam encer. Banyak protein telah pecah dan dimurnikan berdasarkan atas ukuran molekul dan kelarutannya. Ultracentrifugasi dapat digunakan untuk memisahkan molekul protein menurut berat molekulnya. Gaya gravitasi yang tinggi molekul-molekul mengendap dengan laju sebanding dengan berat dan bentuk molekulnya (Driyer, 1993).

Protein gabungan terdiri atas protein sederhana yang bergabung dengan komponen yang bukan protein atau yang bukan asam amino, yang lazim disebut gugus prostetik. Protein gabungan ini contohnya masing-masing adalah sebagai berikut : *Glikoprotein*, mencakup mukopolisakarida dan oligosakarida sebagai gugus prostetiknya (di dalam jaringan ikat dan mukosa saliva); *Lipoprotein*, gugus prostetiknya adalah lemak (di dalam plasma darah dan kuning telur); *Nukleoprotein*, gugus prostetiknya adalah asam nukleat (dalam nukleos sel, kromosom, dan virus); *Kromoprotein*, gugus prostetiknya adalah Fe-profirin (hemoglobin, sitokrom); *Metaprotein*, gugus prostetiknya ialah Fe, Zn atau Cu (dalam transferin darah, feritin, anhidrose karbonat); dan *Fosfoprotein*, gugus prostetiknya adalah fosfat (kasein dalam susu, vitellin dalam telur).

Protein derivat adalah hasil pemecahan dari protein yang ada di alam, supaya dikurangi kompleksitasnya. Contohnya derivat protein primer, metaprotein, protein koagulasi, derivat protein sekunder, proteose, peptose, dan peptide (Frandsen, 1992).

Protein merupakan suatu rantai peptida atau polipeptida yang dihasilkan atau disintesa karena ekspresi gen, ekspresi gen yang menghasilkan protein melibatkan dua tahap proses yaitu transkripsi dan translasi. Transkripsi adalah proses pemindahan informasi genetika dari DNA ke RNA. Sedangkan sintesis protein atas dasar kode genetik kodon-kodon mRNA disebut translasi, (Rahayu 1988). Agar ekspresi gen dapat diwujudkan dalam waktu dan besaran yang tepat sesuai pula dengan sifat dan karakter gen, maka perlu ada pengaturan pengendalian ekspresi gen (Hartiko, 1988).

2.2 Tinjauan Terhadap Protein Serum Darah yang Tidak Distimulasi hormon Estrogen

Darah hewan yang dibiarkan tanpa antikoagulan dapat membeku dan beberapa protein plasma membantu proses pembentukan pembekuan tersebut. Larutan plasma yang mengandung fibrinogen, fibrin dan beberapa faktor pembekuan darah disebut serum. Plasma darah adalah cairan supernatan yang diperoleh dengan mengendapkan secara sentrifugal dengan sel – sel darah pada keadaan tidak terjadi pembekuan. Serum normal mengandung 60 – 80 g/l protein, dari jumlah 30 – 50 g/l tersusun atas globulin. Protein serum biasanya digolongkan berdasarkan kelarutan dan pemisahan dengan elektroforesis menjadi enam katagori, yaitu : *Albumin*, α_1 - *globulin*, α_2 - *globulin*, β *globulin*, dan

fibrinogen. Protein plasma dipisahkan dan diukur dengan prosedur yang menggunakan spektrofotometer dan *SDS-PAGE* (Coles, 1986; Dryer, 1993).

Plasma darah adalah substansi kompleks yang mengandung protein (*albumin*, *globulin*, dan *fibrinogen*), Karbohidrat (*glukosa*), lemak, mineral, vitamin, dan hormon. *Albumin*, *fibrinogen* dan sejumlah kecil *globulin* (*alfa* dan *beta*) dibentuk dalam hati. Sintesis *albumin* ditentukan oleh fungsi hati dan pakan hewan (Bijanti dan Partosoewignjo, 1999).

Ayam yang tidak mendapatkan perlakuan estrogen tidak terjadi peningkatan tranlasi mRNA untuk mesintesis protein dengan massa total dan RNA 9,3445 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (mg/ml) dan 0,4407 (mg/ml) dan dilakukan pemeriksaan berat molekul protein dengan metode *SDS - PAGE* didapatkan berat molekul 31 Kda dan 45 Kda (Suryanie dkk, 1999; Satria, 2002).

2.3. Tinjauan terhadap Protein Kuning Telur

Estrogen menyebabkan sel-sel epitel yang terletak pada sel hepar (organ yang menghasilkan kuning telur) meningkat dalam jumlah, ukuran dan mensekresi protein. *Yolk protein* atau kuning telur secara normal dibentuk di hepar hewan betina dan ditransprot ke oviduk melalui serum kemudian dari oviduk masuk ke dalam telur. Kecepatan transkripsi dari gen ini (pada hepar) meningkat pada ayam yang mendapat perlakuan estrogen dibanding dengan hewan yang tidak mendapat perlakuan estrogen, sebagai hasil dari peningkatan transkripsional (Lodish *et al.*, 1986).

Langkah utama sintesis *yolk protein* atau protein kuning telur adalah didahului dengan sintesis protein *vitellogenin* pada sel hepar hewan betina, karena distimulasi estrogen. Hasil sintesis disekresikan dalam darah dan ditranspot ke ovarium. Dalam ovarium protein tersebut secara selektif diambil *oocyt* lalu digabung menjadi kuning telur. Stimulasi awal terhadap produksi *vitellogenin* datang dari T-Hypothalamus yang merangsang hipofise anterior untuk menghasilkan hormon *Folicle Stimulation Hormon* (FSH) yang merangsang folikel pada ovarium untuk berkembang dan membebaskan hormon estrogen. Seterusnya estrogen menstimulasi transkripsi gen *vitellogenin* yang dimulai dengan terikatnya estrogen pada reseptor (Lodish *et al.*, 1986; Freefelder, 1987).

Estrogen mengendalikan ekspresi gen *vitellogenin* pada dua laras atau tingkatan yaitu pada inisiasi transkripsi dan stabilisasi mRNA dalam sitoplasma. Massagger RNA gen *vitellogenin* di dalam sitoplasma ditranslasi untuk membentuk *vitellogenin* yang selanjutnya akan menjadi kuning telur atau *yolk protein* (Lodish *et al.*, 1986).

Pengaruh estrogen dalam meningkatkan transkripsi dan stabilisasi mRNA gen *vitellogenin* dalam sitoplasma telah pula dibuktikan oleh Suryanie dkk. (1999) yang dalam penelitiannya memperlihatkan bahwa pemberian hormon estrogen pada ayam dara menjelang berproduksi dapat meningkatkan massa total mRNA dan RNA. Pada penelitian tersebut massa total mRNA dan RNA masing-masing adalah 9,3445 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (mg/ml) dan 0,4407 (mg/ml) pada kelompok kontrol menjadi masing-masing 12,9145 (mg/ml) dan 0.6544 mg/ml untuk perlakuan. Sedangkan

peningkatan translasi mRNA menjadi protein kuning dan putih telur telah dibuktikan oleh (Mustafa dan Mahaputra, 1997; Hermawan 1999).

Kuning telur setelah di analisis dengan elektroforesis memiliki 5 fraksi protein dengan berat molekul masing – masing 116, 75, 70, 65, dan 60 Kda (Suryanie dkk. 2002)

2.4. Tinjauan Terhadap Protein Serum Darah Yang Distimulasi Hormon Estrogen

Protein yang dibuat pada sel hepar karena stimulasi estrogen adalah *vitellogenin*. Setelah disintesis lalu ditransport ke oviduk. Hewan jantan sel heparnya juga responsif terhadap percobaan dengan penambahan estrogen (seperti estradiol). Pada inti sel hepar, transkripsional secara tajam meningkat mengikuti perlakuan estrogen. Akumulasi mRNA *vitellogenin* telah diketahui dari kurva waktu paruh estrogen kira-kira 24 jam. Setelah perlakuan estrogen dihentikan konsentrasi mRNA *vitellogenin* menurun, dan waktu paruhnya kurang dari 3 jam. Jadi kontrol hormonal dari protein ini sangat signifikan pada dua tingkat transkripsional yaitu inisiasi dan stabilisasi mRNA (Gilbert, 1978; Lodish *et al.*, 1986).

Setelah sel hepar distimulasi estrogen, sel hepar akan mensintesis dan mensekresi dua polipeptida *vitellogenin* yaitu *vitellogenin* I dan *vitellogenin* II. *Vitellogenin* II mempunyai akumulasi yang lebih banyak daripada *vitellogenin* I. Akumulasi maksimal serum *vitellogenin* berkisar 5 hari dari penyuntikan, dan perbandingan konsentrasi serum *vitellogenin* I dengan serum *vitellogenin* II 1:4.

Penyuntikan kedua estrogen pada ayam meningkatkan akumulasi *vitellogenin* secara cepat di dalam sirkulasi darah. (Pang Peter and Schriebman, 1991).

Sel hepar yang distimulasi estrogen merangsang gen *vitellogenin* untuk menghasilkan bahan penyusunan kuning telur. Kuning telur dibawa dari sel hepar menuju oviduk melalui transpot media darah dalam bentuk protein yang tercampur lemak. (Follet 1978; Gilbert, 1978; Lodish *et al.*, 1986).

Pemberian 17-beta estradiol dengan dosis 1,0; 0,1; 0,01 mg atau bahan yang bersifat estrogenik (*nonylphenol*) 50; 10; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,01, dan 0,001 mg dapat meningkatkan mRNA *vitellogenin* pada hepar embrio ayam yang selanjutnya ditranlasi menjadi *vitellogenin* II (Sakimura *et al.*, 2001).

Protein serum darah ayam yang distimulasi dengan hormon estrogen mempunyai 2 fraksi dengan 65 KDa dan 45 KDa. Sedangkan protein serum darah ayam yang tidak mendapat stimulasi hormon estrogen mempunyai 2 fraksi dengan berat molekul 45 KDa dan 31 KDa setelah dilakukan uji *SDS – PAGE* (Satria, 2002; Suryanie dkk, 2002)

Protein *vitellogenin* hasil isolasi dari serum darah yang telah diberi perlakuan 17-beta estradiol pada Artic chour betina (*Salvelinus Alpinas*) dan dirunning dengan *SDS-PAGE* didapatkan berat molekou 158 KDa. Protein *Vitellogenin* yang telah dimurnikan dapat digunakan sebagai Ag untuk memproduksi Ab poliklonal dan untuk mengetahui spesifisitas antibodi *vitellogenin* tersebut dilakukan dengan analisis *Western Blot*, dengan *Western Blot* tidak ada reaksi silang antara serum kontrol hewan betina yang tidak mendapat perlakuan 17-beta estradiol dengan serum perlakuan 17-beta estradiol Artic Chour

betina, dan penggunaan antibodi yang kompetitif dikembangkan untuk *ELISA* (Jhonson *et al.*, 1999).

Protein *vitellgenin* didapat dari hasil isolasi dan diidentifikasi dari ovarium dan hemolymph lobster betina (*Homarus americanus*) yang telah diinduksi hormon estrogen. *Vitellogenin* ketika disuntikkan pada lobster muda betina (*Homarus americanus*) menghasilkan antibodi *vitellogenin*. Antiserum antivitellogenin dikembangkan untuk mengidentifikasi *vitellin* dan *vitellogenin* dengan cara *ELISA* dan teknik *Western Blot* (Tsukimura *et al.*, 2002).

Antiserum anti-*vitellogenin* digunakan untuk uji imunoblotting (*Western Blot*) fase solid yang digabungkan dengan densometric scanning, memperlihatkan tingkat sensitifitas dan spesifitas antiserum anti-*vitellogenin* kurang lebih 1 μ l darah Mosquitofishes (*Gambusia affinis*) (Angus *et al.*, 2000).

2.5. Tinjauan terhadap Hormon Estrogen

Estrogen disekresi oleh sel theca interna folikel, korteks adrenal, dan plasenta pada hewan betina, sedangkan hewan jantan estrogen disintesa dan dibebaskan oleh testes dan korteks adrenal. Jalan biosintesis estrogen meliputi pembentukan dari androgen. Sel-sel granulosa juga menghasilkan estrogen, dan tidak seperti estrogen dari sel theca interna. Jaringan stoma ovarium juga mempunyai potensi untuk membentuk androgen dan estrogen (Ganong, 1991)

Estrogen pada hewan betina mempunyai pengaruh terhadap tingkah laku seksual, metabolisme tubuh, pertumbuhan tulang, dan estrogen menyebabkan kulit lebih halus, juga menyebabkan pergerakan rambut getar dan tuba falopii.

Estrogen menyebabkan pertumbuhan sifat-sifat sekunder pada hewan betina. Hormon ini secara kimia dan potensinya dibagi menjadi : Estrone, Estriol, Estradiol 17 α , dan Estradiol 17 β (Partodihardjo, 1992; Hardjopranjoto, 1995)

Estrogen menimbulkan estrus atau birahi pada hewan betina. Estrogen merupakan salah satu dari tiga kelompok hormon yang dihasilkan oleh ovarium. Dua hormon lainnya adalah progesteron dan relaksin (Toelihere , 1981).

2.6. Tinjauan Terhadap Dot Blot

Imunoblotting biasanya digunakan untuk menentukan kadar relatif dari suatu protein dalam suatu campuran berbagai jenis protein atau lainnya, sehingga protein dapat dideteksi dengan menggunakan probe antibodi yang sesuai (Kresno, 2001).

Dot Blot merupakan salah satu metode dari imunoblotting yang digunakan untuk mendeteksi ikatan antigen dengan antibodi. Uji Dot Blot digunakan mendeteksi secara kualitatif Ig M Leptospirosis pada serum atau plasma darah yang diambil dari penderita penyakit Leptosira dengan menunjukkan gejala klinis yang dilakukan secara invitro, maka didapatkan adanya beberapa serotipe lainnya dari hasil *Dot Blotting* (Anominus ^a , 2002).

Dot blot dapat dipergunakan sebagai metode aplikasi untuk mendeteksi protein secara langsung pada membran Imunobilon. Protein yang terdapat pada membran imunobilon dapat secara langsung dianalisis, dan hasil yang didapat berupa dot biru keunguan (Anominus ^b , 2002)

Menurut Sumitro dkk. (1998) Pemeriksaan antibodi dengan menggunakan dot blotting dapat digunakan sebagai penetapan adanya protein pada serum, sedangkan teknik *Western Blot* hampir sama dengan pemisahan protein melalui *SDS-PAGE*, dan yang pertama dimasukkan adalah whole protein. Kemudian diamati adanya band-band sebagai reaksi positif antigen dan antibodi, sedangkan Dot Blot yang diamati munculnya noktah (dot) yang berwarna biru keunguan.

2.7. Tinjauan Terhadap Antigen

Antigen adalah substansi yang bila diperkenalkan pada suatu spesies asing, dapat menimbulkan pembentukan antibodi (Ab) pada binatang hidup dapat bereaksi secara spesifik dengan Ag tersebut. Pada umumnya Ag-Ag lengkap adalah protein, tetapi beberapa adalah polisakarida atau polipeptida. Kebanyakan Ag-Ag adalah makromolekuler yang mempunyai berat molekul diatas 10.000 Dalton. Agar bekerja sebagai Ag, suatu substansi harus dinilai sebagai asing oleh seekor binatang, karena pada umumnya binatang tidak membentuk Ab terhadap protein-proteinnnya sendiri atau *self* (Jawetz *et al.*, 1991).

Roitt *et al.* (1993) dan Turner (1994) menyebutkan istilah antigen digunakan untuk beberapa molekul yang dapat mempengaruhi sel B memproduksi antigen yang spesifik. Akan tetapi istilah antigen harus lebih diperluas untuk menunjukkan beberapa molekul yang secara spesifik dikenal oleh sistem imunitas yaitu sel B, sel T atau keduanya.

Antigen dapat diartikan sebagai substansi yang spesifik berkaitan dengan antibodi. Makromolekuler seperti : karbohidrat kompleks, fosfolipid, asam nukleat

dan protein dapat digunakan sebagai Ag. Antibodi yang berikatan secara spesifik dengan makromolekuler disebut determinan atau epitop (Abbas *et al.*, 1991).

Antigen dapat dibedakan menjadi 2 tipe yaitu eksogenous dan endogenous. Antigen eksogenous yang didapat dari lingkungan luar tubuh yang masuk ke dalam individu seperti mikroorganisme, tepung sari, obat-obatan dan polutan. Antigen endogenous yaitu yang ditemukan didalam tubuh individu dan dipengaruhi oleh heterologous-eksogenik, autologus dan allogenik. Antigen eksogenik merupakan Ag yang didapatkan dari aneka macam spesies filogenik yang tidak saling memiliki hubungan. Ag tersebut juga dikenal sebagai Ag heterogenik (Wahab dan Noerjati, 1993).

Antigen autogenik adalah antigen yang berasal dari tubuhnya sendiri, Ag autogenik digunakan untuk merubah komponen tubuh menjadi imunogenik, tertentu dari hostnya. Antigen allogenik tidak jauh berbeda dengan antigen lainnya. Antigen allogenik didapat secara genetik yang dikontrol oleh Ag determinan yang dibentuk oleh beberapa spesies dan manusia. Antigen determinan dapat ditemukan pada sel darah merah, sel darah putih, platelet, protein serum dan sel dipermukaan jaringan tubuh (Wahab dan Noerjati, 1993; Karnen, 2001).

Sifat-sifat umum imunogen : 1. Keasingan yaitu : dalam lingkungan normal sistem imun membedakan antara *self* dan *non self*. 2. Ukuran, antigen harus mempunyai ukuran minimum yang efektif dengan berat molekul lebih kurang 10.000. 3. Kompleksitas, faktor yang menentukan kompleksitas imunogen yaitu sifat fisik dan kimia molekuler. (Wahab dan Noerjati, 1993).

2.8. Tinjauan Terhadap Antibodi

Antibodi adalah protein yang terbentuk sebagai respon terhadap suatu antigen yang bereaksi secara spesifik dengan antigen itu atau sesuatu yang mempunyai hubungan erat dengannya. Hanya golongan vertebrata saja yang membuat Ab-Ab. Antibodi adalah protein khusus, yaitu imunoglobulin-imunoglobulin. Sifat antibodi ini antara lainnya tergantung pada kelas imunoglobulin dimana imunoglobulin ini tergolong (Jawetz *et al.*, 1991).

Imunoglobulin merupakan 20% dari jumlah protein serum dan suatu bagian yang variabel dari imunoglobulin memiliki daya Ab. Antibodi dapat dikenal melalui sifat-sifat kimia-fisik. Diantara sifat-sifat kimia-fisik utama yang digunakan untuk klasifikasi Ab adalah daya larut dalam garam-garam dan pelarut-pelarut, mobilitas elektroforesis, ukuran molekul, dan pengendapan pada alat pemusing ultra. Secara elektroforesis, sebagian besar bergerak bersama fraksi-fraksi gama dan beta dan sedikit dengan globulin alfa (Tizard, 1987; Noel and Krieg, 1993).

Antibodi diproduksi dari respon satu antigen yang secara nyata harus memadai struktur yang berbeda dari Ab yang diproduksi dari respon Ag lainnya, sebagai contoh Ab tetanus harus berbeda struktur kimianya dengan Ab dipteria. Tempat pengikatan Ag atau tempat aktivitas Ab di molekul. Imunoglobulin adalah daerah yang dikombinasi dengan Ag spesifik (Wahab dan Noerjati, 1993).

Antibodi atau imunoglobulin adalah struktur yang berhubungan dengan glikoprotein diproduksi oleh limposit B yang berfungsi sebagai moderator spesifik imunitas humoral. Semua Ab umumnya mempunyai 2 struktur rantai ringan (*light*

chain) dan 2 struktur rantai berat (*heavy chain*) yang identik serta dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan disulfida (Crighton, 1984; Abbas *et al.*, 1991; Norris & Varma, 1992)

Langkah pertama dalam pembentukan Ab adalah fagositosis Ag oleh makrofag. Makrofag ini memberikan antigen kepada sel – sel B dan sel-sel T pembantu. Sel-sel B yang membawa Ig pada permukaannya yang cocok dengan antigen, dirangsang untuk berproliferasi, membentuk klon, dan berdiferensiasi menjadi sel-sel plasma. Sel plasma mensintesa protein antibodi (Jawetz *et al.*, 1991; Vilk, 1992).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3. 1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 minggu mulai tanggal 1 September sampai 14 Oktober 2002. Tempat penelitian adalah : Kandang Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya; Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Biologi Universitas Brawijaya Malang ; dan Laboratorium Bakteriologi Dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 6 ekor kelinci lokal berumur 5-6 bulan dengan kelamin jantan, antigen yang berasal dari protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen , protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen (Lampiran 2), serta protein kuning telur (lampiran 3), adjuvan komplit dan inkomplit, membran nitroselulose, dan alkohol, sedangkan reagen yang digunakan adalah PBS-Na Azida 1%, Bloking buffer (PBS skim 5 %), PBS Tween 20 0,05 %, PBS skim 1 %, *Anti rabbit IgG AP Conjugate*, dan Subtrat *Western Blue*

3.2.2. Alat Penelitian

Kandang yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang baterai yang dibuat dari kayu kilan, pada kandang ini terdapat 6 ruangan bentuk persegi panjang dengan ukuran 40x30x50 cm untuk tiap ekor kelinci.

Alat yang digunakan meliputi : sentrifus, freezer, spuit tubekulin, tabung reaksi, pipet mikroliter, dan kapas .

3.3 Metode Perlakuan Estrogen pada Ayam

Penelitian ini menggunakan dua kelompok ayam kampung betina masing-masing berjumlah enam ekor . Kelompok pertama ayam betina yang berumur satu bulan tanpa disuntik estrogen dan kelompok kedua ayam betina berumur 4-5 bulan yang disuntik estrogen. Hormon estrogen yang digunakan adalah ethynil estradiol 20000 UI (merek dagang Ovalumon). Estrogen disuntikan satu kali selama tiga hari dengan dosis setiap ayam 0,2 ml intra muskuler, kemudian dilakukan pengambilan darah. (lampiran 2)

3.4. Metode Dot Blot

Antigen yang telah diencerkan 1/100, dan 1/200 dengan PBS-Na Azida 1 %, kemudian ditetaskan pada membran nitroselulose yang telah dibasahi dengan PBS. Membran yang berisi antigen ini kemudian dibloking dengan *bloking buffer* (PBS-Skim 5%) selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05 % (3 menit yang diulang 3 kali). Hasilnya kemudian diinkubasi dengan serum (antibodi primer) dalam PBS-*Skim Milk* 1 % selama 2 jam. Selanjutnya

dilakukan pencucian dengan PBS-Tween 20 0,05 % (3 menit yang diulang 3 kali). Hasil yang didapatkan diinkubasi kembali dengan antibodi sekunder (*Anti Rabbit IgG AP Conjugate*) selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 0,05 % selama 3 menit yang diulang 3 kali. Kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat *Western Blue* dan dikeringkan pada suhu kamar, dan diamati munculnya noktah (Dot) berwarna biru keunguan (Sumitro dkk, 1998). (Lampiran 4)

3.5. Metode Penelitian

Enam ekor kelinci dikelompokkan menjadi tiga perlakuan masing-masing dua ekor:

Kelompok K : Kelinci diberi perlakuan dengan protein serum darah ayam berumur satu bulan yang tidak distimulasi estrogen

Kelompok P : Kelinci diberi perlakuan dengan protein serum darah ayam berumur 4-5 bulan yang distimulasi hormon estrogen

Kelompok KT : Kelinci diberi perlakuan dengan protein kuning telur

Enam ekor kelinci disuntik antigen sekali dengan masing-masing perlakuan sebanyak 0,2 ml (Anominus, 1996) dengan konsentrasinya 100 µg dengan ditambahkan adjuvan komplit dan diberikan secara subkutan dengan perbandingan antara antigen dengan adjuvan 1:1.

Penyuntikan kedua dilakukan setelah 2 minggu dari penyuntikan pertama dengan dosis yang sama tetapi menggunakan adjuvan inkomplit perbandingan 1:1. Kemudian penyuntikan diulang sekali setiap satu minggu selama tiga minggu sehingga didapatkan antibodi.

3.5.1. Pengujian Reaksi Imunologis Antigen-Antibodi Dot Blot

Antigen Kuning Telur direaksikan dengan Antibodi Kuning Telur

Antigen Kuning Telur direaksikan dengan Antibodi Perlakuan

Antigen Perlakuan direaksikan dengan Antibodi Kuning Telur

Antigen Perlakuan direaksikan dengan Antibodi Perlakuan

Antigen Perlakuan direaksikan dengan Antibodi Kontrol

Antigen Kontrol direaksikan dengan Antibodi Perlakuan

Antigen Kontrol direaksikan dengan Antibodi Kontrol

Antigen Kontrol direaksikan dengan Antibodi Kuning Telur

Antigen Kuning Telur direaksikan dengan Antibodi Kontrol

3.6. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *The Posttest-Only Control Group Design* dan analisa data disajikan dalam bentuk data diskriptif

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Setelah masing-masing serum darah ayam yang distimulasi estrogen, kuning telur, dan serum darah ayam yang tidak distimulasi estrogen dilakukan penentuan kadar protein (lamp.1), kemudian masing-masing protein disuntikkan pada kelinci dan berdasarkan pemeriksaan imunologis melalui metode Dot Blot (lamp. 4) didapatkan hasil dibawah ini:

a

Ag KT	Anti-Perlakuan	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit IgG-AP Conjugate	1/1000	

b

Ag KT	Anti-Kuning Telur	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit IgG-AP Conjugate	1/1000	

c

Ag (P)	Anti-Kuning Telur	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit IgG-AP Conjugate	1/1000	

Gambar1. Reaksi Silang Antara Antigen-Antibodi Protein Kuning Telur dengan Protein Serum Darah Ayam yang Distimulasi Hormon Estrogen

Keterangan:

- a. Ag Kuning Telur X Anti-Perlakuan,
- b. Ag Kuning Telur X Anti-Kuning Telur
- c. Ag Perlakuan X Anti-Kuning Telur

a'

Ag (P)	Anti-Perlakuan	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit -AP Conjugate	1/1000	

b'

Ag (P)	Anti- Kontrol	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit -AP Conjugate	1/1000	

c'

Ag (K)	Anti-Perlakuan	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit -AP Conjugate	1/1000	

Gambar 2. Reaksi Silang Antara Antigen-Antibodi Protein Serum Darah Ayam yang Distimulasi Hormon Estrogen dengan Protein Serum Darah Ayam yang Tidak Distimulasi Hormon Estrogen

Keterangan :

a'. Ag Perlakuan X Anti-Perlakuan

b'. Ag Perlakuan X Anti-Kontrol

c'. Ag Kontrol X Anti Perlakuan

a''

Ag K	Anti- Kontrol	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit Egg AP Conjugate	1/1000	

b''

Ag KT	Anti- Kontrol	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit Egg AP Conjugate	1/1000	

c''

Ag (K)	Anti-Kuning Telur	
	1/100	1/200
1/100		
1/200		
Anti Rabbit Egg AP Conjugate	1/1000	

Gambar 3. Reaksi Silang Antara Antigen-Antibodi Protein Kuning Telur dengan Protein Serum Darah Ayam yang Tidak Distimulasi Hormon estrogen

Keterangan :

a''. Ag Kontrol X Anti-Kontrol

b''. Ag Kuning Telur X Anti-Kontrol

c''. Ag Kontrol X Anti-Kuning Telur

Dari hasil Dot Blot gambar 1. Menunjukkannya adanya reaksi positif Ag-Ab antara protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan protein kuning telur yang ditandai munculnya dot atau titik biru keunguan.

Gambar 2. Menunjukkan adanya reaksi positif antara protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen yaitu melalui munculnya dot atau titik biru keunguan.

Gambar 3. Menunjukkan adanya reaksi negatif antara protein kuning telur dengan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi dengan hormon estrogen dikarenakan tidak munculnya dot atau titik biru keunguan

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Penyuntikan antigen pada kelinci menimbulkan respon pembentukan antibodi yang spesifik terhadap antigen tersebut, karena antigen sebagai substansi asing pada kelinci (Jawetz *et al.*, 1991). Antigen yang dipergunakan berasal dari protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen, protein kuning telur, dan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen. Pengujian reaksi antigen-antibodi menggunakan metode Dot Blot. Munculnya dot atau noktah yang berwarna biru keunguan menunjukkan bahwa antigen – antigen tersebut sangat spesifik terhadap antibodinya (Jawetz *et al.*, 1991).

5.1 Persamaan Antara Protein Serum Darah Ayam Yang Distimulasi Hormon Estrogen Dan Protein Kuning Telur

Protein kuning telur dan protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen bila disuntikkan pada kelinci dapat memberikan respon dalam pembentukan antibodi. Protein kuning telur dan protein serum darah yang distimulasi hormon estrogen merupakan protein asing bagi kelinci bila disuntikkan dapat menimbulkan pembentukan antibodi (Jawetz *et al.*, 1991; Wahab dan Noerjati, 1993).

Antigen protein kuning telur bereaksi silang terhadap antibodi protein kuning telur dan juga antigen protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen terhadap antibodinya. Karena adanya persamaan berat molekul antara

protein kuning telur dengan protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen, maka terjadi reaksi silang antigen-antibodi yang dilihat dari munculnya dot yang berwarna biru keunguan pada membran nitroselulosa (Sumitro dkk. 1998). Protein kuning telur dengan protein serum darah yang distimulasi hormon estrogen dari hasil analisis *SDS-PAGE* mempunyai berat molekul 65 KDa (Suryanie dkk. 2002).

Sintesis protein kuning telur didahului dengan sintesis protein *vitellogenin*. Hasil sintesis disekresikan dalam darah dan ditranspor ke ovarium (Freefelder, 1987). Hormon estrogen merangsang gen *vitellogenin* pada sel hepar untuk menghasilkan bahan dasar kuning telur. Kuning telur dibawa dari hepar ke oviduk melalui transpor media darah (Follet, 1978; Gilbert, 1978; Lodish *et al.*, 1986). Serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen meningkatkan transkripsi dan stabilisasi mRNA gen *vitellogenin* pada ayam yang menjelang berproduksi meningkatkan massa total RNA dan mRNA (Suryanie dkk. 1999).

5.2 Persamaan Antara Protein Serum Darah Ayam Yang Distimulasi Hormon Estrogen Dengan Protein Serum Darah Ayam Yang Tidak Distimulasi Hormon Estrogen

Protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen disuntikkan pada kelinci menimbulkan respon terbentuknya antibodi, disebabkan protein – protein tersebut sebagai substansi asing bagi kelinci (Wahab dan Noerjati, 1993) dan antigen protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen bereaksi silang terhadap antibodinya, dan juga antigen protein serum darah ayam yang

tidak distimulasi hormon estrogen bereaksi silang terhadap antibodinya. Antibodi terbentuk sebagai respon dari suatu antigen dan bereaksi secara spesifik dengan antigen itu (Jawezt *et al.*, 1991).

Adanya persamaan protein yang dimiliki serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen setelah dilakukan analisa *SDS - PAGE* yaitu protein dengan berat molekul 45 KDa (Satria, 2002; Suryanie dkk. 2002). Protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen memiliki protein dengan berat molekul yang sama, maka terjadi reaksi silang antara antigen-antibodi keduanya melalui munculnya dot berwarna biru keunguan.

5.3 Perbedaan Antara Protein Kuning Telur Dengan Protein Serum Darah Ayam Yang Tidak Distimulasi Hormon Estrogen

Tidak adanya reaksi silang antara antigen-antibodi protein kuning telur dengan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen disebabkan adanya ketidaksamaan protein antara kuning telur dengan serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen. Protein kuning telur sintesisnya didahului dengan sintesis *vitellogenin* pada sel hepar yang diinduksi oleh hormon estrogen dan protein kuning telur memiliki berat molekul 65 KDa (Lodish *et al.*, 1986; Freefelder, 1987; Suryanie dkk, 2002).

Protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen setelah dilakukan pemeriksaan *SDS-PAGE* protein dengan berat molekulnya 31 KDa

(Satria, 2002) yang tidak dimiliki oleh protein kuning telur, sehingga antigen-antibodi protein kuning telur tidak dapat bereaksi silang dengan antigen-antibodi protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, dikarenakan tidak munculnya dot atau noktah biru keunguan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Adanya persamaan protein antara kuning telur dengan serum darah yang distimulasi hormon estrogen, adanya persamaan protein antara serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, dan adanya perbedaan protein antara kuning telur dengan serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen
2. Dot Blot dapat digunakan untuk mendeteksi adanya protein tertentu yang terdapat pada serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dan pada pada kuning telur tetapi tidak terdapat serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen.

6.2. Saran

1. Dot Blot dapat digunakan untuk mendeteksi adanya protein dalam serum melalui pemeriksaan imunologis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan penggunaan metode Dot Blot dengan Metode Immunoblot yang lainnya, untuk mendeteksi protein serum darah yang distimulasi hormon estrogen.

RINGKASAN

Antibodi mengalami perkembangan tidak hanya digunakan sebagai imunitas atau pertahanan tubuh terhadap penyakit yang spesifik terhadap antibodi tersebut, akan tetapi antibodi dapat digunakan untuk menganalisis protein makanan, mendeteksi lingkungan biologis ikan, pencemaran limbah industri, dan mengidentifikasi protein hasil kloning. Protein kuning telur dapat dihasilkan dari ekspresi gen *vitellogenin* pada sel hepar karena stimulasi estrogen.

Metode Dot Blot dapat digunakan untuk mendeteksi adanya protein dalam serum secara kualitatif dan hasilnya dapat dilihat melalui munculnya dot biru keunguan.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui apakah terdapat protein tertentu pada serum darah yang dihasilkan sebagai akibat stimulasi hormon estrogen dengan metode Dot Blot. Estrogen menyebabkan sel epitel pada sel hepar meningkat dalam jumlah, ukuran, dan mensekresi protein. Protein kuning telur secara normal dibentuk oleh hewan betina dan ditranspot ke oviduk melalui serum.

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok yaitu kelompok K, kelompok P, dan Kelompok KT, masing – masing disuntik dengan protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen, protein kuning telur, dan protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen. 6 minggu kemudian dilakukan pemeriksaan reaksi Ag-Ab dengan metode Dot Blot.

Hasil penelitian menunjukkan adanya persamaan protein antara serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan kuning telur, adanya persamaan protein antara serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen dengan serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen, dan adanya perbedaan protein antara kuning telur dengan serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen, serta Dot Blot dapat mendeteksi adanya protein yang terdapat pada serum darah yang distimulasi hormon estrogen dan pada kuning telur, tetapi tidak terdapat pada serum darah yang tidak distimulasi hormon estrogen.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K., M.L Andew and J. Pober. 1991. *Cellular & Molecular Immunology*. W.B. Saunder Company USA. P 37-40
- Angus, Robert, W.R. Douglas, H.W. Mike Blanchard, and Paul. 2000. *A short – Term In Vivo Screnning System For Endocrine Disreptor Mosquitofishes (Gambusia affinis & Gambusia Halbrooki)* . U.S. Environmental Protection Agency – National Center For Environmental Research. P 1-2
- Akoso, B.K. 1993. *Manual Kesehatan Unggas Edisi I*. Kanisius Yogyakarta. hal 29-30
- Anominus , 1996. *Egg Yolk antibodies Offer Advantages over Mammalian*. Departement Home-IFA Tulin Home. P1-2
- Anominus ^a, 2002. *Leptospira biflexa Ig M Detection by Dot Blot*. Arum Laboratories. Chipeta way. Salt Lake City. UT. P1-3
- Anominus ^b, 2002. *Dot Blotting Using Immunobillon TM-P*. Technical Protocol TP001. Millpore Corporation Bedford. Massachusetts. USA. P1- 4
- Bijanti, R dan S. Partosoewignjo. 1999. *Hematologi Veteriner I* . Laboraturium Patologi Klinik. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 1-2
- Coles, E.H.. 1986. *Veterinery Clinical Pathology 4 Ed*. W.b. Saunders Company. London. England. P 291-292
- Crighton, D.B., 1984. *Immunological Aspects of Reproduction In Animals*. Robert Hortnall Ltd. England. P 27-28
- Driyer, R.L. 1993. *Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal. 45-51
- Follett, B.K. 1978. *Photoperiodism And seasional Breeding In Bird & Animals*. Willey and Sons Ltd. USA. P 76-79
- Frandsen. 1992. *Anatomy & Physiology of Farm Animal 4 thred*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. P 23-25
- Freefelder, D. 1987. *Molecular Biology 2nd Ed*. Jone and Bartillet Publishier Inc. Boston Partulavallay. P 16-20

- Ganong, W.F., 1991. Fisiologi Kedokteran. ECG Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta . Hal 17-19
- Gilbert, A.B. 1978. *Fertility In femela Domestic Poultry In Fifth European Poultry Conferency II*. Marsa, Malta, Wolrd. Poultry Science association. Vol 5 1173-1197.
- Hardjopranojoto, S., 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak Airlangga University Press. Surabaya. Hal 43-47
- Hartiko, H. 1988. Ekspresi Genetik & Pengendaliannya. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.. Hal 12-14
- Hermawan, Y.D. 1999. Pengaruh Penyuntikan Dosis Berulang Hormon Gonadotropin Terhadap Berat Telur Ayam Bertelur. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 26-27
- Jawetz, J., L. Melnick and E.A. Adeberg. 1991. Mikrobiologi Untuk Profisi Kesehatan (Review of Medical Microbiology). Edisi 16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 198-205.
- Jhonson, H.K., H. Tveiten, N.D. Willasen , and A.M. Arnesen ,1999. *Arctic Chour (Salvelinus alpinus) Vitellogenin Devolepment & Validition of An Enzyme ImmunoSorbent Assay*. Norwegian. Comp Biochem Physiol B. 124 (3); 355-62
- Karnen, G.B. 2001. Imunologi Dasar Edisi 4. Fakultas Kedokteran. Univervitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-32
- Kresno, S.B., 2001, Imunologi : Diagnosa Dan Prosedur Laboratorium, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia Press, Jakarta, Hal 411-412
- Lodish, H., J. Darnell & D. Baltimore. 1986. *Molecular Cell Biology*. Scientifie American Book. P 34-35
- Mustafa, I. dan L. Mahaputra . 1997. Pengaruh Penyuntikan Pregnat More Serum Gonadotropin (PMSG) Pada Ayam Yang Mengalami Terlambatan Masa Produksi. Hemera Zoa. Hal 79
- Noel, M.J.R., and R. Krieg. 1993. *Microbiology Concepts & Application*. MC Grow-Hill, Inc. USA. P 501-510
- Norris, J.R. & A.K. Varma. 1992. *Method In Microbiology Vol 24*. Academic Press Inc. San Diego. P. 101-105

- Pang Peter, K.T., and M.P. Schrieblman, 1991, *Vertebrae Endocrinology : Fundamentals And Biomedical Implications, Vol. 4, Part A Reproduction*, Academic Perss, London, England. P. 91-100
- Partodihardjo, S., 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan. Fakultas Kedokteran Veteriner. Jurusan Reproduksi. IPB. Mutiara Sumber Widya. hal 131-132
- Pichler, H., 1996. *Devolepment of Immunoasaay by Use of Egg Yolk Antibodies*. Center For Analitical Chemestry. USA. P1-2
- Rahayu, S.A. 1988. Biosintesa RNA Pada Organisme Eukaruioitik. PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Pp. 8-26.
- Roitt, I.M , Jonathan, Brostott, and D.K. Male. 1993. *Microbiology Molecular*. Mosby Year Book. Europe Limited. P.17-18
- Sakimura. M., Shozo. H., Akira. T., Ichiro. Y., and K. Shimada. 2001. *Effect of Estradiol and Nonyl on mRNA Levels of Vitellogenin in The Liver of Chicken Embryos*. Easbrt 38: P. 250-257.
- Satria, D. 2002. Pengaruh Pemberian Estrogen Terhadap Gambaran Serum Darah ayam. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya. Hal 34-35
- Sumitro, B.S., Rahayu, S., Fathiyah, Widyarti S., dan Arumingtyas E. 1998. Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Brawijaya. Malang
- Suryanie, S., Wiwiek T. dan S. Chusniati. 1999. Studi mRNA Gen Vitellogenin Sel Hepar Ayam Sedang Bertelur Untuk kloning Gen Yang Menghasilkan Protein Telur Non Kolesterol. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 22-23
- Suryanie, S., Wiwiek T., dan S. Chusniati. 2002 Produksi Antibodi Vitellogenin Indikator Hasil Kloning Gen Kuning Telur Non Kolesterol. Fakultas Kedokteran Hewan. Universita Airlangga. Surabaya. Hal 19-20
- Tizard, I. 1987. *Veterinary Immunology An Introduction Third Edition*, W.B. Saubder Company, USA, P. 25-47
- Toelihere, M. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa. Bandung . hal. 49-50

- Tsukimura B. , Waddy S.E., Vogel J.M, Linder CJ. Bauer DK., Borst DW. 2002. *Charalterization & Purification of Yolk Protein In The Lobters. Elomarus American. USA. Jexp Zool* 292 (5): 417-29
- Turner, RJ. 1994. *Immunology A Comparative Apporach*. John Willey & Sons Ltd. Buffens Lane, Chichester Mess Sussex PO 1911UD Inc. USA. P 203-206
- Tyler, CR., A.R. Van , M.V. Nilsen , R. Blackwell , S. Maddix , and B.M. Nilsen, 2002. *Monoklonal Antibodi Enzyme linked Immunsorbent Assay To Quantify Viotellogenin For Studies On Enviromental Estrogen In The Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss)*. *Environ Toxicol* 21(1): 47-54
- Vilk, W.A , 1992. *Basic Microbiology 7Ed*. Harper Collins Publisher Inc. USA. P 276-277
- Wahab, A.S dan Noerjati S. 1993. *Imunologi III*. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal. 45-49
- Yadatei, F., and R. Male. 2002. *Effect of 4-nonylphenol On Gene (Salmon Salar)*. Departement of Molecular Biology. University of Bergen. Norway. *Aquat Toxicol* 58 (1-2): 113-29

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Kadar Protein Serum Darah dan Kuning Telur

1.1 Penentuan Kadar Protein Menurut Metode Biuret

Kadar protein ditentukan dengan cara mengkonversikan data absorbansi dan konsentrasi dengan menggunakan persamaan regresi linier kurva BSA (Bovine Serum Albumin) $y = 5,4027 \cdot 10^{-5}$

Sampel protein diambil sebanyak 0,5 ml ditambahkan 1,00 ml larutan BSA 5000 ppm (konsentrasi pada serapan maksimum) ditambahkan 4,00 ml reagen Biuret dikocok, dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian diukur serapan pada panjang gelombang 550 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan penambahan 4,00 ml reagen Biuret dalam 1,00 ml aquades.

1.2 Konsentrasi Massa Protein Serum Perlakuan, Serum Kontrol , dan Kuning Telur

Sampel	Jumlah Sampel (μL)	Penambahan Aquades (μl)	Absorpsi	Konsentrasi ppm (μl)
K	800	1600	1,075	8874
P	1560	2440	2,322	19074
KT	800	-	1,069	8835

Keterangan ;

K : Protein serum darah ayam yang tidak distimulasi hormon estrogen

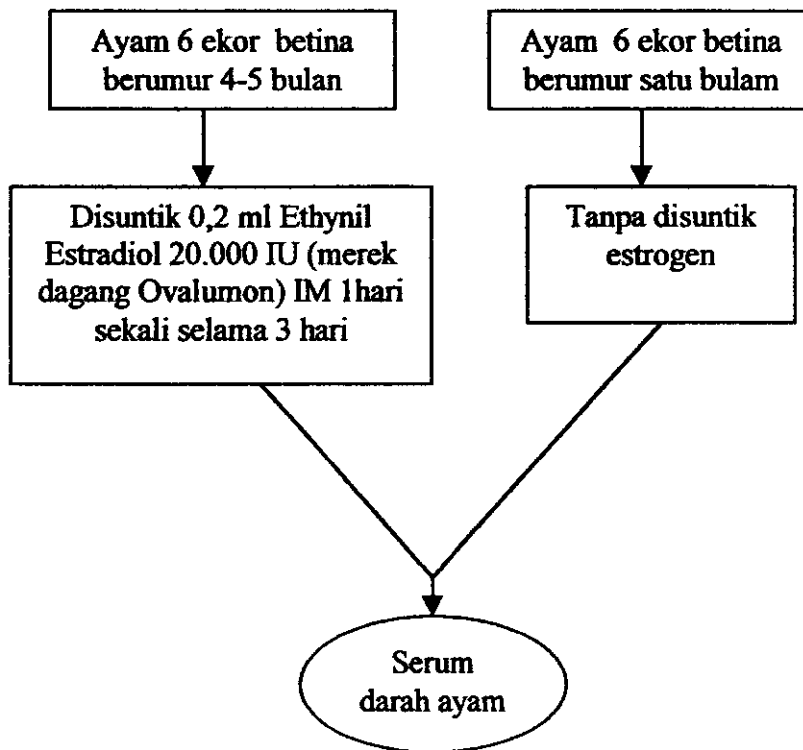
P : Protein serum darah ayam yang distimulasi hormon estrogen

KT : Protein kuning telur

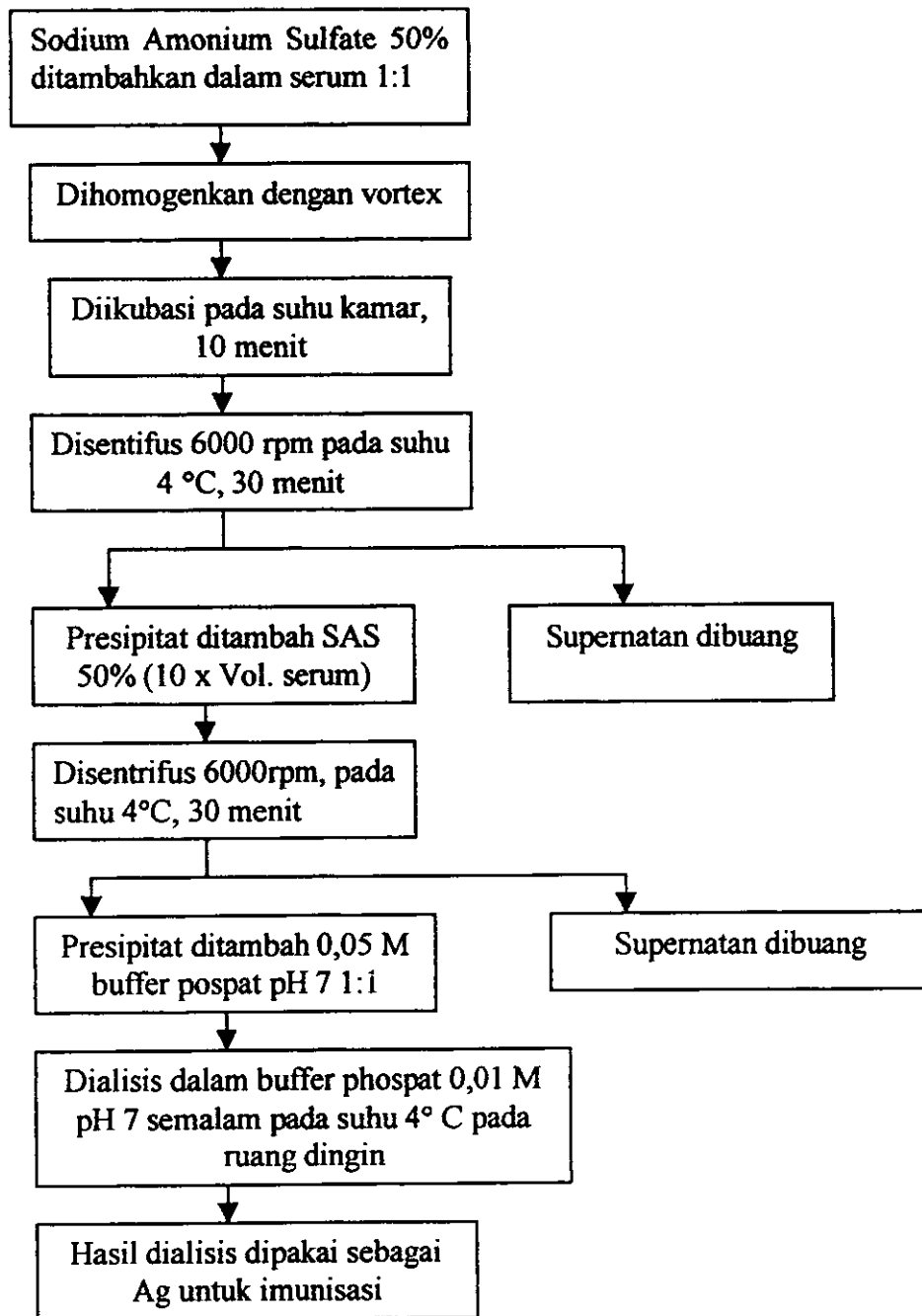
(Satria , 2002)

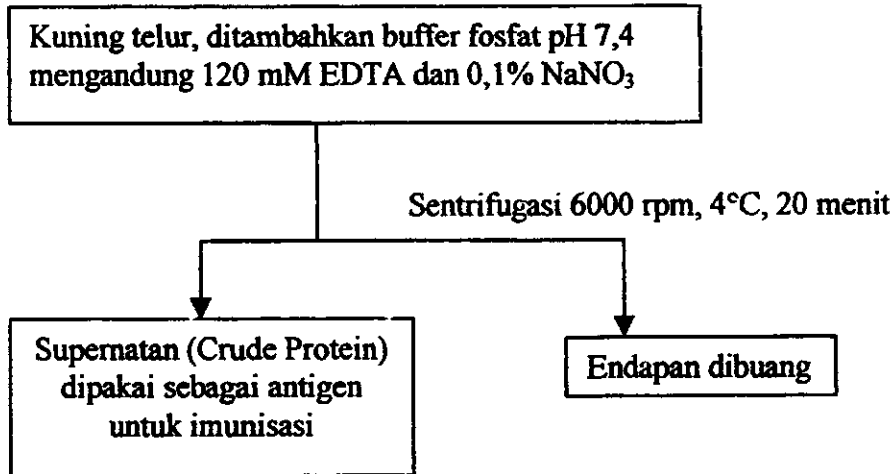
Lampiran 2. Metode Penyuntikan Estrogen Dan Isolasi Protein Serum

2.1. Penyuntikan Estrogen Pada Ayam



2.2 Metode Isolasi Protein Serum



Lampiran 3. Metode Isolasi Protein Kuning Telur

Lampiran 4. Metode Dot Blot