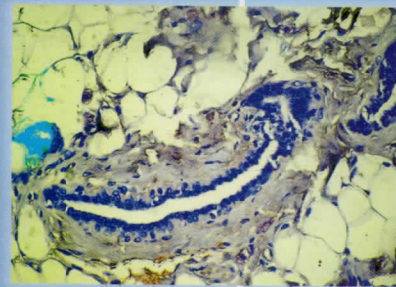
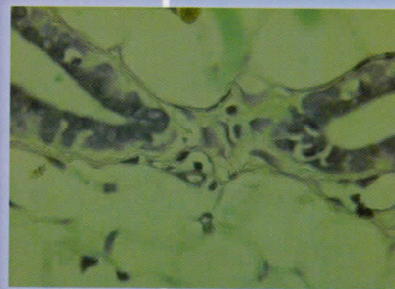


MEDIA

Kedokteran Hewan

Veterinary Medicine Journal



MKH (Vet.Med.J.)	Vol. 24	No. 3	Hal. 139-201	Surabaya, Sept. 2008	ISSN 0215-8930
------------------	---------	-------	--------------	----------------------	----------------

Akreditasi Dirjen Dikti No. 108/Dikti/Kep/2007
Tanggal 23 Agustus 2007

Media Kedokteran Hewan

Vol. 24, No. 3, September 2008

Media Kedokteran Hewan memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan
Peternakan

Terbit pertama kali tahun 1985 dengan frekuensi terbit tiga kali satu tahun pada bulan

Jahuari, Mei dan September

SUSUNAN DEWAN REDAKSI

Ketua Penyunting :

Epy Muhammad Luqman

Sekretaris :

Erma Safitri

Bendahara :

Diah Kusumawati Gali

Iklan dan Langganan :

Budiarto

Penyunting Pelaksana :

Sri Subekti Bendryman Soedjoko

Mas'ud Hariadi

Fedik Abdul Rantam

Suwarno

Sri Agus Sudjarwo

Penyunting Teknik :

Kusnoto

Thomas Valentinus Widiyatno

Tata Usaha :

Berty Ferijanti

Alamat: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus "C" Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992785; 5993016; Fax. (031) 5993015
e-mail: mkh_ua@yahoo.com

Rekening: Tahapan BCA - No. 01-4018-9375 (Dr. Diah Kusumawati G.)

Media Kedokteran Hewan diterbitkan oleh **Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia (PDHI)**
dan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.
Akreditasi Dirjen Dikti No. 108/Dikti/Kep/2007.

KETENTUAN UNTUK PENULISAN NASKAH

1. Ketentuan Umum
 - a. Media Kedokteran Hewan memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan, berupa hasil penelitian, artikel ulas balik (*review*) dan laporan kasus baik dalam Bahasa Indonesia maupun Bahasa Inggris.
 - b. Naskah / makalah harus orisinal dan belum pernah diterbitkan. Apabila diterima untuk dimuat dalam Media Kedokteran Hewan, maka tidak boleh diterbitkan dalam majalah atau media yang lain.
2. Standar Penulisan
 - a. Makalah diketik dengan jarak 2 spasi, kecuali Judul, Abstrak, Judul tabel dan tabel, Judul gambar, Daftar Pustaka, dan Lampiran diketik menurut ketentuan tersendiri.
 - b. Alinea baru dimulai 3 (tiga) ketukan ke dalam atau (*First line 0.3"*) dari format paragraf.
 - c. Huruf standar untuk penulisan adalah Book Antiqua 11.
 - d. Memakai kertas HVS ukuran kuarto (8,5 x 11").
 - e. Menggunakan bahasa Indonesia atau bahasa Inggris.
 - f. Tabel / Ilustrasi / Gambar harus amat kontras, juga menyertakan *file scanning* (foto) terpisah dengan makalah dengan format file JPG. Keterangan Tabel, Gambar atau Penjelasan lain dalam Lampiran diketik 1 (satu) spasi.
3. Tata cara penulisan naskah / makalah ilmiah
 - a. Tebal seluruh makalah sejak awal sampai akhir 12-14 halaman.
 - b. Penulisan topik (Judul, Nama Penulis, Abstrak, Pendahuluan, Metode dst.) tidak menggunakan huruf kapital (*setence*) tetapi menggunakan *Title Case* dan diletakkan di pinggir (sebelah kiri).
 - c. Sistematika penulisan makalah adalah Judul (Bahasa Indonesia dan Inggris), Nama Penulis dan Identitas, Abstrakt dengan Key words, Pendahuluan, Metode Penelitian, Hasil dan Pembahasan. Kesimpulan. Ucapan Terima Kasih (bila ada), Daftar Pustaka dan Lampiran (bila ada).
 - d. Judul harus pendek, spesifik, tidak boleh disingkat dan informatif, yang ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris.
 - e. Nama penulis di bawah judul, identitas dan instansi penulis harus jelas, tidak boleh disingkat dan ditulis di bawah nama penulis.
 - f. Abstrak maksimal terdiri dari 200 (dua ratus) kata, diketik 1 (satu) spasi dalam bahasa Indonesia dan Inggris.
 - g. Kata kunci (*key words*) maksimum 5 (lima) kata setelah abstrak.
 - h. Metode Penelitian memuat peralatan / bahan yang digunakan (terutama yang spesifik). prosedur penelitian dan analisis statistik (bila ada).
 - i. Daftar Pustaka disusun secara alfabetik tanpa nomor urut. Singkatan majalah/jurnal berdasarkan tata cara yang dipakai oleh masing-masing jurnal. Diketik 1 (satu) spasi dengan paragraf *hanging 0.3"* dan before 3.6 pt. Proporsi daftar pustaka, Jurnal/Majalah Ilmiah (60%), dan *Text Book* (40%). Berikut contoh penulisan daftar pustaka berturut-turut untuk *Text Book* dan Jurnal.

Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1996. *Immunology*. 4th Ed. Black Well Scientific Pub. Oxford.

Staropoli I, Clement JM, Frenkiel MP, Hofnung M, and Deuble V. 1996. Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus neutralization antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am.J. Trop. Med. Hygi.* 45: 159-167.
4. Pengiriman makalah dapat dilakukan setiap saat dalam bentuk cetakan (*print out*) sebanyak 3 (tiga) eksemplar. Setelah ditelaah oleh Tim Editor MKH, makalah yang telah direvisi penulis segera dikembalikan ke redaksi dalam bentuk cetakan 1 (satu) eksemplar dengan menyertakan makalah yang telah direvisi dan 1 (satu) disket 3.5" (Progam MS Word/IBM Compatible) dikirim ke alamat redaksi: **Media Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115, Telepon 031-599.2785; 599.3016; Fax. 031-599.3015; e-mail : mkh_ua@yahoo.com**
5. Ketentuan akhir

Terhadap naskah/makalah yang dikirim, redaksi berhak untuk:

 - a. memuat naskah/makalah tanpa perubahan
 - b. memuat naskah/makalah dengan perubahan
 - c. menolak naskah/makalah
6. Redaksi tidak bertanggung jawab atas isi naskah/makalah.
7. Makalah yang telah dimuat dikenai biaya penerbitan dan biaya pengiriman.
8. Penulis / pelanggan dapat mengirimkan biaya pemuatan makalah / langganan lewat **transfer-bank** pada **Dr. Diah Kusumawati G.**, dengan nomor rekening **Tahapan BCA No. 01-4018-9375**.
9. Semua keputusan redaksi tidak dapat diganggu gugat dan tidak diadakan surat menyurat untuk keperluan itu.

Media Kedokteran Hewan

Vol. 24, No. 3, September 2008

Terbit tiap 4 bulan sekali, pada bulan Januari, Mei dan September

UCAPAN TERIMA KASIH

Redaksi, penulis dan pembaca *Media Kedokteran Hewan* memberikan penghargaan dan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada para pakar di bawah ini, selaku mitra bestari yang telah menelaah semua tulisan baik yang dimuat maupun yang ditolak sesuai rekomendasi yang disampaikan pada redaksi dalam Volume 24 No.3, edisi September 2008.

Prof. Dr. Aulanni'am, DES., Drh. (MIPA UNIBRAW)

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. (FKH UNAIR)

Prof. Dr. Imam Mustofa, M.Kes., Drh. (FKH UNAIR)

Dr. Osfar Stofjan, MSc., Ir. (Fapet UNIBRAW)

Media Kedokteran Hewan

Vol. 24, No. 3, September 2008

Terbit tiap 4 bulan sekali, pada bulan Januari, Mei dan September

DAFTAR ISI

		Halaman
23	Isolasi dan Identifikasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas Air Sehat di Peternakan Skala Rumah Tangga di Jawa Barat (R. Susanti, Retno D Soejoedono, I Gusti Ngurah K Mahardika, I Wayan T Wibawan, dan Maggy T Suhartono)	139 – 146
24	Nilai Diagnostik Amboseptor Kelinci dan Tes Aglutinasi Darah Domba untuk Deteksi Faktor Rheumatoid pada Artritis Rematoid (F. M. Judajana)	147 – 152
25	Karakteristik Protein N1 Virus Avian Influenza A/Ck/BI/Indonesia/2003 sebagai Antigen Diagnostik pada ELISA Tak Langsung (Suwarno)	153 – 158
26	Peta Resistensi Antibiotika <i>Staphylococcus aureus</i> dari Kasus Mastitis Sapi Perah di Beberapa Daerah Peternakan (Mustofa Helmi Effendi)	159 – 164
27	Nilai Nutritif Onggok-terfermentasi Mutan <i>Trichoderma</i> AA1 pada Ayam Broiler (Ali Mursyid Wahyu Mulyono, Zaenal Bachruddin, Zuprizal, dan Muhammad Nur Cahyanto)	165 – 170
28	Ekspresi Protein <i>p53</i> pada Kelenjar Mammae Tikus Galur <i>Sprague Dawley</i> setelah Inisiasi Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA) dan Pemberian Kemopreventif <i>Gynura procumbens</i> (Iwan Sahrial Hamid, Sugiyanto, Edy Meiyanto, dan Sitarina Widyarini)	171 – 176
29	Penentuan Dosis Isolat Prolaktin Hasil Purifikasi Serum Darah Itik Fase Moulting untuk Produksi Anti Prolaktin (Erma Safitri, Wiwik Misaco, dan Husni Anwar)..	177 – 182
30	Kemampuan Reproduksi Monyet Kecil (<i>Tarsius spectrum</i>) yang Mengonsumsi Beberapa Jenis Makanan dalam Kandang Penangkaran <i>Ex Situ</i> (Hengki J. Kiroh)..	183 – 188
31	Stresor Iklim Tropis Menurunkan Kadar Immunoglobulin (Ig) Kolostrum pada Sapi Perah FH (An Observation and Analytical Study) (Paridjata Westra)	189 – 194
32	Penggunaan Asam Lemak Omega 3, Omega 6 dan Kolesterol Sintetis terhadap Kadar Hormon Testosteron dan Penampilan Reproduksi Puyuh Jantan (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) (Abyadul Fitriyah, Wihandoyo, Supadmo, dan Ismaya)	195 – 201

Penentuan Dosis Isolat Prolaktin Hasil Purifikasi Serum Darah Itik Fase Moulting untuk Produksi Anti Prolaktin

Dose Determination of Prolactine Isolate from Purification of Duck's Serum in Moulting Phase for Produce of Anti Prolactine

Erma Safitri¹, Wiwik Misaco², dan Husni Anwar¹

¹Departemen Reproduksi Veteriner

²Departemen Klinik Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
Kampus C Unair Mulyorejo Surabaya. email: rma_fispro@telkom.net

Abstract

The experiment was done for dose determination of prolactine isolate from purification of duck's serum in moulting phase. Purification was done by electroelusi method. The result of the experiment can used for scientific base to produce the antiprolactine. Antiprolactine can inhibited the moulting process. The duck's serum from axillaris vein was added SAS 50%, homogenated, sentrifugated, and dialised. Furthermore, characterization of prolactine was started by SDS PAGE 12% for determinated the molecule weight and specificity test by Western Blotting. The observed was showed that prolactine protein can be identificados at 27 kDa. Furthermore, prolactine isolate was measurement of protein total by Biuret method. Result the Biuret method was determinated 300 µg of prolactine isolate for every immunisation in goat as trial animal.

Key words: dose determination, duck's serum, moulting phase

Pendahuluan

Protein prolaktin penyebab itik mengalami fase moulting dapat diisolasi, diidentifikasi dan diuji spesifitasnya melalui metode SAS 50%, SDS PAGE 12% dan Western Blotting (Safitri, 2008 dan Srianto, 2008). Menurut Hall (1987), pada penelitiannya menyatakan bahwa kadar prolaktin dalam darah itik fase moulting $25,8 \pm 2,3$ ng/ml, sedangkan kadar prolaktin dalam darah itik fase bertelur $10,8 \pm 1,9$ ng/ml. Hal ini memberi petunjuk bahwa terjadi kenaikan kadar prolaktin dalam darah itik yang memasuki fase moulting sebesar 2,5 kali lipat dibanding fase bertelur.

Knobil *et al* (1988) dan Hafez *et al.* (2000), mengatakan bahwa proses moulting pada itik dibawah pengaruh sistem hormonal. Hormon gonadotropin seperti FSH dan LH ditemukan sangat rendah pada itik yang sedang moulting, padahal hormon gonadotropin diperlukan untuk perkembangan folikel dan proses oviposisi dari telur seekor unggas. Menurut Turner dan Bagnara (1988), Hall (1987) dan Safitri (2004) mengatakan bahwa ditemukan hormon prolaktin yang tinggi pada unggas yang sedang memasuki fase moulting. Prolaktin mempunyai pengaruh antigonadal yang langsung pada gonad atau secara tidak langsung menekan pelepasan

gonadotropin yang dihasilkan oleh hipofisa anterior (Gan *et al.*, 1987; Safitri, 2005).

Berdasarkan latar belakang diatas, telah dilakukan penelitian awal yang ditujukan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menguji spesifitas protein prolaktin dari serum darah itik fase moulting melalui metode SAS 50% (Aulanni'am, 2004), SDS-PAGE 12% (Rantam, 2003) dan dilanjutkan dengan uji spesifitas dengan metode Western Blotting (Murray *et al.*, 2003; dan Parslow *et al.*, 2001). Protein prolaktin yang telah diisolasi, diidentifikasi dan di uji spesifitasnya pada penelitian terdahulu selanjutnya perlu dilakukan suatu purifikasi untuk mendapatkan isolate prolaktin yang murni. Purifikasi protein prolaktin pada penelitian ini dilakukan melalui metode Elektroelusi (Aulanni'am, 2004). Selanjutnya isolat yang didapat nantinya digunakan untuk memproduksi antibodi poliklonal anti prolaktin untuk mengatasi moulting pada itik.

Metode Penelitian

Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa serum darah itik fase moulting, antibodi poliklonal anti prolaktin dari kambing (sebagai antibodi primer), antigoat anti IgG Alkaline phosphatase

conjugate (sebagai antibodi sekunder). Bahan untuk teknik SAS 50% adalah : SAS jenuh 50%, buffer fosfat 0,2 M pH 8, buffer fosfat 0,1 M pH 7, larutan BaCl₂. Bahan untuk teknik SDS-PAGE 12% adalah : cairan sampel, trisaminomethan, glisin, SDS (Biorad), aquades, bis acrilamid, TEMED (sigma), poliakrilamid, mercaptoethanol, Commasie Brilliant Blue, Bromophenol blue. Bahan untuk teknik Western Blotting adalah : Membran Nitroselulose, gel PAGE yang mengandung protein, Transfer buffer (Tris, Glycine, Methanol, Aquades steril), PBS Skim Milk 5%, antibodi primer, TBS, substrat Western blue, PBS Tween 20, anti goat anti Ig G alkaline phosphatase (Sigma NB 710- 55588) komposisi: 0,03 M Tris, 0,14 M Sodium Chlorida pH 8 dan 1% bovine albumin. Produksi Santa Cruz Biotechnology. Bahan untuk teknik Elektroelusi : gel PAGE protein, Buffer Phospat 0,2 M, Buffer Phospat 0,1 M dan Etanol.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang hewan coba, disposable syringe 10 ml (Terumo Co., Europe), tabung reaksi venojack 10 ml, rak tabung venojack, pipet eppendroof, waterbath sacker, freezer -20°C, refrigerated centrifuge, vortexer, pH meter merk Schoot-Gerate, micropipet, kantong dialisis (kantong selofan) (Sigma,D9652), sparating gel, plate SDS PAGE, stacking gel, comb (pencetakan sumuran dari gel), kertas tisu, chamber untuk running SDS-PAGE, transfer blotter (Biorad), electrophoresis equipment (SDS-PAGE), membrane nitroselulose.

Pelaksanaan penelitian

Penelitian ini sebelumnya diawali dengan isolasi dari serum darah itik fase moulting untuk memisahkan antara protein dengan unsur lain. Serum didapat dengan cara pengambilan darah pada vena axilaris di daerah sayap dari itik. Pada penelitian ini digunakan 5 ekor itik yang mengalami moulting. Darah yang didapat dari 5 ekor itik tersebut ditampung pada tabung venojack, diletakkan miring 45° dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar, dilakukan sentrifuge 1500 rpm selama 30 menit untuk mendapatkan serum yang dimaksud. Serum yang didapat ditambahkan Saturation Amonium Sulfat (SAS) 50% dengan perbandingan volume yang sama antara serum dengan SAS 50%, dilakukan homogenisasi, lalu didiamkan selama 20 menit dan dilakukan tiga kali pengulangan.

Serum ini kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit, supernatan dibuang, pada presipitat ditambahkan SAS 50% sepuluh kali volume serum, dihomogenkan kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama selama 10 menit. Supernatan dibuang, presipitat ditambahkan Buffer Fosfat 0,2 M pH 8 dengan volume yang sama, dimasukkan ke dalam selofan, diberi label, kemudian diikat. Selanjut-

nya direndam dalam Buffer Fosfat 0,1 M pH 7, dihomogenkan dalam keadaan dingin (suhu ±5°C) selama 24 jam, kemudian buffer diganti dengan buffer fosfat 0,1 M yang baru dan dibiarkan semalam selama 6 jam. Larutan luar selofan kemudian diuji dengan larutan BaCl₂ (apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO₄ maka dialisis dapat dihentikan). Hasil dialisis kemudian diangkat dan disimpan pada suhu -20°C dan siap diidentifikasi dengan metode SDS-PAGE 12%.

Metode SDS-PAGE 12% ini bertujuan untuk mengetahui gambaran protein yang berupa persentase area (bands atau pita-pita dari protein). Beberapa tahapan yang harus dikerjakan adalah sebagai berikut: dimasukkan running gel (sparating gel) ke dalam plate SDS-PAGE melalui dinding kira-kira kurang dari batas atas. Kemudian ditambahkan aquades sampai batas atas supaya sparating gel rata, selanjutnya aquades diserap dengan kertas tisu. Langkah berikutnya ditambahkan stacking gel melewati dinding sampai penuh dan setelah itu dimasukkan comb (pencetak sumuran dari gel) dan ditunggu sampai betul-betul set (terbentuk gel). Selanjutnya comb diambil dan dibersihkan sisa-sisa gel dengan tissue. Cetakan gel yang sudah jadi dipindahkan dan dimasukkan dalam chamber, kemudian direndam dalam running buffer. Selanjutnya diletakkan cetakan penuntun cairan sample yang akan dirunning. Cairan sample (serum itik fase moulting) sebanyak 8µl dimasukkan ke lubang cetakan dengan tip 200µl. Langkah berikutnya chamber dihubungkan dengan alat biorad, power supply dinyalakan dengan kekuatan 130 V, 40mA selama 1,5 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan, plate dibuka dan dipisahkan, selanjutnya hasilnya berupa lembaran berbentuk gel diwarnai dengan coomassie brilliant blue dan di sacker (digoyangkan). 30 menit kemudian dientaskan dan ditambahkan cairan Destaining kemudian di sacker lagi selama 30 menit, jika cairan sudah terlihat berwarna biru diganti dengan cairan destaining yang baru, begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasil yang berupa band-band. Berat molekul akan dapat diketahui pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003).

Tahap akhir dari karakterisasi protein prolaktin adalah dilakukan uji spesifisitas melalui metode Western Blotting untuk menentukan apakah protein hasil SDS-PAGE sebelumnya adalah benar-benar protein spesifik penyebab moulting. Teknik Western Blotting dapat digunakan untuk konfirmasi Berat Molekul (BM) dari protein yang dimaksud. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan konfirmasi dari hasil Western Blotting dan SDS-PAGE, jika BM yang muncul dari kedua metode itu sama, maka

dapat dikatakan bahwa protein tersebut adalah benar-benar protein spesifik yang dimaksud.

Serum itik fase moulting yang diduga mengandung protein spesifik penyebab moulting dirunning dalam SDS-PAGE 12% dalam kondisi tereduksi dan satu sumuran adalah marker dan ditransferkan pada membran Nitrosellulose. Membran di blok dengan blocking buffer (PBS Skim milk 5%) selama 1 jam, lalu di cuci dengan Phosphat Buffer Salin Tween (PBST) selanjutnya diinkubasi dengan anti moulting yang diproduksi pada kambing sebagai antibodi primer selama semalam 4°C. Kemudian dicuci dengan Transfer Buffer Salin (TBS) lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder (Anti Goat Anti Ig G Alkaline phosphatase conjugated, pengenceran 1:2500), kemudian dicuci dengan PBST dan diinkubasi dengan substrat western blue selama semalam dalam ruang gelap. Pita yang muncul adalah pita protein spesifik penyebab moulting sehingga bisa diketahui BM protein tersebut dari serum (Upstate 2002; Bedecerrats *et al.*, 1999 dan Choy *et al.*, 1997)

Tahap penelitian berikutnya adalah pelaksanaan purifikasi dari protein prolaktin untuk mendapatkan isolate prolaktin murni. Gel hasil SDS-PAGE (*gel acrilamid*) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,2 M Phosphat Buffer (PB) sebanyak 1-2 ml. kemudian dimasukkan dalam *chamber elektroelusi* yang mengandung Phosphat Buffer 0,1 M. langkah berikutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 4°C (dalam *refrigerator*), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 250 V, 20 mA selama satu malam (*overnight*).

Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara melakukan pemotongan gel acrilamide dan diwarnai dengan staining coomassie brilliant blue selama 20 menit, kemudian ditambahkan destaining, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi.

Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan kemudian dipresipitasi atau dipurifikasi dengan etanol untuk mendapatkan protein yang dimaksud. Protein yang dimaksud dalam penelitian ini adalah isolate prolaktin.

Hasil dan Pembahasan

Metode pemurnian protein harus memperhatikan produk, yaitu protein hasil pemurnian harus masih mempunyai aktivitas biologi. Pemurnian akan membuat adanya variasi atau kemiripan kualitas protein yang dihasilkan, tergantung dari kemampuan menghilangkan kontaminan protein dari metode yang digunakan. Hal ini akan menghasilkan perbedaan

an dalam bentuk, muatan, hidrofobisitas, kelarutan dan aktivitas biologis (Aulani'am, 2004).

Pemurnian dilakukan untuk mendapatkan molekul protein dengan BM 27 kDa, yang telah diyakini sebagai molekul prolaktin dengan metode elektroelusi. Pelaksanaan elektroelusi tersebut berasal dari hasil SDS-PAGE 12% (Srianto, 2008).

Pemurnian isolate protein menjadi penting setelah dilakukan karakterisasinya. Pemurnian protein yang telah didapat adalah usaha memisahkan protein tertentu dari ekstrak kasar seluruh serum yang mengandung banyak unsur lain. Banyak cara yang digunakan untuk memurnikan protein, salah satunya yaitu dengan menggunakan metode elektroelusi (Aulani'am, 2004).

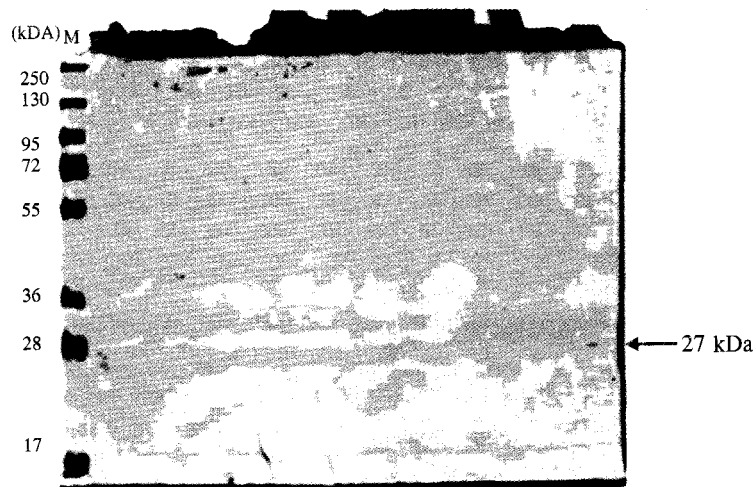
Berdasarkan hasil uji spesifisitas dengan metode *Western Blotting* antara serum yang teridentifikasi melalui SDS-PAGE yang diduga mengandung prolaktin (sebagai antigen) direaksikan dengan antibodi poliklonal anti prolaktin (Sigma L-6520) menunjukkan adanya reaksi positif dengan munculnya pita pada BM yang sama. Oleh karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE 12% adalah pita protein prolaktin dengan berat molekul 27 kDa.

Setelah diyakini bahwa protein dapat diidentifikasi dengan metode SDS-PAGE 12% kemudian dilakukan uji spesifisitas protein prolaktin maka penelitian dilanjutkan untuk mendapatkan isolate prolaktin sesuai dengan sifat-sifatnya. Isolat prolaktin tersebut didapatkan dengan cara isolasi dan pemurnian dengan metode *ElektroElusi* (Safitri, 2005). Hasil dari pemurnian pada penelitian ini berupa isolate prolaktin murni dengan BM 27 kDa.

Selanjutnya setelah dilakukan purifikasi dilakukan pengukuran kadar total protein melalui Metode biuret. Pengukuran kadar total protein Metode biuret pada penelitian ini menggunakan spektrofotometer. Melalui spektrofotometer dapat ditentukan total protein berdasarkan nilai absorbansi yang terbaca. Hasil pengukuran kadar total protein dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengukuran kadar total protein dari isolate prolaktin melalui Metode biuret pada penelitian ini, yaitu didasarkan pada pembentukan kompleks yang berwarna ungu. Kompleks ini terbentuk apabila suatu protein yang mempunyai empat atom nitrogen yang berasal dari asam amino berikatan dengan Cu^{2+} dari CuSO_4 (Aulani'am, 2003).

Walker (1994) menjelaskan bagaimana berlangsungnya reaksi biuret, sebagai berikut: Kupri sulfat dalam suasana basa dapat bereaksi positif dengan protein, karena itu larutan yang akan diuji terlebih dahulu dibuat bersifat alkalis, dengan penambahan NaOH dalam reagent biuret. Kupri sulfat dalam suasana basa bereaksi dengan senyawa yang mengandung dua atau lebih ikatan peptida menghasilkan



Gambar 1. Pita prolaktin hasil Elektroelusi yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE 12% dengan pewarnaan Comassie brilliant blue. M = marker protein, → = prolaktin dengan BM 27 kDa.

senyawa kompleks yang berwarna ungu. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada banyaknya ikatan peptida yang terdapat dalam protein. Hal ini sebanding dengan jumlah molekul protein total yang ada pada molekul prolaktin sampel. Semakin banyak jumlah protein dalam sampel maka intensitas warna semakin besar karena adanya sejumlah ikatan peptida dalam sampel.

Pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin dalam penelitian ini ditujukan untuk penentuan dosis yang akan digunakan untuk produksi Anti prolaktin pada penelitian selanjutnya. Setelah dilakukan pengukuran terhadap 9 sampel isolat prolaktin dengan volume serum $4,96 \pm 0,35$ ml dan konsentrasi $377,67 \pm 88,14$ ppm didapatkan kadar total protein $377,67 \pm 88,14$ $\mu\text{g/ml}$, selanjutnya dipilih dosis untuk produksi anti prolaktin dengan kadar total protein 300 $\mu\text{g/ml}$. Dosis ini sesuai dengan pendapat Agrisera (2004), dimana dikatakan bahwa dosis imunogen yang dianjurkan untuk kambing adalah $20-500$ μg per immunisasi. Dosis ini juga sesuai dengan dosis per immunisasi pada kambing yang disampaikan oleh Kerr and Thorpe (1994), yaitu 250 $\mu\text{g}-1000$ μg .

Dosis 300 $\mu\text{g/ml}$ isolat prolaktin tersebut diberikan untuk setiap kali immunisasi per ekor kambing sebagai hewan coba. Anti prolaktin yang diproduksi

pada hewan coba pada akhirnya akan digunakan untuk mempercepat proses moulting pada itik.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa protein prolaktin yang telah diisolasi, diidentifikasi dan diuji spesifisitasnya dengan berat molekul 27 kDa dan dapat ditentukan dosis untuk pembuatan antinya yaitu sebesar 300 $\mu\text{g/ml}$ untuk setiap kali immunisasi per ekor kambing sebagai hewan coba.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai oleh dana RAPBN dari Dinas Peternakan Tingkat I Jatim tahun 2007. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih.

Daftar Pustaka

- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekuler Cetakan Pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. 28-45.
- Bedecarrats G, Guemene D, Morvan C, Kuhnlein U, and Zad vorny D.1999. Quantification of Prolactin Messenger Ribonucleic Acid Pituitary Content and Plasma Levels of Prolactin and Detection of Immunoreactive Isoform of Prolactin in Pituitaries from Turkey Embryos during

- Ontogeny. *Biology of Reproduction* 61,757-763. zadworny@agradm.lan.mcgill.ca. Accessed: 2 September 2007.
- Choy VJ, Nixon AJ, and Pearson AJ. 1997. Distribution of prolactin Receptor Immunoreactivity in ovine Skin & changes during the wool Follicle growth Cycle. *J. Endocrinology*; 155,265-275. Accessed: 2 Oktober 2007.
- Freeman ME, KanyieskaB, and Nagy G. 2000. Prolactin, structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev.* Oct; 80(4): 1523-631. www.physrev.org. Accessed: 19 Agustus 2007.
- Gan S, R. Setiabudy, U Sjamsudin dan ZS, Bustami. 1987. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 3. Gaya Baru, Jakarta.
- Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 6th Ed. Philadelphia. Lea and Febiger.
- Hall MR. 1987. External Stimuli Affecting Incubation Behavior and Prolactin Secretion in the Duck (*Anas Platyrhynchos*). 21(3): 87-269.
- Hardjopranto S. 2003. Luteotropic hormon (LTH). Hand Out Kuliah. Mata Kuliah Endokrinologi Reproduksi. Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi. Pascasarjana. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Jabbour HN and Kelly PA. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Journals of Abreviation reproduction and Fertility*. 2: 14-18.
- John PA And Wentworth BC. 1998. Pulsatile Secretion of Prolactin in Laying and Incubating Turkeys Hens. *Tektran. Agriculture Research Service*. Baltimore Blvd Bldg. 200. RM. 100, Barcbeltville MD 20705. Accessed: 25 Juli 2007.
- Knobil E, Neill D, Ewing LL, Market CL, Greenwald GS and Pfaff DW. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2. Raven Press. New York. 1379-1385.
- Li A, Zhong YY, Wang S, and Kang WC. Cloning and sequence analysis of prolactin gene from muscovy duck. 2003. [http:// www. ceps. com](http://www.ceps.com). Accessed: 04 Agustus 2007.
- March JB, Sharp PJ, Wilson PW and Sang HM. 1999. Effect of Active Immunization Against Recombinant-derived Chicken Prolactin Fusion Protein on the on-set of Broodiness and Photoinduced Egg Laying in Bantam Hens. *Journal of Reproduction and fertility*. 101: 227-233.
- Michael HR. 1987. Nesting Success in Mallards after Partial Clutch Loss by Predators. *The Journal of Wildlife Management*. 51(3): 530-533.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenenbaum RH. 2003. *Manual of Clinical Microbiology* 8 th. Ed. ASM Press. Washington DC. 219-226.
- Parslow TG, Stites DP, Terr AI, and Imboden JB. 2001. *Medical Immunology*. 10th Ed. Lang Medical Books Mc Graw-Hill. Medical Publishing Division. New York Chicago San Fransisco Lisbon London Madrid Mexico City Milan New Delhi San Juan Singapore Sydney Toronto. 227-228.
- Ramachandran R, Kuenzel WJ, and Proudman JA. 2003. Increased proliferative activity and programmed cellular death in the turkey hen pituitary gland following interruption of incubation behaviour. *Regular Article Biology of Reproduction*. 64: 611-618.
- Ramesh R, Kuenzel WJ, and Proudman JA. 2001. Increased proliferative activity and programmed cellular death in the turkey hen pituitary gland following interruption of incubation behaviour. *Regular Article Biology of Reproduction*. 64: 611-618.
- Rantam FE. 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya. 148-162.
- Safitri E, Samik A, dan Hendarti GA. 2004. Crude prolactin sebagai bahan bioaktif pembentuk anti prolaktin pada ayam arab petelur. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
- Safitri E. 2004. Isolation, identification and characterization of prolactin protein for production of anti-prolactin as moulting process inhibitor. *Reproductive Biotechnology for Improved Animal Breeding in Southeast Asia*. Proceeding Seminar Internasional. University of Udayana. Bali.
- Safitri E. 2005. Metode pembuatan antiprolaktin pada hewan coba kambing lokal sebagai penghambat proses moulting pada ayam arab petelur. *Berkala Penelitian Hayati. Journal of Biological Researches*. 11(1): 26-29
- Safitri E. 2008. Isolasi dan identifikasi protein prolaktin dari serum itik fase moulting melalui metode SAS 50% dan SDS PAGE 12%. *Veterinaria Medika*.

- Srianto P. 2008. Uji spesifisitas protein prolaktin dari serum darah itik moulting melalui metode western blotting. *Jurnal Faal*. 17(2): 14-18
- Tachibana T, Saito S, Tomonaga S, Takagi T, Saito ES, Nakanishi T, Koutoku T, Tsukada A, Ohkubo T, Boswell T, and Furuse M. 2003. Effect of central administration of prolactin-releasing peptide on feeding in chicks. Article in Press. *Physiology and Behaviour*. Elsevier. E-mail:tetsu@brs, kyushu-u.ac.jp. Accessed: 25 Oktober 2007.
- Turner CD, dan JT Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum*. Cetakan keenam. Airlangga University Press.
- Upstate B. 2002. Anti Prolactin (Rabbit Antiserum) and Immunoblotting Proptocol. Up state Biotechnology. Certificate of Analysis. www.upstatebiotech.com . Accessed: 23 april 2007.
- Yamamoto Wakita M, and Tanaka M. 2003. Tissue Distribution of Prolactin Receptor mRNA during late Stage. *Embryogenesis of The Chick*. *Poultry Science* 82: 155-157.