

repository.ub.ac.id

**PROFIL PITA PROTEIN DAN KADAR PROTEIN OGP
(*Oviduct-specific Glycoprotein*) PADA KAMBING
PERANAKAN ETAWA YANG MENGALAMI
ABNORMALITAS DI OVARIUM**

SKRIPSI

Oleh:

CHEPTIEN WINDA VIRGIANTARI

145130100111006



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

repository.ub.ac.id

**PROFIL PITA PROTEIN DAN KADAR PROTEIN OGP
(*Oviduct-specific Glycoprotein*) PADA KAMBING
PERANAKAN ETAWA YANG MENGALAMI
ABNORMALITAS DI OVARIUM**

SKRIPSI

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh:

CHEPTIEN WINDA VIRGIANTARI

145130100111006



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PROFIL PITA PROTEIN DAN KADAR PROTEIN OGP
(*Oviduct-specific Glycoprotein*) PADA KAMBING
PERANAKAN ETAWA YANG MENGALAMI
ABNORMALITAS DI OVARIUM****Oleh:****CHEPTIEN WINDA VIRGIANTARI****145130100111006**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal.....
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet

NIK. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Cheptien Winda Virgiantari
NIM : 145130100111006
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Proposal Skripsi berjudul:

**Profil Pita Protein dan Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*)
pada Kambing Peranakan Etawa yang Mengalami Abnormalitas di Ovarium**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam proposal skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2 Januari 2018
Yang menyatakan,

(Cheptien Winda Virgiantari)
NIM. 145130100111006

Profil Pita Protein dan Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada Kambing Peranakan Etawa yang Mengalami Abnormalitas di Ovarium

ABSTRAK

Penyakit gangguan reproduksi perlu diketahui dan dipetakan dengan akurat, sehingga upaya pencegahan, pengendalian, serta penanganannya dapat membuahkan hasil yang optimal. OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) merupakan salah satu dari glikoprotein yang memiliki berat molekul tinggi. Glikoprotein ini dihasilkan oleh sel sekretori yang tidak bersilia pada epitelial saluran oviduk yang bersifat estrogen dependen, sehingga terjadinya kasus penyakit reproduksi hipofungsi ovarium, memungkinkan terjadinya perbedaan pada profil pita protein serta kadar protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pada profil pita protein dan kadar protein OGP kambing PE betina yang mengalami abnormalitas di ovarium (hipofungsi ovarium). Sampel organ ovarium diperoleh dari limbah RPH kemudian diidentifikasi secara *gross anatomy*. Analisa profil pita protein dilakukan secara deskriptif, kemudian untuk kadar protein OGP dilakukan secara kuantitatif melalui uji t independen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat molekul protein OGP pada kambing Peranakan Etawa (PE) betina adalah 62-66 kDa. Dengan pola profil pita protein OGP pada sampel dengan ovarium normal memiliki garis pita lebih tebal apabila dibandingkan dengan sampel organ reproduksi kambing PE yang mengalami hipofungsi. Nilai rata-rata kadar protein OGP antara ovarium normal dan hipofungsi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), dengan rata-rata kadar OGP pada kelompok ovarium normal sebesar 408.72 ± 38.91 pg dan rata-rata kadar OGP pada kelompok ovarium hipofungsi sebesar 94.85 ± 18.41 pg. Disimpulkan bahwa kondisi ovarium memengaruhi level sekresi protein OGP dalam organ reproduksi betina.

Kata kunci : Kambing Peranakan Etawa, ovarium, OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*), SDS-PAGE, kadar protein.

The Profile of Protein Band and Protein Levels of OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) on Ovarian Abnormalities Etawa Crossbreed Goat

ABSTRACT

Reproductive disorders need to be known and mapped accurately, so the prevention, control and handling efforts of those disorders can produce optimal results. OGP (*Oviduct-specific glycoprotein*) is one of the glycoproteins that have high molecular weight. This glycoprotein is produced by nonciliated secretory cells on the oviduct with *oestrogen-dependent* characteristic, so the occurrence of reproductive hypofunction ovarian disease allows the differences in both of band profile and protein levels. This study aims to determine the differences in OGP band profile and OGP protein levels of female Etawa Crossbreed goats with ovarian abnormalities (ovarian hypofunction). The samples of ovarian organs were obtained from slaughter house waste then identified by gross anatomy. Analysis of protein band profiles was carried out descriptively, then for OGP protein levels carried out quantitatively through an independent t test. The results showed that the molecular weight of OGP protein in female Etawa Crossbreed goats was 62-66 kDa. The pattern of OGP protein band profiles with normal ovaries sample have a thicker band line compared to organs sample with ovarian hypofunction. The mean value of OGP protein levels between normal ovaries and hypofunction showed a significant difference ($p < 0.05$), with an OGP level average in the normal ovary group was 408.72 ± 38.91 pg and the OGP level average in the hypofunction ovary group was 94.85 ± 18.41 pg. In conclusion, the ovary condition affects the level of OGP protein secretion in the female reproductive organ.

Keywords: Etawa Crossbreed Goat, Ovary, OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*), SDS-PAGE, protein levels.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Profil Pita Protein dan Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada Kambing Peranakan Etawa yang Mengalami Abnormalitas di Ovarium”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulani'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan selaku dosen pembimbing I Skripsi yang telah bersedia membimbing, mengarahkan, serta memberi motivasi kepada penulis.
2. Drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet., selaku dosen pembimbing II Skripsi yang telah bersedia memberikan bimbingan, arahan, serta motivasi kepada penulis.
3. Drh. Desi Wulansari, M.Vet dan Drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si, selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat baik kepada penulis.
4. Dr. Dra. Herawati, MP., selaku dosen pembimbing akademik penulis.
5. Drh. Yudit Oktanella, M.Si., selaku dosen yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk bergabung dalam payung penelitian serta bersedia memberikan bimbingan dan motivasi.
6. Drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya.

7. Drh. Dyah Ayu Oktavanie, M.Biomed., selaku Wakil Dekan Bidang Akademik.
8. Ayahanda Sugiyarno, Ibunda Widya Handayani, serta Adik Fayiz Gidya yang senantiasa memberikan dukungan, motivasi, dan kasih sayang kepada penulis.
9. Rekan-rekan *Amaze* Kelas 2014 A dan *Avengers* Angkatan 2014 atas dukungan, kebersamaan, dan kekompakannya selama ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang selama ini telah banyak mendukung, membantu, serta memotivasi penulis dalam mengerjakan Skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan semoga proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 2 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

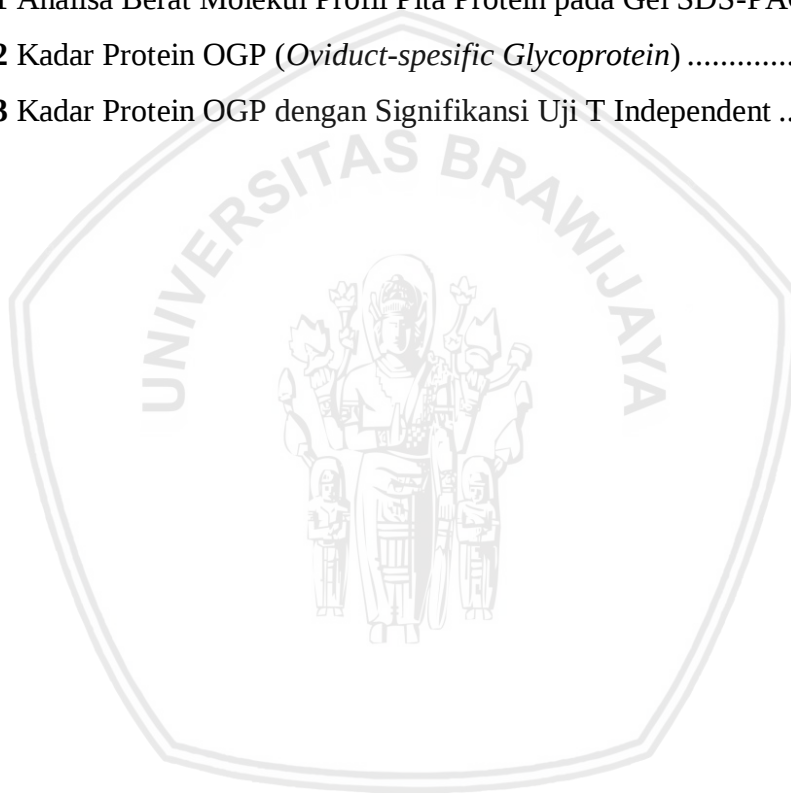
Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Kambing Peranakan Etawa (PE).....	8
2.2 Morfologi dan Klasifikasi Kambing Peranakan Etawa	9
2.3 Saluran Reproduksi Kambing	10
2.4 Abnormalitas pada Ovarium	15
2.5 <i>Oviduct-specific Glycoprotein</i> (OGP)	17
2.6 SDS-PAGE	18
2.7 Spektrofotometri	22

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN....	25
3.1 Kerangka Konseptual	25
3.2 Hipotesis Penelitian.....	29
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	30
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	30
4.2 Sampel Organ.....	30
4.3 Alat dan Bahan.....	31
4.4 Rancangan Penelitian	32
4.5 Variabel Penelitian	32
4.6 Tahapan Penelitian	33
4.7 Prosedur Penelitian.....	33
4.7.1 Identifikasi Sampel Organ Reproduksi Kambing PE	33
4.7.2 Isolasi Protein	34
4.7.3 Analisa Profil Pita Protein dengan SDS-PAGE	34
4.7.4 Pengukuran Kadar Protein	36
4.7.5 Analisa Data	36
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
5.1 Preparasi Sampel Set Organ Reproduksi Kambing Peranakan Etawa Betina	37
5.2 Analisa Profil Pita Protein OGP (<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>) pada	
Kambing Peranakan Etawa Betina Menggunakan SDS-PAGE	39
5.3 Analisa Kadar Protein OGP (<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>) pada Kambing	
Peranakan Etawa Betina	45
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
6.1 Kesimpulan	51
6.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA.....	52
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1 Perbedaan Karakter Genetik dan Parameter Reproduksi pada Kambing dan Domba	8
Tabel 5.1 Analisa Berat Molekul Profil Pita Protein pada Gel SDS-PAGE	41
Tabel 5.2 Kadar Protein OGP (<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>)	46
Tabel 5.3 Kadar Protein OGP dengan Signifikansi Uji T Independent	46

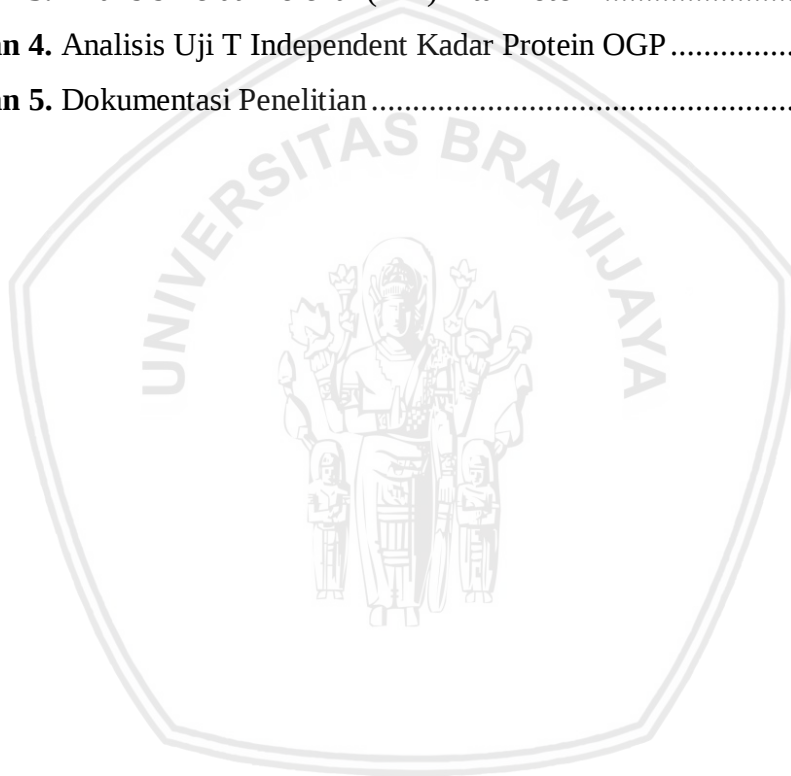


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Kambing Peranakan Etawa.....	9
Gambar 2.2 Anatomi Saluran Reproduksi Kambing Betina	12
Gambar 2.3 Alur Kerja SDS-PAGE.....	20
Gambar 5.1 Penampang Makroskopis Set Organ Reproduksi dan Ovarium Kambing Peranakan Etawa Betina yang Didapat dari Limbah Rumah Potong Hewan.....	38
Gambar 5.2 Ekspresi Profil Pita OGP (<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>) pada Sampel Organ Reproduksi Kambing PE Betina dengan Ovarium Normal dan Ovarium Hipofungsi	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Bagan Kerangka Konseptual.....	57
Lampiran 2. Alur Kerja Penelitian.....	58
Lampiran 3. Analisis Berat Molekul (BM) Pita Protein	63
Lampiran 4. Analisis Uji T Independent Kadar Protein OGP	85
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	87



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
ADD	<i>Animal Diagnostic Disease</i>
APS	<i>Ammonium persulphate</i> (ammonium persulfat)
BM	Berat molekul
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cm	Centimeter
FKH	Fakultas Kedokteran Hewan
FSH	<i>Folicle Stimulating Hormone</i>
g	Gram
GDF9	<i>Growth Differentiaton Factor 9</i>
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
LH	<i>Luteinezing Hormone</i>
mA	Mili Ampere
mL	Mili Liter
mmol	Milimol

Mr	<i>Mobilitas rate</i>
OGP	<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>
PAGE	<i>Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PE	Peranakan Etawa
pg	picogram
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
R _f	<i>Retardation factor</i>
RPH	Rumah Potong Hewan
Rpm	<i>Rotation per minutes</i>
RSB	<i>Reducing Sample Buffer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> (Natrium dodesil sulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electroforesis</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TEMED	N, N, N', N'- <i>tetramethylethylenediamine</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
UTJ	<i>Uterine Tuba Junction</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencapaian target populasi ternak dalam pemenuhan kebutuhan protein hewani sampai saat ini masih terkendala oleh beberapa faktor, antara lain seperti menipisnya jumlah populasi ternak, reproduktivitas dan produktivitas ternak yang rendah, serta akibat adanya gangguan reproduksi yang dapat mempengaruhi kondisi ternak, dimana gangguan reproduksi ternak tersebut memiliki kontribusi yang besar dalam peningkatan penurunan populasi serta menjadi salah satu penyebab utama rendahnya status kesehatan hewan maupun kesehatan reproduksi hewan (Tarmudji, 2010).

Menurut Santosa (2014), penyakit gangguan reproduksi sangat perlu diketahui serta dipetakan dengan akurat sehingga upaya pencegahan, pengendalian, serta penanganannya dapat membuahkan hasil yang optimal. Pentingnya pemetaan dan pengetahuan tersebut menjadi sangat penting karena hingga saat ini masih sering dijumpai adanya kasus gangguan reproduksi pada ternak ruminansia yang ditandai dengan rendahnya fertilitas induk, dimana gangguan reproduksi pada ruminansia secara garis besar disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya cacat anatomi saluran reproduksi, gangguan fungsional organ reproduksi, infeksi organ reproduksi, ataupun kesalahan manajemen.

Faktor-faktor penyebab terjadinya gangguan reproduksi pada ternak yang disebutkan oleh Santosa (2014), antara lain seperti: cacat anatomi organ reproduksi, contohnya cacat kongenital pada ovarium yang meliputi hipoplasia ovarium yang dapat

terjadi secara unilateral maupun bilateral dan agensis ovarium (ovarium tidak terbentuk); kemudian gangguan fungsional organ reproduksi, yang menyebabkan organ reproduksi tidak berfungsi dengan baik, dimana bentuk abnormalitas fungsional organ ini disebabkan oleh adanya abnormalitas hormonal.

Ovarium merupakan organ reproduksi utama untuk memproduksi sel gamet betina (ovum) dan hormon-hormon reproduksi. Hamny (2006) menyebutkan, ovarium merupakan salah satu organ reproduksi dari hewan betina yang mengalami perkembangan dan perubahan morfologi yang dinamis seperti adanya perkembangan folikel, ovulasi, dan luteinisasi. Proses-proses tersebut merupakan hasil dari proses pembelahan sel, kematian sel, migrasi sel, dan perlekatan (adhesi) dari sel-sel ovarium. Sepanjang berlangsungnya proses tersebut, terjadi perubahan glikoprotein pada setiap tahapan perkembangan folikel. Namun informasi mengenai jenis glikoprotein yang berperan pada sistem reproduksi ruminansia masih sangat sedikit.

Dalam upaya peningkatan keberhasilan peningkatan populasi ternak kambing, langkah-langkah yang dapat dilakukan salah satunya adalah dengan melakukan penelitian terhadap faktor-faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan fertilisasi. Salah satu faktor tersebut antara lain dengan melakukan penelitian terhadap protein spesifik yang diduga memiliki peran yang penting dalam sistem reproduksi kambing. Jayavardhana (2005), menyebutkan bahwa protein merupakan suatu susunan rantai polimer yang tersusun atas sejumlah unit asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptide. Dalam berbagai proses biologi, protein mempunyai peranan yang sangat penting. Protein menentukan ukuran dan struktur sel, menjadi komponen utama dari

sistem komunikasi antar sel, serta sebagai katalis berbagai reaksi biokimia yang ada di dalam sel.

Oviduct-specific Glycoprotein (OGP) atau juga dikenal sebagai *Oviductin*, menurut Brindha (2014), merupakan salah satu dari glikoprotein yang memiliki berat molekul tinggi, dimana glikoprotein ini dihasilkan oleh sel sekretori yang tidak bersilia pada epithelial saluran oviduk mamalia. Pradeep, *et al.*, (2010), dalam jurnalnya menyatakan bahwa glikoprotein ini mempunyai fungsi yang positif, salah satunya yaitu pada proses kapasitasi sperma, pengikatan sperma dan ovum, penetrasi ovum, dan perkembangan embrio. OGP merupakan glikoprotein yang memiliki sifat *estrogen dependent* (Coy and Yanagimachi, 2015).

Aguilar dan Reyley (2005), menyebutkan bahwa OGP telah diidentifikasi dan dikarakterisasikan pada beberapa spesies seperti pada tikus, hamster, mencit, domba, babi, sapi, kambing, baboon, dan manusia. Jumlah dari glikoprotein oviduk ini bervariasi pada setiap tahap siklus estrus, dengan konsentrasi tertinggi berada selama periode periovulasi. Estrogen berperan dalam menstimulasi sintesis dan sekresi OGP, sedangkan progesterone tampak memiliki efek yang sedikit. Pada jurnal Bhatt, *et al.*, (2004), menyebutkan bahwa protein OGP (*Oviductal-specific Glycoprotein*) yang disekresikan di lumen oviduk ini memiliki berat molekul dengan rentang 70-350 kDa, yaitu pada mencit sebesar 215 kDa; hamster, 160-350 kDa; tikus >330 kDa; kelinci 71 kDa, babi, 75-85 kDa dan 100 kDa, domba 90-92 kDa; sapi 85-97 kDa; baboon, 100-130 kDa; dan manusia, 130 kDa. Sedangkan pada jurnal Pratiwi, dkk (2017)

menyebutkan untuk berat molekul protein tersebut pada kambing Kacang sebesar 55-65 kDa.

Abnormalitas yang terjadi pada organ reproduksi khususnya ovarium yang terletak di dalam tubuh kambing menjadi tidak tampak secara fenotip, sehingga adanya suatu kelainan ovarium menjadi tidak mudah untuk diidentifikasi secara dini, oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan analisa profil pita protein dari organ reproduksi kambing betina yang ditunjang dengan menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electroforesis*) dan pengukuran kadar protein menggunakan metode spektrofotometri.

SDS-PAGE merupakan salah satu metode analisis molekuler yang dapat digunakan sebagai metode pengujian diagnosa dan memungkinkan deteksi cepat untuk membantu diagnosis suatu penyakit, metode ini memiliki keuntungan yaitu membutuhkan sampel biologis dalam jumlah yang sedikit. Bollag *et al.*, (2002), menyatakan bahwa prinsip metode SDS-PAGE ialah pemisahan molekul bermuatan menurut sifat fisik seperti muatan atau massa dengan teknik pemisahan menggunakan *Polyacrylamide Gel Electroforesis* (PAGE) untuk mengidentifikasi suatu protein tunggal pada sampel dengan kompleks protein. Metode ini memisahkan protein berdasarkan massa (berat molekul) dengan *ionic detergent* berupa *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS).

Dari beberapa hasil penelitian mengenai OGP yang telah dijelaskan diatas dapat diketahui bahwa OGP merupakan protein yang banyak memberikan beberapa manfaat dan fungsi yang baik dalam proses fertilisasi ternak kambing. Sebagaimana OGP

merupakan protein estrogen dependen, terjadinya keabnormalitasan di ovarium memungkinkan memberikan pengaruh terhadap produksi protein tersebut sehingga dapat memberikan dampak yang kurang optimal terhadap proses fertilisasi pada proses reproduksi ternak.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah yang diajukan adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan profil pita protein OGP (*Oviductal-specific Glycoprotein*) kambing Peranakan Etawa betina dengan ovarium normal dan yang mengalami abnormalitas?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar protein OGP (*Oviductal-specific Glycoprotein*) kambing Peranakan Etawa betina dengan ovarium normal dan yang mengalami abnormalitas?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Sampel organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina yang digunakan berasal dari limbah Rumah Potong Hewan (RPH).
2. Sampel organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina abnormal menggunakan sampel organ reproduksi yang mengalami hipofungsi ovarium.

3. Organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina yang digunakan adalah bagian oviduk dan ovarium yang sebelumnya telah dianalisa secara makroskopis (*gross anatomy*) untuk membedakan ovarium normal dan ovarium hipofungsi.
4. Sampel protein diisolasi dari sampel organ reproduksi (oviduk) kambing Peranakan Etawa betina menggunakan *DeRiPRO™ DNA, RNA, & Protein Extraction Technology Kit*.
5. Analisa profil pita protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*).
6. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan menggunakan *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui adanya perbedaan profil pita protein OGP (*Oviductal-specific Glycoprotein*) kambing Peranakan Etawa betina dengan ovarium normal dan yang mengalami abnormalitas?
2. Mengetahui adanya perbedaan kadar protein OGP (*Oviductal-specific Glycoprotein*) kambing Peranakan Etawa betina dengan ovarium normal dan yang mengalami abnormalitas?

1.5 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi mengenai profil pita protein dan kadar protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada kambing Peranakan Etawa betina yang mengalami abnormalitas di ovarium.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Kambing Peranakan Etawa (PE)

Capra aegagrus atau kambing liar terbagi atas tiga kelompok, antara lain kelompok bezoar (*Capra aegagrus*), kelompok ibeks (*Capra ibex*), dan kelompok markhor (*Capra falconeri*). Setiap kelompok tersebut meliputi beberapa sub-spesies yang terpisahkan secara geografi. Namun, beberapa masyarakat masih belum bisa membedakan antara kambing dengan domba. Menurut Hafez (2000), perbedaan antara karakter genetik dan parameter reproduksi kambing dan domba dapat dilihat pada

Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Perbedaan Karakter Genetik dan Parameter Reproduksi pada Kambing dan Domba (Hafez, 2000).

Parameter	Domba	Kambing
Taksonomi	<i>Ovis aries</i>	<i>Capra hircus</i>
Jumlah kromosom	54	60
Umur pubertas (bulan)	6-9	5-7
Siklus estrus (hari)	17 (14-19)	21 (18-22)
Lama estrus (jam)	24-36	24-28
Ovulasi	Beberapa saat setelah akhir estrus	Menjelang akhir estrus

Kambing Peranakan Etawa (PE) (**Gambar 2.1**) adalah kambing yang berasal dari persilangan antara kambing Jawa dengan kambing Etawa yang berasal dari India.

Kambing Peranakan Etawa ini pertama kali dibudidayakan di daerah Kaligesing, Purworejo, Jawa Tengah (Suparman, 2005).



Gambar 2.1. Kambing Peranakan Etawa (Suparman, 2005)

1.2 Morfologi dan Klasifikasi Kambing Peranakan Etawa.

Sebagai kambing hasil persilangan antara kambing Jawa dan kambing Etawa, kambing Peranakan Etawa terbukti dapat beradaptasi dengan kondisi dan habitat Indonesia. Suparman (2005), menjelaskan mengenai morfologi atau ciri-ciri fisik dari kambing Peranakan Etawa antara lain:

- a. Bentuk hidungnya melengkung ke atas.
- b. Memiliki panjang telinga sekitar 15-30 cm dengan posisi agak menggantung kebawah dan sedikit kaku.
- c. Bulunya berwarna hitam serta coklat, ataupun kombinasi antara kedua warna tersebut.

- d. Kambing Peranakan Etawa jantan bulunya agak tebal, dengan bawah bagian leher dan pundak agak panjang. Pada kambing betina, bulunya agak panjang pada bagian bawah ekor sampai arah garis kaki.
- e. Memiliki rata-rata berat badan sekitar 40 kg pada kambing jantan dan 35 kg pada kambing betina.

Menurut Mileski dan Myers (2004), klasifikasi dan taksonomi dari kambing

Peranakan Etawa adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*
Filum : *Chordata*
Kelas : *Mammalia*
Ordo : *Artiodactyla*
Family : *Bovidae*
Sub family : *Caprinae*
Genus : *Capra*
Spesies : *Capra aegragus*



1.3 Saluran Reproduksi Kambing

1.3.1 Ovarium

Menurut Arman (2014), ovarium adalah organ betina primer yang analog dengan testis pada hewan jantan. Ovarium dipertautkan oleh bagian ligamentum lata yakni mesovarium yang terletak pada bagian dorsal dan lateral serta ligament utero-

ovariumal pada bagian medial. Letak ovarium yaitu di batas kranial ligamentum lata atau dibawahnya, yang terdiri atas suatu stroma serta pembuluh-pembuluh darah yang dilingkupi oleh selaput peritoneum kecuali di batas pertautan antar hilus sebagai bagian dari pembuluh-pembuluh darah dan syaraf masuk ke ovarium (Toelihere, 2006). Syamsyuddin (2014), menyatakan bahwa arteri ovariumal dan cabang dari arteri utero-ovariumal adalah arteri yang memberikan suplai darah ke ovarium, sedangkan suplai syaraf berasal dari syaraf-syaraf otonom dari plexus ovariumal yang berasal dari plexus aortic dan renalis.

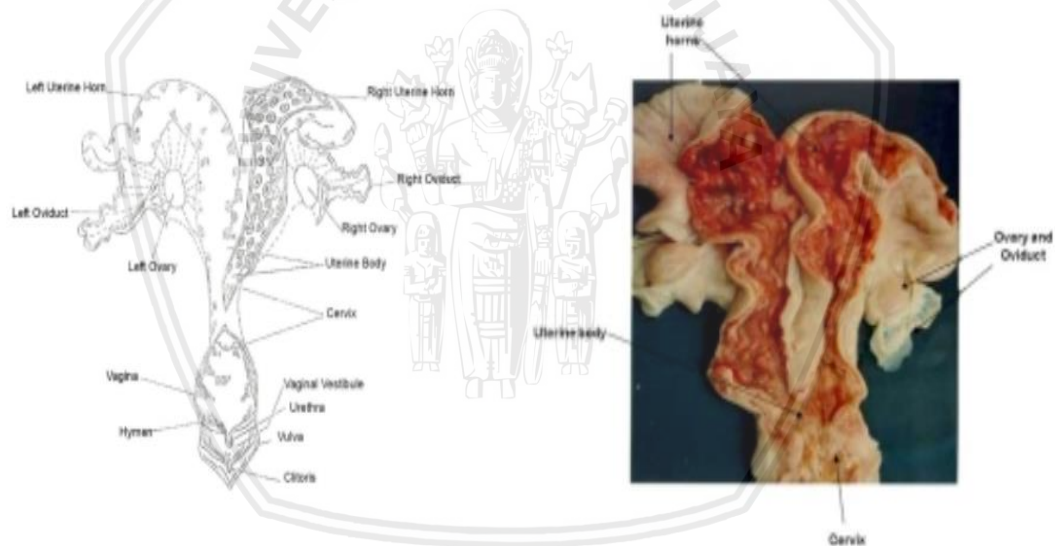
Ovarium tersusun atas bagian medula dan korteks, dimana bagian medula mempunyai jalinan vaskuler yang luas yang di dalam jaringan ikat selular longgar, sedangkan bagian korteks ialah tempat dimana folikel-folikel ovarium dapat ditemukan (Syamsuddin, 2014).

1.3.2 Oviduk

Menurut Chen (2013), pada mamalia, oviduk merupakan sebuah struktur anatomi yang menghubungkan ovarium dengan kornua uteri. Pada studi terbaru telah mengusulkan bahwa organ tersebut bukan hanya saluran pasif, melainkan organ reproduktif dengan transport dan fungsi sekresi, mengatur tindakan termasuk penyimpanan dan transport gamet, kapasitasi sperma, fertilisasi, dan perkembangan awal embrio.

Dari perspektif anatomi, oviduk dibagi menjadi empat region, yaitu: uterinetubal junction (UTJ), isthmus, ampulla, dan infundibulum (**Gambar 2.2**). Infundibulum adalah bentukan yang menyerupai terompet pada bagian cranial akhir

dari oviduk, yang menangkap oosit yang ovulasi dengan cara menggelincirkan fimbriae pada permukaan ovarium. Infundibulum terbuka hingga ampulla, yang merupakan tempat fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Ampulla memiliki panjang lebih dari separuh dari saluran oviduk, dengan lumen yang didalamnya banyak terdapat lipatan mucosal dan sel siliata yang padat. Dibandingkan dengan ampulla, isthmus relatif lebih sempit dan memiliki lebih sedikit lipatan mucosal. Ini merupakan segitiga proksimal saluran (tuba) dan meluas hingga UTJ, yang melewati sepanjang dinding uterus.



Gambar 2.2 Anatomi Saluran Reproduksi Kambing Betina (Leite-Browning, 2009)

Dari penampang longitudinal, oviduk tersusun dari tiga lapisan yang berbeda, yaitu: serosa, muskularis, dan mukosa. Bagian lapisan terluar serosa mengelilingi dan menghubungkan oviduk dengan mesosalpinx; lapisan muskularis

terletak dibawah serosa dan terdiri atas lapisan muskularis inner sirkular outer longitudinal. Bagian ini secara utama membantu transport gamet pada area fertilisasi oleh aktifitas otot polos; mukosa bagian dalam merupakan situs fungsional utama, dilapisi oleh epitelium monolayer yang terdiri atas dua populasi sel: sel sekretori dan sel bersilia (Chen, 2013).

Menurut Chen (2013), peran oviduk di dalam reproduksi mamalia antara lain yaitu:

a. **Pengaruh pada spermatozoa.**

Setelah ejakulasi, sebagian kecil dari spermatozoa akan sampai pada UTJ dan tiba pada caudal oviduk, dimana mereka berikatan pada bagian rostral dan sel bersilia pada epitelium oviduk. Telah dilaporkan bahwa banyak sperma yang berikatan pada isthmus daripada ampulla. Epitelium sperma berikatan membentuk reservoir sperma, yang diyakini berguna dalam menseleksi sperma dengan morfologi akrosom yang normal, kontrol polyspermi, serta mengatur kapasitas sperma dan hiperaktivasi.

b. **Pengaruh pada maturasi oosit.**

Setelah diovulasikan, kompleks cumulus-oosit ditransportasikan oleh silia dan kontraksi otot ke bagian ampulla. Setelah proses ekspansi, bagian zona pelusida akan terpapar oleh cairan oviductal, dimana komposisinya dapat berubah secara konstan bergantung pada tahapan siklus estrus. Pada babi dan sapi, OGP telah terbukti berperan dalam modifikasi zona pelusida tersebut.

c. **Pengaruh pada perkembangan awal embrio.**

Ekspresi pergantian pada tingkat genomic dan proteomic telah ditunjukkan pada oviduk dan embrio secara *in vivo* dan *in vitro*. Beberapa studi menunjukkan bahwa protein pada oviduk dan *growth factor* ada pada cairan oviduk yang melindungi embrio terhadap dampak buruk dan mendukung perkembangan embrio.

1.3.3 Uterus

Uterus adalah salah satu bagian dari saluran reproduksi hewan betina yang terdiri atas dua buah kornua uteri, sebuah korpus uteri, dan serviks. Dimana masing-masing bagian tersebut memiliki proporsi yang berbeda antar spesies. Ligamentum lata uteri merupakan bagian yang menghubungkan kedua sisi dari uterus ke dinding pelvic dan abdomen. Kambing termasuk dalam golongan hewan yang memiliki tipe uterus bipartitus, hal tersebut karena ujung distal dan kedua kornua berfusi sehingga menunjukkan bentuk korpus yang cukup besar. Tipe uterus ini mempunyai septum yang memisahkan kedua kornua uteri serta korpus uteri besar.

Beberapa fungsi yang dimiliki uterus (endometrium beserta cairannya) dalam proses reproduksi antara lain:

- a. Sebagai transport sperma serta tempat deposisi semen ke tempat fertilisasi di oviduk yang dibantu oleh kontraksi myometrium.
- b. Sebagai pengaturan fungsi korpus luteum melalui pelepasan $\text{PGF2}\alpha$.

- c. Sebagai tempat inisiasi implantasi dengan menyediakan nutrisi bagi embrio
- d. Sebagai tempat terjadinya kebuntingan

Serviks adalah organ yang disusun atas jaringan ikat fibrosa dan sebagian kecil otot polos. Strukturnya mirip dengan *sphincter* yang mengarah kearah caudal vagina dengan dinding tebal dan lumennya yang berkerut. Ukuran dan struktur serviks antar spesies ini berbeda-beda, dimana pada ruminansia terdapat susunan *interlocking* (mengunci) satu sama lain yang disebut dengan annular ring yang dapat membuat serviks tertutup. Keadaan serviks selalu tertutup kecuali pada saat hewan dalam periode estrus.

1.3.4 Vagina

Merupakan bagian saluran reproduksi betina yang terletak di caudal serviks dan tersusun atas lapisan epitel, lapisan otot, serta lapisan serosa. Keadaan pada vagina dapat berubah-ubah selama siklus estrus, dan antar spesies berbeda-beda. Fungsi vagina antara lain sebagai organ kopulasi, tempat penampungan spermatozoa (pada kawin alami), transport spermatozoa, serta jalan fetus saat partus (Chen, 2013).

1.4 Abnormalitas pada Ovarium

Laheri *et al.*, (2017) menyebutkan pada jurnalnya terkait dengan beberapa kasus abnormalitas pada ovarium, yang ternyata diketahui memiliki kaitan dengan keberadaan serta level kadar protein OGP. Abnormalitas/kelainan ovarium diartikan

sebagai suatu kondisi dimana pada organ ovarium tersebut sudah mengalami penurunan ataupun kehilangan fungsinya, salah satunya:

1.4.1 Hipofungsi ovarium

Gangguan fungsi kelenjar hipofisa anterior dapat menyebabkan hipofungsi ovarium, yang ditandai dengan permukaan ovarium yang licin sehingga tidak dijumpai adanya folikel-folikel. Hal ini disebabkan karena menurunnya FSH dan LH dalam darah sangat rendah, hewan terlalu lama dalam kandang dengan pemberian pakan dengan kualitas dan kuantitas yang kurang baik. Gejala klinis yang terlihat adalah anestrus. Pada kondisi tubuh yang buruk dan kekurangan pakan berjalan dalam waktu lama, maka hipofungsi ovarium akan menjadi atropi ovarium. Atropi ovarium adalah ovarium yang ukurannya mengecil dan permukaannya licin karena tidak tumbuh folikel sehingga proses reproduksi tidak berjalan sama sekali (Hermadi, 2015)

Pada ruminansia, hipofungsi ovarium kadang ditemukan pada induk betina pada 2-4 bulan setelah partus sewaktu laktasi tinggi, dan sekitar 7,5% dari sekelompok sapi tidak memperlihatkan tanda-tanda birahi yang jelas dengan ovarium yang licin dan tidak berfungsi akan tetapi mempunyai ukuran yang normal.

Kesembuhan pada kasus hipofungsi ovarium dapat terjadi spontan apabila kondisi tubuh hewan dapat dikembalikan pada kondisi tubuh yang baik. Penanggulangan kondisi anestrus akibat kelemahan, *cachexia*, ataupun kekurangan energi, protein serta mineral, harus diikuti dengan pemeriksaan klinis terlebih

dahulu dan melakukan analisis makanan perlu dilakukan untuk menunjang proses diagnosis. Anestrus yang diakibatkan oleh defisiensi makanan dapat ditanggulangi dengan melakukan perbaikan pemberian pakan. Kemudian, untuk menstimulasi pertumbuhan folikel pada ovarium yang licin dan tidak aktif pada ternak yang anestrus dapat dilakukan penginduksian preparat yang mengandung FSH (Waluyo, 2014).

1.5 *Oviductal-specific Glycoprotein (OGP)*

Buhi (2002), menyebutkan bahwa family glycoprotein ini juga diidentifikasi sebagai *Oviduct Secretory Glycoprotein* (pOSP), *Oestrus-associated Glycoprotein* (EAP), *Oviduct Glycoprotein* (sOP₉₂), *Ovgp*, *Oviductin*, *Glycoprotein GP 215*, serta *Oestrogen-dependent Glycoproteins* (OGPs). *Oviduct-specific Glycoprotein* (OGP) merupakan salah satu dari kelompok mayor dari glikoprotein yang teridentifikasi pada beberapa spesies mamalia. Glikoprotein ini dihasilkan dari sekresi sel epitelial tidak bersilia pada oviduk, yang diidentifikasikan sebagai glikoprotein yang memiliki berat molekul tinggi. Glikoprotein ini mempunyai fungsi yang positif, salah satunya yaitu pada kapasitas sperma, pengikatan sperma dan ovum, penetrasi ovum dan perkembangan embrio. OGP secara spesifik terekspresi dalam oviduk selama fase post ovulasi dari siklus estrus dan sintesisnya berada dibawah kontrol dari steroid ovarium. OGP memiliki hubungan dengan zona pelusida dan terdapat dalam ruang perivitelin dari oosit dan embrio selama fertilisasi. (Pradeep *et al.*, 2010).

Aguilar dan Reyley (2005), menyebutkan bahwa OGP telah diidentifikasi dan dikarakterisasikan pada beberapa spesies seperti pada tikus, hamster, mencit, domba, babi, sapi, kambing, baboon, dan manusia. Jumlah dari glikoprotein oviduk ini bervariasi pada setiap tahap siklus estrus, dengan konsentrasi tertinggi berada selama periode periovulasi. Estrogen berperan dalam menstimulasi sintesis dan sekresi OGP, sedangkan progesteron tampak memiliki efek yang sedikit. Laheri *et al.*, (2017) dalam jurnalnya menyebutkan bahwa pada ovarium, protein OGP terlokalisasi pada sel dari permukaan epitelium tak bersilia pada oviduk. Sedangkan pada folikel yang sedang berkembang, protein tersebut terdeteksi pada sel granulosa dan korpus luteum. Ekspresi protein OGP tidak terdeteksi pada sel theca dan sebagian besar dari stroma ovarium.

Bhatt, *et al.*, (2004), dalam jurnalnya menyebutkan bahwa protein yang disekresikan di lumen oviduk ini memiliki berat molekul dengan rentang berat molekul 60-350 kDa (mencit, 215 kDa; hamster, 160-350 kDa; tikus >330 kDa; kelinci 71 kDa, babi, 75-85 kDa dan 100 kDa, domba 90-92 kDa; sapi 85-97 kDa; baboon, 100-130 kDa; dan manusia, 130 kDa). Pada kambing Kacang berat molekul protein ini diketahui sebesar 50-65 kDa (Pratiwi dkk, 2017).

1.6 SDS-PAGE

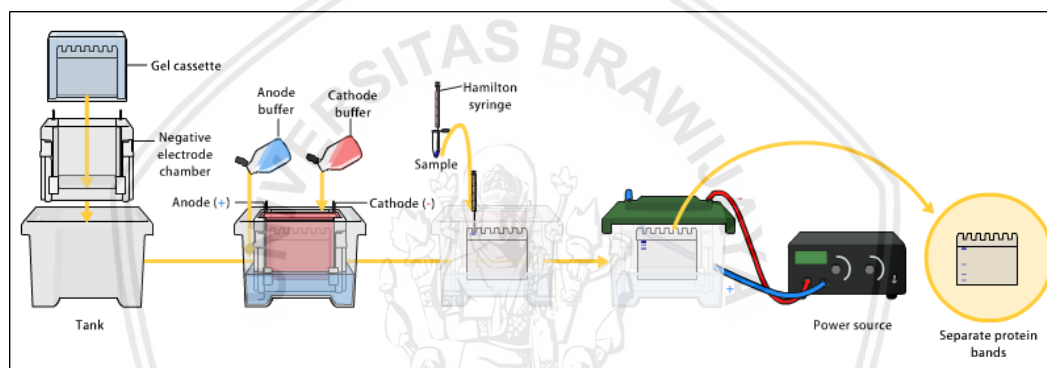
Westermeier (2005), menyebutkan bahwa elektroforesis mempunyai peran dalam memisahkan fraksi-fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid bermuatan dibawah pengaruh medan listrik. Riyanto (2006) menjelaskan bahwa

metode elektroforesis mempunyai prinsip yaitu molekul-molekul yang bermuatan listrik, yang besarnya bergantung pada jenis molekul, pH, dan komponen medium pelarutnya dalam larutan, akan bergerak mengarah ke elektroda yang memiliki polaritas yang berlawanan dengan muatan molekul tersebut.

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electroforesis*) merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan rantai polipeptida protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya. SDS merupakan detergen anionic yang dapat menyelubungi protein yang secara umum berbanding dengan berat molekulnya, serta memberikan muatan listrik yang negative pada semua protein pada sampel. Fungsi dari SDS yaitu guna mendenaturasi protein karena SDS memiliki sifat deterjen yang membuat ikatan dalam protein terputus membentuk protein yang dapat terelusi di gel. SDS dapat merubah semua molekul protein kembali ke struktur primernya (struktur linear) dengan cara yaitu meregangkan gugus utama polipeptida.

Polyacrilamid merupakan polimer dari monomer akrilamid, dimana saat polyacrilamid ini berbentuk gel maka akan terbentuk pori-pori kecil yang memberikan jalan sehingga memungkinkan molekul bergerak (migrasi). Poliakrilamid ini merupakan medium yang tepat untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran pori-pori kecil yang memungkinkan untuk memperlambat gerakan molekul. Gel poliakrilamid ini terbentuk akibat proses polimerasi radikal bebas akrilamid dan agen cross linking NN' methylene bis-akrilamid.

Analisis dengan metode SDS PAGE menggunakan gel poliakrilamid yang tersusun atas dua, yakni stacking gel dan resolving gel. Stacking gel mempunyai fungsi yaitu sebagai gel tempat meletakkan sampel, sedangkan resolving gel merupakan tempat dimana protein akan bergerak atau berpindah menuju anoda. Antara stacking gel dan resolving gel ini memiliki komposisi yang sama, yang membedakan antara keduanya adalah konsentrasi poliakrilamid pembentuknya, dimana pada stacking gel konsentrasinya lebih rendah daripada resolving gel.



Gambar 2.3. Alur Kerja SDS PAGE (Riyanto, 2006).

Metode SDS PAGE mempunyai prinsip dasar, antara lain: larutan protein yang akan dianalisis dicampur dengan SDS terlebih dahulu, dimana SDS merupakan detergen anionic yang apabila dilarutkan molekulnya mempunyai muatan negative dalam range pH yang luas, muatan negative SDS akan mendenaturasi sebagian besar struktur kompleks protein, dan secara kuat tertarik kearah anoda bila ditempatkan pada sebuah medan listrik; saat arus listrik berjalan, molekul akan berpindah atau migrasi melalui gel poliakrilamid menuju kutub positif (anoda) dimana molekul yang kecil

akan bermigrasi lebih cepat dan sebaliknya, sehingga akan terjadi pemisahan; molekul protein akan melewati pori-pori gel pada proses elektroforesis sehingga pergerakan melalui pori juga tergantung pada diameter molekul; dan dengan demikian SDS-PAGE akan memisahkan molekul berdasarkan berat molekul (BM).

Gel membutuhkan pewarnaan guna melihat pita komponen yang terbentuk, pewarna yang dapat digunakan antara lain: Commasie Brilliant Blue (dapat mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen) dan Silver Salt Staining (sifatnya lebih sensitif dan akurat namun membutuhkan proses yang agak panjang/lama) (Saputra, 2014).

Menurut Soedarmadji (1996), kecepatan migrasi dari molekul protein dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu:

- a. Ukuran molekul protein, dimana migrasi molekul protein yang berukuran besar akan lebih lambat dibandingkan dengan migrasi molekul protein yang berukuran kecil.
- b. Konsentrasi gel, pada gel yang berkonsentrasi rendah migrasi molekul protein berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan migrasi molekul protein yang sama pada gel dengan konsentrasi yang lebih tinggi.
- c. Buffer (penyangga), dapat memberi pengaruh pada kecepatan gerak senyawa karena ion sebagai pembawa protein yang bermuatan. Di dalam buffer, kekuatan ion yang tinggi dapat meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal, sehingga gerakan molekul protein menjadi cepat. Sebaliknya, kekuatan ion yang rendah pada buffer akan menurunkan panas

sehingga aliran listrik menjadi minimal, sehingga gerakan molekul menjadi lambat.

- d. Medium penyangga, dalam elektroforesis yang ideal yaitu bahan kimia inert yang mempunyai sifat relatif stabil, memiliki daya serap yang baik, dan mudah ditangani sebagai migrasi electron berdasarkan ukuran molekul seperti gel poliakrilamid.

Aulanni'am (2005)., menyebutkan bahwa di jalur pergerakan protein nantinya akan diperoleh jajaran protein yang disebut pita protein. Kemunculan tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan ataupun banyaknya protein yang memiliki berat molekul yang sama yang terdapat pada posisi pita yang sama. Hal tersebut sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan. Pada satu sampel protein, dapat muncul lebih dari satu bahkan puluhan pita dalam satu gel poliakrilamid. Saat pita protein sudah dalam kondisi terwarnai, maka dapat diketahui keberadaan protein dan dapat dilakukan pengukuran mobilitas protein, sehingga dapat ditentukan berat molekulnya dengan melakukan pengamatan untuk membandingkannya terhadap protein standar.

1.7 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah salah satu dari sekian metode yang dapat digunakan dalam menganalisa karakteristik suatu materi dengan cara menganalisa spektrum yang

dihasilkan oleh materi yang dianalisa. Menurut Irianti (2010), gambaran spektra materi yang merupakan hasil interaksi antara energi radiasi dengan atom-atom ataupun molekul-molekul penyusun materi disebut sebagai variasi intensitas radiasi atau absorbansi sebagai fungsi panjang gelombang.

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan guna mempelajari interaksi sinar elektromagnetik dengan materi. Cahaya yang digunakan dalam keperluan analisa spektrofotometri berada pada daerah ultraviolet dan sinar tampak. Panjang gelombang pada spektrum sinar tampak memiliki kisaran 380-780 nm, sedangkan pada spectrum ultraviolet memiliki kisaran 180-380 nm (Bintang, 2010). Menurut Bintang (2010), selain memiliki fungsi sebagai alat pengukuran kualitatif, spektrofotometer juga memiliki fungsi sebagai alat pengukuran kuantitatif, karena jumlah sinar yang diserap oleh partikel di dalam larutan juga bergantung pada jumlah serta jenis partikel. Praira (2008), menyebutkan bahwa prinsip dasar dari metode spektrofotometri ialah pelewatan cahaya yang mempunyai panjang gelombang tertentu melalui sampel, dimana cahaya tersebut kemudian diserap oleh sampel berwarna dan sebagian lagi diteruskan untuk kemudian ditangkap oleh fotometer yang merupakan alat pendeteksi atau pengukur cahaya. Intensitas cahaya yang didapat oleh fotometer kemudian dikonversi menjadi satuan serapan (absorbansi) dan kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel dengan persamaan Lambert-Beer.

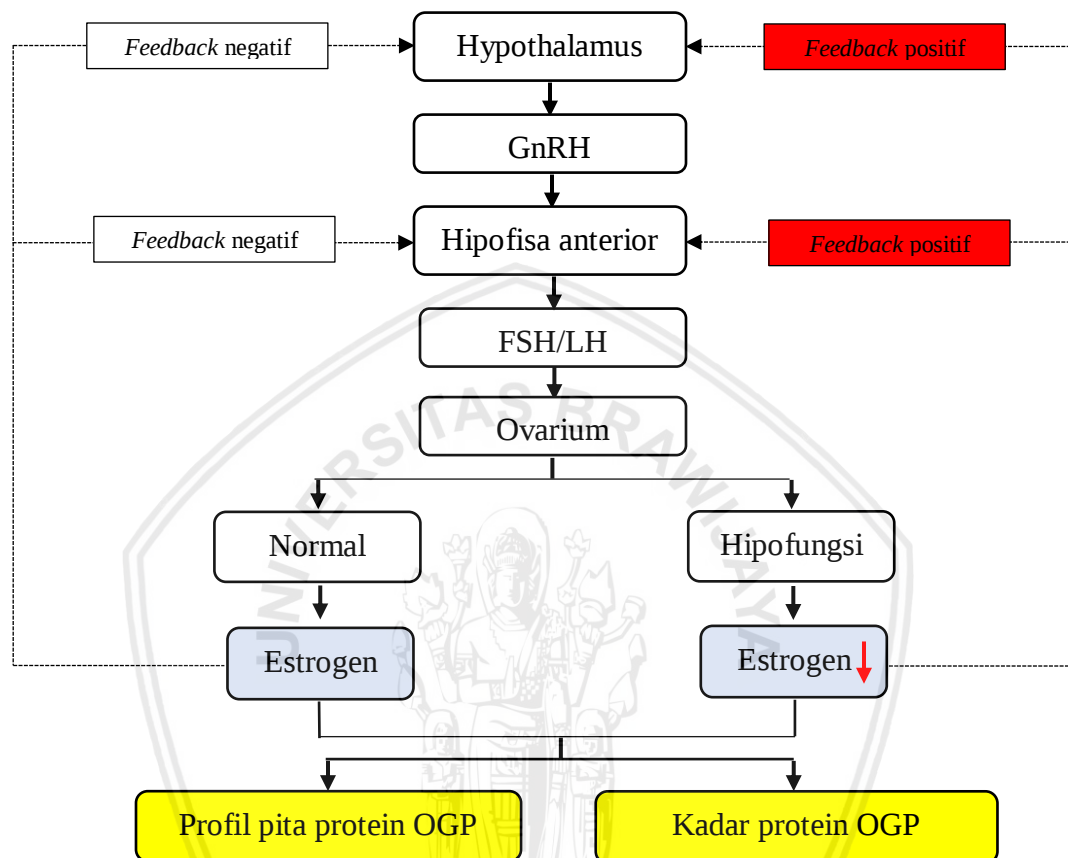
Menurut Bintang (2010), bahwa banyak senyawa memiliki spektra absorpsi yang spesifik pada daerah UV-Vis, sehingga identifikasi materi dalam suatu campuran

dapat dilakukan. Protein merupakan salah satu materi yang dapat diidentifikasi. Praira (2008), menyebutkan bahwa kadar protein dapat diketahui menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, dengan memakai suatu pereaksi ataupun reagen berwarna dengan intensitas warna yang dibentuknya sebanding dengan konsentrasi protein sampel.



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual



Keterangan :



: variabel berpengaruh



: variabel tergantung



: turun/kurang



: pengaruh ovarium abnormal (tinggi; rendah)

Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

Ovarium merupakan salah satu organ reproduksi dari hewan betina yang mengalami perkembangan dan perubahan morfologi yang dinamis seperti adanya perkembangan folikel, ovulasi, dan luteinisasi. Proses-proses tersebut merupakan hasil dari proses pembelahan sel, kematian sel, migrasi sel, dan perlekatan (adhesi) dari sel-sel ovarium. Sepanjang berlangsungnya proses tersebut, terjadi perubahan glikoprotein pada setiap tahapan perkembangan folikel. Namun informasi mengenai jenis glikoprotein yang berperan pada sistem reproduksi ruminansia masih sangat sedikit (Hamny, 2006).

OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) merupakan salah satu dari kelompok mayor glikoprotein yang teridentifikasi pada beberapa spesies mamalia. Glikoprotein ini dihasilkan dari sekresi sel epitelial tidak bersilia pada oviduk, yang diidentifikasi sebagai glikoprotein yang memiliki berat molekul tinggi. OGP secara spesifik terekspresi dalam oviduk selama fase post ovulasi dari siklus estrus dan sintesisnya berada dibawah kontrol dari steroid ovarium (Buhi, 2002). Aguilar dan Reyley (2005), menyebutkan bahwa estrogen berperan dalam menstimulasi sintesis dan sekresi OGP, sedangkan progesteron tampak memiliki efek yang sedikit. Glikoprotein ini memiliki berat molekul dengan *range* 60-350 kDa dan pada kambing Kacang protein ini berada pada kisaran 50-65 kDa.

Buhi (2002), menyatakan bahwa setiap tahapan siklus estrus dengan sirkulasi konsentrasi hormon estrogen akan memengaruhi ekspresi OGP. Hormon estrogen dalam saluran reproduksi betina dibentuk oleh serangkaian konversi reaksi enzimatik oleh sel-sel granulosa dan sel-sel teka, dimana kolesterol merupakan substrat utama

pembentuk estrogen. OGP mempunyai sifat estrogen-dependen. Sifat glikoprotein OGP yang estrogen dependen ini dapat menginisiasi terjadinya perubahan produksi glikoprotein apabila pada suatu organ reproduksi terdapat suatu kelainan atau keabnormalitasan pada ovarium, karena ovarium merupakan salah satu organ terpenting dimana salah satu fungsinya adalah menghasilkan hormon estrogen.

Secara normal, regulasi yang terjadi pada kelenjar hipofisa, terutama hipofisa anterior, diawali oleh sekresi GnRH oleh hypothalamus yang disebut *releasing factor*. Faktor pelepasan (*releasing factor*) yang selanjutnya dikenal sebagai GnRH secara langsung diangkut dari hipotalamus ke hipofisa anterior melalui sistem portal. Kemudian, hipofisa anterior akan melepaskan hormon gonadotropin yakni FSH dan LH, dimana hormon FSH ini berfungsi dalam merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel ovarium dengan cara menstimulasi proses sintesis protein serta meningkatkan aktivitas mitosis sel-sel granulosa. Sedangkan fungsi hormon LH yaitu merangsang sel granulosa dan sel teka pada folikel yang matang guna mensintesis estrogen, sehingga menginisiasi terjadinya ovulasi dan pembentukan korpus luteum. Kadar FSH dan LH di dalam darah dikontrol oleh kadar hormon oestradiol dan progesteron. Saat kadar oestradiol dalam darah cukup tinggi maka akan terjadi umpan balik negatif terhadap hipofisa dan menghambat pelepasan FSH. Saat menjelang ovulasi, konsentrasi oestradiol dalam tubuh tinggi dan akan menekan produksi FSH, serta menstimulus pelepasan LH yang kemudian diikuti ovulasi (Hermadi, 2015).

Pada keadaan hipofungsi ovarium yang merupakan penyebab utama kegagalan reproduksi ternak, salah satunya ialah akibat buruknya faktor manajemen yang

berhubungan erat dengan nutrisi, dimana kekurangan nutrisi akan memengaruhi fungsi hipofisa anterior, yang menyebabkan sekresi dan produksi hormon FSH menurun/rendah, sehingga menyebabkan *feedback* negatif terhadap FSH pada hipotalamus dan hipofisa anterior rendah. Kemudian, ovarium menjadi tidak berkembang atau ditandai dengan permukaan ovarium menjadi licin sehingga tidak dijumpai adanya folikel-folikel di permukaan ovarium (Suartini *et al.*, 2013). Oleh karena itu, pada kasus hipofungsi ovarium kadar hormon estrogen dalam tubuh ternak mengalami penurunan akibat tidak terdapatnya sel teka dan sel granulosa yang memiliki fungsi dalam menghasilkan hormon estrogen. Estrogen ialah hormon steroid yang dihasilkan oleh sel teka dan sel granulosa dari folikel de Graff di ovarium. Dalam menangani kasus hipofungsi ovarium, saat ini banyak menggunakan GnRH guna menginduksi pelepasan FSH dan LH, yang dilaporkan dapat menginduksi sebesar 80% pada ternak sapi. Pemberian GnRH berfungsi dalam merangsang gonadotropin (FSH dan LH) dari hipofisa sehingga terjadi pertumbuhan dan perkembangan folikel. Folikel yang tumbuh dan berkembang akan menghasilkan estrogen yang dilepaskan ke dalam aliran darah sehingga hewan akan memunculkan tanda-tanda estrus (Suartini *et al.*, 2013).

Terjadinya perbedaan kondisi hormonal pada kasus penyakit ovarium yang abnormal seperti hipofungsi pada ternak betina ini memungkinkan berpengaruh terhadap produksi protein OGP yang erat kaitannya dengan kondisi hormon estrogen dalam tubuh hewan. Dengan demikian, profil pita protein serta kadar protein OGP diduga memiliki perbedaan sehingga hasil analisa dari penelitian ini dapat dijadikan

sebagai suatu penanda ataupun kajian ilmiah mengenai protein OGP pada ternak kambing betina.

Profil pita protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) dianalisa menggunakan metode SDS-PAGE dan untuk kadar protein dihitung dengan spektrofotometer. SDS-PAGE merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan rantai polipeptida protein berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik berdasarkan berat molekulnya.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Terdapat perbedaan profil pita protein antara sampel organ dengan ovarium normal dan sampel organ dengan ovarium yang mengalami abnormalitas pada kambing PE betina.
2. Terdapat perbedaan nilai kadar protein antara sampel organ dengan ovarium normal dan sampel organ dengan ovarium yang mengalami abnormalitas pada kambing PE betina.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan limbah sampel organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH). Isolasi organ oviduk dan ovarium dilakukan di Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB). Tahap isolasi protein dan analisa profil pita protein dilakukan di Laboratorium ADD (*Animal Diagnostic Disease*) FKH UB. Penelitian ini dilakukan pada bulan September-Desember 2017.

4.2 Sampel Organ

Sampel organ yang digunakan berasal dari organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina yang didapatkan dari limbah RPH. Pengambilan sampel organ yang digunakan didasarkan pada abnormalitas yang terjadi pada ovarium kambing, yaitu hipofungsi ovarium, yang dilakukan dengan cara analisa pengamatan organ secara makroskopis (*gross anatomy*). Dimana secara makroskopis, ovarium hipofungsi tampak berukuran normal namun memiliki permukaan licin karena tidak terjadi pertumbuhan folikel. Di samping itu, digunakan pula organ reproduksi kambing betina yang memiliki kondisi ovarium normal sebagai sampel yang berfungsi sebagai pembanding.

Sampel organ reproduksi berasal dari kambing Peranakan Etawa betina yang berada dalam umur pubertas. Hafez (2000), menyebutkan bahwa pubertas pada kambing betina terjadi pada kisaran umur 5-7 bulan.

4.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain *disposable syringe*, *ice box*, gelas ukur, tabung erlenmeyer, nampan organ, *dissecting set*, *microtube/ependorf* 1,5 mL, vortex, mikropipet, *white tip*, *yellow tip*, sentrifugator, inkubator, timbangan analitik digital, komputer, *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*, seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE (*Mini-PROTEAN Tetra Cell BioRad*), *BioRad GelDoc Analyzer*, kamera, kertas label, sarung tangan, masker, dan tisu.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain sebanyak delapan sampel isolat protein dari bagian oviduk dan ovarium pada organ yang mengalami abnormalitas dan sebanyak delapan sampel isolat protein dari bagian oviduk dari ovarium pada organ yang normal; *DeRiPRO™ DNA, RNA, & Protein Extraction Technology Kit*; *Reducing Sample Buffer* (RSB); stok poliakrilamid 30%; Tris Cl pH 8,8 (1 M); SDS 10%; APS 10%; TEMED; *running buffer* pH 8,3; *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R250; aquades; aquabidest; alkohol 70%; dan marker protein.

4.4 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini terdapat dua kelompok penelitian, yaitu kelompok ovarium normal dan ovarium abnormal (hipofungsi). Estimasi jumlah sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut (Montgomery dan Kowalsky, 2011):

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

$$2(n-1) \geq 15$$

p = jumlah perlakuan

$$2n - 2 \geq 15$$

n = jumlah ulangan diperlukan

$$2n \geq 15$$

$$n \geq 8,5$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, untuk dua kelompok penelitian tersebut diperlukan jumlah ulangan masing-masing sebanyak 8 kali dalam setiap kelompok, sehingga jumlah sampel organ yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 16 sampel set organ reproduksi kambing PE betina.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : set organ reproduksi kambing PE betina dengan ovarium normal dan set organ reproduksi kambing PE betina dengan ovarium hipofungsi.

Variabel tergantung : profil pita protein OGP pada ovarium normal dan ovarium abnormal; serta kadar protein OGP ovarium normal dan ovarium hipofungsi.

Variabel kendali : umur kambing, spesies kambing, serta media pembawa organ.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Pengambilan limbah sampel organ reproduksi kambing betina Peranakan Etawa di RPH.
2. Identifikasi sampel organ reproduksi yang normal maupun yang mengalami keabnormalitasan di ovarium organ reproduksi kambing.
3. Isolasi protein.
4. Pengukuran kadar protein dengan *NanoDrop™ 1000 Spektrofotometer*.
5. SDS-PAGE.
6. Analisa profil pita protein.
7. Analisa data.

4.7 Prosedur Penelitian.

4.7.1 Identifikasi Sampel Organ Reproduksi Kambing Peranakan Etawa.

Identifikasi sampel organ reproduksi yang normal maupun mengalami keabnormalitasan di ovarium organ reproduksi kambing dilakukan dengan melakukan observasi dan dianalisa secara makroskopis dengan mengamati bentukan *gross*

anatomy-nya untuk kemudian diklasifikasikan apakah ovarium tersebut masuk dalam kategori normal ataupun abnormal.

4.7.2 Isolasi Protein

Isolasi protein dari sampel organ oviduk kambing betina Peranakan Etawa menggunakan *DeRiPRO™ DNA, RNA, & Protein Extraction Technology Kit* yang dilakukan dengan mengikuti protokol isolasi protein dari sampel organ yang telah dikoleksi, dengan terlebih dahulu memanaskan *Drop 1* dengan suhu 65°C selama 15 menit, kemudian sambil menunggu diambil 0,1 gram atau lebih sampel organ kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL, kemudian diberikan 100 µL *Drop 1* tiap 0,1 gram sampel. Inkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit, kemudian lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu ruang selama 5 menit. Supernatan yang muncul diambil untuk kemudian dipindahkan ke *microtube* yang baru.

4.7.3 Analisa Profil Pita Protein dengan SDS-PAGE

Langkah analisa pita protein menggunakan metode SDS-PAGE yaitu dengan menyiapkan sampel protein dengan cara menambah *Reducing Sample Buffer* (RSB) ke dalam sampel protein pada tabung eppendorf dengan perbandingan 1:1. Sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, kemudian setelah dingin sampel dapat disimpan pada suhu 20°C. Selanjutnya, dilakukan pembuatan separating gel 12,5% dengan bahan-bahannya antara lain stok poliakrilamida 30%, 1 M Tris pH 8,8, aquabides, SDS 10%, APS 10%, dan TEMED. Campuran larutan tersebut dituang ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 mL dengan catatan tidak

sampai terbentuk gelembung udara, sampai mencapai batas pada plate. Aquades ditambahkan secara perlahan di atas larutan gel pada plate agar gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan hingga memadat selama kurang lebih 30 menit, lalu buang cairan aquades yang menutupi separating gel. Stacking gel dibuat dengan langkah yang hampir sama dengan pembuatan separating gel dengan bahan-bahan stacking gel yaitu Bis-akrilamida, 1 M Tris pH 6,8, aquabides, SDS 10%, APS 10%, dan TEMED.

Plate yang berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis, kemudian dituang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam. Sampel protein dimasukkan sebanyak 10-20 μ L secara perlahan. Running dilakukan dengan arus konstan yaitu 20 mA selama sekitar 40-50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Pewarnaan gel dengan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), dilakukan dengan cara merendam gel ke dalam 20 mL staining solution selama 15 menit sambil digoyangkan dilanjutkan dengan membilas gel dengan air beberapa kali untuk kemudian direndam lagi ke dalam 50 mL destaining solution selama sekitar 30-60 menit sambil digoyangkan atau sambil terlihat pita protein dan gel siap untuk diamati. Gel yang sudah terwarnai kemudian didokumentasi dengan mesin *GelDoc*. Pita protein pada gel dapat diketahui dengan membandingkan berat molekul hasil elektroforesis terhadap protein marker yang digunakan. Kemudian dilakukan pengukuran berat molekul pada masing-masing pita protein yang diperoleh (Aulanni'am, 2005). Penentuan berat molekul sampel protein dilakukan dengan menggunakan perbandingan antara pola pita marker yang telah mempunyai ukuran berdasarkan jenis proteinnya dengan pola pita protein masing-masing sampel.

4.7.4 Pengukuran Kadar Protein.

Pengukuran kadar protein hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan mesin *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*. Blanko yang digunakan adalah nuclease free water. Nuclease free water diteteskan langsung di atas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 2 μ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol “*blank*” setelah penutup alat ditutup. Panjang gelombang yang digunakan adalah 280 nm. Sampel protein yang digunakan sebanyak 2 μ L yang kemudian diteteskan di atas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. Kemudian penutup alat ditutup dan tekan tombol “*sample*”, selanjutnya ditunggu hingga hasilnya keluar di layar monitor alat (NanoDrop Technologies, Inc., 2009).

4.7.5 Analisa data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini untuk profil pita protein OGP pada uji SDS-PAGE bersifat deskriptif. Kemudian untuk jumlah kadar protein OGP dianalisa secara kuantitatif yang dilakukan dengan cara analisa statistik uji T independent menggunakan program SPSS 25.0 ($\alpha=5\%$) untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok. Uji T independent merupakan prosedur uji untuk sampel bebas dengan membandingkan rata-rata dua kelompok kasus.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

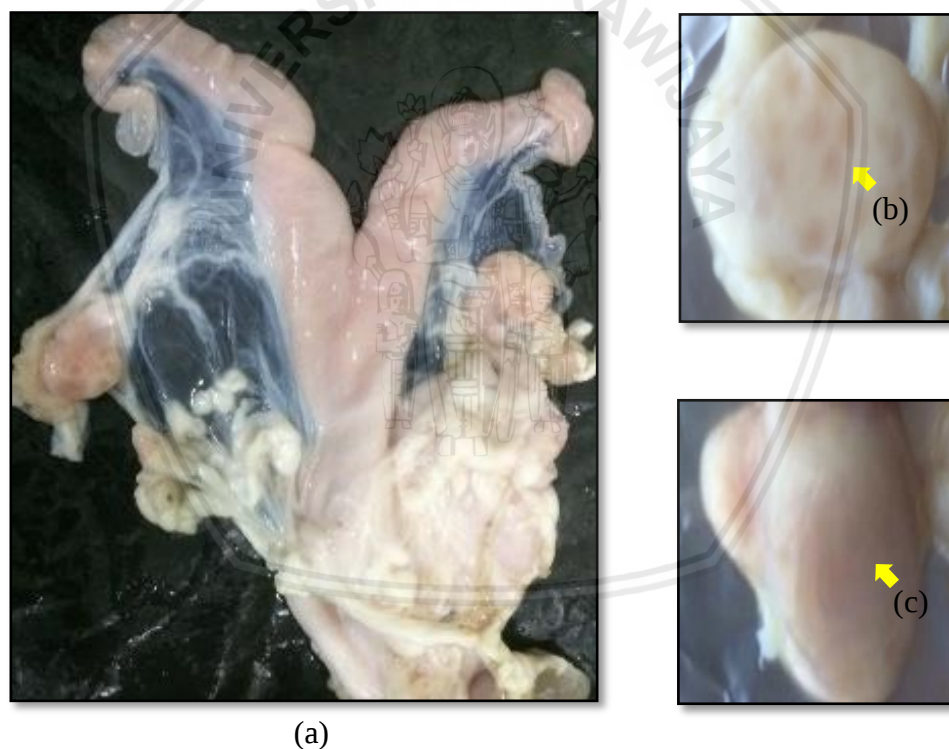
5.1. Preparasi Sampel Set Organ Reproduksi Kambing Peranakan Etawa Betina.

Pentingnya pemetaan serta pengetahuan mengenai penyakit gangguan reproduksi sangat perlu dipelajari sehingga upaya pencegahan, pengendalian, serta penanganannya dapat memberikan hasil yang optimal. Penyebab terjadinya gangguan reproduksi pada ternak antara lain terjadinya cacat anatomi organ reproduksi dan gangguan fungsional organ reproduksi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil pita protein dan kadar OGP serta profil pita protein tertentu yang muncul pada organ reproduksi hewan betina yang mengalami ovarium abnormal (ovarium yang mengalami penurunan ataupun kehilangan fungsinya) yaitu, hipofungsi ovarium.

Sampel set organ reproduksi hewan betina yang digunakan sebagai bahan penelitian ini merupakan limbah organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina yang berada dalam usia pubertas yang diperoleh dari limbah Rumah Potong Hewan (RPH), untuk selanjutnya dibawa menuju laboratorium dengan memasukkannya ke dalam *ice box* yang telah diberi *ice gel*. Sampel set organ reproduksi tersebut selanjutnya dipreparir untuk diidentifikasi set organ reproduksi kambing betina yang mengalami hipofungsi pada bagian ovariumnya. Di samping itu, digunakan pula organ reproduksi kambing betina yang memiliki kondisi ovarium normal sebagai sampel yang berfungsi sebagai pembanding (**Gambar 5.1**). Jumlah sampel yang dikoleksi pada masing-masing kelompok sampel dengan

ovarium normal dan ovarium hipofungsi adalah sebanyak delapan set organ reproduksi.

Penentuan kedua kelompok sampel tersebut dilakukan berdasarkan pengamatan secara makroskopis, di mana apabila ditemukan bentukan folikel pada ovarium maka dikelompokkan menjadi sampel organ reproduksi normal, dan apabila tidak ditemukan adanya folikel pada ovarium maka dikelompokkan ke dalam sampel organ reproduksi yang mengalami hipofungsi.



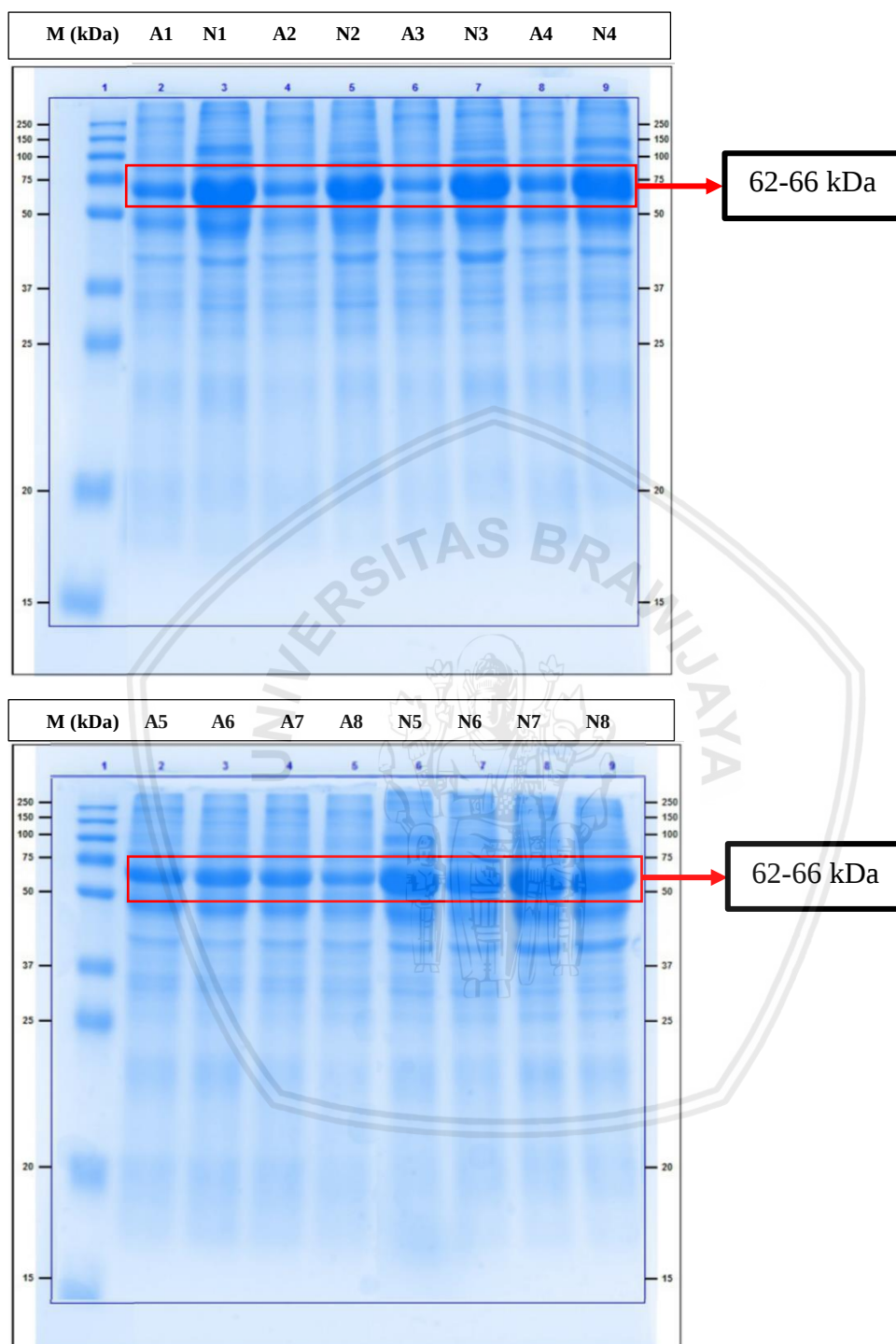
Gambar 5.1 Penampang Makroskopis Set Organ Reproduksi dan Ovarium Kambing Peranakan Etawa Betina yang Didapat dari Limbah Rumah Potong Hewan

Keterangan: (a) Sampel Utuh Set Organ Reproduksi Kambing Peranakan Etawa Betina; (b) ovarium normal; (c) ovarium hipofungsi.

Masing-masing set organ reproduksi tersebut kemudian dikoleksi bagian oviduknya, untuk kemudian dilakukan isolasi protein dari oviduk tersebut. Di mana pada lumen oviduk ini terjadi sekresi oleh sel ephitelial tidak bersilia berupa glikoprotein dengan berat molekul tinggi yaitu OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*), yang mempunyai sifat *estrogen dependent*.

5.2. Analisa Profil Pita Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada kambing Peranakan Etawa Betina Menggunakan SDS-PAGE

Analisa profil protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada organ reproduksi kambing betina Peranakan Etawa ini dilakukan dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Analisa profil protein dan berat molekul protein dengan metode SDS-PAGE membutuhkan suatu media yang dapat memisahkan protein yang didasarkan pada berat molekulnya, media tersebut berupa gel poliakrilamid. Analisis profil protein OGP dengan metode SDS-PAGE dilakukan dengan tujuan untuk melihat berat molekul protein OGP dan melihat perbedaan terhadap pola profil protein OGP pada sampel yang berasal dari organ reproduksi kambing Peranakan Etawa betina normal serta yang mengalami hipofungsi ovarium (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 Ekspresi Profil Pita OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada Sampel Organ Reproduksi Kambing PE Betina dengan Ovarium Normal dan Ovarium Hipofungsi.

Keterangan: Analisa menggunakan *Gel Doc™ EZ Imager*. Waktu eksposur 0,310 detik dengan menggunakan *auto-intensed bands* untuk secara otomatis mendeteksi pita dengan sensitivitas yang tinggi. Analisis Berat Molekul (BM) protein menggunakan standar *Bio-Rad Precision Plus* dengan metode regresi Point to Point (semi-log).

Keterangan Kode Sampel:

A1: sampel dengan ovarium hipofungsi	N1: sampel dengan ovarium normal
A2: sampel dengan ovarium hipofungsi	N2: sampel dengan ovarium normal
A3: sampel dengan ovarium hipofungsi	N3: sampel dengan ovarium normal
A4: sampel dengan ovarium hipofungsi	N4: sampel dengan ovarium normal
A5: sampel dengan ovarium hipofungsi	N5: sampel dengan ovarium normal
A6: sampel dengan ovarium hipofungsi	N6: sampel dengan ovarium normal
A7: sampel dengan ovarium hipofungsi	N7: sampel dengan ovarium normal
A8: sampel dengan ovarium hipofungsi	N8: sampel dengan ovarium normal

Tabel 5.1 Analisa Berat Molekul Profil Pita Protein pada Gel SDS-PAGE

Kode Sampel	Berat Molekul Protein (kDa)									
	250	197	118-100	89-83	66-62	50-47	42-40	35-32	29-27	23
A1	√		√	√	√	√	√	√		
A2	√		√	√	√	√	√	√		√
A3	√		√	√	√	√	√	√		
A4	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
A5	√		√	√	√	√	√	√		
A6	√		√	√	√	√	√	√	√	
A7	√		√	√	√	√	√	√		
A8	√		√	√	√	√	√	√		√
N1	√		√	√	√√	√	√	√		
N2	√		√	√	√√	√	√	√		
N3	√		√	√	√√	√	√	√		
N4	√		√	√	√√	√	√	√		
N5	√		√	√	√√	√	√	√	√	
N6	√	√	√	√	√√	√	√	√	√	
N7	√		√	√	√√	√	√	√		√
N8	√		√	√	√√	√	√	√		√

Keterangan: √√= terekspresi lebih banyak; √= terekspresi lebih sedikit.

Visualisasi hasil elektroforesis gel SDS-PAGE terhadap profil pita protein OGP yang disekresikan oleh saluran oviduk kambing PE betina ditunjukkan pada **Gambar 5.2**. Pada hasil visualisasi gel SDS-PAGE tersebut ditemukan satu pita protein sama yang sangat *prominen* (menonjol) pada rentang berat molekul protein 62-66 kDa. Kemunculan pita protein ini diduga merupakan pita protein spesifik yang dihasilkan oleh sel sekretoria tidak bersilia pada epitel lumen oviduk, protein tersebut adalah OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*).

Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa protein OGP pada kambing PE mempunyai berat molekul dengan rentang 62-66 kDa. Di mana pada **Gambar 5.2** dan **Lampiran 3**, pada kelompok ovarium normal dengan kode sampel antara lain N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, dan N8 masing-masing mempunyai berat molekul protein OGP yaitu, 62 kDa; 65,8 kDa; 65,4 kDa; 65,2 kDa; 62,6 kDa; 62,9 kDa; 62,9 kDa; dan 63,6 kDa. Kemudian pada kelompok ovarium abnormal (hipofungsi) dengan kode sampel antara lain A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, dan A8, masing-masing mempunyai berat molekul protein OGP yaitu, 65 kDa; 66,6 kDa; 65,8 kDa; 62 kDa; 62,2 kDa; 62,7 kDa; 62,7 kDa; dan 62,7 kDa.

Terjadinya perbedaan berat molekul protein di atas, sejalan dengan Pradeep *et al.*, (2011) yang dalam penelitiannya menyatakan bahwa profil pita OGP yang diperoleh dari isolasi jaringan oviduk tersebut menunjukkan beberapa pita protein yang mempunyai berat molekul berbeda pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE dengan rentang berat molekul OGP sekitar 60-95 kDa. Malette and Bleu (1993), menyatakan bahwa berat molekul protein OGP yang diuji dengan SDS-PAGE ialah

spesifik, namun variasi asam dan basa isoelektrik yang ditemukan pada semua spesies hewan akan memunculkan berat molekul yang berbeda.

Pratiwi *et al.*, (2017), menyebutkan bahwa berat molekul OGP setelah dikonfirmasi dengan *Western Blotting* pada kambing berjenis Kacang adalah 65 kDa. Di mana hasil tersebut berbeda dengan yang disebutkan Pradeep *et al.*, (2011) dalam jurnalnya yang menyatakan bahwa berat molekul protein OGP pada kambing berjenis India adalah 57,5 kDa, setelah dikonfirmasi dari sekuens asam aminonya. Terjadinya perbedaan berat molekul dari protein OGP tersebut dapat diakibatkan oleh perbedaan spesies kambing yang digunakan, yaitu kambing Kacang dan kambing India, di mana kedua jenis spesies kambing tersebut mempunyai perbedaan jumlah potensi situs *glukolisasi O-linked*. Semakin besar berat molekul protein OGP, diasumsikan semakin besar pula jumlah potensi situs *glukolisasi O-linked* (Pratiwi *et al.*, 2017)

Glukolisasi O-linked merupakan proses pemasangan dari suatu rantai samping gula lewat kelompok hidroksil dari serin atau trionin asam amino. *Glukolisasi O-linked* merupakan salah satu dari dua jenis umum glukolisasi, di mana terdapat dua jenis umum glukolisasi, yaitu: *glukolisasi O-linked* dan *glukolisasi N-linked*. *Glukolisasi N-linked* melibatkan pemasangan melalui gugus amino pada rantai samping asparagin. Glukolisasi merupakan jenis lebih kompleks dari modifikasi kimia. Modifikasi kimia merupakan salah satu dari keempat proses post-translational protein yang terdiri atas *protein folding*, *cleavage* proteolitik, modifikasi kimia, dan intein penyambung. Modifikasi kimia sederhana melibatkan penambahan kelompok kimia kecil (asetil, metil, atau fosfat) pada satu rantai asam

amino atau gugus karboksil dari asam amino terminal di polipeptida. Tipe lain modifikasi kimia mempunyai peran regulator penting sebagai contoh terjadinya fosforilasi guna mengaktifkan beberapa protein yang terlibat di dalam sinyal transduksi (Bradshaw *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil analisa berat molekul protein pada seluruh sampel juga ditemukan pita-pita protein dengan rentang berat molekul berkisar 23-197 kDa (**Tabel 5.1** dan **Lampiran 3**). Protein-protein dengan berat molekul 115 kDa, 82-89 kDa, 62-66 kDa, 47-48 kDa, 41 kDa, 33-35 kDa, 32 kDa, 23 kDa, serta 27,6 kDa muncul pada beberapa sampel, kemunculan protein-protein tersebut dimungkinkan merupakan sifat umum sel epitel sekretorik oviduk yang juga menghasilkan beragam protein yang kemungkinan terdiri atas *growth factor*, peptida-peptida kecil, sitokin, hormon dan sejenisnya di sepanjang siklus reproduksi (Woldesenbet dan Newton, 2003).

Pola pita protein OGP yang muncul pada gel dengan sampel organ reproduksi kambing PE yang memiliki ovarium normal tampak mempunyai garis pita yang lebih tebal/terekspresi lebih banyak apabila dibandingkan dengan pola pita protein OGP yang terdapat pada sampel organ reproduksi kambing PE yang mengalami hipofungsi ovarium. Terjadinya perbedaan pola tebal dan tipisnya pita protein tersebut disebabkan adanya perbedaan kadar protein pada masing-masing sampel tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fatchiyah, *et al.*, (2011) menyebutkan bahwa kemunculan tebal atau tipisnya pita protein yang tampak pada gel hasil elektroforesis menunjukkan konsentrasi atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul sama yang berada pada posisi pita yang sama. Di mana

semakin tinggi konsentrasi sampel maka pita protein yang terbentuk juga semakin tebal. Hal tersebut sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama maka akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama.

5.3. Analisa Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada Kambing Peranakan Etawa Betina.

Analisa kadar protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*) pada Kambing Peranakan Etawa Betina dengan sampel ovarium normal dan ovarium hipofungsi dapat diamati secara kualitatif dengan melihat pola pita protein OGP yang tampak pada gel hasil elektroforesis serta menghitungnya secara kuantitatif (**Tabel 5.2**). Pola pita protein OGP yang lebih tipis pada seluruh sampel hipofungsi ovarium dapat diakibatkan oleh jumlah kadar protein OGP dalam sampel hipofungsi tersebut yang memang terekspresi lebih sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok sampel ovarium normal. Hal ini dapat dimengerti karena protein OGP ini memiliki sifat *estrogen-dependent*, yang berarti bahwa sekresi daripada protein OGP tersebut bergantung pada kondisi hormon estrogen di dalam tubuh ataupun organ reproduksi dari ternak (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*).

Ulangan	Kadar Protein OGP (pg)	
	Ovarium normal	Ovarium abnormal
1	469.5	115.2
2	373.7	90.3
3	407.2	70.9
4	451.5	118.1
5	423.2	94.4
6	354.9	108.1
7	408.3	92.3
8	381.5	69.5
Rata-rata	408.7	94.8

Rata-rata kadar protein OGP (**Tabel 5.2**) pada kelompok sampel ovarium normal mempunyai kadar protein OGP sebesar 408,7 pg dan pada kelompok sampel ovarium abnormal yang mengalami hipofungsi ovarium mempunyai kadar protein OGP dengan rata-rata sebesar 94,8 pg. Berdasarkan rata-rata kadar protein OGP kedua kelompok tersebut, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik T independent untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan dari ketiga tahap tersebut.

Tabel 5.3 Kadar Protein OGP dengan Signifikansi Uji T Independent.

Kelompok	Rata-rata Kadar OGP (<i>Oviduct-specific Glycoprotein</i>) $\pm$ SD	Sig. (2 tailed)
Ovarium normal	408.7250 $\pm$ 38.91459	.000
Ovarium abnormal	94.8500 $\pm$ 18.41537	

Hasil signifikansi uji T independent (**Tabel 5.3**) untuk jumlah kadar protein OGP pada kedua kelompok baik kelompok sampel normal dan abnormal memberikan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dilihat dari nilai Sig.(2-tailed).

Rata-rata jumlah kadar protein OGP tertinggi terdapat pada kelompok ovarium normal, dengan jumlah kadar protein OGP sebesar 408.7250 ± 38.91459 , sedangkan jumlah kadar protein OGP pada kelompok ovarium abnormal (hipofungsi) adalah sebesar 94.8500 ± 18.41537 . Jumlah kadar protein OGP yang tinggi pada kelompok ovarium normal akan berbanding lurus dengan tebal dan tipisnya profil pita protein yang muncul pada visualisasi gel elektroforesis SDS-PAGE.

Hipofungsi ovarium merupakan suatu kondisi patologis yang dapat terjadi dalam organ reproduksi hewan betina, dimana penyebab terjadinya hipofungsi ovarium salah satunya adalah akibat dari buruknya faktor manajemen yang berhubungan erat dengan nutrisi, di mana kekurangan nutrisi akan memengaruhi fungsi hipofisa anterior, sehingga menyebabkan sekresi dan produksi hormon FSH dan LH menurun/rendah, yang menyebabkan ovarium tidak berkembang atau ditandai dengan permukaan ovarium menjadi licin serta tidak dijumpai adanya folikel-folikel di permukaan ovarium (Suartini *et al.*, 2013). Oleh karena itu, pada kasus hipofungsi ovarium kadar hormon estrogen dalam tubuh ternak mengalami penurunan akibat tidak terdapatnya sel teka dan sel granulosa, di mana sel teka dan sel granulosa ini memiliki fungsi dalam menghasilkan hormon estrogen. Estrogen ialah hormon steroid yang dihasilkan oleh sel teka dan sel granulosa dari folikel de Graff di ovarium. Penanganan yang banyak dilakukan untuk mengatasi kasus hipofungsi ovarium saat ini banyak menggunakan hormon GnRH dengan tujuan untuk menginduksi pelepasan FSH dan LH, yang dilaporkan dapat menginduksi sebesar 80% pada ternak. Pemberian GnRH berfungsi dalam merangsang

gonadotropin (FSH dan LH) dari hipofisa sehingga terjadi pertumbuhan dan perkembangan folikel.

Ingman dan Robertson (2002), menyatakan bahwa pada kasus hipofungsi ovarium proses steroidogenesis tidak terjadi, sehingga menyebabkan proses folikulogenesis juga tidak terjadi. Hal tersebut dikarenakan kadar hormon FSH dan LH di dalam aliran darah rendah ataupun kurang. Ingman dan Robertson (2002), juga menyebutkan bahwa TGF β (*Transforming Growth Factor β*) yang merupakan ligand/reseptor dari OGP mempunyai peranan dalam meningkatkan beberapa efek FSH, termasuk di dalamnya menginduksi aktivitas aromatase sel granulosa serta menginisiasi folikel dalam sintesis DNA. Aromatase adalah suatu enzim yang mempunyai fungsi dalam mengkatalis konversi androgen menjadi estrogen, di mana androgen ini dihasilkan oleh sel-sel teka pada ovarium. TGF β juga disebutkan berperan dalam membantu proses perkembangan folikel pada ovarium serta turut berkontribusi dalam pematangan oosit (Ingman dan Robertson, 2002).

Saputra (2018), dalam penelitiannya melaporkan bahwa pada analisa imunohistokimia ovarium hipofungsi menunjukkan ekspresi yang negatif pada folikel preantral yang disebabkan oleh penurunan peran dari TGF β members. TGF β members ini mempunyai fungsi antara lain yaitu membantu proses folikulogenesis, ovulasi, serta pematangan oosit. Pada kondisi ovarium hipofungsi, folikel sekunder juga tidak terbentuk, di mana hal tersebut juga merupakan akibat dari terjadinya penurunan peran dari TGF β members dan GDF9. Sedangkan pada folikel antral, pada ovarium normal tampak ekspresi yang positif pada sel granulosa dan sel teka, hal tersebut dikarenakan peran dari TGF β members yang

berkontribusi dalam proses peningkatan proliferasi sel granulosa; GDF9 yang meningkatkan perkembangan cumulus sebagai pengontrol respon FSH terhadap sel granulosa; activin yang meningkatkan FSHR dan FSH yang menginduksi ekspresi aromatase; serta inhibin yang meningkatkan LH sehingga dapat menginduksi produksi androgen.

Deschenes *et al.*, (2004), turut menyatakan bahwa OGP merupakan salah satu protein yang teridentifikasi mempunyai *Estrogen Responsive Elements* (EREs) dengan afinitas yang tinggi. Terjadinya sekresi hormon estrogen yang tinggi mengakibatkan terjadinya interaksi antara *Estrogen Receptor* (ER) dengan *Estrogen Responsive Elements* (EREs). Domain pengikat DNA sentral bertanggung jawab dalam pengenalan sekuensi primer dan ikatan kooperatif oleh reseptor dimer pasangannya. Ligan mengikat domain mengandung permukaan dimerisasi kuat yang menstabilkan reseptor homodimeter atau heterodimeter serta meningkatkan ikatan terhadap pasangan reseptor dimer. Selanjutnya EREs pada OGP akan dikenali oleh reseptor estrogen dengan afinitasnya yang tinggi sehingga menghasilkan serangkaian perintah *coactivator* kompleks yang mengarah pada asetilasi histone, remodeling kromatin, serta peningkatan transkripsi (Marino *et al.*, 2006). Dengan demikian, tingginya ekspresi kadar OGP pada sampel ovarium normal berkaitan dengan tingginya ekspresi hormon estrogen.

Hormon estrogen yang disekresikan pada tubuh ternak mempengaruhi proses sintesis mRNA protein OGP. Secara umum, OGP mempunyai peranan penting dalam keberhasilan fertilisasi melalui kontrol polispermi, perkembangan awal embrio dengan menyediakan lingkungan yang memadai, folikulogenesis, dan

maturasi sel oosit. Pada ovarium normal, antrum folikel akan diisi oleh liquor folikuli (cairan folikel) yang mengandung banyak estrogen guna meningkatkan fungsi FSH. Adanya peningkatan fungsi FSH tersebut memiliki dampak pada aktivitas mitosis sel granulosa folikel, sehingga folikel pada ovarium mengalami perkembangan. Selanjutnya, sintesis mRNA protein OGP akan turut meningkat. Namun, pada kondisi ovarium hipofungsi, terjadi penurunan peran dari hormon-hormon steroid yang dilanjutkan dengan penurunan aktivitas FSH, LH, serta peran *growth factor* TGF β , mengakibatkan tidak terjadinya pertumbuhan folikel, sehingga ternak yang mengalami hipofungsi ovarium kerap ditandai dengan timbulnya anestrus, gangguan ovulasi menghasilkan embrio yang tidak sempurna (Saputra, 2018).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan pada pola pita protein OGP, di mana pita protein pada sampel ovarium normal tampak lebih tebal dibandingkan dengan sampel ovarium yang mengalami hipofungsi. Protein OGP Kambing PE betina yang terekspresikan memiliki berat molekul dengan rentang 62-66 kDa.
2. Terdapat perbedaan jumlah kadar protein OGP baik pada organ reproduksi dengan ovarium normal maupun yang mengalami hipofungsi ovarium. Pada sampel organ reproduksi dengan ovarium normal, jumlah kadar protein OGP terhitung lebih banyak dibandingkan pada sampel organ reproduksi yang mengalami hipofungsi.

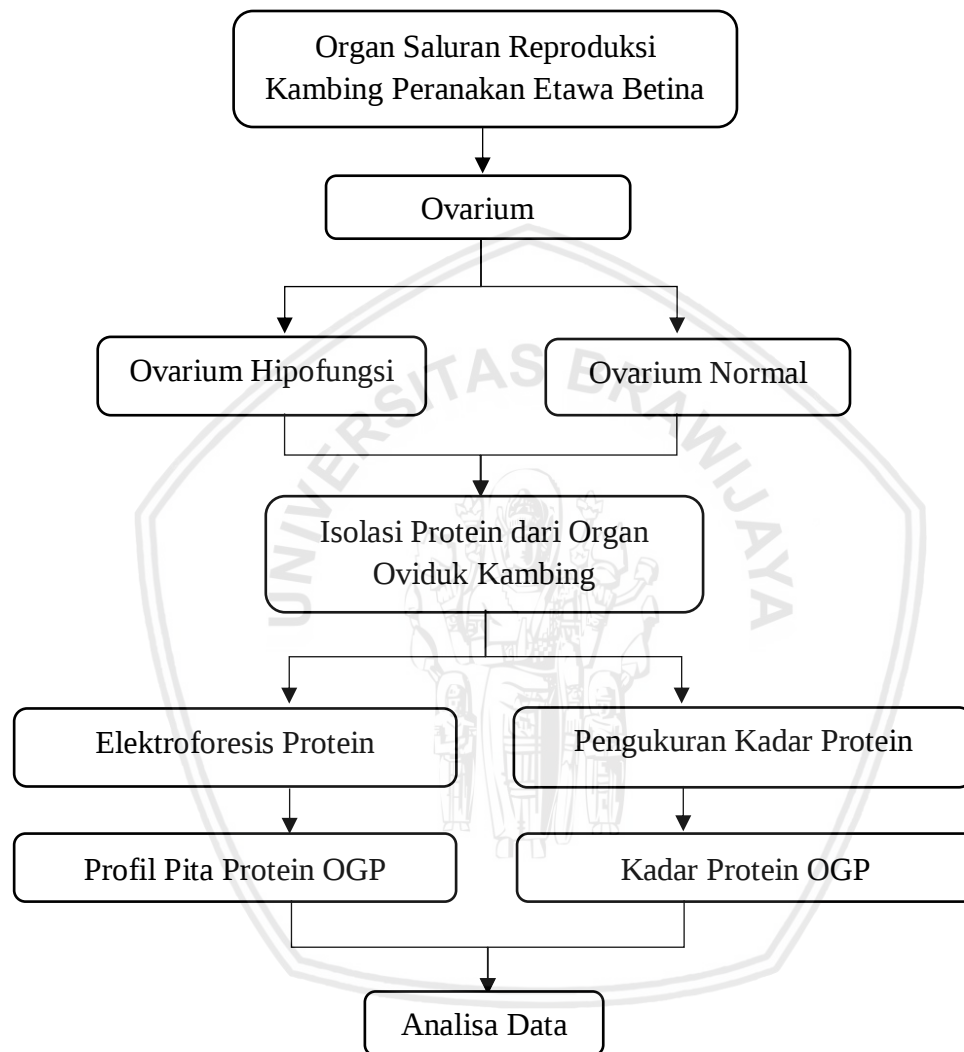
6.2 Saran

Diperlukan adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui protein spesifik yang dapat dijadikan penanda terjadinya kelainan pada suatu organ.

LAMPIRAN

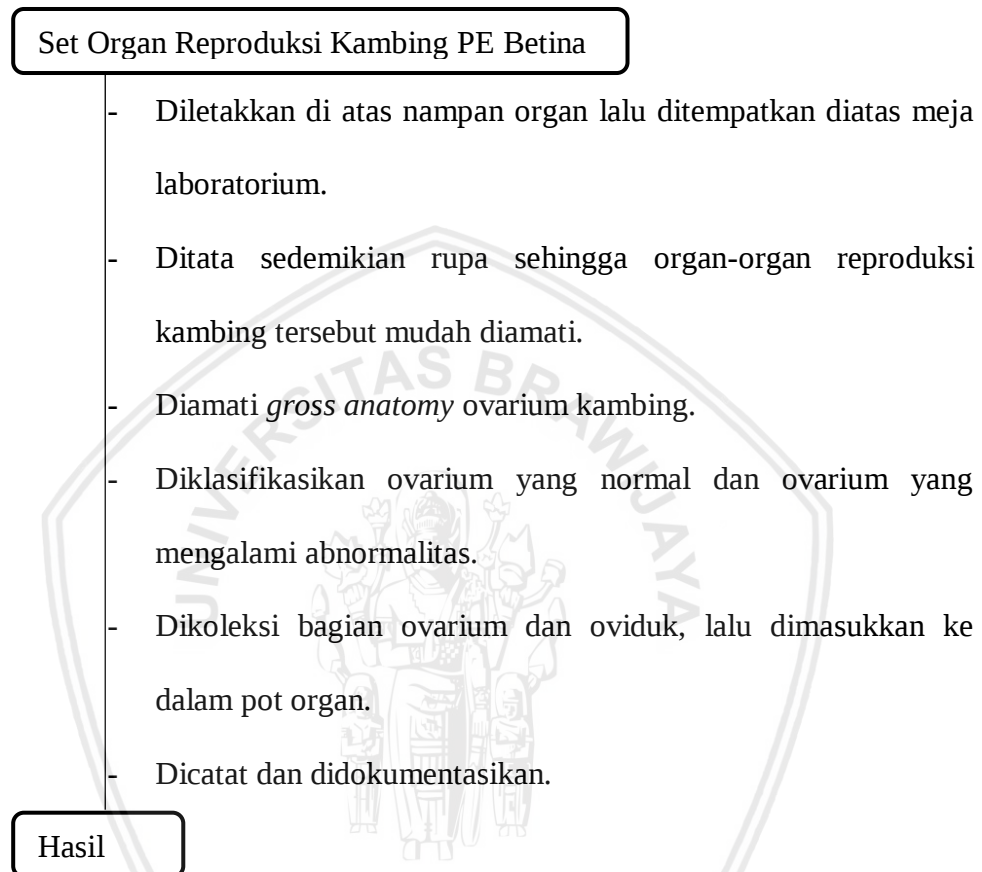


Lampiran 1. Bagan Kerangka Operasional Penelitian

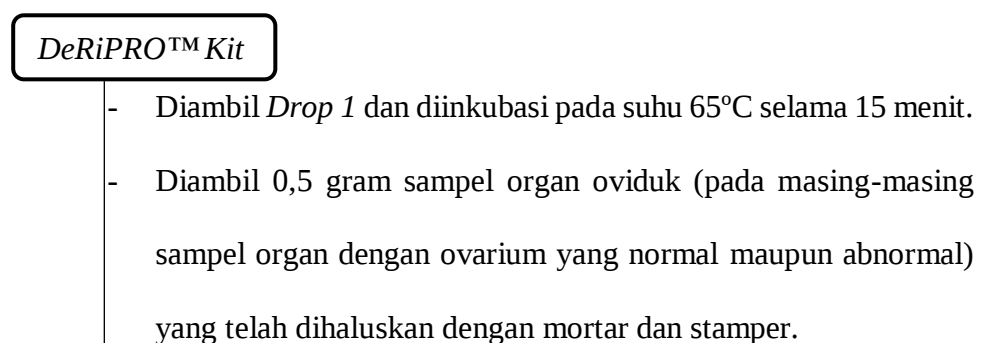


Lampiran 2. Alur Kerja Penelitian

A. Persiapan Sampel Organ



B. Isolasi Sampel Protein dengan *DeRiPRO™ DNA, RNA & Protein Extraction Technology Kit*.



- Diletakkan sampel organ yang sudah halus ke dalam mikrotube 1,5 mL.
- Ditambahkan 100 μ L Drop 1 pada setiap 0,1 gram sampel organ.
- Diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit.
- Disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu ruang selama 5 menit.
- Diambil supernatant, kemudian dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 μ L yang baru.

Hasil

C. SDS-PAGE.

- **Persiapan Sampel.**

Sampel Protein

- Ditambahkan *Reducing Sampel Buffer* (RSB) ke dalam mikrotube 1,5 mL dengan perbandingan 1:1.
- Dipanaskan sampel pada suhu 100°C selama 5 menit.

Hasil

- **Pembuatan *Separating Gel* 12,5%.**

Tabung *Erlenmeyer*

- Dimasukkan sebanyak 3,125 mL stok poliakrilamid 30%.
- Ditambahkan sebanyak 1,505 mL Tris 1 M; pH 8,8.
- Ditambahkan sebanyak 2,75 mL aquades.

- Ditambahkan sebanyak 75 uL SDS 10%.
- Ditambahkan sebanyak 75 uL APS 10%.
- Ditambahkan sebanyak 5 uL TEMED.
- Dipanaskan sampai larutan gel tercampur, lalu segera tuang larutan gel ke dalam plate gel menggunakan mikropipet 1 mL sampai pada batas yang terdapat pada plate.
- Ditambahkan aquades secara perlahan di atas larutan gel dalam plate agar gel tidak bergelombang.
- Ditunggu hingga gel memadat selama kurang lebih 30 menit.
- Dibuang aquades yang menutupi *separating gel*.

Hasil

- **Pembuatan *Stacking* Gel 5%.**

Tabung *Erlenmeyer*

- Dimasukkan sebanyak 0,45 mL stok poliakrilamid 30%.
- Ditambahkan sebanyak 0,38 mL Tris 1 M; pH 6,8.
- Ditambahkan sebanyak 2,11 mL aquades.
- Ditambahkan sebanyak 30 uL SDS 10%.
- Ditambahkan sebanyak 30 uL APS 10%.
- Ditambahkan sebanyak 5 uL TEMED.
- Dipanaskan sampai larutan gel tercampur, lalu segera tuang larutan gel ke dalam plate gel kemudian dipasang sisiran gel.

Hasil

- **Pemasangan *Plate* dan *Running*.**

Chamber Elektroforesis

- Diisi dengan plate yang berisi gel.
- Dituang *Running Buffer* dengan pH 8,3 sampai batas atas dan bawah gel terendam.
- Diangkat sisiran pada plate gel sehingga terbentuk sumuran gel.
- Dimasukkan sebanyak 10-30 μ L sampel protein ke dalam masing-masing sumuran gel.
- Dihubungkan perangkat elektroforesis pada power supply dengan constant current 20 mA selama kurang lebih 3 jam atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Diambil gel dari plate setelah proses running selesai

Hasil

- **Pewarnaan Gel.**

Gel

- Direndam dalam 20 mL staining solution (dengan komposisi 50% methanol, 10% asam asetat glasial, 40% aquades, dan 0,05% CBB R250) selama kurang lebih 15 menit sambil digoyang-goyangkan.
- Dicuci dengan air secukupnya.

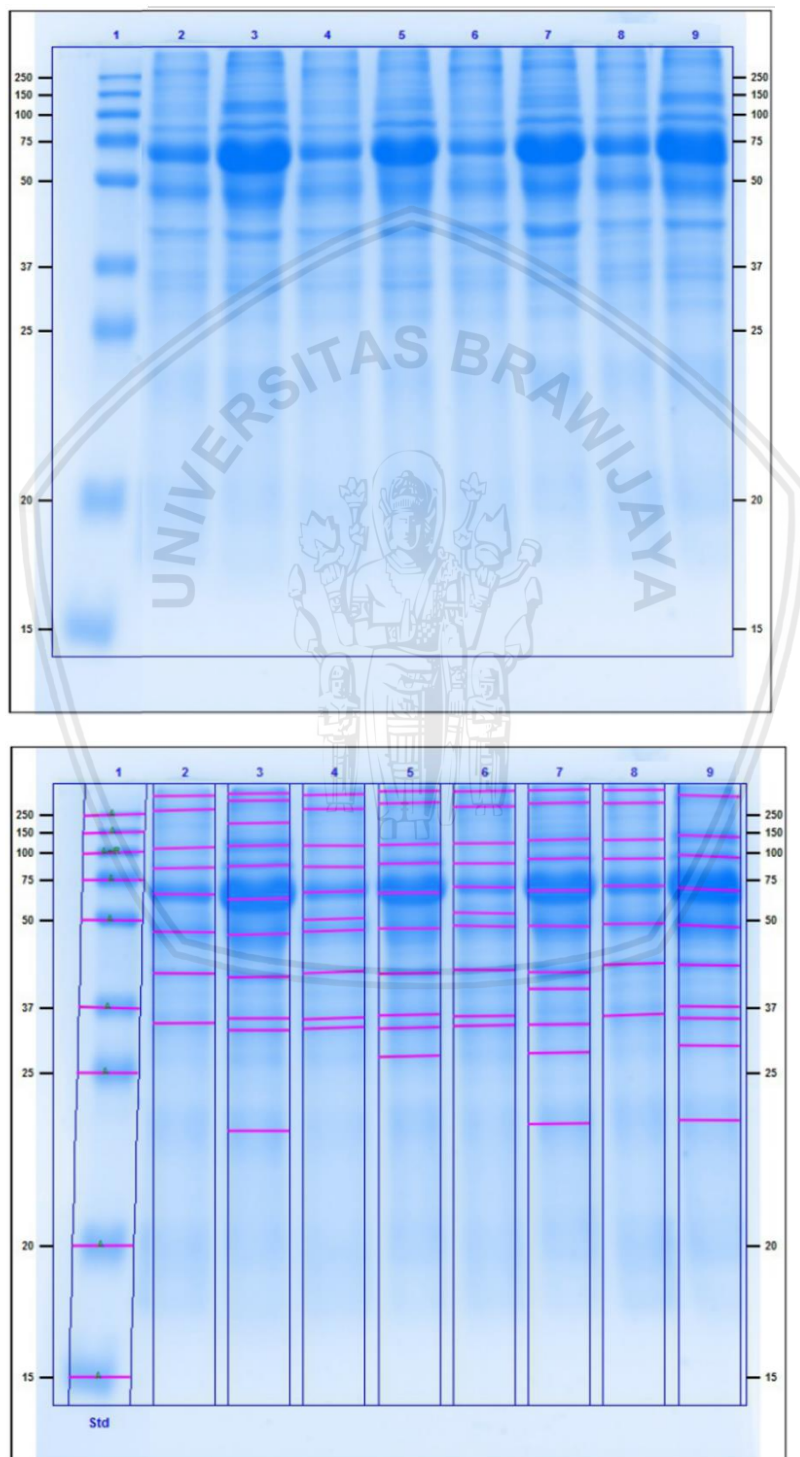
- Direndam gel ke dalam 50 mL destaining solution (dengan komposisi 50% methanol, 10% asam asetat glasial, dan 40% aquades) selama kurang lebih 30 menit sambil digoyang-goyangkan atau sampai pita/band protein muncul.

Hasil



Lampiran 3. Analisis Berat Molekul (BM) Pita Protein dan Kadar Protein.

Image Report: Gel A



Acquisition Information

Imager	Gel Doc™ EZ
Exposure Time (sec)	0.310 (Auto - Intense Bands)
Application	Coomassie Blue
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec)	10
Flat Field	Applied
Serial Number	735BR04835
Software Version	5.2.1
Illumination Mode	White Transillumination

Image Information

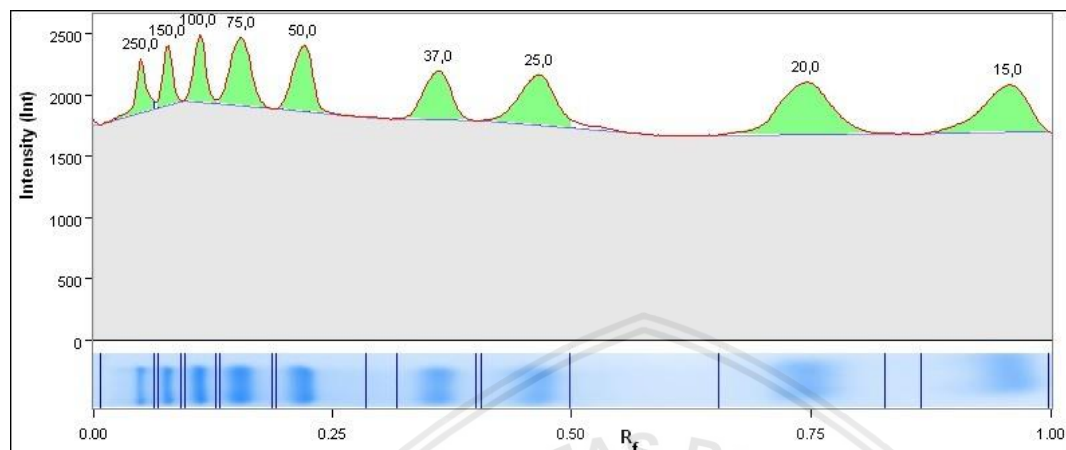
Acquisition Date	14/05/2018 12:46:50
User Name	User
Image Area (mm)	X: 93.0 Y: 65.3
Pixel Size (um)	X: 107.8 Y: 107.8
Data Range (Int)	1612 – 3749

Analysis Settings

Detection	Lane detection: Manually created lanes Band detection: Automatically detected bands with custom sensitivity: 32 Lane Background Subtraction: Lane background subtracted with disk size: 10 Lane width: 5.60 mm
Mol. Weight Analysis	Standard: Copy of Bio-Rad Precision Plus Standard lanes: first Regression method: Point to Point (semi-log)
Quantity Analysis	Reference Band: Lane 1 Band 3 Quantity Standard Bands: Lane 1 Band 1 Quantity 30.0 pg Lane 1 Band 2 Quantity 30.0 pg Lane 1 Band 3 Quantity 25.0 pg Lane 1 Band 4 Quantity 51.6 pg Lane 1 Band 5 Quantity 42.8 pg Lane 1 Band 6 Quantity 42.5 pg Lane 1 Band 7 Quantity 100.0 pg Lane 1 Band 8 Quantity 214.4 pg Lane 1 Band 9 Quantity 146.6 pg Quantity regression method: Linear Regression equation: $y = 0.000271 * x - 42.8$ R-squared value: $R^2 = 0.890776$

Lane And Band Analysis

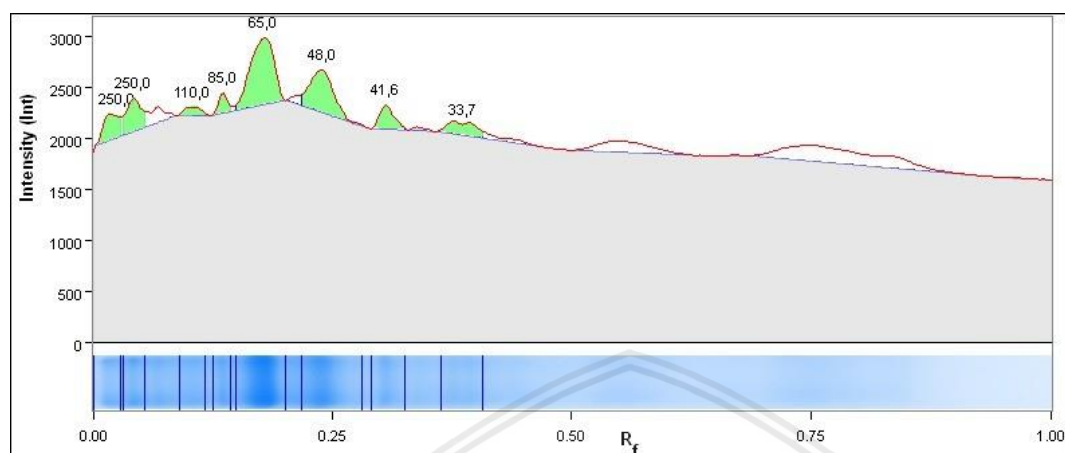
Lane 1 - Copy of Bio-Rad Precision Plus



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,051	179.348	30,0	0,72	4,6	4,5
2		150,0	0,080	176.020	30,0	0,70	4,5	4,4
3		100,0	0,112	250.224	25,0	1,00	6,3	6,2
4		75,0	0,156	431.132	51,6	1,72	10,9	10,8
5		50,0	0,221	408.304	42,8	1,63	10,4	10,2
6		37,0	0,362	407.680	42,5	1,63	10,3	10,2
7		25,0	0,467	556.764	100,0	2,23	14,1	13,9
8		20,0	0,745	853.476	214,4	3,41	21,7	21,3
9		15,0	0,956	677.612	146,6	2,71	17,2	16,9

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

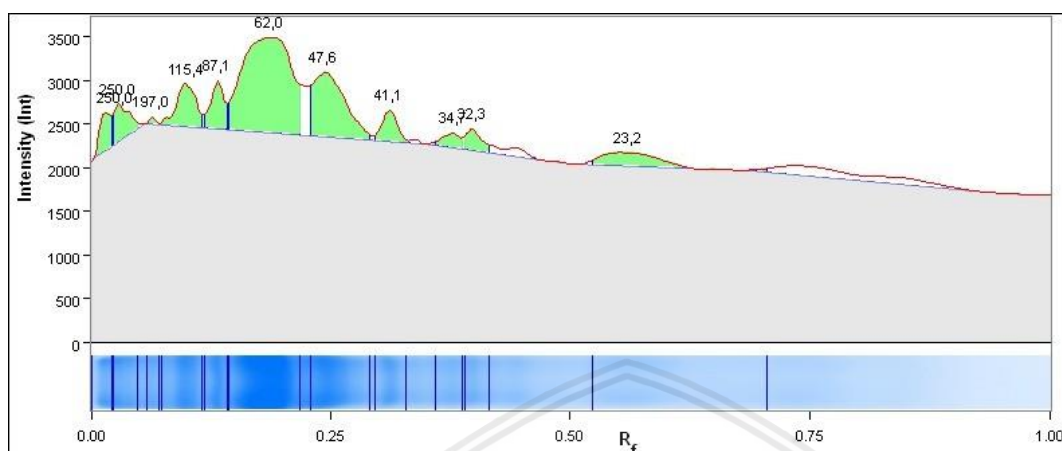
Lane 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,021	148.720	N/A	0,59	8,9	5,5
2		250,0	0,044	182.000	6,5	0,73	10,9	6,8
3		110,0	0,105	53.040	N/A	0,21	3,2	2,0
4		85,0	0,137	69.940	N/A	0,28	4,2	2,6
5	OGP	65,0	0,179	582.764	115,2	2,33	34,9	21,7
6		48,0	0,240	369.772	57,4	1,48	22,1	13,8
7		41,6	0,307	126.828	N/A	0,51	7,6	4,7
8		33,7	0,387	138.580	N/A	0,55	8,3	5,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

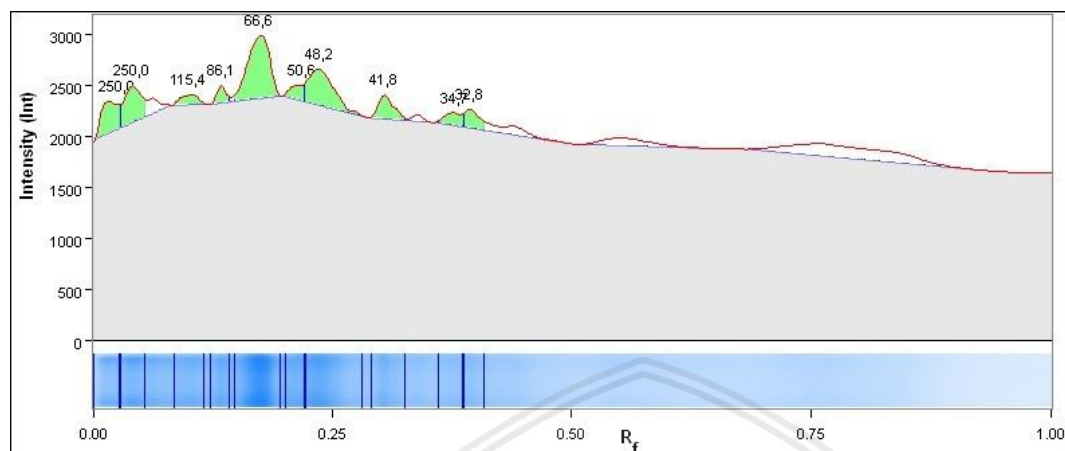
Lane 3



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,017	177.788	5,4	0,71	3,9	3,4
2		250,0	0,029	216.320	15,8	0,86	4,8	4,1
3		197,0	0,065	19.188	N/A	0,08	0,4	0,4
4		115,4	0,101	340.912	49,6	1,36	7,6	6,5
5		87,1	0,133	263.796	28,7	1,05	5,9	5,0
6	OGP	62,0	0,187	1.889.940	469,5	7,55	41,9	36,1
7		47,6	0,244	837.564	184,2	3,35	18,6	16,0
8		41,1	0,312	194.688	10,0	0,78	4,3	3,7
9		34,7	0,379	108.940	N/A	0,44	2,4	2,1
10		32,3	0,398	133.640	N/A	0,53	3,0	2,6
11		23,2	0,560	323.336	44,8	1,29	7,2	6,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

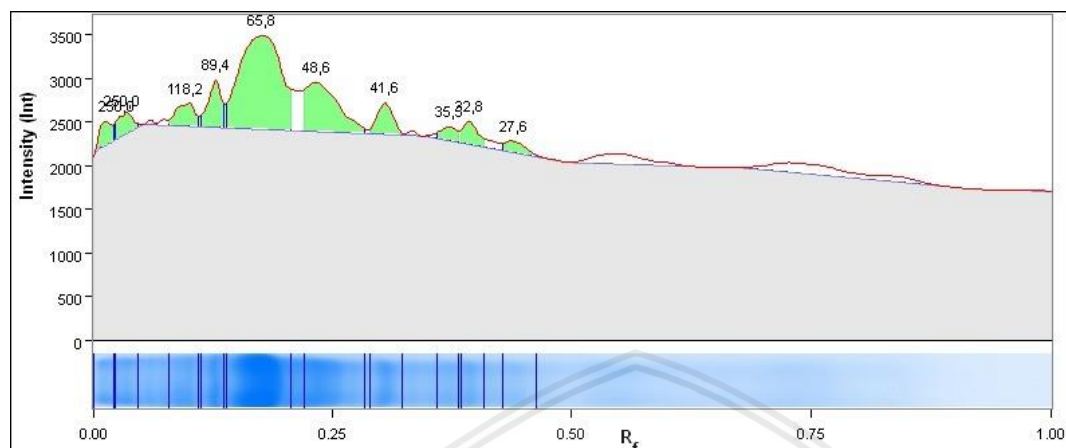
Lane 4



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (kDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,019	181.688	6,4	0,73	10,6	7,1
2		250,0	0,042	220.792	17,0	0,88	12,9	8,7
3		115,4	0,101	64.376	N/A	0,26	3,8	2,5
4		86,1	0,135	56.108	N/A	0,22	3,3	2,2
5	OGP	66,6	0,175	491.036	90,3	1,96	28,7	19,3
6		50,6	0,219	72.332	N/A	0,29	4,2	2,8
7		48,2	0,238	322.088	44,5	1,29	18,8	12,6
8		41,8	0,305	132.132	N/A	0,53	7,7	5,2
9		34,7	0,379	76.440	N/A	0,31	4,5	3,0
10		32,8	0,394	95.420	N/A	0,38	5,6	3,7

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

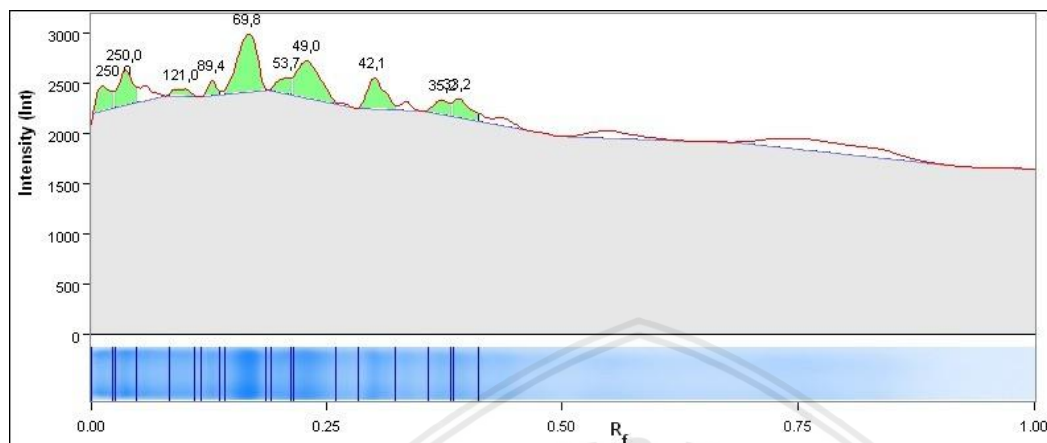
Lane 5



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,013	117.624	N/A	0,47	3,5	2,8
2		250,0	0,032	127.868	N/A	0,51	3,8	3,0
3		118,2	0,099	169.468	3,1	0,68	5,0	4,0
4		89,4	0,130	243.256	23,1	0,97	7,2	5,7
5	OGP	65,8	0,177	1.536.652	373,7	6,14	45,8	36,2
6		48,6	0,234	638.976	130,4	2,55	19,0	15,1
7		41,6	0,307	200.564	11,6	0,80	6,0	4,7
8		35,5	0,373	91.104	N/A	0,36	2,7	2,1
9		32,8	0,394	141.388	N/A	0,57	4,2	3,3
10		27,6	0,440	91.832	N/A	0,37	2,7	2,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

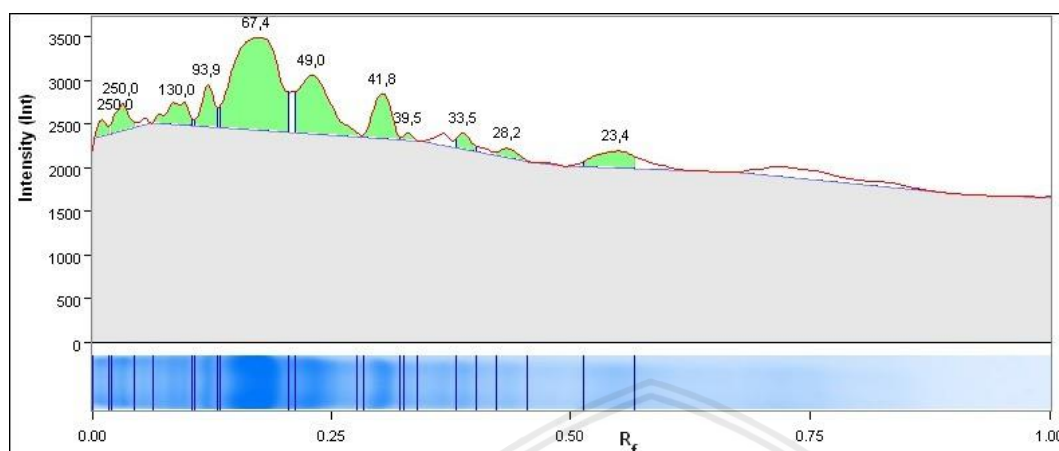
Lane 6



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,013	121.160	N/A	0,48	7,5	5,0
2		250,0	0,038	179.296	5,8	0,72	11,1	7,5
3		121,0	0,097	46.020	N/A	0,18	2,9	1,9
4		89,4	0,130	45.396	N/A	0,18	2,8	1,9
5	OGP	65,8	0,168	419.380	70,9	1,68	26,1	17,5
6		53,7	0,210	82.732	N/A	0,33	5,1	3,4
7		49,0	0,230	321.776	44,4	1,29	20,0	13,4
8		42,1	0,301	195.988	10,3	0,78	12,2	8,2
9		35,2	0,375	83.096	N/A	0,33	5,2	3,5
10		33,2	0,390	114.504	N/A	0,46	7,1	4,8

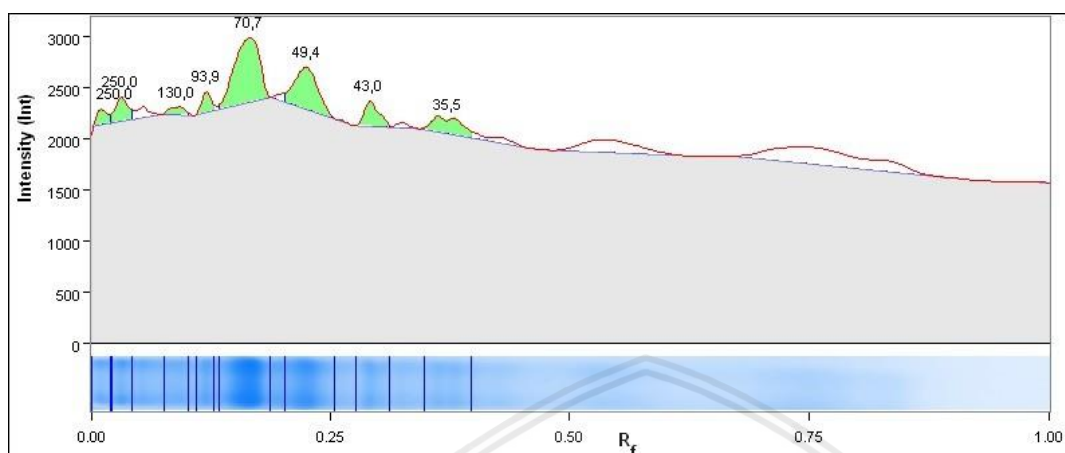
Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 7



Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

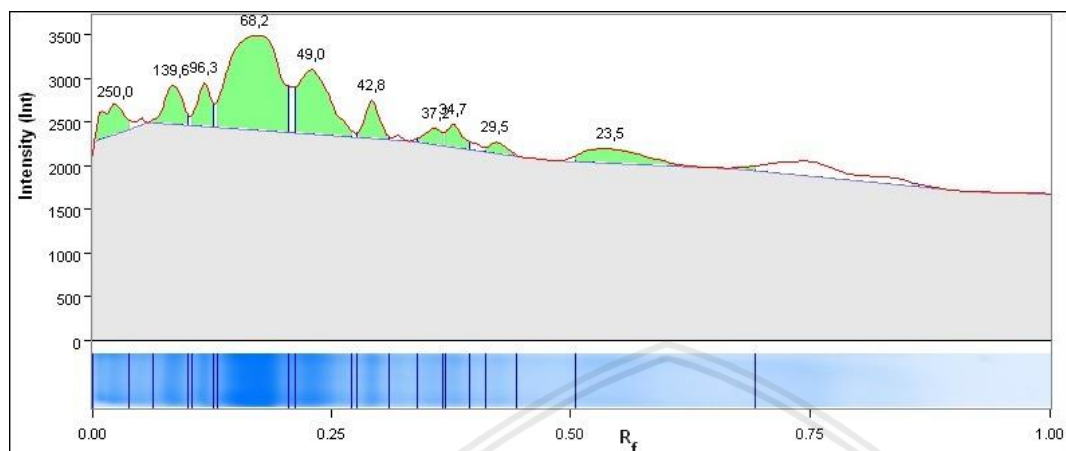
Lane 8



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,011	59.488	N/A	0,24	3,8	2,3
2		250,0	0,032	111.436	N/A	0,45	7,1	4,2
3		130,0	0,091	46.904	N/A	0,19	3,0	1,8
4		93,9	0,122	70.720	N/A	0,28	4,5	2,7
5	OGP	62	0,166	593.736	118,1	2,37	38,1	22,6
6		49,4	0,227	363.636	55,8	1,45	23,3	13,8
7		43,0	0,291	136.136	N/A	0,54	8,7	5,2
8		35,5	0,373	177.736	5,4	0,71	11,4	6,8

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

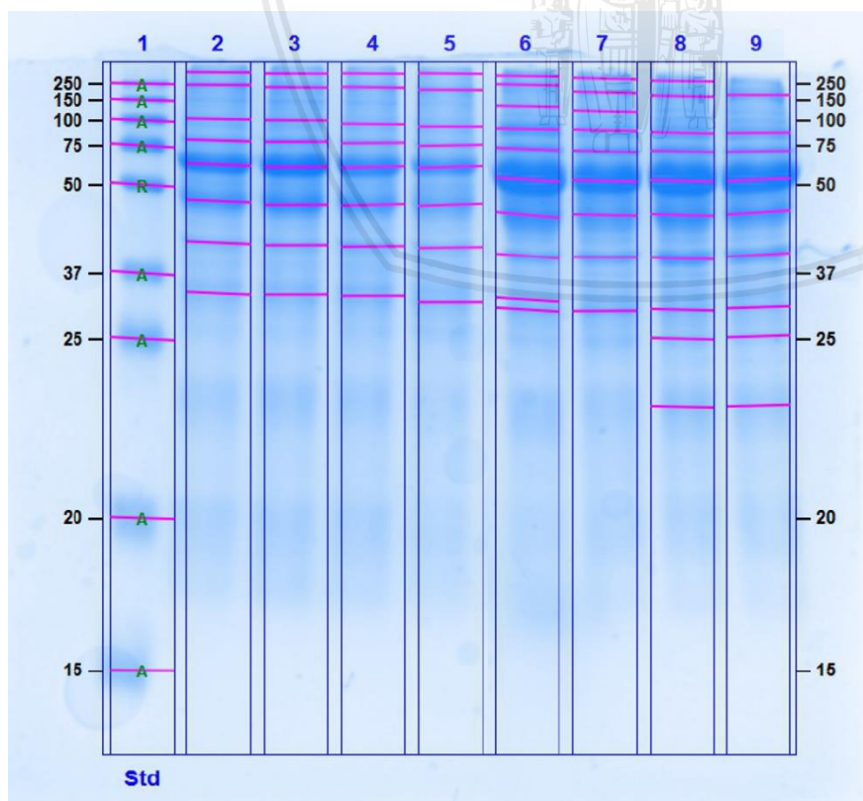
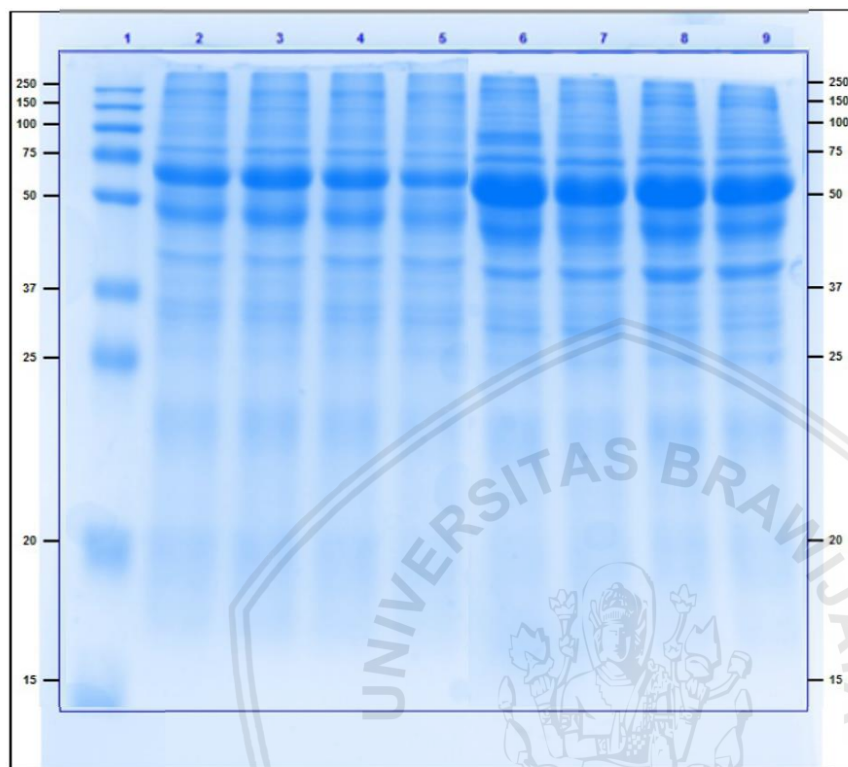
Lane 9



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,021	265.824	29,2	1,06	6,1	5,3
2		139,6	0,086	275.548	31,9	1,10	6,4	5,5
3		96,3	0,118	232.804	20,3	0,93	5,4	4,6
4	OGP	65,2	0,171	1.823.848	451,5	7,29	42,1	36,2
5		49,0	0,230	802.256	174,6	3,21	18,5	15,9
6		42,8	0,293	220.324	16,9	0,88	5,1	4,4
7		37,2	0,360	111.956	N/A	0,45	2,6	2,2
8		34,7	0,379	139.828	N/A	0,56	3,2	2,8
9		29,5	0,423	78.988	N/A	0,32	1,8	1,6
10		23,5	0,543	380.432	60,3	1,52	8,8	7,6

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 32
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.60 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Image Report: Gel B



Acquisition Information

Imager	Gel Doc™ EZ
Exposure Time (sec)	0.276 (Auto - Intense Bands)
Application	Coomassie Blue
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec)	10
Flat Field	Applied
Serial Number	735BR04835
Software Version	5.2.1
Illumination Mode	White Transillumination

Image Information

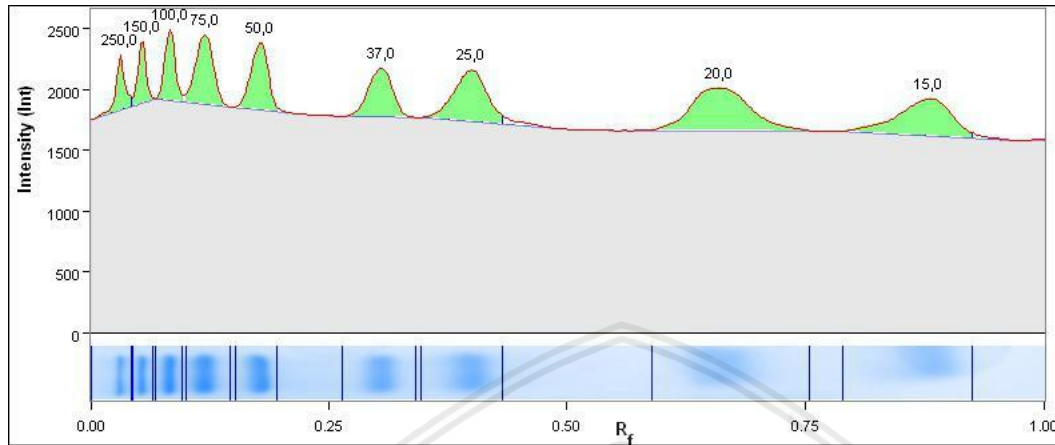
Acquisition Date	14/05/2018 12:38:55
User Name	user
Image Area (mm)	X: 150.0 Y: 107.8
Pixel Size (um)	X: 107.8 Y: 107.8
Data Range (Int)	1481 - 3789

Analysis Settings

Detection	Lane detection: Manually created lanes Band detection: Automatically detected bands with custom sensitivity: 31 Lane Background Subtraction: Lane background subtracted with disk size: 10 Lane width: 5.50 mm
Mol. Weight Analysis	Standard: Copy of Bio-Rad Precision Plus Standard lanes: first Regression method: Point to Point (semi-log)
Quantity Analysis	Reference Band: Lane 1 Band 5 Quantity Standard Bands: Lane 1 Band 1 Quantity 30.0 pg Lane 1 Band 2 Quantity 31.4 pg Lane 1 Band 3 Quantity 44.8 pg Lane 1 Band 4 Quantity 73.3 pg Lane 1 Band 6 Quantity 68.9 pg Lane 1 Band 7 Quantity 100.0 pg Lane 1 Band 8 Quantity 148.5 pg Lane 1 Band 9 Quantity 115.8 pg Quantity regression method: Linear Regression equation: $y = 0.000174 * x + 1.97$ R-squared value: $R^2 = 1$

Lane And Band Analysis

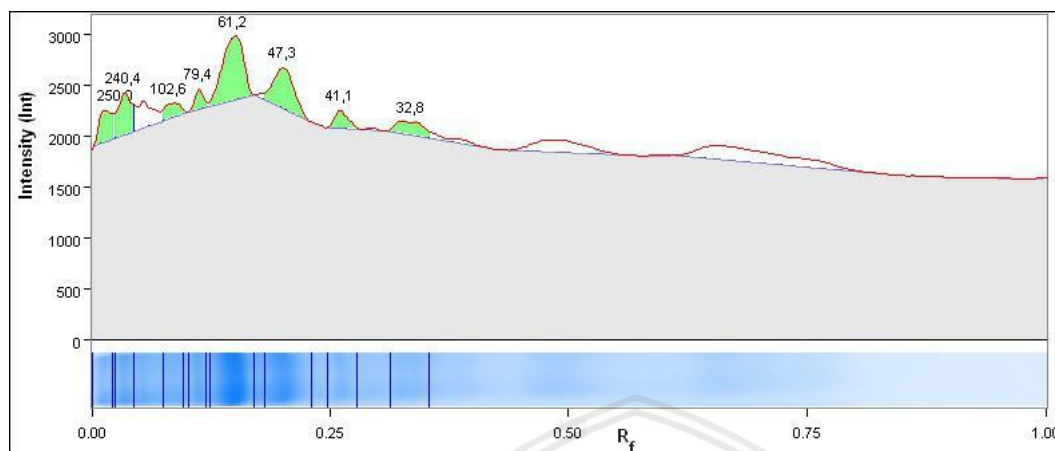
Lane 1 - Copy of Bio-Rad Precision Plus



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,032	161.517	30,0	0,43	4,2	4,1
2		150,0	0,056	169.473	31,4	0,45	4,4	4,3
3		100,0	0,085	246.942	44,8	0,65	6,5	6,3
4		75,0	0,121	411.009	73,3	1,08	10,8	10,5
5		50,0	0,178	379.236	67,8	1,00	9,9	9,7
6		37,0	0,306	385.815	68,9	1,02	10,1	9,9
7		25,0	0,400	564.927	100,0	1,49	14,8	14,4
8		20,0	0,659	844.560	148,5	2,23	22,1	21,6
9		15,0	0,879	656.268	115,8	1,73	17,2	16,8

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

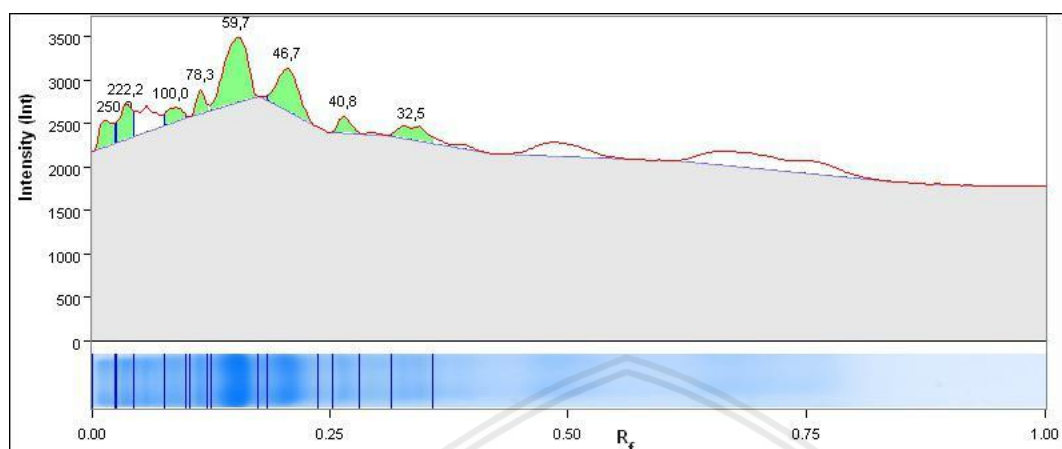
Lane 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,016	158.406	29,5	0,42	9,6	5,9
2		240,4	0,034	228.582	41,6	0,60	13,8	8,5
3		102,6	0,083	88.995	17,4	0,23	5,4	3,3
4		79,4	0,114	67.014	13,6	0,18	4,1	2,5
5	OGP	62,2	0,150	532.644	94,4	1,40	32,2	19,7
6		47,3	0,202	337.212	60,5	0,89	20,4	12,5
7		41,1	0,261	94.911	18,4	0,25	5,7	3,5
8		32,8	0,335	145.707	27,3	0,38	8,8	5,4

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

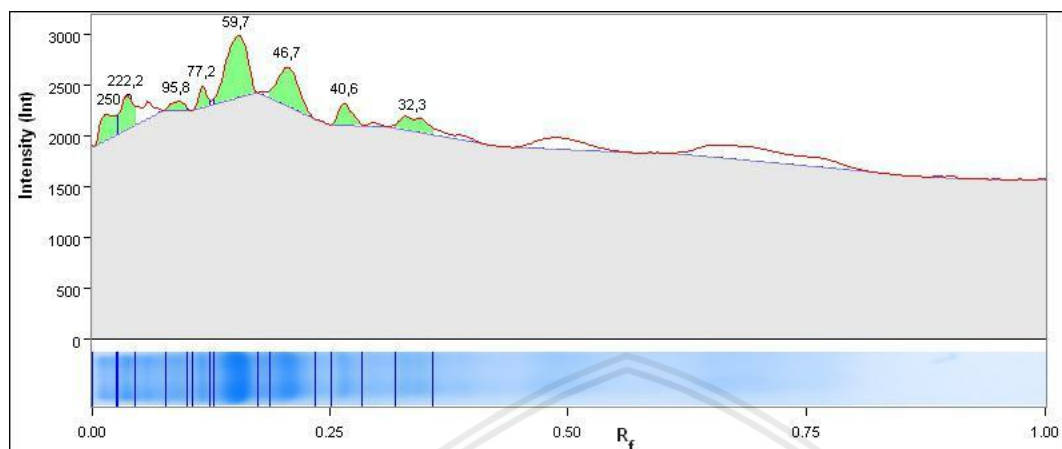
Lane 3



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,018	145.248	27,2	0,38	8,4	4,9
2		222,2	0,038	188.037	34,6	0,50	10,8	6,3
3		100,0	0,085	93.891	18,3	0,25	5,4	3,1
4		78,3	0,115	82.212	16,2	0,22	4,7	2,7
5	OGP	62,7	0,153	611.796	108,1	1,61	35,3	20,4
6		46,7	0,207	370.770	66,3	0,98	21,4	12,4
7		40,8	0,265	87.567	17,2	0,23	5,0	2,9
8		32,5	0,337	154.887	28,8	0,41	8,9	5,2

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

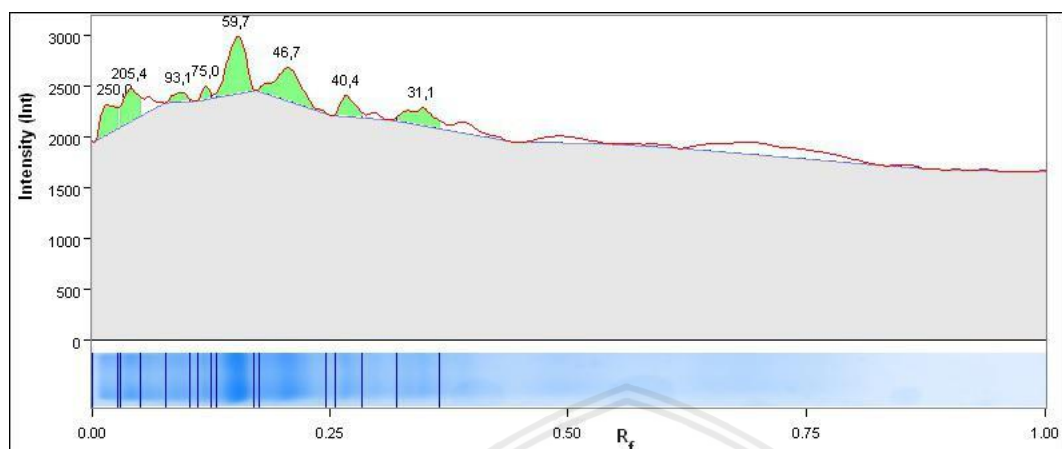
Lane 4



Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,018	145.809	27,3	0,38	9,5	5,7
2		222,2	0,038	165.750	30,7	0,44	10,8	6,5
3		95,8	0,090	50.286	10,7	0,13	3,3	2,0
4		77,2	0,117	66.708	13,5	0,18	4,3	2,6
5	OGP	62,7	0,153	520.557	92,3	1,37	33,8	20,3
6		46,7	0,207	326.349	58,6	0,86	21,2	12,7
7		40,6	0,267	119.238	22,7	0,31	7,7	4,6
8		32,3	0,339	146.727	27,4	0,39	9,5	5,7

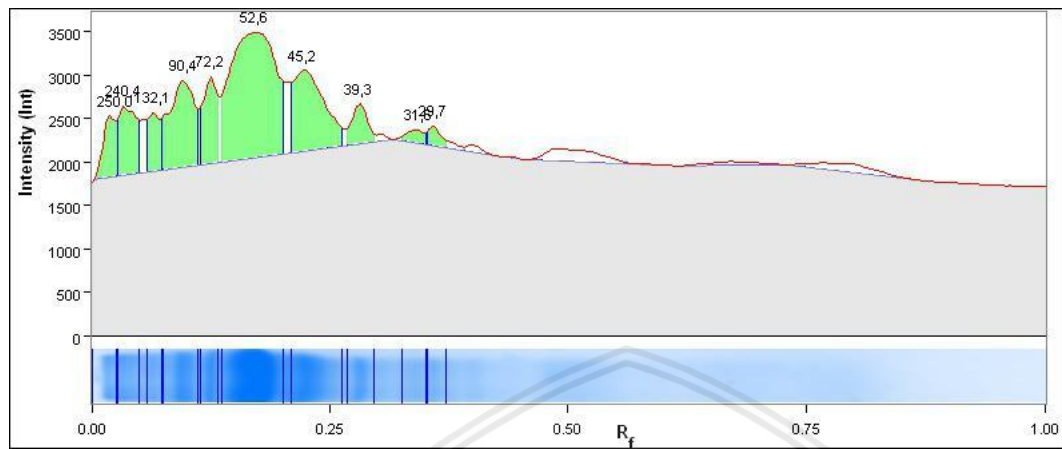
Lane 5



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,018	166.974	30,9	0,44	11,4	7,1
2		205,4	0,041	190.383	35,0	0,50	13,0	8,1
3		93,1	0,094	51.255	10,9	0,14	3,5	2,2
4		75,0	0,121	38.454	8,6	0,10	2,6	1,6
5	OGP	62,7	0,153	389.283	69,5	1,03	26,6	16,6
6		46,7	0,207	338.946	60,8	0,89	23,2	14,5
7		40,4	0,268	114.444	21,8	0,30	7,8	4,9
8		31,1	0,348	172.635	31,9	0,46	11,8	7,4

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

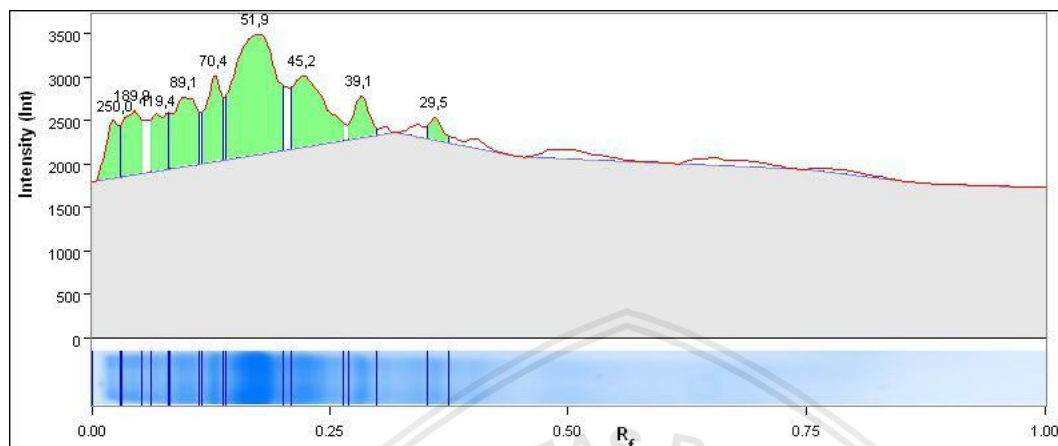
Lane 6



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,022	331.653	59,5	0,87	5,1	4,3
2		240,4	0,034	503.421	89,3	1,33	7,7	6,6
3		132,1	0,065	307.581	55,3	0,81	4,7	4,0
4		90,4	0,097	909.636	159,8	2,40	13,9	11,9
5		72,2	0,126	505.308	89,7	1,33	7,7	6,6
6	OGP	62,6	0,171	2.427.345	423,2	6,40	37,2	31,8
7		45,2	0,222	1.059.933	185,9	2,79	16,3	13,9
8		39,3	0,281	272.238	49,2	0,72	4,2	3,6
9		31,6	0,344	99.552	19,2	0,26	1,5	1,3
10		29,7	0,359	105.417	20,3	0,28	1,6	1,4

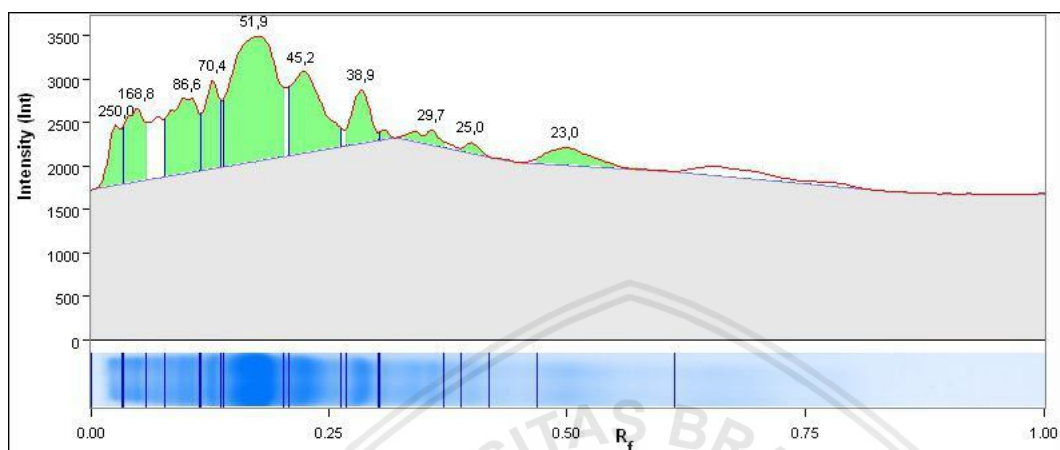
Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 7



Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

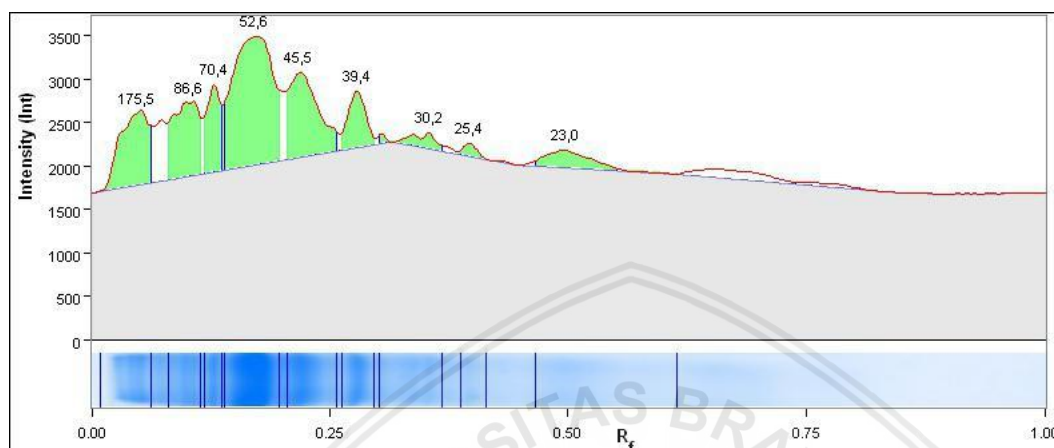
Lane 8



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250,0	0,029	333.489	59,8	0,88	4,9	4,3
2		168,8	0,050	575.943	101,9	1,52	8,5	7,5
3		86,6	0,103	893.673	157,0	2,36	13,2	11,6
4		70,4	0,130	553.962	98,1	1,46	8,2	7,2
5	OGP	62,9	0,173	2.341.410	408,3	6,17	34,5	30,4
6		45,2	0,222	1.077.324	188,9	2,84	15,9	14,0
7		38,9	0,285	413.508	73,7	1,09	6,1	5,4
8		29,7	0,359	178.857	33,0	0,47	2,6	2,3
9		25,0	0,400	67.167	13,6	0,18	1,0	0,9
10		23,0	0,499	355.164	63,6	0,94	5,2	4,6

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 9



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (pg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		175,5	0,049	899.079	158,0	2,37	13,8	12,0
2		86,6	0,103	841.194	147,9	2,22	12,9	11,2
3		70,4	0,130	505.359	89,7	1,33	7,7	6,7
4	OGP	63,6	0,171	2.187.390	381,5	5,77	33,5	29,2
5		45,5	0,218	1.056.618	185,3	2,79	16,2	14,1
6		39,4	0,279	431.766	76,9	1,14	6,6	5,8
7		30,2	0,355	183.702	33,8	0,48	2,8	2,5
8		25,4	0,396	75.837	15,1	0,20	1,2	1,0
9		23,0	0,497	343.740	61,6	0,91	5,3	4,6

Band Detection	Automatically detected bands with custom sensitivity: 31
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 10
Lane Width	5.50 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method





Lampiran 4. Analisis Uji T Independent Kadar Protein OGP (*Oviduct-specific Glycoprotein*)

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
O. Normal	.133	8	.200*	.968	8	.884
O. Abnormal	.153	8	.200*	.917	8	.405

Data terdistribusi normal karena nilai Sig. > 0.05

2. Uji Homogenitas

Tests of Homogeneity

Lavene				
Statistic	df	df2	Sig.	
.133	8	8	.884	
.153	8	8	.405	

Varian data homogen karena nilai Sig. > 0.05

3. Uji T Independen

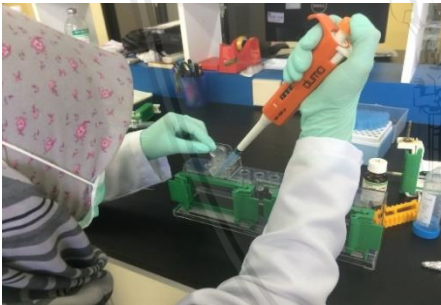
Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Kadar Protein	O. Normal	8	408.7250	38.91459	13.75838
	O. Abnormal	8	94.8500	18.41537	6.51082

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Differe nce	Std. Error Differe nce	95% Confidence Interval of the Difference	
Kadar protein	Equal variances assumed	2.981	.106	20.621	14	.000	313.87 500	15.221 16	281.228 85	346.521 15
	Equal variances not assumed			20.621	9.985	.000	313.87 500	15.221 16	279.953 44	347.796 56

Kedua kelompok sampel memiliki perbedaan yang signifikan karena nilai Sig. (2-tailed) < 0.05

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.

Gambar	Keterangan
	Proses pengerjaan analisa protein dengan metode SDS-PAGE.
	Proses pembuatan gel poliakrilamid untuk melakukan prosedur SDS-PAGE.
	Proses memasukkan sampel pada sumuran gel poliakrilamid SDS-PAGE
	Proses <i>Staining</i> dan <i>Destaining</i> gel poliakrilamid SDS-PAGE