

Isolasi dan Karakterisasi Protein 100kDa dari Membran Kepala Spermatozoa Kambing

Bayyinatul Muchtaromah^{1*}, Sutiman B. Sumitro², Soemarno³, Trini Susilawati⁴

¹Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

³Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

⁴Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

Abstrak

Antigen adalah protein yang dapat menginduksi terbentuknya antibodi. Berat molekul protein sebesar 100 kDa dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari kandidat vaksin imunokontrasepsi dan melakukan isolasi serta karakterisasi protein 100 kDa yang diduga mempunyai peranan penting di dalam interaksi spermatozoa-ovum. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif. Materi Protein 100 kDa diisolasi dari membran spermatozoa kambing menggunakan detergen *N-Octyl-glycopiranoside* kemudian *dirunning* menggunakan metode SDS-PAGE dan dikoleksi dengan elektroelusi. Karakterisasi Protein 100 kDa meliputi penentuan berat molekul melalui SDS-PAGE, penentuan titik isoelektrik (pI) dengan IEF (*isoelectric focusing*) dan kandungan protein dengan metode Biuret. Hasil *running* isolat protein membran spermatozoa kambing menggunakan metode SDS-PAGE diperoleh pita protein yang terdiri atas 7 pita dengan berat molekul 166,7; 122; 100; 82,8; 60,4; 29,9 dan 14,8 kDa. Isolat Protein 100 kDa diperoleh dengan purifikasi menggunakan metode elektroelusi. Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang diejakulasikan ini mempunyai tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64. Kandungan protein dalam isolat Protein 100 kDa sebesar $2375 \pm 5,65$ $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat protein 100 kDa dapat digunakan sebagai imunogen.

Kata Kunci : isolasi, karakterisasi, membrane spermatozoa, protein 100kDa

PENDAHULUAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Mitra *et al.* [1] diketahui bahwa membran plasma spermatozoa kambing memiliki aktivitas enzim *ecto-cAMP independent protein kinase* (ecto-CIK) yang menyebabkan fosforilasi dari protein endogenous (fosfoprotein). Substrat dari enzim ecto-CIK (MPS ecto-CIK), berhasil diisolasi oleh Maiti *et al.* [2] dengan menggunakan enzim kinase endogen [γ -³²P]-ATP dari membran plasma spermatozoa kambing di cauda epididimis. Untuk melarutkan ³²P-labeled substrat diperlakukan dengan Triton X-100 1% kemudian dimasukkan *Sepacryl S-300 molecular sieve chromatography*. Dari perlakuan tersebut berhasil ditemukan tiga titik isoelektrik MPS ecto-CIK yaitu 6,37; 6,05 dan 5,14.

Dengan menggunakan *Sepacryl S-200* diketahui bahwa MPS ecto-CIK merupakan

fosfoprotein monomer dengan berat molekul 100 kDa, hasil yang sama juga didapatkan dengan menggunakan elektroforesis SDS PAGE. Fosfoprotein hasil isolasi membran plasma spermatozoa cauda epididimis ini menunjukkan tingkat kemurnian yang tinggi seperti yang ditunjukkan pada band protein tunggal (monomer) di bawah kondisi *native* dan *denaturing gel* [2].

Analisis Western Blot terhadap tiga isoform protein MPS ecto-CIK yang mempunyai harga pI (*point isoelectric*) berbeda memperlihatkan bahwa ketiga isoform tersebut berikatan dengan anti MPS ecto-CIK [2].

Pada penelitian pendahuluan telah diisolasi protein dengan berat molekul (BM) 100 kDa dari membran kepala spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan. Antigen adalah protein yang dapat menginduksi terbentuknya antibodi. Timbulnya antibodi dapat digunakan sebagai petunjuk bahwa protein yang dimaksud mempunyai sifat imunogenik. Berat molekul protein sebesar 100 kDa dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Subowo [3] mengatakan

* Alamat korespondensi:
Bayyinatul Muchtaromah
Email: Bayyinatul_m@yahoo.com
Alamat : Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang

protein dengan berat molekul lebih dari 10 kilo dalton merupakan imunogen kuat. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mencari bahan kandidat vaksin imunokontrasepsi sehingga perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi protein 100 kDa tersebut.

METODE PENELITIAN

Variabel Penelitian

Parameter yang diamati untuk karakterisasi Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan meliputi berat molekul, penentuan titik isoelektrik dan kandungan protein.

Spermatozoa yang dipakai dalam penelitian ini berasal dari semen yang ditampung dari kambing yang berumur 1,5-2 tahun, berat badan \pm 50 kg dengan kondisi sehat.

Untuk mengetahui karakter biokimiawi protein 100 kDa dari membran kepala spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan dilakukan elektroforesis SDS PAGE untuk menentukan berat molekulnya. *Isoelectric Focusing* (IEF) untuk menentumkan titik isoelektriknya dan metode Biuret untuk mengukur kandungan proteinnnya.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tahap I ini adalah: semen kambing peranakan etawah (PE) umur 1,5-2 tahun yang dipelihara oleh peternak desa Sumber Sekar, vaselin, air hangat, NaCl fisiologis 0,9%, *eosin negrosin*, *Brackett and Oliphant's Medium* (NaCl, KCl, CaCl₂, NaH₂PO₄, MgCl₂, NaHCO₃, Glukosa, Sodium piruvat, Penisilin (Meiji), Streptomisin (Meiji), *Phenol red*, *PBS Dulbeccoes*, NaCl 3%, *aprotinin*, *leupeptin*, *pepstatin*, *phenyl methyl sulfonil fluoride* (PMSF), *N-Octyl-Glycopiranoside* (NOG), akuades steril, *sodium azida* (sigma), buffer tris-glisin, buffer fosfat, bis akrilamid, poliakrilamid, *sodium dedosil sulfat* (SDS), metanol 15%, asam asetat glacial 3% (Merck), *β -mercaptoetanol*, *Phosfet Buffer Salin*, NaHCO₃, alkohol 70%, *Teepol* 1%, *Tris base*, Tween 20, *glycine*, etanol (Merck), *bromophenol blue*, *Reducing Sample Buffer* (RSB), membran nitroselulose, urea, akrilamid 30%, bisakrilamid 0,2%, *ampholine* pH 3,5 – 10, *ampholine* pH 4 – 6, APS 10%, *Amonium persulfat* (APS), *N,N,N', N' tetrametiletlen diamina* (TEMED), TCA 10%, TCA 1%, KCl 10 mM, CuSO₄.5H₂O, NaKC₄O₆4H₂O, *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Alat yang digunakan adalah satu unit vagina buatan, mikroskop cahaya, gelas obyek, *cover glass*, ose, *haemositometer thoma*, *handly counter*, kertas lakmus, kertas tissue,

seperangkat alat gelas, *timer*, *ependorf*, tip, *sonication bath*, *homogenizer*, *magnetic stirrer*, tabung sentrifuse, sentrifuse tipe T-C kecepatan maks 5000 rpm, sentrifuse dingin merk Jovan MR 1822 (maks 18000 rpm), neraca analitik merk Mettler AE-50, mini 2D elektroforesis proteon II (Biorad), spektrofotometer UV-VIS *Thermo Spectronic Genesys 10 UV*, *waterbath*, vorteks, pipet mikro 10-1000 μ l, pipet mikro 10 μ l, pipet mikro 20 μ l, pH meter, *shaker*, *water bath* dan inkubator CO₂.

Penampungan Semen Kambing

Penampungan semen pada kambing jantan dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Pejantan yang akan ditampung dipersiapkan dengan membersihkan preputium dengan air kemudian dikeringkan. Vagina buatan yang telah dilengkapi dengan tabung penampung semen diisi dengan air hangat sampai mendapatkan suhu kira-kira 40°C dan sepertiga bagian depan selubung diberi vaselin. Penampungan semen dilakukan setelah 3-5 kali *false mounting* dan semen ejakulat pertama ditampung untuk diperiksa [4].

Uji Kualitas Semen Segar

Pemeriksaan kualitas meliputi pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis merujuk pada Partodihardjo [4]. Pemeriksaan secara makroskopis meliputi: volume, warna, pH serta uji kekentalan atau konsistensi. Volume diukur dengan melihat langsung pada tabung berskala, warna dilihat langsung pada tabung penampung, pH diukur dengan menggunakan kertas lakmus yang kemudian dicocokkan dengan warna standar pada pH pen. Konsistensi diperiksa dengan menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan.

Pemeriksaan mikroskopis yang meliputi persentase motilitas, dengan melihat persentase motilitas individu, motilitas massa, uji viabilitas dan konsentrasi spermatozoa. Penentuan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan melihat gerakan individu spermatozoa, yang diperiksa menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 x. Penilaian dilakukan dengan menghitung 100 spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan (gerakan maju progressif) dan dipersentasakan.

Motilitas massa dengan melihat gerakan spermatozoa yang berupa gelombang, dengan pembesaran 100 x. Penilaian sangat baik (+++) bila terlihat gelombang besar, banyak, gelap, jelas dan bergerak cepat, baik (++) bila terlihat

gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban; sedang (+) bila terlihat gerak individu aktif progresif dan buruk; (0) tidak ada gerakan sama sekali.

Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna, sedangkan yang mati menyerap warna. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100x, dihitung sebanyak 100 spermatozoa, sehingga dapat diketahui proporsi spermatozoa yang hidup dan yang mati.

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dilakukan menggunakan *haemocytometer*. Dengan cara pipet eritrosit yang berskala 0,5-101 dihubungkan dengan selang penghisap. Semen dihisap hingga skala 0,5 lalu diteruskan dengan NaCl fisiologis sampai pada skala 101. Setelah itu digoyang dengan gerakan menyerupai angka 8 selama 2-3 menit. Pada saat akan dilakukan perhitungan, beberapa tetes dibuang dan dikocok lagi. Selanjutnya "kamar hitung Neubauer" yang sudah dipasang *cover glass* ditetesi isi pipet eritrosit. Kemudian gelas penutup ditekan perlahan. Perhitungan konsentrasi dengan menghitung lima kotak besar secara diagonal di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

Isolasi membran kepala spermatozoa kambing

Metode Isolasi ini merupakan metode modifikasi dari Jayendran *et al.* [5], Hinsch *et al.* [6] dan Gatti *et al.* [7]. Mula-mula spermatozoa diperkaya dan dimurnikan dari sel yang lain dengan metode *Swim Up*. Satu ml semen diencerkan dengan *PBS dulbeccoes* 1:5 diikuti dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali pada suhu kamar untuk pencucian terhadap seminal plasma.

Medium *Brackett Olliphant* (2ml) secara hati-hati diletakkan pada pelet, dengan memiringkan dinding tabung sudut 45°C dan diinkubasi selama 20 menit pada 37°C. Supernatan mengandung fraksi spermatozoa motil yang diperkaya diaspirasi dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu kamar. Ditambahkan PMSF 0,5 mM, *leupeptin* 4 µg/ml, *aprotinin* 4 µg/ml, *pepstatin* 1 µg/ml divorteks selama 5 menit, tiap 1 menit dimasukkan refrigerator. Kemudian ditambahkan detergen *N-Octyl-Glycopyranoside* 1%, divorteks, kemudian dihomogenizer selama 3 menit pada suhu 4°C setelah itu disonikasi dalam *sonication bath* selama 3 menit.

Suspensi didiamkan dalam refrigerator selama 30 menit dan disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C sebanyak 2x. Supernatan diambil kemudian dilakukan dialisis semalam dalam PBS. Hasilnya dapat langsung digunakan untuk elektroforesis atau ditambahkan etanol (1:1) dan didiamkan semalam dalam refrigerator. Kemudian disentrifuse 6000 rpm selama 10 menit kemudian taruh di freezer selama 5 menit, supernatan dibuang dan pelet diangin-anginkan. Jika sudah tidak berbau ditambahkan tris Cl 20 mM dan disimpan pada suhu -40°C.

Penentuan Berat Molekul

Persiapan gel

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat ± 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfat* (APS) dan *N,N,N', N' tetrametiletlen diamina* (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam plate dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. Plate dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel, dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi Sampel

Sampel yang berisi 12,5 µl isolat protein membran spermatozoa dan 12,5 µl *reducing sample buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air bersuhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 µl untuk tiap sumur. Untuk protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan reservoir bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik menggunakan arus sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda ± 0,5 cm dari batas bawah plate gel.

Perlakuan setelah *running*

Gel hasil *running* direndam dalam larutan staining sambil digoyang selama 30 menit.

Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat yang direndam dalam larutan destaining selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening.

Penentuan massa molekul relatif (Mr) protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul protein, dilakukan dengan menghitung Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relatif sampel.

Tabel 1. Nilai Protein Standar Produksi Biorad

Rf (Sb X)	BM (kDa)
0,064	200
0,177	116,25
0,223	97,4
0,371	66,2
0,564	45
0,887	31

Isolasi dan Purifikasi Protein 100 kDa dengan Metode Elektroelusi

Gel hasil SDS-PAGE (gel akrilamid) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang sudah ditentukan berada pada BM 100 kDa. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,2 mM *phosphat buffer* (PB) sebanyak 1-2 ml. Kemudian dimasukkan dalam chamber elektroelusi yang mengandung *phosphat buffer* 0,1 mM. Langkah berikutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 40°C (dalam *refrigerator*), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama *overnight*.

Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara mewarnai potongan gel *acrilamide* dengan *staining commasie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan *destaining*, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan kemudian dipresipitasi dan dipurifikasi dengan ethanol absolut 1:1 untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

Penentuan Titik Isoelektrik

Membuat Akrilamid 31%

Akrilamid sebanyak 3 gr dan bis akrilamid 0,1 gr dilarutkan dalam 5 ml dH₂O setelah larut ditambahkan dH₂O sampai 10 mL.

Membuat Gel

Urea sebanyak 5 gr dan 3,5 dH₂O dilarutkan terlebih dahulu sambil dipanaskan. Setelah larut dipindah ke tabung polipropilen 45 mL. Masing-masing bahan yaitu Akrilamid 31%, Ampholite pH 3-10 sebanyak 40 µL, 200 µL ampholite pH 5-7, 20,7 µL APS 10%, 16,4 µL TEMED ditambahkan satu per satu dan divorteks. Setelah semua bahan larut dan tercampur rata kemudian dimasukkan ke plate sampai penuh dan dipasang sisir, ditunggu sampai ngejel lebih kurang 1,5 jam.

Running

Memasang plate yang berisi gel. *Chatolyte* dituang pada *upper buffer plate* (kutub -), sedang *anolyte* dituang pada *lower buffer plate* (kutub +). Sisiran dilepas dan sumuran dibersihkan dengan syringe. Sampel Protein 100 kDa ditambah loading buffer 1:1 diinjeksikan ke dalam sumuran. Running dilakukan pada 2 tahap *constan voltage* yaitu pertama *constan voltage* 150 V selama 30 menit dan kedua *constan voltage* 200 V selama 1,5 jam.

Fixing

Menuangkan masing-masing *running buffer* (*Chatolyte* dan *anolyt*) pada tempat yang berbeda. Gel diambil dan diletakkan pada wadah yang berisi TCA 10%, rendam selama 10 menit. Setelah 10 menit larutan dibuang dan rendam gel dalam TCA 1% selama 2 jam sampai semalam.

Staining dan Destaining

Gel hasil fixing direndam dalam larutan staining sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat yang direndam dalam larutan destaining selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Mengukur Kadar Protein dengan Metode Biuret

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA 5000 ppm. Sebanyak 200 µL larutan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) konsentrasi 5000 ppm dimasukkan ke dalam eppendorf, ditambah dengan 800 µL reagen Biuret, kemudian dikocok

dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran panjang gelombang 500-600 nm. Sebagai blanko dipipet 200 µL akuades dan 800 µL reagen Biuret.

Pembuatan Kurva Standar BSA

Diiapkan 10 eppendorf, masing-masing ditambah dengan 200 µL larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan variasi konsentrasi 100-10.000 ppm. Masing-masing ditambah dengan 800 µL reagen Biuret. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Kemudian dibuat persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh kurva standar BSA.

Pengukuran Kandungan Protein 100 kDa

Diambil 200 µL sampel Protein 100 kDa, ditambah 800 µL reagen Biuret kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Sebagai blanko dipipet 200 µL air dan ditambah dengan 800 µL reagen Biuret dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar selanjutnya diukur serapannya dan diulangi 3 kali.

Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data dan absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA, menurut Hamilton [8] menggunakan rumus:

$$Y = a.X$$

$$X = \frac{Y}{A}$$

Dimana X = konsentrasi total protein

Analisis Data

Data yang telah diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Kambing

Pemeriksaan semen segar dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis segera setelah proses penampungan semen dilakukan. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan warna, volume, konsistensi dan pH, sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi

konsentrasi, persentase hidup, motilitas massa dan motilitas individu. Hasil pemeriksaan semen segar yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan kualitas semen yang normal seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 2.

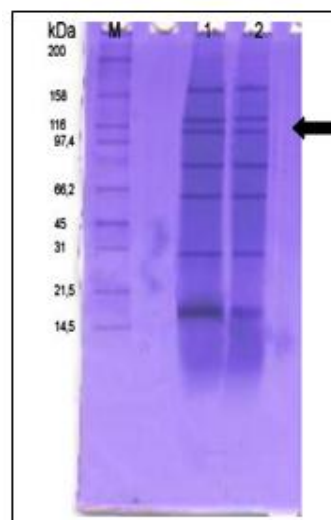
Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Semen Segar Kambing Percobaan

Parameter	Standar Semen Normal	Rata-rata ± SD
Volume (ml/ejakulat)	0,5 – 2	0,90 ± 0,25
Warna	Krem-putih kekuningan	Krem
pH	6,9 – 7,5	7
Konsistensi	Kental	Kental
Motilitas Massa	2+ – 3+	2+
Motilitas individu (%)	60 – 90	70 ± 0,25
Persentase hidup (%)	≥ 70	80,44 ± 0,35
Konsentrasi (juta/ml)	1500 – 5000	2560 ± 257,10

Berdasarkan hasil pemeriksaan terhadap beberapa parameter di atas dapat diketahui bahwa kualitas dan kuantitas semen kambing yang digunakan dalam penelitian ini baik.

Berat Molekul Protein 100 kDa

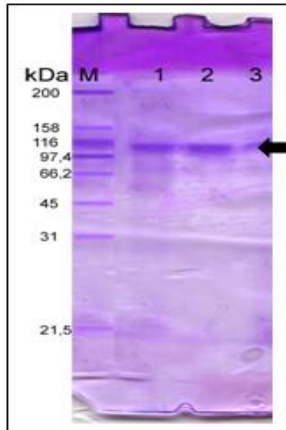
Berat molekul isolat protein membran spermatozoa kambing ditentukan dengan mengplotkan harga Rf yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = - 2,1378X + 5,5952$ kurva hubungan antara Rf (sumbu X) dengan log BM protein standar (sumbu Y) sehingga diperoleh pita protein yang terdiri atas 7 pita dengan berat molekul 166,7; 122; 100; 82,8; 60,4; 29,9 dan 14,8 kDa (Gambar 1).



Gambar 1. Elektroforegram Protein 100 kDa
Keterangan: M = Marker; 1, 2 = Sampel; → = BM Protein 100 kDa

Untuk memperoleh isolat Protein 100 kDa maka dilakukan purifikasi menggunakan metode elektroelusi dengan cara memotong pita dengan BM 100 kDa dan dilakukan elusi selama semalam.

Hasil elusi Protein 100 kDa terlihat pada Gambar 2.

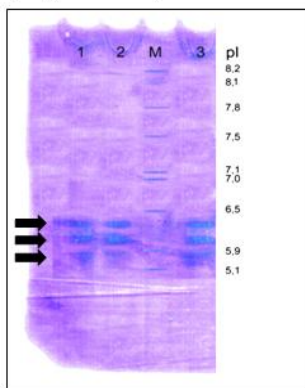


Gambar 2. Hasil elusi Protein 100 kDa
Keterangan: M = Marker; 1, 2 = Sampel; → = BM Protein 100 kDa

Titik Isoelektrik Protein 100 kDa

Isoelectric Focusing (IEF) gel elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan protein pada muatan bersihnya (tanpa/titik isoelektrik). Pemisahan protein berdasarkan gradien pH pada muatan listriknya (*electric field*). Pada kondisi ini, protein bermigrasi sampai posisi gradien pHnya tidak bermuatan atau titik isoelektriknya nol (*zero*) [9].

Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang diejakulasikan ini mempunyai tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64. Hasil tersebut hampir sama dengan hasil *Isoelectric Focusing* dari protein MPS ecto CIK yang berasal dari membran spermatozoa di cauda epididimis kambing yang ditemukan Maiti *et al.* [2] yaitu 6,37; 6,05 dan 5,14. Hasil IEF Protein 100 kDa pada penelitian ini tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil IEF gel elektroforesis Protein 100 kDa
Keterangan: M =Marker Protein; 1, 2, 3 = Sampel; →= tiga titik isoelektrik (pI) protein 100 kDa yaitu: 6,37 ; 6,05 dan 5,64.

Kandungan Protein 100 kDa

Pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap kandungan protein isolat Protein 100 kDa dengan metode Biuret. Hasil analisis data dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakter Biokimia Protein 100 kDa dari membran Spermatozoa Kambing

Rataan Kandungan dalam Isolat Protein 100 kDa	Isolat Protein 100 kDa
Protein (µg/mL)	2375 ± 5,65

Kandungan protein dalam isolat Protein 100 kDa ditentukan dengan mengkonversikan serapan pada kurva *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang sudah diketahui konsentrasinya. Dari hasil penelitian dan analisis pada persamaan $Y = 5.10^{-5} X$, diperoleh kandungan rata-rata protein total isolat Protein 100 kDa sebesar $2375 \pm 5,65 \mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa isolat Protein 100 kDa dapat digunakan sebagai imunogen. Syarat minimal penggunaan protein sebagai antigen adalah sebesar $300 \mu\text{g}/200 \text{ ml}$ pelarut [10].

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang diuraikan di atas maka dapat diambil kesimpulan bahwa karakter biokimia Protein 100 kDa dari membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan yaitu mempunyai berat molekul 100 kDa dengan tiga titik isoelektrik yaitu 6,37; 6,05 dan 5,64 dan rata-rata kandungan protein total dari isolat sebesar $2375 \pm 5,65 \mu\text{g/ mL}$.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan Protein 100 kDa membran spermatozoa kambing yang sudah diejakulasikan dalam menginduksi respon imun humoral.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Mitra S. and Majumder G.C. 1991. Alteration of the Ecto-protein phosphorylation profile of intact goat Spermatozoa during Epididymal Maturation. *Biochem Int.*, 23 (3): 611-618.
 [2] Maiti A., Mishra K.P. and Majumder G.C. 2004. *J. of Cell. Biochem.*, 92:164-177.
 [3] Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Angkasa. Bandung
 [4] Partodihardjo S.W. 1992. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.

- [5] Jayendran R.S., H. H. Van der van and Perz-Pelaez M. 1984. Development of an assay to access the functional integrity of the human sperm membrane.
- [6] Hinsch E., Oehringer S., Schill W.B and Hinsch K.D. 1999. Specificity of human and murin anti ZP3 Synthetic Peptide Antisera and use of antibodies for localization and Identification of ZP3 or ZPC Domains of Functional Significance. *Hum. Reprod. Feb.* 14(2): 419-28.
- [7] Gatti J.L., Druat X., Syntin P., Guerin Y., Dacheux J.L. and Dacheux F. 2000. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoprotein. *Biol. of Reprod.*, (62): 950-958.
- [8] Hamilton D.W. and Gould R.P. 1997. Preliminary observations on enzymatic galactosylation of glycoproteins on the surface of rat caput epididymal spermatozoa. *Int. J. Androl. (suppl.)*, 5: 73-80.
- [9] Walker. 1994. Methodes in molecular biology, basic protein and peptide *Protocols*, 32: 59-67
- [10] Robert K. and Peter A. 1993. Harper's biochemistry, 23th edition. Preble hall International Inc., USA.