

# Ekstraksi dan Isolasi Ovine Pregnancy Associated-Glycoprotein (ovPAG) dari Kotiledon Plasenta Domba Garut pada Saat Melahirkan

E.T. SETIATIN<sup>1</sup>, D. SAJUTHI<sup>2,3</sup>, B. PURWANTARA<sup>2</sup>, C. TALIB<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Ilmu Pemuliaan dan Reproduksi Ternak, Kampus UNDIP Tembalang Gedung B Lt 2, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro., Tlp : 024 7474750, Semarang

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus Darmaga IPB, Tlp : 0251 8629461, Bogor

<sup>3</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Kampus Darmaga IPB, Tlp. 0251 8624567

<sup>4</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Jl. Raya Pajajaran Kav E59, Bogor

(Diterima dewan redaksi 1 Agustus 2009)

## ABSTRACT

SETIATIN, E.T., D. SAJUTHI, B. PURWANTARA and C. TALIB. 2009. Extraction and isolation of Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (ovPAG) from cotyledon placenta of Garut sheep. *JITV* 14(3): 208-215.

Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) structurally related to aspartic protease, expressed in the outer epithelial cell layer (trophoblast) of ungulate placenta. Ovine PAG (ovPAG) synthesized by mono- and binucleic trophoblast before complete implantation at Day 14-15. Of this, ovPAG could be used as a marker for early pregnancy. The objective of study was to extract and isolate PAG from placenta of Garut Sheep collected at term and to characterize their molecular weight. The procedures included extraction of protein at neutral pH (cotyledon was thawed, minced, added PBS, blended and centrifuged), acidic ( $H_3PO_4$  1M, pH 4,5; centrifuged) and ammonium sulfate (40% and 80%  $(NH_4)SO_4$ , centrifuged) precipitation; gel filtration (Sephadex-G75), anion exchange chromatography (DEAE-cellulose). Cotyledon extract was subjected to Sephadex-G75 and DEAE cellulose, and their fractions were measured their absorbances. Absorbances of Sephadex-G75 and DEAE fractions at peak were assayed for protein concentration (Bichinoninic protein assay). Continuously, these fractions were subjected to monogel SDS-PAGE and stained by Commassie Brilliant Blue. It was four different molecular weights isolating from cotyledon of *Garut Sheep*, namely 68.8, 36.04, 32.39 and 12.18 kDa. However, after chromatography anion exchange (DEAE-cellulose), only three bands exist, those were 71,67; 33,64 and 30,86 kDa.

**Key words:** Garut sheep, Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG), Cotyledone, SDS-PAGE, DEAE-cellulose

## ABSTRAK

SETIATIN, E.T., D. SAJUTHI, B. PURWANTARA dan C. TALIB. 2009. Ekstraksi dan isolasi Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (ov PAG) dari kotiledon plasenta domba Garut sesaat setelah melahirkan. *JITV* 14(3): 208-215.

Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) merupakan glikoprotein asam yang mempunyai sekuen paling dekat dengan pepsin. Pada domba, PAG disintesa oleh sel mono- dan binukleat trofoblas sesaat sebelum implantasi sempurna pada hari ke 14-15. Keberadaan ov PAG ini dapat dijadikan penanda kebuntingan dini. Isolasi protein (ovPAG) dari kotiledon plasenta dilakukan untuk ovPAG berdasarkan berat molekulnya. Prosedur isolasi terdiri dari ekstraksi kotiledon plasenta (pencairan kotiledon, dicincang, ditambahkan PBS, kemudian dilumatkan dan sentrifus), presipitasi asam ( $H_3PO_4$  1M, pH 4,5; sentrifus) dan garam (40%  $(NH_4)SO_4$  dilanjutkan 80%  $(NH_4)SO_4$ , dan disentrifus), gel filtrasi (Sephadex G-75) dan kromatografi pertukaran anion (DEAE-cellulose). Absorbansi protein yang terkandung dalam fraksi yang ditampung diukur, protein dengan absorbansi tinggi diukur total proteinnya menggunakan *Bichinoninic Protein Assay*. Fraksi yang sudah terukur total proteinnya dialirkan pada monogel SDS-PAGE, selanjutnya pita protein yang muncul diwarnai *Commassie Brilliant Blue* (CBB). Ada lima empat pita utama yang dihasilkan dari isolasi ekstrak kotiledon plasenta sebelum gel filtrasi dan kromatografi pertukaran anion yaitu 68,8, 36,04, 32,39 dan 12,18 kDa. Setelah melewati kolom DEAE-cellulose, pada konsentrasi NaCl 160 dan 320 mM ditemukan tiga pita protein yaitu 71,67; 33,64 dan 30,86 kDa.

**Kata Kunci:** Domba Garut, Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG), Kotiledon, SDS-PAGE, DEAE-cellulose

## PENDAHULUAN

Deteksi kebuntingan pada ruminansia kecil belum berkembang seperti pada sapi. Beberapa metode deteksi kebuntingan telah diadopsi untuk domba tetapi hasilnya

belum memuaskan, seperti *Early Pregnancy Factor* dapat terdeteksi dalam waktu 24 jam tetapi sulit diterapkan di lapangan (JAINUDEEN dan HAFEZ, 2000). Interferon- $\tau$  terdeteksi pada hari ke 10-22 (SPENCER dan BAZER, 2004; EZASHI dan ROBERTS, 2004). Konsentrasi

progesteron dan estrogen pada domba setelah implantasi sempurna mempunyai level yang setara antara bunting dan tidak bunting berkaitan dengan sifat prolific dari domba (JOHNSON dan EVERITT, 2000). Transrectal ultrasonography (TUSG), perlu peralatan dan keahlian khusus (STRMŠNIK *et al.*, 2002) serta dilakukan secara invasive yang memungkinkan terjadinya stress (WODZICKA-TOMASZEWSKA *et al.*, 1991). Oleh karena itu perlu dikembangkan metode kebuntingan dini yang aplikatif, murah, akurat dan *non-invasive* (CHELINI *et al.*, 2005; KAREN *et al.*, 2003), diantaranya adalah pregnancy-associated glycoprotein.

*Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (ovPAG)* merupakan protein yang disekresikan oleh chorion atau trophoctoderm plasenta spesies eutherian (GREEN *et al.*, 2000). *Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein* disintesa oleh sel mono- dan binukleat trophoctoderm, yang disekresikan oleh induk sesaat dimulai kebuntingan (WOODING, 1992) dan perlekatannya semakin bertambah erat pada saat dimulai pembentukan plasenta (SOUSA *et al.*, 2006). Dengan demikian keberadaannya juga sangat berguna selain untuk menentukan kebuntingan juga menunjukkan kesehatan foetus (BARBATO *et al.*, 2007).

*Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG)* telah diisolasi pada berbagai spesies yang mempunyai kisaran berat molekul tertentu. Domba dan kambing mempunyai berat molekul antara 55-62 kDa (GARBAYO *et al.*, 1998; SOUSA *et al.*, 2002; EL AMIRI *et al.*, 2004); sapi 67kDa (ZOLI *et al.*, 1991); kerbau 59,5 – 75,8 kDa pada pertengahan kebuntingan dan 57,8 – 80,9 kDa pada akhir kebuntingan (BARBATO *et al.*, 2007).

*Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein* pertama diisolasi dari kotiledon fetus domba (*ovine*) oleh RANILLA *et al.*, (1994) dan *ovPAG* telah terdeteksi keberadaannya dalam darah induk pada usia 3-4 minggu. *Ovine PAG* disekresikan sepanjang usia kebuntingan dan mencapai puncaknya pada akhir masa kebuntingan. Konsentrasi *ovPAG* akan mulai menghilang pada hari ke 4-5 sampai seminggu setelah melahirkan sehingga *ovPAG* dimungkinkan untuk menjadi penanda kebuntingan dini (EL AMIRI *et al.*, 2007). Temuan ini dimungkinkan untuk dikembangkan di Indonesia karena berdasarkan penelitian HERDIS (2005), dengan belum berkembangnya metode deteksi kebuntingan dini pada ruminansia kecil khususnya domba garut maka secara tidak langsung akan berakibat pada rendahnya efisiensi reproduksi. Hal ini terjadi karena umumnya perkawinan domba garut dilakukan dengan cara mengumpulkan domba betina dan pejantan selama hamper 40 hari, peternak hanya menunggu sampai domba bunting. Apabila domba tidak berhasil bunting maka akan menghabiskan waktu sekitar 60 hari yang berakibat pada peningkatan biaya produksi.

Kondisi ini mendorong untuk dikembangkan metode kebuntingan sedini mungkin terutama sebelum memasuki siklus berahi berikutnya atau kurang dari 18 hari dalam upaya memperbaiki manajemen reproduksi utamanya pada ruminansia kecil khususnya domba garut. Penelitian ini bertujuan mendapatkan protein penentu kebuntingan dengan cara mengisolasi *ovPAG* dari kotiledon plasenta yang dikoleksi pada saat melahirkan sehingga dengan demikian tidak ada ternak yang dikorbankan.

## MATERI DAN METODE

### Hewan percobaan

Penelitian ini menggunakan domba garut (*Ovis aries*) betina sejumlah 9 ekor yang pernah melahirkan, berumur 2-3 tahun dengan bobot sekitar 22 – 36 kg serta dipelihara dalam kandang individu. Seluruh betina dikawinkan menggunakan semen cair dari pejantan unggul yang sama dengan teknik inseminasi buatan.

### Ekstraksi Kotiledon

**Pengumpulan Kotiledon.** Plasenta dikumpulkan sesaat melahirkan. Kotiledon dipisahkan dari karunkula kemudian dicuci bersih menggunakan NaCl 0,9%, disimpan pada suhu – 20°C (SOUSA *et al.* 2002) sampai semua induk melahirkan.

**Ekstraksi.** Ekstraksi kotiledon dilakukan dengan metode GARBAYO *et al.* (1998), SOUSA *et al.* (2002), dan EL AMIRI *et al.* (2007) yang dimodifikasi. Setelah semua induk melahirkan, kotiledon siap diproses. Kotiledon dicairkan, dicincang, ditambahkan PBS (1 gr kotiledon: 3,5 ml PBS) dan di campur menggunakan *blender* selama 5 menit lalu diputar semalaman (*overnight*) menggunakan *stirer* pada suhu 4°C disebut larutan awal (S0). Larutan S0 disentrifus pada suhu 4°C (Refrigerated High Speed Centrifuge, Himac-CR21G, R20A2) pada 27.000 g selama 60 menit (SOUSA *et al.*, 2002; EL AMIRI *et al.*, 2007). Pemisahan presipitat dengan supernatan diperoleh supernatan 1 (S1).

**Presipitasi asam.** Supernatan 1 (S1) ditambah H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M sampai mencapai pH 4,5 kemudian diputar selama 120 menit. Larutan S1 disentrifus pada 27.000 g selama 60 menit, supernatan-2 (S2) dipisahkan dari presipitat kemudian ditambah KOH 1M sampai mencapai pH 7,6 (GARBAYO *et al.*, 1998).

**Presipitasi Garam Amonium Sulfat.** Supernatan 2 (S2) ditambah 40% (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (24,2 gr/100ml), penambahan dilakukan secara hati-hati dan perlahan-lahan sambil diputar serta disimpan semalaman pada suhu 4°C. Selanjutnya larutan disentrifus pada 27.000 g selama 60 menit, presipitat dibuang sementara supernatant 3 (S3) dikumpulkan kemudian ditambah 80% (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (28,1 gr/100ml) dan mendapat

perlakuan sama dengan pada 40% (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Larutan disentrifus pada 27.000 g selama 90 menit, presipitat dikumpulkan sedangkan supernatant 4 (S4) disimpan untuk pengujian keberadaan protein dalam ovPAG. Presipitat ditambah 250 ml Tris- HCl 0,01 M, pH 7,6 (GARBAYO *et al.*, 1998; EL AMIRI *et al.*, 2004) menjadi larutan S5. Larutan S5 didialisis menggunakan bufer yang sama selama 48 jam, kemudian disentrifus pada 36.000 g selama 30 menit. Presipitat dibuang sedangkan supernatant 5 (S5) dikumpulkan. Larutan S5 didialisis sampai mencapai 10% volume awal, menjadi supernatant prekolom (S6) yang siap dialirkan pada kolom Sephadex-G75 dan DEAE-cellulose.

Semua supernatant yang diperoleh selama proses ekstraksi dialirkan pada monogel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) untuk diukur berat molekulnya berdasarkan posisi pita protein yang muncul menggunakan persamaan logaritmik (Gambar 1).

### Isolasi ovPAG dari ekstrak kotiledon plasenta

*Filtrasi Gel menggunakan Sephadex-G75.* Isolat prekolom dialirkan pada kolom Sephadex-G-75 yang telah diekuilibrasikan menggunakan bufer NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,05 M dengan kecepatan 1,25 ml/menit. Selanjutnya fraksi-fraksi ini diukur kadar total proteinnya dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer (Hitachi U-2001<sup>®</sup>) pada panjang gelombang 280 nm. Selanjutnya diplot pada grafik, fraksi yang berada pada titik puncak fluktuasi absorbansi, dikumpulkan untuk selanjutnya diukur konsentrasi proteinnya menggunakan *Bichinconinic Protein Assay* (Pearce<sup>®</sup>).

*Kromatografi Pertukaran Anion pada kolom DEAE-cellulose.* Kolom DEAE diekuilibrasikan menggunakan Tris-HCl 0,01M (pH 7,6). Isolat prekolom dialirkan, fraksi ditampung pada kecepatan 2,5 ml/menit. Selanjutnya kolom dielusi menggunakan bufer NaCl pada konsentrasi yang bertingkat yaitu 20, 40, 80, 160, 320 mM dan 1M. Pada setiap pergantian konsentrasi NaCl, fraksi ditampung selanjutnya fraksi-fraksi tersebut diperlakukan sama dengan pada fraksi dari kolom Sephadex-G75.

Protein yang mempunyai konsentrasi protein tinggi dikumpulkan, didialisis menggunakan polietilen glikol (PEG) terlebih dahulu sebelum diukur berat molekulnya. Larutan yang telah didialisis dilairkan pada SDS-PAGE.

### Karakterisasi ovPAG menggunakan Monogel SDS-PAGE

*Pembuatan Monogel SDS-PAGE. Running Gel* dibuat pada konsentrasi 14% sedangkan *stacking gel* pada 4%. Gel pemisah dibuat dengan menggunakan komposisi Acylamide 40%, bis-acrylamide 2%,

TEMED, APS 10%, dH<sub>2</sub>O ditambah buffer Tris-HCl pH 8,8 sedangkan untuk *stacking* pH 6,8. Marker ditambahkan sebagai standar berat molekul protein yang dipisahkan. Setelah *stacking gel* mengental, protein yang akan diidentifikasi dimasukkan yaitu berasal dari S0,S1,S2,S3,S4,S5,S6 yang diperoleh pada saat ekstraksi kotiledon, standar berat molekul yang dipergunakan adalah *Broad Range Standard* dengan kisaran 7,5 – 203 kDa (Sigma<sup>®</sup>). Selanjutnya protein dengan berat molekul tertentu akan terpisah selama melewati gel pemisah pada 100 volt selama 90 menit. Setelah warna biru mencapai garis paling bawah dari monogel, reaksi dihentikan, gel diwarnai dengan *Commassie Brilliant Blue*.

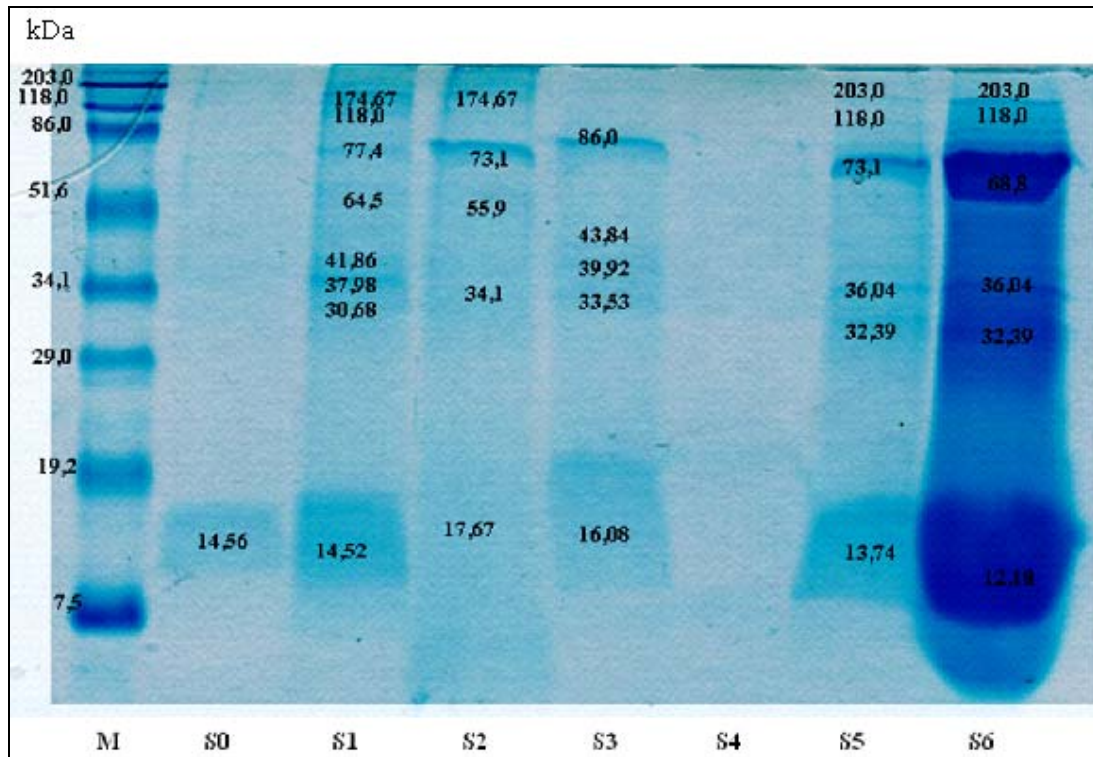
*Pewarnaan Monogel SDS-PAGE menggunakan Commassie Brilliant Blue (CBB).* Gel dilepaskan dari tempatnya dicelupkan pada larutan pewarna CBB (CBB+metanol+asam asetat+dH<sub>2</sub>O) selama 20 menit. Penghilangan pewarnaan dilakukan dengan menambahkan *destaining* (campuran methanol + asam asetat + dH<sub>2</sub>O) sampai permukaan gel terendam selama 2 jam kemudian diulang sampai larutan bening serta pita protein terlihat jelas pada monogel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi kotiledon menggunakan metode GARBAYO *et al.*, 1998; SOUSA *et al.*, 2002 dan EL AMIRI *et al.* 2007 yang dimodifikasi, dari kotiledon kasar (249,19 gr) setelah diekstrak dihasilkan presipitat seberat 15,36 gr pada 80% (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Presipitasi garam umumnya menggunakan ammonium sulfat karena sifatnya yang sangat larut dalam air. Adapun tujuan utama dilakukan presipitasi terhadap ekstrak kasar adalah untuk menghilangkan protein besar yang mengkontaminasi sehingga hanya protein yang dibutuhkan yang terikat oleh adanya kekuatan ion tanpa merusak aktivitas enzim dari protein yang dipurifikasi.

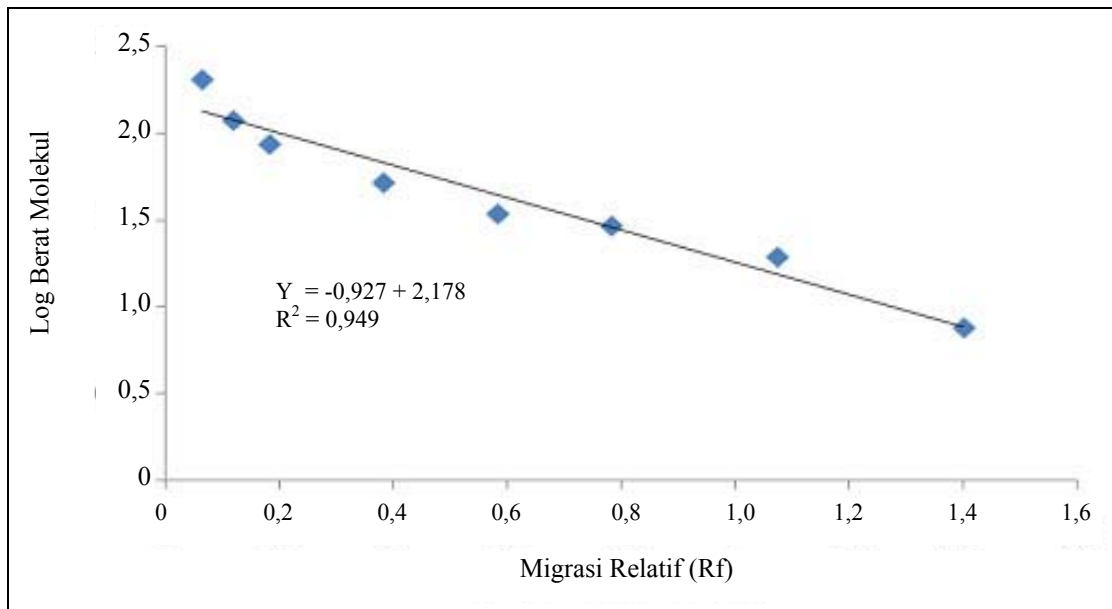
Gambar 1 memperlihatkan pita protein yang terlihat pada monogel SDS-PAGE dari berbagai supernatant dikumpulkan selama proses ekstraksi. Protein yang terwarnai diukur berat molekulnya dengan mengukur migrasi relatif yang dilakukan protein pada saat melewati gel pemisahan (Gambar 2). Selanjutnya berdasarkan persamaan logaritmik ( $Y = -0,927 X + 2,178$ ;  $R^2 = 0,949$ ) yang didapat dengan cara menghitung migrasi relatif *marker* yang dipergunakan, berat molekul protein yang muncul sebagai pita pada monogel elektroforesis dapat dihitung (CHAMPE *et al.*, 2008; STRYER, 1995).

Berdasarkan perhitungan, protein yang terkandung didalam isolat yang dipurifikasi mempunyai berat molekul tertentu yang terbagi menjadi 3 kelompok yaitu 70-an kDa sebanyak 3 pita (77,4; 73,1; 68,8), 30-an kDa sebanyak 7 pita (39,92; 38,68; 37,98; 36,04; 34,1; 33,53; 32,39) dan belasan sebanyak 6 pita (17,64;



Keterangan:  
 M = marker  
 S0 = material kasar  
 S1 = S0 disentrifus  
 S2 = presipitasi asam  
 S3 = 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 S4 = 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 S5 = Tris HCl 0,01M  
 S6 = prekolom

**Gambar 1.** Pita protein dari isolat hasil ekstraksi kotiledon yang terpapar pada monogel SDS-PAGE dengan pewarnaan *Commassie Brilliant Blue*



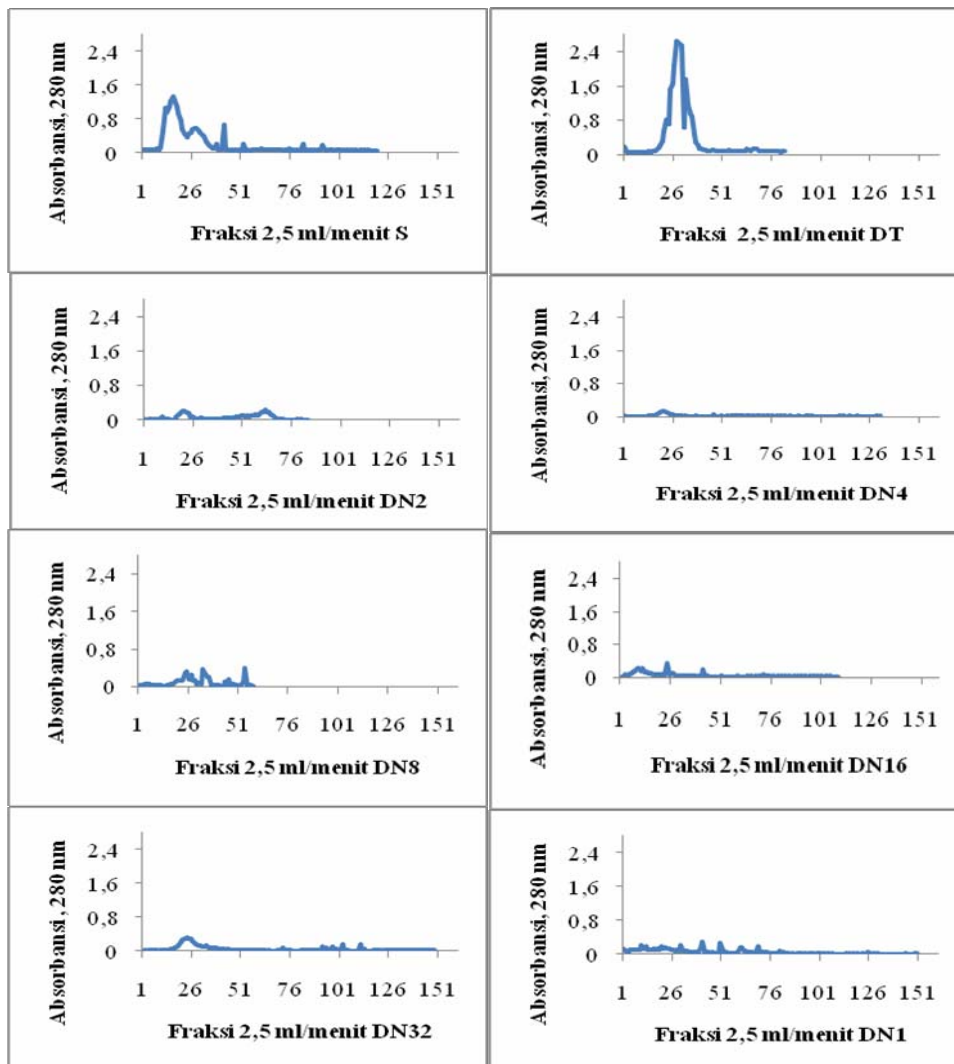
**Gambar 2.** Slop perhitungan migrasi relatif untuk menentukan berat molekul protein *ovine pregnancy-associated glycoprotein* (ov PAG)

16,08; 14,56; 14,52; 13,74; 12,18). Berat molekul PAG domba garut hampir mendekati yang telah diisolasi oleh XIE *et al.* (1996) yakni antara 43 – 70 kDa pada plasenta domba dibanding sapi sekitar 67 kDa (ZOLI *et al.*, 1991). Pada domba garut, ditemukan protein yang spesifik karena belum dilaporkan peneliti terdahulu bahwa ditemukan pita protein dengan dengan berat molekul antara 19,2 dan 11,74 kDa sebanyak 6 pita protein. Hal ini mirip dengan berat molekul Human Chorionic Gonatotrophine (HCG) pada 14.5 kDa ( $\alpha$ HCG) dan 22.2 kDa ( $\beta$ HCG) yang biasa dimanfaatkan sebagai penanda kebuntingan pada manusia (GARN dan LATIFF, 2005).

Purifikasi ovPAG dilakukan dengan mengalirkan ekstrak kotiledon pada kolom Sephadex-G75 dan DEAE-cellulose. Sephadex-G75 dipilih untuk filtrasi protein yang berada pada kisaran tertentu sedangkan DEAE-cellulose dimanfaatkan untuk pertukaran anion

dengan menggunakan konsentrasi NaCl yang bertingkat sebagai upaya untuk mendapatkan protein yang mempunyai ikatan ion yang paling kuat. Penggunaan NaCl pada kromatografi pertukaran anion karena ion  $Cl^{-1}$  dalam kondisi fisiologis normal banyak tersedia dalam membran plasma (EGGERMONT, 2004).

Jumlah fraksi yang diukur absorbansi dari kolom Sephadex-G75(S) sebanyak 82 sedangkan dari kolom DEAE-cellulose (Tris-HCl atau DT; NaCl 20mM atau DN20; NaCl 40mM atau DN40; NaCl 80mM atau DN8; NaCl160 mM atau DN16; NaCl 320 mM atau DN32 dan NaCl 1 M atau DN1) masing-masing 151, 157, 157, 153, 153 dan 150. Absorbansi protein yang terkandung pada fraksi-fraksi tersebut dibuat grafik (Gambar 3) untuk mendapatkan puncak absorbansi dari masing-masing kolom Sephadex-G75 ( $NH_4HCO_3$ ) dan DEAE-cellulose.



**Gambar 3.** Absorbansi protein dalam fraksi dari kolom Sephadex-G75 ( $NH_4HCO_3$ ) dan DEAE-cellulose (Tris-Cl 0,01 M, NaCl 20,40,80,160,320 mM dan 1M)

**Tabel 1.** Jumlah fraksi dan konsentrasi protein pada kolom Sephadex-G75 dan DEAE-cellulose

Kolom	Jumlah total fraksi	Jumlah fraksi diukur absorbansi	Konsentrasi protein (ng/μL)
Sephadex-G75 (S)	120	21	181,00
DEAE-Tris-HCl 0,01 M (DT)			
Tris-HCl 0,01 M (DT)	82	42	171,00
NaCl 20 mM (DN2)	151	34	Negatif
NaCl 40 mM (DN4)	157	29	Negatif
NaCl 80 mM (DN8)	157	35	2,67
NaCl 160 mM(DN16)	153	21	44,33
NaCl 320 mM (DN32)	1153	30	86,00
NaCl 1 M (DN 1)	150	40	Negatif

Keterangan : Negatif = nilai lebih rendah dari standar

Absorbansi protein menggambarkan kandungan protein yang terkandung dalam fraksi yang ditampung. Fraksi yang memiliki absorbansi tinggi berada yaitu pada puncak grafik diukur konsentrasinya sebagai konfirmasi kandungan protein yang terkandung didalamnya. Tingginya kerapatan optik atau OD diikuti dengan tingginya konsentrasi protein yang terkandung di dalamnya. Protein yang berasal dari fraksi DEAE-NaCl 20 dan 40 mM serta 1M mempunyai OD yang rendah setelah dilakukan asai protein konsentrasinya lebih rendah dari standar sehingga tidak dipergunakan sebagai stok sedangkan fraksi kolom Sephadex-G75 dan DEAE-cellulose 80,160,320 mM) mempunyai total protein berturut-turut 181; 171; 2,67; 44,33 dan 86 ng/μL akan dipergunakan sebagai stok ovPAG yang merupakan isolat murni ovPAG sebagai hasil purifikasi ekstrak kotiledon.

Karakterisasi ovPAG dilakukan menggunakan Monogel SDS-PAGE. Hal ini dilakukan untuk mengevaluasi kemurnian isolate yang didapat dengan mengukur berta molekul yang terpapar dari pita protein yang muncul pada monogel SDS-PAGE.yang diwarnai Commassie Brilliant Blue (Gambar 4).

Ada dua pita protein DT yaitu 30,86 dan 11,74 kDa, pada DN2,4,8 dan 1 tidak ada pita protein yang terbentuk sedangkan pada DN16 dan 32 masing-masing memiliki tiga pita protein pada 71,67; 33,64 dan 30,86 kDa. Ada satu pita protein yang memiliki berat molekul yang sama pada DT, DN 16 dan DN32 yaitu pada 30,86 kDa. Temuan ini sedikit lebih rendah dari peneliti

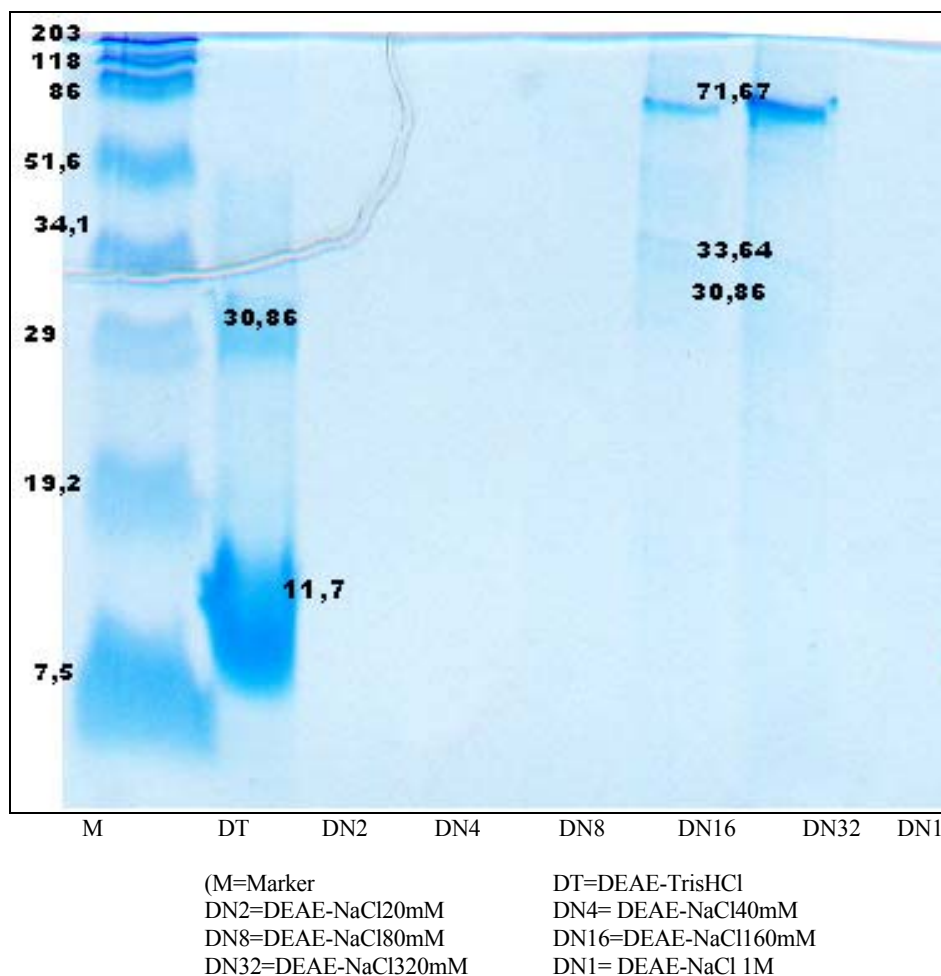
sebelumnya yaitu pada kisaran 43-70 kDa (ZOLI *et al.*, 1991). Protein pada berat molekul sekitar 30,86 kDa yang akan dievaluasi lebih lanjut untuk dijadikan sebagai agen penanda kebuntingan yang spesifik untuk domba Garut.

## KESIMPULAN

Ada 3 kelompok berat molekul protein dari hasil ekstraksi yaitu 70-an kDa sebanyak 3 pita (77,4; 73,1; 68,8), 30-an kDa sebanyak 7 pita (39,92; 38,68; 37,98; 36,04; 34,1; 33,53; 32,39) dan belasan sebanyak 6 pita (17,64; 16,08; 14,56; 14,52; 13,74; 12,18). Setelah purifikasi DT mempunyai ada dua pita protein (30,86 dan 11,74 kDa) sedangkan DN16 dan DN32 memiliki ada tiga pita protein (71,67; 33,64 dan 30,86 kDa). Protein pada berat molekul 30,86 kDa dimungkinkan dapat dijadikan penanda kebuntingan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada Dr. Farida Fathul dan Ir Umi Adiati yang telah membantu dalam pengadaan pakan dan pemeriksaan kebuntingan. Ucapan ini juga kami haturkan pada Badan Litbang Pertanian selaku Pemberi Dana Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) TA 2007.



Gambar 4. Pita protein fraksi hasil kromatografi pertukaran anion DEAE-cellulose

#### DAFTAR PUSTAKA

- BARBATO, O., N.M. SOUSA, K. KLISCH, E. CLERGET, A. DEBENEDETTI, V. BARILE, A. MALFATTI and J.F. BECKERS. 2007. Isolation of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) from water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta by use of *Vicia villosa* bound agarose affinity chromatography. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl 2): 762-765.
- CHAMPE, P.C., R.A. HARVEY and D.R. FERRIER. 2008. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 4<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. pp. 157-172.
- CHELINI, M.O.M., N.M. SOUSA, A.M. ROCHA, E.C.G. FIELIPPE and C.A. OLIVEIRA. 2005. Quantification of fecal oestradiol and progesterone metabolites in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1711-1717.
- EGGERMONT, J. 2004. Calcium-Activated Chloride Channels : (Un)known and (Un)loved?. *Proc. Am. Thor. Soc.* 1: 22-27.
- EL AMIRI, B., A. KAREN, J. SULON, N.M. DE SOUSA, A.V. ALVAREZ-OXILEY, Y. COGNIC, O. SZENCI and J.F. BECKERS. 2007. Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during early pregnancy in lacune sheep. *Reprod. Dom. Anim. Doi.:*1110- 1111.
- EL AMIRI, B., B. REMY, N.M. DE SOUSA and J.F. BECKERS. 2004. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 169-181.
- EZASHI, T. and R.M. ROBERTS. 2004. Regulation of interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) gene promoters by growth factors that target the Ets-2 composite enhancer: A possible model for maternal control of IFN- $\tau$  production by the conceptus during early pregnancy. *Endocrinology* 145: 4452-4460.
- GARBAYO, J.M., B. REMY, J.L. ALABART, J. FOLCH, R. SWATTIEZ, P. FALMAGNE and J.F. BECKERS. 1998. Isolation and partial characterization of pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol. Reprod.* 58: 109-115.

- GARN, L-H. and A. LATIFF. 2005. SDS PAGE electrophoretic property of human chorionic gonadotropin (HCG) and its  $\beta$ -subunit. *Int. J. Biol. Sci.* 1: 103-109.
- GREEN, J.A., S. XIE and R.M. ROBERTS. 1998. Pepsin-related molecule secreted by trophoblast. *Rev. Reprod.* 3: 62-69.
- GREEN, J.A., S. XIE, X. QUAN, B. BAO, X. GAN, N. MATHIALAGAN, J-F. BECKERS and R.M. ROBERTS. 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibits spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol. Reprod.* 62: 1624-1631.
- HERDIS. 2005. Optimalisasi inseminasi buatan melalui aplikasi teknologi laserpunktur pada domba Garut (*Ovis aries*). *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- JAINUDEEN, M.R. and E.S.E. HAFEZ. Pregnancy diagnosis. *In: Reproduction in Farm Animals*. B. HAFEZ and E.S.E. HAFEZ (Eds). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. pp. 395-404.
- JOHNSON, M.H. and B.J. EVERITT. 2000. *Essential Reproduction*. Blackwell Science. Cambridge, UK.
- KAREN, A., J.F. BECKERS, J. SULON, B. EL AMIRI, K. SZABADOS, S. ISMAIL, J. REICZIGEL and O. SZENCI. 2003. Evaluation of false transrectal ultrasonographic pregnancy diagnoses in sheep by measuring the plasma level of pregnancy-associated glycoproteins. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 577-586.
- RANILLA, M.J., J. SULON, M.D. MANTECON and J.F. BECKERS. 1994. Plasmatic Profiles of pregnancy-Associated Glycoprotein and Progesterone Levels during Gestation in Churra and Merino Sheep. *Theriogenology* 42: 537-545.
- SOUSA, N.M., B. REMY, B. EL AMIRI, J.C. DE FIGUEIREDO, H. BANGA-MBOKO, P.B. DIAS GONÇALVES and J-F. BECKERS. 2002. Characterization of pregnancy-associated glycoproteins extracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational periods. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:227-241.
- SOUSA, N.M., A. AYAD, J.F. BECKERS and Z. GAJEWSKI. 2006. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. *J. Phy. Pharm.* 57 Suppl. 8: 153-171.
- SPENCER, T.E. and F. W. BAZER. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 49.
- STRMŠNIK, I., M. POGAČNIK, N.C. KADUNC and M. KOSEC. 2002. Examination of oestrus cycle and early pregnancy in sheep using transrectal ultrasonography. *Stov. Vet. Res.* 39: 47-58.
- STRYER, L. 1995. *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. WH Freeman & Co. New York.
- XIE, S., R.J. NIGEL, J. GREEN, J-F. BECKERS and R.M. ROBERTS. 1996. Trophoblast-specific processing and phosphorylation of pregnancy-associated glycoprotein-1 in day 15 to 25 sheep placenta. *Biol. Reprod.* 54: 122-129.
- ZOLI, A.P., J.F. BECKERS, P. WOUTERS-BALLMAN, J. CLOSSET, P. FALMAGNE and F. ECTORS. 1991. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.* 45: 1-10.
- WODZICKA-TOMASZEWSKA, M., I.K. SUTAMA, I.G. PUTU dan T.D. CHANIAGO. 1991. *Reproduksi, Tingkahlaku, dan Produksi Ternak di Indonesia*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta, Indonesia.
- WOODING, F.B.P. 1992. Current topic: The synepitheliochorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13: 101-113.