

Abdul Samik

KARAKTERISASI PREGNANCY SPECIFIC PROTEIN B (PSPB) DARI PLACENTA FOETALIS (KOTILEDON) SAPI FRIESIAN HOLSTEIN

Characterization of Pregnancy Specific Protein B (PSPB) from Placenta Foetalis (Cotyledon) Friesian Holstein Cows

Abdul Samik

Departemen Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya-60115, Telp +62-031-5992785 Ext. 200, Fax. +62-031-5993015,
E-mail: samik_s3@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menemukan substansi yang bermanfaat untuk mendiagnosis kebuntingan dini pada sapi Friesian Holstein (FH). *Pregnancy Specific Protein B (PSPB)* diisolasi, dipurifikasi dan dikarakterisasi dari kotiledon sapi FH. Karakterisasi PSPB dilakukan dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan *Western Blot*. Antiserum terhadap PSPB dibuat dari tantangan dengan protein PSPB. Untuk mengetahui lokalisasi protein PSPB dilakukan melalui teknik imunohistokimia. Dari hasil teknik tersebut diketahui bahwa lokalisasi protein PSPB terletak pada sel-sel binukleat kotiledon. Berat molekul PSPB sapi FH adalah 59,88 kDa dengan konsentrasi protein PSPB pada kotiledon 6480 ng/ml. Protein PSPB dapat menginduksi antibodi anti-PSPB dengan nilai *optical density* (OD) adalah $0,179\pm 0,0102$ (sebelum imunisasi); $1,466\pm 0,3288$ (minggu ketiga setelah imunisasi); $1,936\pm 0,4754$ (minggu pertama setelah booster); dan $2,256\pm 0,4842$ (minggu kedua setelah booster).

Kata kunci: kotiledon, PSPB, antibodi anti-PSPB

ABSTRACT

This research was aimed to find out a substance that was useful in early pregnancy diagnosis of Friesian Holstein cows. Pregnancy Specific Protein B (PSPB) was isolated, purified and partially characterized from cotyledon Friesian Holstein cows. Characterization of PSPB protein was conducted using SDS-PAGE and Western Blot. Antisera were developed against PSPB and by immunohistochemical techniques the protein was localized to the binucleated cells of the cotyledon. The estimated molecular size of Friesian Holstein cows PSPB was 59.88 kDa with the concentration of PSPB protein in cotyledon was 6480 ng/ml. PSPB protein could induce anti-PSPB antibody with the value of optical density (OD) were 0.179 ± 0.0102 (before immunization); 1.466 ± 0.3288 (3rd week after immunization); 1.936 ± 0.4754 (1st week after booster;) and 2.256 ± 0.4842 (2nd week after booster).

Keywords: cotyledon, PSPB, anti-PSPB antibody

PENDAHULUAN

Diagnosis kebuntingan dini pada sapi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) dan (b) dengan mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine atau air susu selama kebuntingan seperti progesteron dan estron sulfat (Hafez, 2000).

Pregnancy Specific Protein B (PSPB) merupakan protein khusus yang dapat ditemukan di dalam darah sapi bunting mulai umur kebuntingan 7 hari dan menghilang menjelang partus. Keberadaan PSPB ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan.

Selama ini yang telah dilakukan untuk mendiagnosis dini kebuntingan sapi adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dini dengan menggunakan substansi non spesifik seperti progesteron dan estron sulfat dengan menggunakan teknik *Radioimmunoassay* (RIA) belum dapat dilaksanakan secara cepat di lapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit, dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA.

Penelitian ini bertujuan menemukan protein PSPB yang ada pada sapi perah FH bunting dan mempelajari sifat protein PSPB dalam menginduksi terbentuknya anti-PSPB. Anti-PSPB yang didapat nantinya digunakan untuk bahan diagnostik kebuntingan sapi *dipstick* berdasarkan reaksi *Enzymelinkedimmunosorbanassay* (ELISA) *Sandwich* (antibodi penangkap antigen) yang biayanya lebih murah, lebih aman,

dan aplikasinya lebih mudah dibanding pemeriksaan hormonal dengan teknik RIA.

MATERI DAN METODE

Metode Koleksi PSPB Kotiledon Sapi Friesian Holstein

Kotiledon diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Sebanyak 100 gram kotiledon digunakan untuk ekstraksi PSPB. Jaringan tersebut digerus dan dihomogenisasi dengan *hand mixer* selama 1 menit dalam 0,01 M *potassium phosphate buffer* (KH_2PO_4 + KCl, 0,10 M; pH 7,6) dengan perbandingan antara *buffer* dan jaringan 5:1 (v:w). PMSF (0,2 mM) dan sodium EDTA (0,2% w:v) ditambahkan pada saat homogenisasi. Homogenat dikocok dengan *stirer* secara perlahan-lahan selama semalam, kemudian disentrifus selama 1 jam dengan kecepatan 27.000 g dan pelet yang ada di bawah dibuang. Cairan supernatan yang mengandung protein ditambah dengan 0,5 M MH_3PO_4 sampai pH mencapai 4,5, kemudian dikocok dengan *stirer* selama 2 jam. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 27.000 g selama 1 jam. pH supernatan dibuat 7,6 dengan menambahkan 0,5 M KOH.

Metode Uji Pengikatan Anti-PSPB dan Protein-PSPB Kotiledon dengan Imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan pada kotiledon sapi bunting umur 3 bulan. Kotiledon diambil dan dipotong-potong dengan ukuran 1x1x0,2 cm. Pemeriksaan ini bertujuan mengetahui ikatan anti-PSPB dan protein PSPB pada kotiledon yang ditandai dengan adanya gambaran warna merah kecoklatan dalam jaringan. Adapun tahapan metode imuno-

histokimia adalah *embedding, coating object glass*, pembuatan preparat jaringan, dan imunohistokimia.

Preparasi PSPB dengan SDS-PAGE

Running gel dimasukkan ke dalam alat SDS-PAGE melalui dinding sampai di bawah garis atas. Kemudian ditambahkan 1 ml butanol dan dibiarkan selama 25 menit. Setelah gel membeku butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan *Whatman paper*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* 12% melewati dinding sampai penuh dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul set (25 menit). Selanjutnya *comb* diambil dan dibersihkan sisa-sisa gel dengan *buffer*. Sampel (serum kambing bunting) sebanyak 15 µl dicampur dengan 5 µl *Laemmli buffer* dan dipanaskan 100° C selama 5 menit. Kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke lubang cetakan dengan tip 200 µl. Cetakan dimasukkan ke alat gel elektroforesis, *power supply* di *starter* dengan kekuatan 125 V, 40 mA selama 1 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan *buffer* dan hasilnya divisualisasikan dengan pewarnaan *silver* atau langsung ditransfer ke membran nitroselulosa untuk diuji spesifitasnya dengan *Western Blot* (Aulani'am, 2004).

Pengujian PSPB dengan Western Blot

Western blot dilakukan dengan menggunakan fragmen pita PSPB sapi FH yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dan ditransfer pada membran Nitroselulosa. Membran diblok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama satu jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung 1%

BSA dengan anti-EPF sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti-rabbit IgG label AP, pengenceran 1:1000) dan ditambahkan substrat *western blue* (Aulanni'am, 2004). Pita yang muncul adalah pita PSPB sehingga bisa diketahui BM isolat PSPB.

Isolasi PSPB dengan Metode Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong nilon. Kemudian dimasukkan dalam *block glass* yang mengandung PBS dan dilanjutkan dengan *stirrer* selama 24 jam, setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan perwarnaan *silver*, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Setelah itu dilakukan uji Biuret untuk mengetahui kadar dari protein tersebut.

Pemeriksaan Kadar Isolat PSPB dengan Metode Biuret

Kadar total protein ditentukan menggunakan reagen Biuret dengan penambahan larutan standar protein *bovine serum albumin* (BSA). Dipersiapkan tiga kuvet spektrofotometer, kuvet pertama diberi tanda S sebagai kuvet sampel yang akan diukur. Dalam kuvet S dimasukkan 0,05 ml isolat PSPB dan 2,5 ml pereaksi Biuret. Kuvet kedua diberi tanda ST sebagai kuvet standar, dimasukkan 0,05 ml larutan standar protein dan 2,5 ml pereaksi Biuret. Kuvet ketiga diberi tanpa BL (blanko) dimasukkan 2,5 ml pereaksi Biuret dan 0,05 ml aquades. Ketiga kuvet tersebut didiamkan selama 30 menit dan kemudian dibaca pada spektrofotometer Bausch-

Lombs spektronik 20 dengan panjang gelombang 540 nm (Aulanni'am, 2004).

Perhitungan: Kadar total protein ($\mu\text{g/ml}$)

$$\Rightarrow Y = 5.10^{-5}X$$

Keterangan: Y = Nilai absorbansi

X = Kadar protein ($\mu\text{g/ml}$)

Pembuatan Anti-PSPB

Sebanyak 6 ekor kelinci jantan strain *New Zealand* disuntik secara sub kutan dengan 150 μg PSPB dalam pelarut Freund's *complete*. Penyuntikan ulang dilakukan pada minggu ketiga dengan 100 μg PSPB dalam pelarut Freund's *incomplete*. Sampel darah diambil dari masing-masing kelinci sebanyak 5 ml pada hari ke 0 (sebelum penyuntikan), minggu ke 3-5, melalui vena *auricularis* untuk dianalisa titer antibodi terhadap PSPB dengan menggunakan *indirect ELISA*.

Pengujian Anti-PSPB dengan *Indirect ELISA*

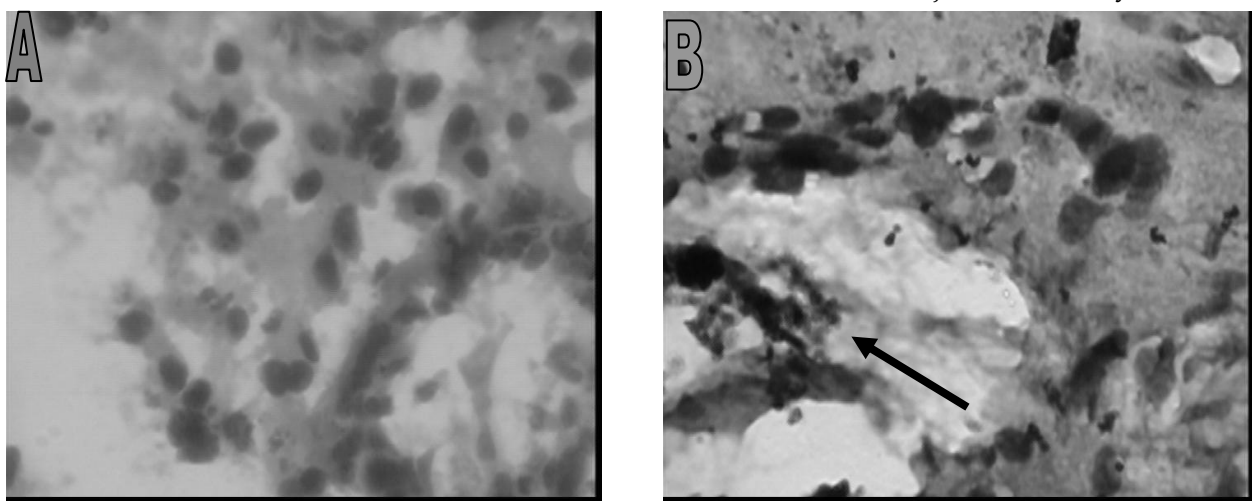
Sebanyak 96 sumuran dalam *micro-plate* di lapisi dengan PSPB sebanyak 100 μl , kemudian diinkubasi pada 4^o C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 6

kali dan di blok dengan *bovine serum albumin* (BSA) *grade 5* dengan konsentrasi 1% sebanyak 200 μl dan diamkan pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan anti-PSPB dari kelinci sebanyak 100 μl dan diinkubasi pada suhu 37^o C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi kedua konyugat alkalin fosfatase dan diinkubasi pada 37^o C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat para nitrophenyl phosphate (PNPP) dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada *ELISA reader* sistem BIO-RAD dengan panjang gelombang 450 nm (Rantam, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imunohistokimia Jaringan Kotiledon Sapi FH

Hasil uji imunohistokimia dari kotiledon sapi FH dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil penelitian imunohistokimia menunjukkan adanya ikatan



Gambar 1. Sediaan histologis jaringan kotiledon sapi FH dengan HE (A) dan Sediaan imunohistokimia protein PSPB pada kotiledon sapi FH dengan *counterstain hematoksilin* (B). Tanda panah: ikatan protein PSPB dan anti-PSPB berwarna coklat (pembesaran 400 X)

antigen dan antibodi yang terdapat pada kotiledon dari sapi FH. Hal ini berarti bahwa protein PSPB diproduksi oleh sel-sel kotiledon.

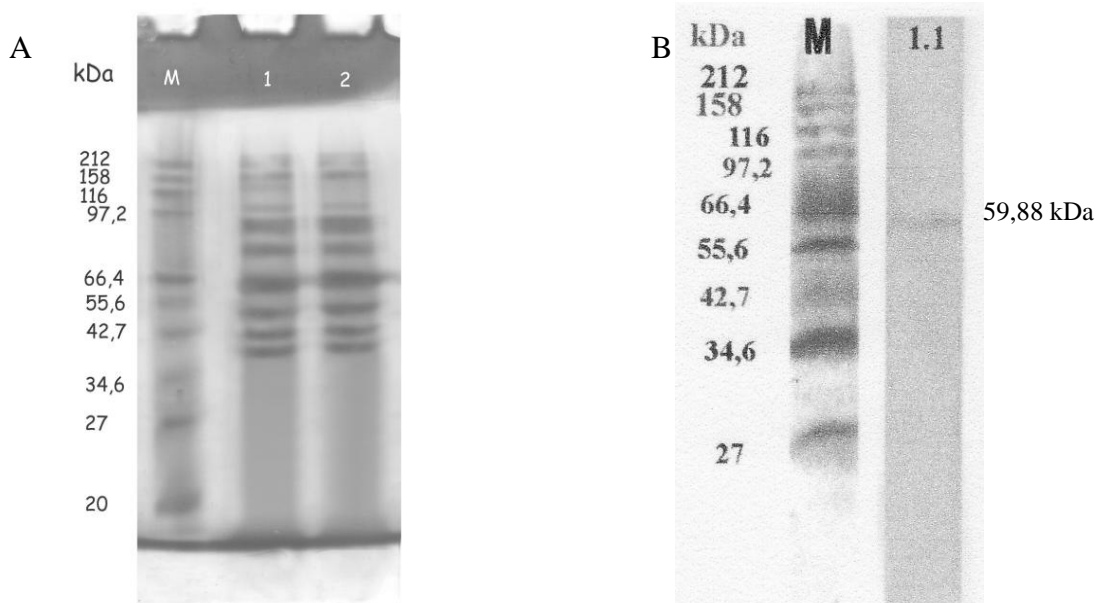
Metode yang digunakan pada uji imunohistokimia ini menggunakan spesifikan ikatan antara molekul avidin dan biotin SA-HRP yang terdapat pada antibodi sekunder yang membentuk kompleks avidin-biotin melalui molekul avidin.

Kromogen yang digunakan pada penelitian ini adalah DAB (3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorida). Pada larutan kromogen ini mengandung peroksida (H_2O_2) sebagai substansi penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP. Kompleks yang terbentuk dari kromogen DAB akan menghasilkan warna kecoklatan. Kromogen ini mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna. Visualisasi jaringan dilakukan dengan menggunakan *countersain hematoksilin*.

Karakterisasi Protein PSPB Kotiledon Sapi Friesian Holstein

Hasil karakterisasi protein kotiledon sapi FH dengan SDS-PAGE dan *Western Blot* (Szafranska *et al.*, 2003) menunjukkan bahwa berat molekul protein kotiledon terletak antara 42,7–97,2 kDa dan berat molekul protein PSPB adalah 59,88 kDa (Gambar 2). Pita-pita protein tersebut agak berbeda dengan yang ditemukan oleh Huang *et al.* (1999) dan Sasser *et al.* (1989) berkisar 37-78 kDa. Sedangkan Xie *et al.* (1991) menemukan berat molekul PSPB pada ruminansia antara 47-53 kDa.

Pregnancy Specific Protein B (PSPB) merupakan polipeptida yang mengandung 382 asam amino dengan berat molekul 42985 Dalton. Lima puluh persen asam amino yang terkandung dalam EPF identik dengan pepsinogen, pepsin, cathepsin D dan cathepsin E (El Amiri *et al.*, 2004). Berat molekul akan meningkat setelah terjadi proses glikosilasi. Rantai oligosakarida menempel pada polipeptida melalui *N-linkage* untuk asparagin atau *O-linkage* untuk serin atau treonin (Xie *et al.*, 1996).



Gambar 2. A. Hasil SDS-PAGE Protein kotiledon sapi FH dan B. Hasil *Western Blot* Protein PSPB. M: Marker

Pregnancy Specific Protein B (PSPB) merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah sapi bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Keberadaan PSPB ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan (Howard, 1998; Barnea, 2000; Transom, 2001). *Pregnancy Specific Protein B* ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Karen *et al.* (2001) menyebutkan bahwa konsentrasi PSPB pada sapi meningkat sesuai dengan umur kebuntingan dan keberadaan PSPB ini sangat erat hubungannya dengan viabilitas embrio (Sakonju *et al.*, 1993) serta dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan (Green *et al.*, 2000).

Pemeriksaan Protein PSPB dengan Metode Biuret

Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah PSPB melalui uji *Western Blot*, maka hasil elusi diperiksa dengan Biuret untuk menentukan kadar protein PSPB. Hasil pemeriksaan isolat protein PSPB dengan metode Biuret dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kadar isolat protein PSPB *cotyledon* sapi FH dengan metode Biuret

Sampel <i>Cotyledon</i>	Abs1	Abs2	Rata-Rata Abs	Kadar Protein (ng/ml)
Endapan	0,378	0,268	0,324	6480
Supernatan	0,468	0,460	0,464	13920

Pembuatan dan Pengujian Anti-PSPB

Anti-PSPB yang diperoleh diuji spesifisitasnya dengan melihat nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan *Indirect ELISA* tidak langsung (Tabel 2).

Tabel 2 menunjukkan bahwa OD anti-PSPB terjadi peningkatan dari hari ke 0 (sebelum imunisasi PSPB/ kontrol) sampai minggu kelima dan secara statistik berbeda nyata. Hal ini sesuai dengan pendapat Darnell *et al.* (1990) dan Abbas *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa minggu pertama dan kedua setelah penyuntikan antigen maka konsentrasi IgG dalam serum akan meningkat dan kemudian akan meningkat lebih tajam pada minggu kelima setelah booster.

Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya

Tabel 2. Rataan *Optical Density* (OD) dari anti-PSPB pada pengenceran 1:20

Kelinci	BLD-1	BLD-2	BLD-3	BLD-4
1	0,191	1	1,359	1,629
2	0,165	1,366	1,855	2,287
3	0,171	1,347	1,857	2,320
4	0,178	1,998	2,715	2,847
5	0,191	1,493	1,619	1,767
6	0,179	1,591	2,213	2,687
Rataan	^a 0,179 ± 0,0102	^b 1,466 ± 0,3288	^c 1,936 ± 0,4754	^c 2,256 ± 0,4842

^{a,b,c} Superskrip berbeda pada kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna (P<0,05).

BLD-1: Pengambilan darah sebelum imunisasi (hari ke 0, sebagai kontrol)

BLD-2: Pengambilan darah minggu ketiga setelah imunisasi, booster

BLD-3: Pengambilan darah minggu pertama setelah booster (minggu ke-4)

BLD-4: Pengambilan darah minggu kedua setelah booster (minggu ke-5)

kemudian disebut dengan antibodi. Mekanisme terbentuknya antibodi dapat dijelaskan sebagai berikut, antigen masuk ke dalam tubuh dan akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang akan berikatan dengan sistim *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) dalam hal ini sel dendrit yang akan mengaktivasi sel T. Sel T kemudian akan menjadi aktif dan akan mengeluarkan sitokin (IL-2) yang berakibat pada aktifnya sel Th. Sel ini kemudian akan menyebabkan sel B memproduksi IgG dalam plasma.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa protein PSPB dapat dikarakterisasi dari kotiledon sapi FH dengan berat molekul antara 59,88 kDa. Protein PSPB merupakan bahan yang bersifat imunogen sehingga mampu menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti-PSPB.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Dirjen Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang berkenan memberikan dana untuk penelitian ini melalui sumber DIPA-DP2M No. 0145.0/023-04.0/-/2007 tanggal 31 Desember 2006, dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian No. 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 tanggal 29 Maret 2007.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, K.A., A.H Lichman, and J.S. Pober. 2000. *Antibodies and Antigens.*

Cellular and Molecular Immunology. 4 th ed. Philadelphia, WB Saunders Co.

Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul.* Universitas Brawijaya Press.

Austyn J.M. and K.J. Wood. 1993. *Principles of Cellular and Molecular Immunology.* 1st Ed. Oxford University Press.

Barnea, E.R. 2000. *Early Pregnancy: Biology and Medicine.* Early Pregnancy Volume IV.

Clarke, F.M., H. Morton, and G.J.A. Clunie. 1978. Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 32:318-323.

Darnell J., H. Lodish, and D. Baltimore. 1990. *Moleculer Cell Biology.* 2nd Ed. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York.

DuPlants, L.J. 2000. *Early Pregnancy Factor.* Lifeissues.net. Kochi, Japan. All Rights Reserved.

El Amiri B., B. Remy, N.M. De Sousa, and J.F. Beckers. 2004. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoprotein present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod Nutr Dev.* 44(3):169-181.

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 Exhibit Spatially and Temporally Distinct Expression Patterns During Pregnancy. *Biol Reprod.* 62(6):1624-1631.

- Hafez, E.S.E. 2000. **Reproduction in Farm Animals**. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Howard, P.J. 1998. Morning after pills: How Do they prevent pregnancy?. **Lancet**. 352:422-428.
- Huang F., D.C. Cockrell, T.R. Stephenson, J.H. Noyes, and R.G. Sasser. 1999. Isolation, purification and characterization of pregnancy-specific protein B from elk and moose placenta. **Biol. Reprod.** 61:1056-1061.
- Karen A, P Kovacs, J.F Beckers, and O Szenci. 2001. Pregnancy diagnosis in sheep : Review of the most practical methods. **Acta Vet.** 70:115-131
- Rantam, F.A. 2003. **Metode Immunologi**. Airlangga University Press.
- Sakonju I., S. Enomoto, S. Kamimura, and K. Hamana. 1993. Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. **J. Vet. Med. Sci.** 55(2):271-274
- Sasser R.G., J. Crock, and C.A. Ruder-Montgomery. 1989. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 37:109-113.
- Szafranska B., G. Panasiewicz, M. Majewska, and J.F. Beckers. 2003. Characterization of pregnancy associated glycoprotein extracted from dairy cattle placentas removed at different gestational periodes. **Reprod. Nutr. Dev.** 43:497-516
- Transom, G. 2001. Early pregnancy factor (EPF)-background and prospects. **Research Report**, Cbio Limited.
- Xie S., R.J. Nagel, 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(1):122-129.
- Xie S., J. Green, B. Bao, J.F. Beckers, K.E. Valdez, L. Hakami, and R.M. Roberts. 1996. Multiple pregnancy-associated glycoprotein are secreted by day 100 ovine placenta tissue. **Biol Reprod.** 57(6):384-1393.