

**Identifikasi Pregnancy Specific Protein B (PSPB)
dari Placenta Foetalis (*Cotyledon*)
Sapi Freishian Holstein**

**Identification of Pregnancy Specific Protein B (PSPB) From
Placenta Foetalis (*Cotyledon*) Freishian Holstein Cows**

Abdul Samik

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya-60115.
Telp +62-031-5992785 Ext. 200, Fax. +62-031-5993015
e-mail : samik_s3@yahoo.co.id

Abstract

This research was aimed to find out a substance that was useful in early pregnancy diagnosis of Freishian Holstein cows. Pregnancy Specific Protein B (PSPB) was isolated, purified and partially characterized from cotyledon Freishian 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 Freishian 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 $0,179 \pm 0,0102$ (before immunization); $1,466 \pm 0,3288$ (3rd week after immunization); $1,936 \pm 0,4754$ (1st week after booster) and $2,256 \pm 0,4842$ (2nd week after booster).

Keywords : cotyledon, PSPB, anti-PSPB antibody

Pendahuluan

Diagnosa 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 *progesterone* dan *estrone sulphate* (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 mendiagnosa dini kebuntingan sapi adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dini dengan menggunakan substansi non spesifik seperti *progesterone* dan *estrone sulphate* dengan menggunakan teknik RIA belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya

mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA.

Penelitian ini bertujuan untuk 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 ELISA Sandwich (antibodi penangkap antigen) yang biayanya lebih murah dibanding pemeriksaan hormonal dengan teknik RIA.

Materi dan Metode Penelitian

Metode Koleksi PSPB *Cotyledon* Sapi Friesian Holstein (FH)

Cotyledon diperoleh dari rumah potong hewan Pegirian Surabaya. Sebanyak 100 gram *cotyledon* 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 *pellet* yang ada di bawah dibuang. Cairan supernatan mengandung protein dan ditambahkan 0,5 M MH_3PO_4 sampai pH mencapai 4,5, kemudian dikocok dengan *stirrer* selama 2 jam. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 27000 g selama 1 jam dan supernatannya mengandung protein. pH supernatan dibuat 7,6 dengan menambahkan 0,5 M KOH.

+ 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 *pellet* yang ada di bawah dibuang. Cairan supernatan mengandung protein dan ditambahkan 0,5 M MH_3PO_4 sampai pH mencapai 4,5, kemudian dikocok dengan stirrer selama 2 jam. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 27000 g selama 1 jam dan supernatannya mengandung protein. pH supernatan dibuat 7,6 dengan menambahkan 0,5 M KOH.

Metode Uji Pengikatan Anti-PSPB dan Proteini-PSPB *Cotyledon* dengan Imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan pada *cotyledon* sapi bunting umur 3 bulan. *Cotyledon* diambil dan dipotong-potong dengan ukuran 1x1x0,2 cm. Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui ikatan anti-PSPB dan protein PSPB pada *cotyledon* yang ditandai dengan adanya gambaran warna merah kecoklatan dalam jaringan. Adapun tahapan metode imunohistokimia 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 bersihkan sisa-sisa gel dengan e buffer. Sampel (serum kambing bunting) sebanyak 15 μl dan dicampur dengan 5 μl laemmli buffer dan dipanaskan 100 $^{\circ}\text{C}$ 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 nitroselulose untuk diuji spesifitasnya dengan *Western Blot* (Aulani'am, 2004).

Pengujian PSPB dengan *Western Blot*

Western blot dilakukan dengan menggunakan fragmen pita PSPB sapi Freishian Holstein yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dan ditransfer pada membran Nitroselulose. 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* (Aulani'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 stirer 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 tanda 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 (Aulani'am, 2004).

Perhitungan : Kadar total protein (g/ml) $\Rightarrow Y = 5.10-5X$
 Keterangan : Y = Nilai absorbansi
 X = Kadar protein (g/ml)

Pembuatan Anti-PSPB

Sebanyak 6 ekor kelinci jantan strain *New Zealand* disuntik secara sub kutan dengan 150 μ g PSPB dalam pelarut Freund's *complete*. Penyuntikan ulang dilakukan pada minggu ketiga dengan 100 μ g 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 ELISA tidak langsung.

Pengujian Anti-PSPB dengan ELISA *Indirect*

Sebanyak 96 sumuran dalam *microplate* di lapisi dengan PSPB sebanyak 100 l, kemudian diinkubasi pada 4 °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 l 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 l dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibody kedua conjugate alkaline fosfatase dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam kemudian dicuci.

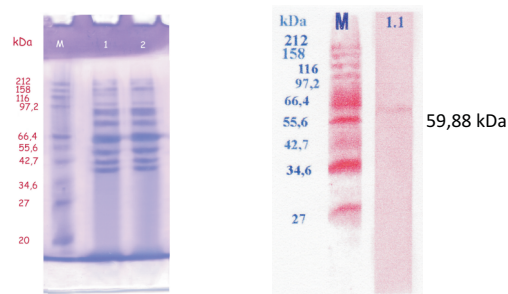
Setelah itu ditambahkan substrat para nitrophenyl phosphate (PNPP) dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA *reader* sistem BIO-RAD dengan panjang gelombang 450 nm (Rantam, 2003).

Hasil dan Pembahasan

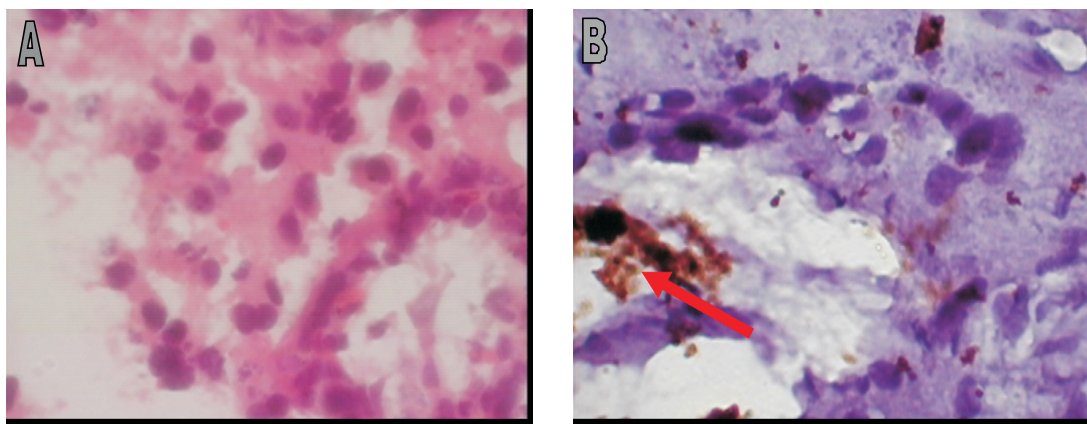
Imunohistokimia Jaringan Cotyledon Sapi FH

Hasil uji imunohistokimia dari cotyledon sapi FH dapat dilihat pada Gambar 1. dibawah ini :

Hasil penelitian imunohistokimia menunjukkan adanya ikatan antigen dan antibodi yang terdapat pada *cotyledon* dari sapi FH. Hal ini berarti bahwa protein PSPB diproduksi oleh sel-sel *cotyledon*. Metode yang digunakan pada uji imunohistokimia ini menggunakan kespesifikan ikatan antara molekul avidin dan biotin SA-HRP yang terdapat pada antibodi sekunder yang membentuk kompleks avidin-biotin melalui molekul avidin.



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



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

Kromogen yang digunakan pada penelitian ini adalah DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride). 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 dengan menggunakan *countersain hematoxilin*. Identifikasi Protein PSPB *Cotyledon* Sapi Friesian Holstein

Hasil identifikasi protein *cotyledon* sapi FH dengan SDS-PAGE dan Western Blot (Szafranska *et al.*, 2003) menunjukkan bahwa berat molekul protein *cotyledon* 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 threonin ((Xie *et al.*, 1996).

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 (Barnea, 2000; Howard, 1998; Transom, 2001). PSPB 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).

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
Supermatan	0,468	0,460	0,464	13920

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

Kelinci	BLD-1	BLD-2	BLD-3	BLD-3	BLD-4
1	0.191	1	1.359	1.359	1.629
2	0.165	1.366	1.855	1.855	2.287
3	0.171	1.347	1.857	1.857	2.320
4	0.178	1.998	2.715	2.715	2.847
5	0.191	1.493	1.619	1.619	1.767
6	0.179	1.591	2.213	2.213	2.687
Rataan	^a 0.179 0.0102	^b 1.466 0.3288	^c 1.936 0.4754	^c 1.936 0.4754	^c 2.256 0.4842

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

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. di bawah ini :

Pembuatan dan Pengujian Anti-PSPB

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

Tabel di dibawah menunjukkan bahwa *Optical density* 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 and Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya 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 system *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) dalam hal ini sel dendrit yang akan mengaktifkan 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 diidentifikasi dari *cotyledon* 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 dan J.S Pober. 2000. *Antibodies and Antigens. Cellular and molecular immunology*. 4 th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. P. 41-62.
- Aulani'am. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Universitas Brawijaya Press.
- Austyn J.M. and K.J. Wood. 1993. *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. 1 st Ed. Oxford University Press. pp. 695
- Barnea, E.R. 2000. *Early Pregnancy: Biology and Medicine*. Early Pregnancy Volume IV. pp. 166-175
- 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. *Molecular Cell Biology*. 2 nd Ed. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York. Pp. 711-716.
- DuPlants, L.J. 2000. *Early Pregnancy Factor*. Lifeissues.net. Kochi, Japan. All Rights Reserved. pp. 1-2
- 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*. 7 th Ed. Lippincutt Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404
- 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. *Reprod. Nutr. Dev.* 43 : 497-516
- Transom, G. 2001. Early Pregnancy Factor (EPF)-Background and Prospects. Research Report, Cbio Limited. pp. 1-9
- 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) : 1384-1393