

LAPORAN PENELITIAN

PENELUSURAN EPITOP SPESIFIK *PREGNANCY
ASSOCIATED SUBSTANCE* (PAS) SEBAGAI BAHAN
BIOAKTIF UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI
PAPER STRIP PADA SAPI PERAH

OLEH

ABDUL SAMIK
MAS'UD HARIADI
AULANI'AM
HERRY AGOES HERMADI
ERMA SAFITRI

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN PADA
MASYARAKAT UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus c, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115, Telp. (031) 5995246, 5995248,
5995247, Fax. (031) 5962066, e-mail : infolemlit@unair.ac.id

5 DESEMBER 2008

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

KFC
KK
LP. 236/10
Pen

LAPORAN PENELITIAN

PENELUSURAN EPITOP SPESIFIK *PREGNANCY*
ASSOCIATED SUBSTANCE (PAS) SEBAGAI BAHAN
BIOAKTIF UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI
PAPER STRIP PADA SAPI PERAH

OLEH

ABDUL SAMIK
MAS'UD HARIADI
AULANI'AM
HERRY AGOES HERMADI
ERMA SAFITRI

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN PADA
MASYARAKAT UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus c, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115, Telp. (031) 5995246, 5995248,
5995247, Fax. (031) 5962066, e-mail : infolemlit@unair.ac.id

5 DESEMBER 2008



LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PENELITIAN PROGRAM INSENTIF
KEMENTERIAN NEGARA RISET DAN TEKNOLOGI

Judul Kegiatan/Riset	:	Fenelusuran Epitop <i>Spesifik Pregnancy Associated Substance (PAS)</i> Sebagai Bahan Bioaktif Untuk Tes Kebuntingan Dini <i>Paper Strip</i> Pada Sapi Perah
Program	:	Insentif Riset Terapan
Bidang	:	Ketahanan Pangan
Pelaku/Peneliti Utama	:	Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
Jenis Kelamin	:	Laki-Laki
Lama Kegiatan/Riset	:	2 tahun (2007-2008)
Tahun Pelaksanaan	:	2008
Biaya	:	Rp. 100.000.000,00



Mengetahui
Ketua LPPM Unair

Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, Drh.
NIP. 131 873 004

Surabaya, 5 Desember 2008
Ketua Peneliti,

Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
NIP. 131 925 904

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan berkah dan rahmatNya sehingga penulisan laporan penelitian ini dapat selesai tepat waktu.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada Kementrian Riset dan Teknologi, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

Kepada para sejawat anggota peneliti kami ucapkan terima kasih atas kerjasamanya dan juga kepada UPT ternak Singosari, Branggahan Kediri dan Tuban yang dengan rela hati memberikan fasilitas ternaknya untuk kelancaran proses penelitian ini.

Kami sadari bahwa penulisan ini masih perlu disempurnakan, oleh karena itu masukan yang sangat berguna demi perbaikan penulisan penelitian ini sangat kami harapkan. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi kita semuanya.

Surabaya, Desember 2008

Peneliti

RINGKASAN

PENELUSURAN EPITOP SPESIFIK *PREGNANCY ASSOCIATED SUBSTANCES* (PAS) SEBAGAI BAHAN BIOAKTIF UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI *PAPER STRIP* PADA SAPI PERAH

Oleh

Abdul Samik*, Mas'ud Hariadi*, Aulani'am**, Herry A.H*, Erma Safitri*

* Bagian Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya

** Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan cenderung menurun. Propinsi Jawa Timur sejak tahun 1999 sampai 2003 terjadi penurunan populasi ternak besar yaitu kuda turun 3,24 %, sapi perah 5,86 %, kerbau 5 % sedangkan sapi potong naik 0,02 %.

Demikian juga untuk kebutuhan konsumsi susu nasional masih jauh dari cukup. Kebutuhan konsumsi susu nasional pada tahun 2006 sebesar 896.791 ton/tahun. Sedangkan produksi susu nasional pertahun sebesar 577.626 ton, sehingga masih terdapat kekurangan produksi susu nasional sebesar 319.165 ton/tahun (Direktur Jendral Peternakan, 2005).

Melihat kenyataan atau kondisi peternakan tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga kebutuhan daging dan susu nasional bisa terpenuhi. Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi dan sinkronisasi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan awal yang tepat dan akurat.

Diagnosa kebuntingan dini pada sapi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *Pregnancy Associated Substance* (PAS) dan (b) dengan mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine atau air susu selama kebuntingan seperti *progesterone*, *estrone sulphate* (Hafez, 2000).

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 (Nalbandov, 1990) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA.

Dengan melihat *Pregnancy Associated Substance* (PAS) maka tujuan umum dari penelitian ini adalah pengembangan metode baru tes kebuntingan dini yang didasarkan pada reaksi antigen dan antibodi yang berlabel dengan menggunakan teknik *indirect Sandwich* ELISA (antibodi penangkap antigen).

Tujuan khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah membuktikan protein PAS mampu menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PAS dan mengkaji peran antibodi terhadap PAS sebagai bahan diagnostik kebuntingan dini sapi perah.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair dan UPT Ternak Branggahan Kediri, UPT ternak Singosari Malang, UPT Ternak Tuban dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut : Karakterisasi anti-PAS hasil induksi isolat protein PAS *Cotyledon* sapi perah bunting, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PAS serum darah, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal dan Uji validitas kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PAS serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer anti-PAS terjadi peningkatan dari minggu pertama sampai minggu ke 3 setelah *booster* pertama. Pada minggu ke 4 mulai terjadi penurunan dan mencapai angka terendah pada minggu ke 5. Pada minggu ke 5 dilakukan *booster* ke 2, setelah *booster* ini diikuti peningkatan titer kembali sampai minggu ke 8 dan mulai menurun kembali pada minggu ke 9 dan 10. Pada pemeriksaan kadar PAS serum darah ditemukan sebanyak 27 ekor sapi perah (27 %) di dalam darahnya sudah ada PAS Pada hari ke 14 pasca inseminasi buatan. Sedangkan pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan, sebanyak 65 ekor sapi perah di dalam darahnya sudah ada PAS. Pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 hari pasca inseminasi buatan diperoleh hasil mikrotiter strip masing-masing 0 ekor, 27 ekor, 65 ekor dan 65 ekor. Rataan kadar protein PAS serum darah sapi perah yang diperoleh

pada hari 7, 14, 21 dan 28 pasca inseminasi buatan adalah 0 µg/ml, 113,801 µg/ml, 370,221 µg/ml dan 716,317 µg/ml.

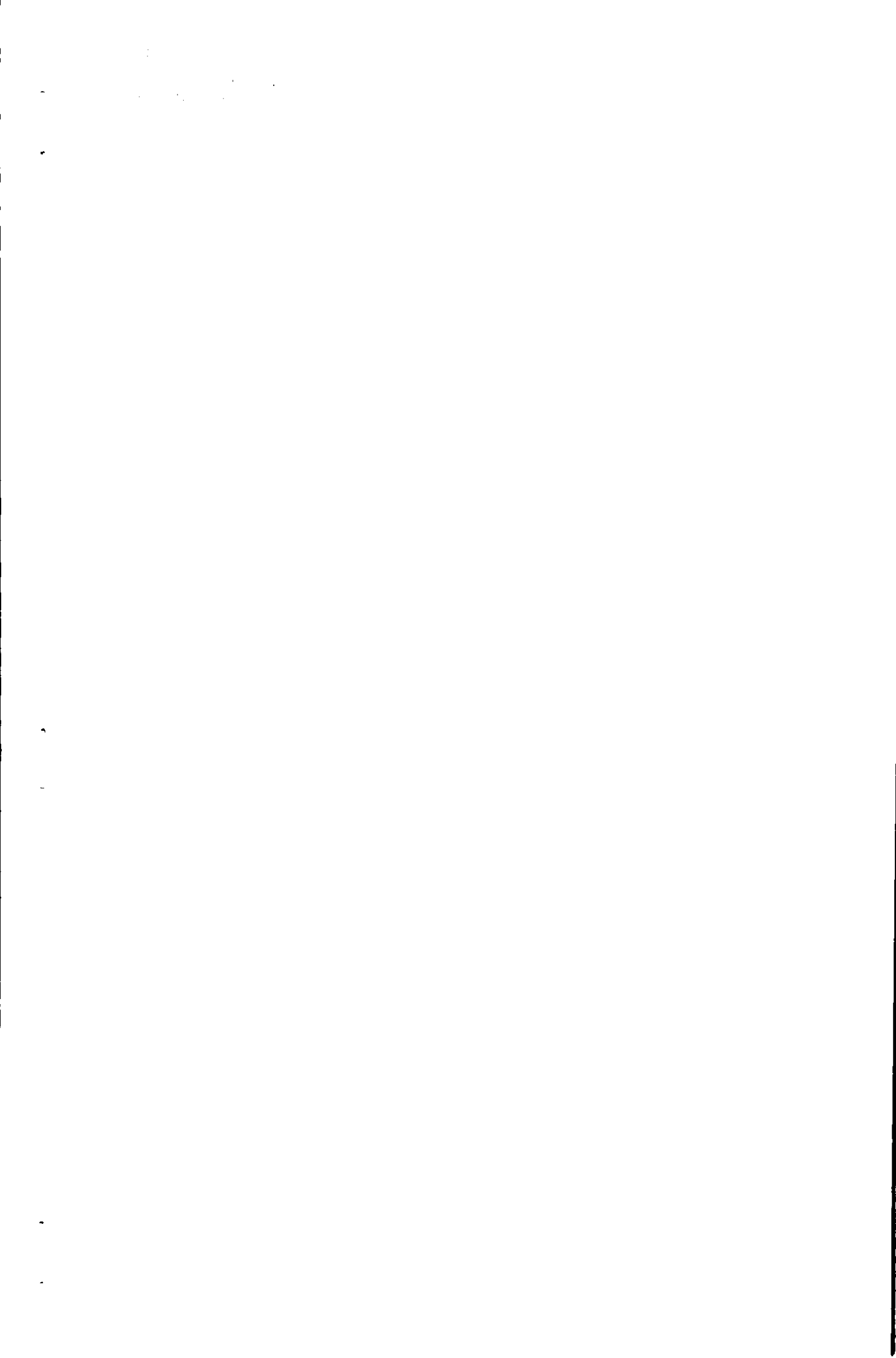
Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu : protein PAS bersifat imunogen yang dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti-PAS dan anti-PAS yang dihasilkan dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan kambing dengan metode PAS mikrotiter strip (*Sandwich*: ELISA).

Berdasarkan kesimpulan umum dapat ditarik subkesimpulan sebagai berikut :

1. kadar glikoprotein, karbohidrat, protein PAS masing-masing sebesar 9,562 mg/ml (supernatan) dan 12,516 mg/ml (endapan), 3,959 mg/ml (supernatan) dan 5,181 mg/ml (endapan), 5,603 mg/ml (supernatan) dan 7,335 mg/ml (endapan).
2. Protein PAS dari *cotyledon* kambing bunting mampu menginduksi terbentuknya anti-PAS.
3. Anti-PAS dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan pada kambing.
4. Diagnosis kebuntingan pada 21 hari pasca iB dengan menggunakan PAS mikrotiter strip memperoleh hasil angka akurasi atau validasi lebih baik dibanding pemeriksaan kadar progesteron serum darah.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Ilmiah	4
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Siklus Reproduksi Sapi	6
2.1.1. Pubertas	6
2.1.2. Siklus Birahi	8
2.1.3. Perkawinan	11
2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur	12
2.1.3.2. Transpor Gamet	13
2.1.3.3. Transpor Spermatozoa	14
2.1.3.4. Transpor Spermatozoa Pada Serviks	16
2.1.3.5. Transpor Spermatozoa Dalam Uterus	17
2.1.3.6. Transpor Spermatozoa Dalam Oviduks	18
2.1.3.7. Kontrol Endokrin Terhadap Transpor Sperma	19



2.1.3.8. Hiperaktivasi Dari Motilitas Spermatozoa.....	19
2.1.4. Kebuntingan	20
2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta	21
2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan.....	24
2.1.4.3. Peranan Hormon Dalam Proses Kebuntingan	27
2.1.5. Diagnosis Kebuntingan.....	28
2.1.5.1. Palpasi Rektal	29
2.1.5.2. Penggunaan USG	29
2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron	30
2.1.5.4. Penggunaan Radiografi	30
2.1.5.5. Penggunaan Antigen Embrio	31
2.1.6. Kelahiran	31
2.1.6.1. Stadium Persiapan.....	32
2.1.6.2. Stadium Pengeluaran Fetus	33
2.1.6.3. Stadium Pengeluaran Plasenta	35
2.1.6.4. Hormon Yang Berperan Dalam Proses Kelahiran	36
2.2. <i>Pregnancy Associated Substances (PAS)</i>	40
BAB III. METODE PENELITIAN	42
3.1. Rancangan Penelitian	42
3.2. Sampel Penelitian	42
3.3. Metode Penelitian	43
3.3.1. Metode Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PAS	43
3.3.1.1. Pengukuran Absorbansi Protein Standar	43
3.3.1.2. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein EPF	44
3.3.2. Karakterisasi Antibodi PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS.....	45
3.3.2.1. Metode Imunisasi Kambing dengan Isolat Protein PAS	45
3.3.2.2. Metode Purifikasi Antibodi PAS dengan <i>Saturated Ammonium Sulphate (SAS)</i>	46
3.3.2.3. Metode Pengukuran <i>Optical Density (OD)</i> Antibodi PAS dengan <i>Indirect ELISA</i>	47

3.3.2.4. Pengukuran Titer Antibodi PAS dengan Menggunakan Kurva Standar Antibodi PAS	47
3.3.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah	48
3.3.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah.....	49
3.3.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal	50
3.4. Bagan Prosedur Penelitian	50
3.4.1. Karakterisasi Antibodi PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS <i>Cotyledon</i> SapiPerah Bunting	50
3.4.2. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah dan Pengukuran Kadar Progesteron Serum Darah	51
3.4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal	52
3.5. Analisis Data	52
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	54
4.1. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PAS	54
4.2. Karakterisasi Antibodi PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS <i>Cotyledon</i> Sapi Perah Bunting	56
4.2.1. Pembuatan Antibodi Poliklonal Terhadap PAS (Antibodi PAS) dan Pengukuran <i>Optical Density</i> (OD) Antibodi PAS.....	56
4.2.2. Pengukuran Titer Antibodi PAS dengan Kurva Standar....	57
4.3. Diagnosis Kebuntingan Kambing dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah	61
4.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah	65

4.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal	68
4.6. Analisis Data	68
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	72
5.1. Kesimpulan	72
5.2. S a r a n	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	77

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Lama Siklus Birahi, Lama Birahi dan Ovulasi	8
Tabel 3.1.	Nilai Protein Standar dan Kandungan Karbohidrat Total Berdasarkan Glikoprotein Karbohidrat <i>Estimation</i> Kit 23260	44
Tabel 3.2.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PAS Standar ...	48
Tabel 3.3.	Uji Validitas Kebuntingan Sapi Perah (Sensitivitas dan Spesifisitas)	53
Tabel 4.1.	Nilai Absorbansi Protein-Protein Standar dan Protein PAS ..	53
Tabel 4.2.	Rataan <i>Optical Density</i> Anti-PAS (pengenceran 10 X) pada Kelinci Setelah Mendapatkan Imunisasi Isolat PAS	57
Tabel 4.3.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PAS Standar ...	58
Tabel 4.4.	Rataan Titer Anti-PAS ($\mu\text{g/ml}$) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS	59
Tabel 4.5.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein PAS Standar	62
Tabel 4.6.	Kadar Progesteron Standar dan Nilai Absorbansinya	65
Tabel 4.7.	Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur PAS Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB	69
Tabel 4.8.	Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB	69
Tabel 4.9.	Hasil Diagnosis Kebuntingan pi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah pada 14 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1.	Bagan Prosedur Karakterisasi Antibodi PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS <i>Cotyledon</i> Sapi Perah Bunting	50
Gambar 3.2.	Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah.....	51
Gambar 3.3.	Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Metode Palpasi Rektal	52
Gambar 4.1.	Grafik Kurva Standar Anti-PAS	58
Gambar 4.2.	Titer Antibodi PAS pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS.....	59
Gambar 4.3.	Grafik Kurva Baku Protein PAS	62
Gambar 4.4.	Grafik Kadar Protein PAS Sapi Perah Pada Hari ke 21 Pasca Inseminasi Buatan	63
Gambar 4.5.	Grafik Kurva Standar Progesteron	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Optical Density</i> (OD) dari Antibodi PAS Serum Darah Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS.....	77
Lampiran 2.	Titer antibodi PAS ($\mu\text{g/ml}$) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS.....	78
Lampiran 3.	Kadar Progesteron Serum Darah Sapi Perah Hari ke 21 Pasca Inseminasi	79
Lampiran 4.	Kadar Protein PAS, Progesteron dan Pemeriksaan Palpasi Rektal Sapi Perah.....	82

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Pembangunan peternakan pada dasarnya adalah untuk menyediakan pangan asal ternak baik kualitas maupun kuantitas yang turut berperan mendorong peningkatan kualitas sumber daya manusia dari segi pemenuhan protein hewani. Kebutuhan protein hewani asal ternak nasional 6 gram/kapita/hari namun pada tahun 2006 baru tercapai 5,34 gram/kapita/hari (Ditjenak, 2006).

Peta populasi ternak nasional diwarnai oleh laju pertumbuhan yang beragam, pertumbuhan ternak selama 20 tahun terakhir (1987-2006) secara umum menunjukkan laju pertumbuhan positif. Namun laju pertumbuhan ternak besar cenderung menurun terutama periode 10 tahun terakhir (1997-2006). Populasi sapi menurun -1,22 % rata-rata per tahun, kerbau menurun -3,17 % rata-rata per tahun. Populasi kambing Indonesia pada tahun 2006 sebesar 13.082.000 ekor dengan laju pertumbuhan populasi kambing pada periode 10 tahun terakhir (1997-2006) terjadi peningkatan 0,45 % rata-rata per tahun dan pada tahun 2006 produksi daging kambing sebesar 53.700 ton. (Ditjenak, 2006).

Upaya menghindari penurunan laju pertumbuhan ternak dan peningkatan produktivitas dengan melakukan perbaikan asas kelestarian sumberdaya ternak nasional (populasi), asas keseimbangan (suplai-pemintaan) dan asas kemandirian (mengurangi impor). Asas kelestarian



sumberdaya ternak akan terkait dengan aspek peningkatan kelahiran, memperpendek jarak antar kelahiran, penurunan kematian, pengendalian pematangan betina dan pejantan unggul (Sudardjad, 2005).

Salah satu upaya untuk memperpendek *calving interval* adalah melakukan diagnosis kebuntingan secara dini setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Secara laboratoris diagnosis kebuntingan dilakukan dengan melihat substansi non spesifik yang ada dalam darah, urin dan air susu induk selama kebuntingan seperti progesteron dan estron sulfat (Hafez, 2000). Namun pemeriksaan ini masih banyak kendala karena mahal biaya dan lamanya waktu diagnosis.

Sampai saat ini masih terus dilakukan pengembangan dan pencarian metode alternatif untuk diagnosis kebuntingan dini ternak yang relatif lebih cepat, akurat, murah dan mudah dilakukan di lapangan. Pengembangan metode diagnosis kebuntingan dini ternak dapat dilakukan dengan melihat substansi spesifik yang terdapat dalam darah induk yaitu *Pregnancy Associated Substances* (PAS) (Hafez, 2000).

Pregnancy Associated Substances merupakan protein spesifik yang berperan penting pada proses implantasi dan kebuntingan dengan memelihara *corpus luteum graviditatum* untuk menghasilkan hormon progesteron (Karen *et al.*, 2001).

Placentoma pada golongan mamalia tersusun atas *placenta maternalis (carunculæ)* dan *placenta foetalis (cotyledon)*. *Pregnancy Associated Substances* diproduksi oleh *placenta foetalis (cotyledon)* setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk bunting sampai partus dan menghilang empat minggu setelah partus (DuPlants, 2000).

Penelitian yang akan dilakukan pada tahap ini adalah pembuatan antibodi terhadap PAS (Anti-PAS) pada hewan kambing, purifikasi anti-PAS dengan metode *Saturation Ammonium Sulphate (SAS)*, penentuan titer anti-PAS dengan *indirect ELISA* dan sinkronisasi birahi pada sapi perah.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul sebagai berikut :

- 1.2.1. Apakah isolat protein PAS cotyledon sapi perah bunting bersifat imunogen sehingga dapat menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PAS ?
- 1.2.2. Apakah antibodi terhadap PAS dapat digunakan sebagai bahan diagnostik untuk uji kebuntingan pada sapi perah ?
- 1.2.3. Apakah ada perbedaan hasil diagnosis kebuntingan sapi perah dengan menggunakan PAS mikrotiter strip dibandingkan dan pemeriksaan kadar progesteron darah ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan bahwa protein PAS mampu menginduksi respon imun humoral yang ditandai terbentuknya anti-PAS dan membuktikan anti-PAS yang dihasilkan mampu mengenali protein PAS dari serum darah sapi perah bunting sebagai dasar pengembangan salah satu tes kebuntingan dini pada sapi perah.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan protein PAS dalam menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PAS.
2. Mengkaji peran antibodi terhadap PAS sebagai bahan diagnostik kebuntingan dini pada sapi perah.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Ilmiah

Penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat di bidang ilmu peternakan dan khususnya ilmu kedokteran hewan, antara lain :

1. Memberikan informasi ilmiah peran PAS sebagai antigen yang bersifat imunogen dan mampu menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya antibodi terhadap PAS.

2. Memberikan informasi ilmiah tentang teknik mikrotiter strip yang didasarkan pada reaksi ikatan anti-PAS dan protein PAS untuk diagnosis kebuntingan sapi perah.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat praktis di bidang peternakan antara lain :

1. Dapat digunakan sebagai diagnosis kebuntingan secara mudah dan cepat oleh peternak sapi perah.
2. Dapat digunakan sebagai model untuk diagnosis kebuntingan dini pada hewan mamalia lain.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Siklus Reproduksi Sapi

Siklus reproduksi ialah rangkaian kejadian biologik kelamin yang berlangsung secara sambung-menyambung hingga terlahir generasi baru dari suatu makhluk hidup. Siklus reproduksi meliputi pubertas, musim kelamin, siklus birahi dan aktivitas seksual post partum. Beberapa faktor yang mempengaruhi siklus reproduksi adalah lingkungan, genetik, fisiologik, hormonal dan psychososial. Tingkat fertilitas suatu individu dimulai pada waktu pubertas dan dipertahankan selama beberapa tahun sebelum kemudian menurun selama proses ketuaan.

2.1.1. Pubertas

Pubertas atau dewasa kelamin ialah periode kehidupan makhluk jantan dan betina dimana proses-proses reproduksi mulai terjadi yang ditandai oleh kemampuan untuk pertama kalinya memproduksi benih. Kejadian pubertas didasari oleh penyesuaian secara bertahap antara peningkatan aktivitas gonadotropik dan kemampuan gonad secara simultan dalam steroidogenesis dan gametogenesis. Pubertas pada sapi dicapai pada umur 8-13 bulan.

Sebelum masa pubertas, terjadi sekresi androgen dari kelenjar adrenal, androstendion, dehidroepiandrosteron dan dehidroepiandrosteron sulfat. Ini tidak berhubungan dengan perubahan dalam sekresi kortisol dan aldosteron dari kelenjar adrenal. Pada saat dimulai pubertas, konsentrasi gonadotropin dalam sirkulasi meningkat baik dalam peningkatan amplitudo maupun frekuensi dari impuls periodik dari gonadotropin.

Pada hewan jantan, sebagai respon dari sekresi gonadotropin, testosteron secara progresif meningkat dari kadar yang rendah menuju ke kadar dewasa. Setiap terjadi pusing LH setiap satu jam kemudian diikuti oleh peningkatan sekresi testosteron. Peningkatan testosteron yang tinggi dalam darah pada akhirnya akan menekan sekresi gonadotropin oleh umpan balik negatif (*negative feedback effect*).

Pada hewan betina, sekresi estrogen secara bertahap akan meningkat sejalan dengan respons dari gonadotropin pubertal yang meningkat sesuai dengan pembentukan folikel antral dimulai. Hal ini terjadi pada sapi dan domba. Di lain pihak, kadar estrogen hanya meningkat pada babi 11 hari setelah lahir, pada waktu folikel antral pertama tampak, sementara sekresi gonadotropin dimulai 3 minggu sebelumnya.

2.1.2. Siklus Birahi

Siklus birahi ialah ritme fungsi faal tertentu dari sistem kelamin, yang terdapat pada hewan ternak setelah masa pubertas dicapai. Pada hewan ternak, perkawinan terbatas hanya pada waktu birahi yang kemudian diikuti dengan terjadinya ovulasi. Pada manusia dan primata, perkawinan tidak terbatas selama siklus menstruasi, sedangkan ovulasi terjadi pada pertengahan siklus.

Panjang siklus birahi pada sapi berkisar 20-21 hari. Secara lengkap panjang siklus birahi, lama birahi dan waktu ovulasi dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. 1. Lama siklus birahi, lama birahi dan ovulasi

HEWAN	SIKLUS BIRAH	LAMA BIRAH	OVULASI
Domba	16-17 hari	24-36 jam	24-30 jam*
Kambing	21 hari	32-36 jam	30-36 jam*
Babi	19-21 hari	48-72 jam	35-45 jam*
Sapi	21-22 hari	18-19 jam	10-11 jam**
Kuda	19-25 hari	4-8 hari	1-2 hari***
Kerbau	19-25 (21 hari)	12-96 (42 jam)	

* Dari dimulainya birahi

** Setelah birahi berakhir

*** Sebelum akhir birahi

Siklus birahi secara kasar dapat dibagi menjadi empat periode menurut perubahan-perubahan yang tampak maupun yang tidak tampak dari luar selama siklus birahi yaitu: proestrus, estrus, metestrus dan

diestrus. Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh FSH. Folikel yang sedang bertumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung hormon estrogen yang lebih banyak. Hormon estrogen inilah yang akan mempengaruhi suplai darah ke saluran alat kelamin dan meningkatkan pertumbuhannya. Vulva agak membengkak dan vestibulum menjadi berwarna kemerahan karena adanya kongesti pembuluh darah. Bagian vagina dan serviks membesar karena pembengkakan sel-sel mukosa dan dimulailah sekresi lendir dari saluran serviks. Proestrus pada sapi berlangsung selama 2 - 3 hari. Pada periode ini biasanya sapi akan menolak bila dinaki pejantan maupun sesama betinanya, tetapi akan berusaha menaiki betina yang lainnya (Jumping heat).

Periode estrus merupakan masa keinginan kawin, periode ini ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik. Sapi akan sering menguak dan biasanya tidak tenang, nafsu makan dan memamah biak menurun. Vulva makin membengkak dan mukosa vulva berwarna merah keunguan, pengeluaran lendir yang terang tembus kurang begitu jelas. Selama periode ini folikel terus berkembang dengan cepat. Gejala fisik yang jelas tampak dari luar dan sudah diketahui oleh peternak adalah 3 A (Abang, Abuh dan Anget). Apabila sapi betina tersebut dilepas dipadangan maka akan mencari pejantan untuk mengawininya dan akan menaiki sesama betina. Sapi yang tepat berada pada periode birahi ini apabila dikumpulkan dengan sesama betina akan memperlihatkan

tingkah diarn bila dinaiki (Standing heat). Gejala ini adalah yang terpenting dari gejala-gejala yang lain. Ekor biasanya diangkat dan lendir transparan menggantung atau melekat pada pangkal ekor. Vulva membengkak, lunak, oedematous dan relaks.

Pada pemeriksaan vaginal, mukosa vagina merah dan oedematous. Lendir birahi tidak begitu banyak yang terdapat di dalam vagina berasal dari sel-sel selaput lendir serviks dibawah pengaruh estrogen. Pada puncak birahi viskositas lendir tersebut paling rendah dan elastistasnya pengalirannya paling tinggi, apabila lendir tersebut dioleskan tipis pada gelas obyek dan dikeringkan, maka NaCl yang terlihat dalam kadar tinggi akan berkristalisasi dan memberikan pola aborisasi yang khas. Os servikalis eksterna berwarna merah jambu, oedematous, agak mengendor dan membuka pada waktu eestrus. Pembuatan preparat ulas vagina selama proestrus dan estrus menunjukkan peningkatan jumlah sel-sel yang berkornifikasi, tetapi variasi perubahan tersebut terlampau besar antara individu kambing sehingga cara ini tidak dapat dipakai sebagai indikasi birahi. Kira-kira 3 jam setelah perkawinan jumlah leukosit meningkat pesat. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya semen di dalam alat reproduksi hewan betina.

Metestrus ditandai dengan berhentinya birahi yang tiba-tiba. Pada periode ini terjadi ovulasi dengan pecahnya folikel dan rongga folikel

secara berangsur-angsur akan mengecil, pengeluaran lendir dari serviks juga telah berhenti.

Periode diestrus merupakan periode akhir dari siklus birahi, dimana ditandai dengan berkembangnya korpus luteum dan menghasilkan hormon progesteron. Oleh pengaruh hormon progesteron inilah endometrium menebal, kelenjar dan urat daging uterus berkembang, sebagai persiapan uterus untuk menampung dan memberi makan embrio serta pembentukan plasenta bila terjadi kebuntingan. Bila ovum tidak terbuahi (tidak terjadi kebuntingan), korpus luteum akan tetap berfungsi selama kurang lebih 19 hari. Selama diestrus vagina terlihat pucat dan kering, mukus sedikit serta agak liat.

2.1.3. Perkawinan

Di samping harus diketahui cara inseminasi yang paling baik, perlu juga diperhatikan waktu inseminasi yang tepat. Oleh karena banyak sekali faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk berhasilnya program inseminasi ini, seperti umur ovum yang pendek, begitu juga dengan daya hidup spermatozoa yang terbatas (Anonymous, 1986). Walaupun umur spermatozoa lebih panjang dari pada umur ovum akan tetapi spermatozoa di dalam saluran alat kelamin betina perlu mengalami perubahan-perubahan terlebih dahulu sebelum spermatozoa itu dapat membuahi ovum (Djanuar, 1985). Balai Inseminasi Lembang (1984) membagi saat inseminasi menjadi lima katagori yaitu; terlalu cepat, baik,

baik sekali, sedang dan terlambat. Selanjutnya disebutkan pula bahwa kemungkinan konsepsi (kebuntingan) bila diinseminasi pada saat-saat ; 1). permulaan birahi adalah 44 %, 2). pertengahan birahi 82 %, 3). akhir birahi 75 %, 4). enam jam sesudah birahi 62.5 %, 5). 12 jam sesudah birahi 32.5 %, 6). 18 jam sesudah birahi 28 %, 7). 24 jam sesudah birahi 12 %, 8). 36 jam sesudah birahi 8 % dan 48 jam sesudah birahi 0 %.

Penelitian yang dilakukan oleh Pusat Inseminasi Buatan dan penelitian tandingannya memiliki hasil yang hampir sama. Hasil tersebut pada umumnya menunjukkan angka konsepsi yang lebih rendah dari pada angka konsepsi tertinggi bila sapi-sapi tersebut dikawinkan pada awal birahi atau lebih dari enam jam sesudah birahi. Hasil tertinggi akan didapatkan bila sapi-sapi tersebut dikawinkan terhitung diantara pertengahan birahi sampai akhir birahi. Menurut anjuran Tramberer (1948) dibuat suatu patokan, bila sapi itu mulai birahi pada waktu sore hari sesudah jam 12.00 siang supaya dikawinkan sebelum jam 12.00 pada hari berikutnya.

2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur

Lapisan massa cumulus oophorus yang mengandung oosit dan sel corona menempel pada stigma sehingga mudah disentuh oleh kinosilia dari fimbriae. Mula-mula ovum ditranspor dengan sendirinya melalui ostium dan kemudian beberapa milimeter dari ampula gerakannya dipengaruhi oleh silia.

Mekanisme fisiologik penangkapan sel telur yang baru diovulasikan oleh oviduk, bergantung pada beberapa faktor: 1. Struktur yang khas fimbriae dari infundibulum dan hubungannya dengan permukaan ovarium pada saat ovulasi; 2. Pola pembebasan cumulus oophorus yang terdapat pada sel telur pada waktu ovulasi; 3. Biofisik yang terkandung dalam cairan folikuler yang mempengaruhi cumulus oophorus dan; koordinasi kontraksi dari fimbriae dan ligamen utero ovarica.

Pada waktu ovulasi, fimbriae penuh dengan darah sehingga mendekatkan pada permukaan ovarium oleh aktivitas otot dari mesotubarium. Fimbriae dan infundibulum terdiri dari struktur erektil yang kaya akan pembuluh darah dan jaringan otot. Selama estrus aliran darah ke fimbriae meningkat, sehingga menyebabkan tepi atau ujung dari fimbriae menjadi oedematus. Aktivitas kontraktil dari fimbriae, oviduk dan ligamen sebagian dikordinasi oleh mekanisme hormonal dimana didalamnya terlibat perbandingan estrogen dan progesteron.

2.1.3.2. Transpor Gamet

Sel Spermatozoa dan sel telur mammalia mengalami beberapa perubahan maturasi sebagai persiapan untuk fertilisasi. Sel spermatozoa dan sel telur mempunyai selang waktu hidup (fertil life) yang relatif pendek (20-48 jam), terjadinya fertilisasi bergantung terutama pada transpor dari gamet di dalam saluran reproduksi betina. Transpor gamet di dalam saluran reproduksi betina merupakan kerja dari kontraksi saluran



tersebut yang diatur oleh sistem saraf pusat, refleks dan aktivitas hormonal. Substansi farmakologik aktif dalam semen merangsang dan mengendalikan kontraksi saluran reproduksi betina. Silia dari oviduk dan sekresinya, serviks, uterotubal junction dan ampulary isthmus junction memegang peranan yang belum jelas.

2.1.3.3. Transpor Spermatozoa

Setiap spesies hewan berbeda tempat deposit semen di dalam saluran reproduksi betina pada waktu kopulasi. Pada sapi dan kambing, karena volume semen yang kecil maka didepositkan di ujung kranial dari vagina dan sebagian di serviks. Pada kuda dan babi yang besar volumenya, didepositkan melalui kanalis servikalis yang relaksasi ke dalam uterus.

Sel spermatozoa dalam transportnya terbilang unik, karena ditranspor melalui beberapa cairan yang berbeda fisiologik dan biokimianya misalnya, cairan testis, cairan epididimis, seminal plasma, cairan vagina, mukus serviks, cairan uterus, cairan oviduk dan cairan peritoneal.

Faktor fisiokemikal dan imunologik dalam vagina dan serviks pada waktu inseminasi memegang peranan penting dalam daya kehidupan spermatozoa dan transpor ke uterus dan oviduk. Sekresi vagina menyebabkan spermatozoa tidak bergerak selama 1-2 jam

setelah inseminasi. Plasma seminal memainkan peranan penting dalam transpor dan fisiologik spermatozoa.

Dikenal tiga tahapan dalam transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina yaitu transpor sperma secara cepat, kolonisasi dan lambat.

Transpor cepat dilakukan segera setelah inseminasi, sel spermatozoa akan menembus jonjot-jonjot lendir serviks yang kemudian secara cepat ditranspor melalui kanalis servikalis. Fase ini berlangsung 2 - 10 menit dan dibantu oleh motilitas spermatozoa, demikian juga peningkatan aktivitas kontraksi dari myometrium dan mesosalpinx selama koitus. Beberapa spermatozoa segera mencapai ostium serviks 1,5-3 menit setelah inseminasi. Jadi beberapa spermatozoa dapat mencapai tempat pembuahan secara cepat. Diketahui bahwa pembuahan terjadi hanya bila sejumlah tertentu spermatozoa sampai pada tempat pembuahan.

Transpor spermatozoa juga dilakukan secara berkeloni. Sejumlah kumpulan spermatozoa terjebak dalam lipatan mukosa yang kompleks dari kriptas serviks. Proses ini didorong oleh kenyataan bahwa jonjot dari lendir serviks merolong spermatozoa langsung ke kriptas serviks dimana reserve tersebut dibentuk. Walaupun beberapa sel leukosit diproduksi pada serviks tetapi masih lebih sedikit daripada yang terdapat pada vagina dan uterus. Pelepasan dari sel spermatozoa yang terjadi secara berkeloni ini penting bagi fertilitas.

Timbunan sel spermatozoa paling banyak terdapat pada oviduk. Spermatozoa meninggalkan serviks melalui transpor aktif (motilitas) dan transpor pasif melalui kontraksi serviks dan uterus.

Pada spesies hewan dimana semen diejakulasikan pada komua uteri, timbunan spermatozoa terjadi di utero tubal junction, seperti misalnya pada babi, atau pada kelenjar uterus seperti pada anjing. Pada beberapa spesies hewan transportasi spermatozoa dipengaruhi oleh prostaglandin yang terdapat dalam semen.

Transpor spermatozoa secara pelan terjadi setelah timbunan spermatozoa pada reservoir telah cukup. transpor ini berjalan secara pelan bergantung pada motilitas spermatozoa dan aktivitas kontraksi myometrium dan mesosalphinx.

2.1.3.4. Transpor Spermatozoa pada Serviks

Mukosa serviks penuh dengan alur-alur dan celah-celah kript) yang mempunyai beberapa fungsi: a) Menerima spermatozoa yang menembus untuk fertilisasi dan menghambat migrasi pada suatu fase dari siklus. b) Merupakan tempat reservoir spermatozoa. c) Melindungi spermatozoa dari lingkungan vagina yang tidak cocok dan dari fagositosis leukosit. d) Memberikan energi yang diperlukan spermatozoa. e) Sebagai saringan spermatozoa yang cacat atau tidak motil. f) Kemungkinan berperan dalam kapasitas spermatozoa.

Lendir serviks yang berkumpul pada vagina, mengandung cairan yang berasal dari endometrium, oviduk, folikel dan peritoneal. Selain itu juga mengandung lekosit, reruntuhan sel-sel dari uterus dan serviks serta epitel vagina. Lendir serviks pada saat ovulasi, terbentuk dari makromolekul yang merupakan ikatan dari unit yang terdiri dari 100 - 1000 mikromolekul. Mikromolekul tersebut berangka oligosakarida dan ikatan asam sialat. Molekul organik dengan berat rendah termasuk gula (glukose, maltose dan mannose) serta asam amino. Lendir serviks juga mengandung protein, mikro elemen dan enzim. Keseimbangan fisiologik dari steroid yang berasal dari ovarium penting dalam inisiasi dan mempertahankan populasi spermatozoa dalam serviks setelah inseminasi, terutama setelah sinkronisasi birahi. Ketidak-seimbangan hormon progesteron dan estrogen dapat mempengaruhi transport spermatozoa dengan melalui cara mempengaruhi kuantitas dan kualitas terciri dari sekresi lendir serviks atau motilitas dari saluran reproduksi.

2.1.3.5. Transpor Sperma dalam Uterus

Aktivitas kontraksi dari vagina dan myometrium memegang peranan utama dalam transpor spermatozoa melalui uterus. Sejumlah besar spermatozoa menyerbu kedalam kelenjar uterus. Hal ini merangsang endometrium mengeluarkan lekosit yang akan memfagosit sejumlah spermatozoa hidup maupun yang mati.

2.1.3.6. Transpor Sperma dalam Oviduk

Oviduk mempunyai fungsi yang unik dalam transpor spermatozoa dan sel telur, dimana kedua fungsi transpor yang berlawanan tersebut dapat dijalankan secara simultan. Pola dan kecepatan transpor spermatozoa di dalam oviduk dikontrol oleh beberapa mekanisme seperti peristaltik dan antiperistaltik dari otot oviduk, kontraksi yang kompleks dari lipatan mukosa oviduk dan mesosalphinx, cairan yang ada dan aliran balik yang ditimbulkan oleh aliran silia. Pada oviduk burung dara, dan kura-kura, terdapat dua sistem kinosilia yang satu mengarah pada ovarium dan yang lainnya mengarah pada kloaka.

Pola transpor spermatozoa melalui oviduk diselenggarakan oleh peristaltik dan antiperistaltik otot dan kontraksi dari lipatan mukosa serta mesosalphinx. Frekuensi dan amplitudo kontraksi dari otot oviduk sirkular dan longitudinal mesosalphinx dan mesotubarium dikontrol oleh hormon-hormon dari ovarium, adrenergik dan nonadrenergik, serta beberapa komponen plasma seminal seperti prostaglandin. Pola dan amplitudo kontraksi bervariasi pada tempat (segmen) yang berbeda dari oviduk. Pada Isthmus, kontraksi peristaltik dan antiperistaltik bersifat segmental dan hampir menerus (bersinambungan), sedangkan pada ampulla gelombang kontraksi peristaltik berlangsung segmental dan lebih lemah. Spermatozoa ditranspor ke ampulla dengan cara perubahan relaksasi dari ampullary-Isthmus junction atau oleh gerakannya sendiri, sampai sekarang belum diketahui.

2.1.3.7. Kontrol Endokrin terhadap Transpor Spermatozoa

Hormon-hormon yang berasal dari ovarium diketahui mempengaruhi transpor spermatozoa pada saluran reproduksi betina. Hormon yang berasal dari ovarium mempengaruhi a) struktur dan ultrastruktur serta aktivitas sekresi dari epitel serviks, uterus dan oviduk. b) aktivitas kontraksi dari otot uterotusbal. c) Kualitas dan kuantitas karakteristik dari sekresi lendir servik dan sekresi uterus serta oviduk. Perubahan-perubahan juga terjadi pada kandungan protein, aktivitas enzim, komposisi elektrolit, tegangan permukaan dan konduktivitas dari cairan tersebut. Peningkatan dari sejumlah estrogen endogen selama fase preovulasi atau pemberian sintetik estrogen akan menyebabkan perubahan pada lendir servik dimana akan lebih encer. Transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina juga dikontrol oleh hormon oksitosin dan sistem syaraf simpatik serta para simpatik. Epinephrin, acetylcholin, histamin dan beberapa vaso konstriktor berpengaruh dalam kontraksi uterus, tetapi pengaruhnya ringan.

2.1.3.8. Hiperaktivasi dari Motilitas Spermatozoa

Kecepatan spermatozoa dan pola motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh tempat /segmen dari saluran reproduksi betina dimana spermatozoa tersebut ditranspor. Percepatan spermatozoa terjadi terutama pada oviduk mendekati waktu ovulasi dan mungkin berkaitan

dengan kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom. Secara normal spermatozoa ditahan pada isthmus dari oviduk. Karakteristik fisik dari isthmus adalah sempitnya lumen, viskositas lendir isthmus, temperatur lokal yang lebih rendah, gerak dari silia prouterin dan kontraksi otot oviduk. Interaksi fisiologik antara spermatozoa dan lingkungan isthmus termasuk mempengaruhi motilitas spermatozoa. Keaktifan berenang spermatozoa juga dapat dipengaruhi dengan mengencerkan media yang terdapat pada isthmus dengan cara memberikan media buatan atau cairan ampula. Bila pyruvat terdapat dalam media tersebut, hiperaktivitas flagela dirangsang, tidak demikian bila hanya glukosa saja yang terdapat pada media tersebut. Ion K^+ dan pyruvat mempunyai kebalikan terhadap motilitas spermatozoa. Bila konsentrasi ion K^+ ditingkatkan, maka akan menghambat sedangkan bila piruvat meningkat, maka akan merangsang motilitasnya. Hal ini penting bagi penyiapan media untuk fertilisasi invitro.

Keasaman (pH) cairan pada saluran reproduksi betina berbeda-beda. pH dari vagina umumnya adalah asam yaitu sekitar 4.0; lendir serviks 8.4; uterus 7.8; cairan ovikuk 7.1-7.3 pada fase folikuler dan 7.5-7.8 pada fase luteal.

2.1.4. Kebuntingan

Periode kebuntingan dimulai dengan pembuahan dan berakhir dengan dilahirkannya anak yang hidup. Pertumbuhan dan perkembangan

individu baru selama kebuntingan merupakan hasil perbanyakan, pertumbuhan, perubahan susunan serta fungsi sel. Peristiwa tadi mempengaruhi perubahan-perubahan tertentu, beberapa diantaranya merupakan ciri dari tahap perkembangannya.

Perkembangan anak dalam kandungan berlangsung terus menerus, namun kebuntingan dinyatakan terdiri dari tiga tahap yaitu : periode ovum, periode embrio dan periode fetus.

Periode ovum adalah periode yang dimulai dari fertilisasi sampai implantasi, periode embrio dimulai dari implantasi sampai saat dimulainya pembentukan alat-alat tubuh bagian dalam. Kemudian disambung dengan periode fetus yaitu periode yang dimulai dari terbentuknya alat-alat bagian dalam, bagian ekstrimitas sampai dilahirkan (Menurut Robert, 1956). Sedangkan menurut Hafez (1974) mengatakan bahwa periode ovum dimulai dari ovum diovolasikan sampai terjadi fertilisasi, Periode embrio dimulai sejak terjadi fertilisasi, impiantasi sampai terbentuknya alat-tubuh bagian dalam dan selanjutnya disebut periode fetus.

2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta

Setelah terjadi implantasi embrio pada bagian endometrium uterus, selanjutnya terjadi pertautan trophoblast kedalam endometrium. Nutrisi awal untuk embrio adalah berasal dari uterine milk (histotroph/ susu uterus). Seiring dengan perkembangan embrio maka terbentuk jalinan tenunan tubuh embrio dengan induknya yang berfungsi untuk penyaluran

nutrisi dari induk ke fetus dan membuang zat-zat yang dikeluarkan oleh anak menuju induk . Jalinan ini disebut plasenta. Plasenta terbagi menjadi tiga bagian yaitu bagian dalam yang menyelubungi fetus disebut amnion, bagian yang terdapat diantara chorion dan amnion adalah alantois. Selaput yang menyelubungi fetus di bagian terluar disebut chorion.

Chorion adalah bagian lapis paling luar dari trophoblast. Terbentuknya jaringan plasenta karena penjalaran trophoblast amat tergantung dari spesies hewan. Pada sapi, kambing dan domba lapis sel paling luar dari trophoblast yang bersentuhan dengan epitel karunkula segera melarutkan sel-sel epitel vili trophoblast, sedang pada permukaan endometrium yang tidak didapati karunkula tidak terjadi pembentukan plasenta. Plasenta yang terbentuk pada *sapi, kambing dan domba* disebut Cotyledonaria. Pada *babi dan kuda*, endometriunya tidak mempunyai karunkula, maka plasenta yang terbentuk dari hubungan superficial dari epitel endometrium dengan epitel chorion. Bentuk plasenta ini disebut Difusa. Dua tipe lain dari plasenta adalah Zonaria terdapat pada *anjing* dan Diskoidalis terdapat pada *kera, manusia, tikus, marmot, kelinci*.

Berdasarkan struktur histologisnya, tipe plasenta dapat dibedakan antar spesies berdasarkan jumlah lapisan tenunan sel yang memisahkan aliran darah induk dan aliran darah anak. Epitheliochoriale adalah plasenta difusa dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh dua lapis epitel, dua lapis endotel dan dua lapis tenunan pengikat dari induk dan dari anak. Syndesmochoriale pada plasenta cotyledonaria, yang mempunyai satu

lapis tenunan epitel lebih tipis dari epiteliochoriale. Endotheliochoriale pada plasenta zonaria dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel dari anak yaitu endotel, tenunan pengikat dan tenunan epitel trophoblast, sedang dari induk hanya satu tenunan sel endotel saja. Hemochoriale adalah plasenta diskoidale dimana darah anak dan induk dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel yang semuanya berasal dari trophoblast. Hemoendotelial pada plasenta diskoidale (kelinci) yaitu darah induk dan anak hanya dipisahkan oleh satu lapis tenunan sel endotel dari pembuluh darah anak.

Lama kebuntingan dihitung sejak fertilisasi sampai lahir, oleh karena fertilisasi tidak dapat diketahui dengan tepat, biasanya kebuntingan dimulai sejak perkawinan yang terakhir sampai terjadi keahiran. Periode kebuntingan dihitung mulai saat fertilisasi sampai kelahiran. Berdasarkan hal ini maka perhitungan yang dipakai peternak tidak tepat bisa lebih panjang beberapa jam samapi beberapa hari. Terjadinya fertilisasi pada setiap spesies tidak sama, misalnya pada sapi terjadi 11 sampai 15 jam setelah inseminasi. Lama kebuntingan dipengaruhi oleh faktor-faktor maternal, genetik, fetus dan lingkungan.

Pembesaran volume uterus pada permulaan kebuntingan sebagian besar disebabkan oleh penambahan cairan amnion dan alantois. Pada pertengahan kebuntingan penambahan volume cairan sama dengan volume fetus. Sedang pada kebuntingan akhir, volume uterus sebagian besar dipenuhi oleh fetus.



2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan

Vulva dan Vagina

Setelah fertilisasi, vulva dan vagina belum mengalami perubahan, pada saat umur kebuntingan 6 – 7 bulan terlihat edema vulva terutama pada sapi dara dan pada sapi yang telah beranak edema vulva baru terlihat pada umur kebuntingan 8,5 – 9 bulan. Perubahan vagina terlihat adanya penambahan vaskularisasi mukosa vagina.

Servik

Perubahan pada servik terjadi setelah fertilisasi yaitu kriptakriptik servik menghasilkan lendir kental, semakin tua umur kebuntingan semakin kental lendir yang dihasilkan. Perubahan lain adalah terjadi kontraksi tonus dari muskulatur servik menjelang kelahiran. Pada sapi, 2 – 5 hari sebelum partus otot servik merileks dan servik mulai terbuka.

Uterus

Perubahan yang terjadi pada uterus setelah fertilisasi adalah peningkatan vaskularisasi pada endometrium, kelenjar-kelenjarnya tumbuh lebih panjang dan berkelok serta akan menghasilkan susu uterus (*histotroph*), muskulatur uterus lebih tenang karena pengaruh progesteron. Setelah implantasi penyaluran nutrisi dari induk ke anak serta zat buangan

dari anak ke induk lebih lancar karena adanya hubungan yang lebih erat dari tropoblas dengan pembuluh darah pada endometrium. Karena perluasan tropoblas, maka uterus juga mengalami pertumbuhan muskulatur dan jaringan kolagen.

Pada sapi, kuda dan kerbau, pada umur kebuntingan 90 hari kornua bunting mulai turun. Kebuntingan 4 bulan apex kornua yang mengandung fetus telah sampai ke dasar rongga abdomen. Kebuntingan 5 bulan, dasar rongga abdomen seluruhnya dipenuhi uterus yang bunting. Dengan bertambahnya umur kebuntingan maka jarak dinding uterus dengan rektum menjadi bertambah dekat dan pada kebuntingan 9 bulan dinding uterus dan rektum saling bersentuhan.

Setelah pertukaran nutrisi melalui pembuluh darah berlangsung baik, pertumbuhan embrio menjadi lebih cepat. Tidak ada spesies yang mempunyai struktur pembuluh darah dalam plasentanya yang bersifat langsung dari anak ke induk, selalu ada lapisan tenunan yang menyekat aliran darah anak dan aliran darah induk, fungsi penyekat ini untuk menyeleksi zat-zat yang mengalir dari induk ke anak. Untuk melindungi sekat dari kerusakan karena terjadinya kenaikan tekanan darah induk atau anak, maka dalam plasenta terdapat sistem *shunt* yaitu hubungan tembus dari kapiler ke kapiler.

Ovarium

Setelah ovulasi terbentuklah kawah bekas folikel yang pecah disebut *korpus haemorrhagicum* atau *korpus rubrum*. Selanjutnya terjadi proses luteinisasi dari sel granulosa dan sel teka membentuk sel-sel baru disebut sel lutein, sel lutein berproliferasi dan akhirnya memenuhi seluruh kawah dan membentuk jendolan diatas permukaan ovarium disebut *korpus luteum*.

Pada sapi dan domba, korpus luteum tumbuh pada hari ke-5 – 6 setelah ovulasi. Bila tidak ada kebuntingan, korpus luteum akan diregresikan oleh prostaglandin F2 alfa yang dihasilkan oleh endometrium uterus. Selanjutnya korpus luteum yang tidak berfungsi akan berdegenasi dan berubah menjadi jaringan ikat berwarna putih mengkilap disebut *korpus albican*. Bila terjadi kebuntingan maka korpus luteum tetap berfungsi dan disebut korpus luteum graviditatum dan akan berfungsi terus hingga akhir kebuntingan, terjadi pada sapi, domba, kambing, babi dan kerbau.

Pada kuda, korpus luteum awal hanya berfungsi sampai bulan ke-5. Pada hari ke-40 ovarium kuda membentuk 10 – 15 folikel yang beberapa diantaranya ovulasi. Kuda tidak mengalami birahi karena CL yang pertama masih berfungsi menghasilkan progesteron. Dari folikel ini muncul CL baru yang jumlah cukup banyak satu ovarium bisa mengandung 3 – 5 CL baru. Korpus luteum baru ini disebut CL asesoris. Pada bulan ke-5, CL lama maupun CL asesoris akan regresidan pada bulan ke-7 CL tinggal sisa-

sisanya, progesteron untuk merawat kebuntingan seluruhnya dihasilkan oleh plasenta. Pada akhir masa kebuntingan aktivitas ovarium dalam membentuk folikel meningkat sehingga kadar estrogen yang dihasilkannya juga meningkat, hal ini menyebabkan kuda yang hendak melahirkan menjadi birahi, tetapi secara klinis tidak terlalu jejas karena diimbangi dengan adanya progesteron dalam peredaran darah.

2.1.4.3. Peranan Hormon dalam Proses Kebuntingan

Kelenjar endokrin yang terlibat dalam fase kebuntingan adalah korpus luteum, folikel, plasenta, hipotalamus, dan hipofisa. Kelenjar endokrin pendukung adalah tyroid dan adrenal. Hipotalamus dan hipofisa merupakan kelenjar pengatur sedang yang memegang peranan utama adalah korpus luteum, penghasil progesterone, plasenta, penghasil progesterone dan estrogen dan folikel sebagai penghasil estrogen (hanya jejas pada kuda, pada spesies lain yang bunting tidak ada folikel tumbuh).

Korpus luteum memegang peranan penting untuk pertumbuhan makhluk hidup, mulai implantasi sampai pertengahan kebuntingan. Hampir semua ternak bunting, plasentanya memproduksi estrogen. Hal ini dapat dianalisa dari urin. Kuda, urinenya mengandung estron, estradiol 17 alfa dan beta. , kambing dan domba, didapatkan estradiol 17 alfa, babi, estron dan pada sapi, estron dan estradiol 17 alfa.

Pada kuda, plasentanya menghasilkan steroid dan gonadotropin (PMSG). PMSG berperan menghasilkan folikel , setelah ovulasi akan membentuk

korpus luteum asesoris yang akan menghasilkan progesterone untuk memelihara kebuntingan. Pada semua ternak, kebuntingan tua, KL akan regresi, kadar progesterone akan menurun terutama menjelang kelahiran sedang kadar estrogen akan meningkat sesuai dengan penambahan plasenta. Pola kenaikan kadar estrogen dan berat plasenta terjadi pada semua ternak tetapi tidak berlaku bagi progesteron. Pada wanita, progesterone tetap tinggi sampai kelahiran, sedang pada ternak menurun menjelang kelahiran.

2.1.5. Diagnosis Kebuntingan

Tanda umum terjadinya kebuntingan pada ternak adalah tidak kembalinya birahi setelah dikawinkan (*Non return*) tetapi hal ini ada kemungkinan tidak bunting tetapi adanya korpus luteum persisten atau gangguan hormonal lainnya.

arena keinginan manusia untuk mengetahui kebuntingan hewannya secara dini setelah dikawinkan maka ada beberapa teknik untuk mengetahui kebuntingan pada ternak.

1. Palpasi Rektal
2. Penggunaan Ultrasonographi (USG)
3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron
4. Penggunaan Radiografi
5. Pemeriksaan Antigen Embrio

2.1.5.1. Palpasi Rektal

Pemeriksaan kebuntingan yang paling umum dilakukan adalah palpasi ovarium dan uterus dengan tangan yang dimasukkan lewat rektum. Tujuan palpasi rektal adalah mendeteksi adanya pembesaran uterus yang bunting, memeriksa adanya fetus, arteri uterina media serta kotiledon yang membesar. Palpasi ovarium ditujukan untuk mengetahui adanya CL.

Pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal dapat dilakukan pada umur kebuntingan 35 hari tetapi diagnosis semakin akurat setelah 45 – 60 hari kebuntingan. Palpasi rektal ini dapat dilakukan pada sapi, kerbau dan kuda, sedang pada domba dan kambing untuk diagnosis kebuntingan dapat dengan cara palpasi abdominal.

2.1.5.2. Penggunaan USG

Fraser *et al.*(1968) telah menggunakan alat periksa (ultrasonik) yang ditempelkan pada abdomen untuk mendeteksi fetus mulai kebuntingan 9 minggu. Prinsip Ultrasound adalah suara ultra dengan frekuensi sangat tinggi dan panjang gelombang sangat pendek yang dipantulkan dari benda yang bergerak ke sumber transmisi dengan frekuensi yang sedikit berubah. Ini memungkinkan untuk mendeteksi aspek pulsus fetus (jantung atau tali pusar), arteri uterus. Sinyal ultrasonik yang dipantulkan dari benda yang bergerak itu biasanya diperkeras dan dianalisis dengan pendengaran, dapat diubah menjadi gambaran visual

pada layar monitor. Angka keberhasilan alat ini dalam mendiagnosa kebuntingan sampai 93%.

2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron

Pemeriksaan dengan mengetahui konsentrasi hormon progesteron bisa menggunakan sampel dari air susu atau plasma darah. Konsentrasi progesteron dalam air susu biasanya sejajar dengan yang ada dalam darah. Pemeriksaan dengan sampel air susu hanya cocok untuk sapi perah sedang untuk sapi dara dan pocong kurang sesuai. Pemeriksaan progesteron dalam air susu dapat dilakukan pada hari ke-21 – 24 setelah inseminasi. Uji negatif ternyata 85 – 100% tepat pada hari ke 24 sedang uji positif hanya 80%.

Pengukuran konsentrasi progesteron dalam plasma darah perifer dilakukan dalam upaya mendeteksi perbedaan dalam fungsi ovarium antara ternak bunting dan tidak bunting. Pemeriksaan dapat dilakukan pada hari ke 17 – 18 kebuntingan dengan angka keberhasilan 85%. Pemeriksaan konsentrasi progesteron baik dari air susu maupun plasma darah dapat dilakukan dengan teknik *Radioimmuno Assay (RIA)*.

2.1.5.4. Penggunaan Radiografi

Radiografi fetus didasarkan atas deteksi prose penulangan dengan memakai sinar X setelah hari ke-50 masa perkembangan fetus, angka keberhasilannya 90 – 95% pada tiga bulan setelah kawin. Tidak ada

pengaruh yang merusak dari teknik ini pada induk atau anak domba, dapat digunakan untuk mendeteksi anak kembar dua atau tiga tetapi alat ini jarang digunakan karena mahal.

2.1.5.5. Pemeriksaan Antigen Embrio

Pendekatan lain yang dapat memenuhi syarat pendugaan untuk tes kebuntingan pada sapi adalah dengan mendeteksi adanya antigen khusus yang dihasilkan oleh embrio. Antigen khusus ini mungkin dihasilkan oleh lapisan sel tropoblast dan dapat dideteksi keberadaannya dalam darah induk.

2.1.6. Kelahiran

Yang dimaksud kelahiran adalah proses fisiologik dimana uterus yang bunting mengeluarkan anak dan plasenta melalui saluran kelahiran. Proses kelahiran anak ditunjang oleh perejanan kuat dari urat daging uterus, perut dan diafragma. Sebelum kelahiran didahului dengan beberapa tanda-tanda akan datangnya kelahiran.

Pada sapi, terjadi relaksasi bagian servik terutama ligamentum sacrospinousum dan tuberosum, yang akan menyebabkan urat daging diatas pelvis mengendor, Jika diraba urat daging di kanan dan kiri pangkal ekor terasa kendur dan lunak. Relaksasi urat daging pangkal ekor sekali-sekali disertai dengan kenaikan pangkal ekor, vulva menjadi lebih bengkak, kelenjar ambing membengkak edematous, kolostrum sudah

diproduksi yakni cairan dari kelenjar ambing yang kental berwarna kekuningan. Selain tanda-tanda diatas, terjadi perubahan pada lendir servik dan pembukaan servik. Pada kebuntingan tua, lendir servik bersifat serous. Pada 3 – 4 hari menjelang partus, lendir servik menjadi lebih banyak volumenya dan bersifat cair. Pembukaan servik dapat diikuti dengan memasukkan jari ke dalam lumen servik.

Proses kelahiran dapat dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap permulaan atau tahap persiapan dan tahap pengeluaran fetus dan tahap pengeluaran plasenta. Tahap perejanan terbagi lagi menjadi 3 yaitu persiapan perejanan, perejanan kuat untuk mengeluarkan fetus dan perejanan untuk mengeluarkan plasenta. Pada kelahiran normal, tahap permulaan berlangsung lebih lama dari tahap perejanan. Tahap permulaan dapat berlangsung beberapa jam atau hari sedang tahap perejanan dapat berlangsung dalam hitungan menit.

2.1.6.1. Stadium Persiapan

Stadium ini ditandai dengan intensitas kontraksi dari myometrium. Mula-mula kontraksi terjadi pada setiap 15 menit sekali dengan lama kontraksi hanya 15 sampai 30 detik. Kontraksi dimulai dari apex kornua menuju servik, akibatnya cairan dan membran allantois dan amnion menyusup ke lumen servik. Servik yang telah mereleks sedikit demi sedikit terbuka. Kontraksi semakin lama semakin kuat dan jaraknya semakin pendek. Kontraksi menjadi setiap 3 menit sekali dan lamanya 20 – 40 detik.

Pada sapi, stadium persiapan lamanya berkisar 2 – 6 jam tetapi bisa sampai 24 jam. Akhir dari stadium persiapan servik terbuka luas sehingga servik, vagina dan vulva menjadi satu saluran yang tidak jelas batas-batasnya. Membran allantois menyembul keluar vulva dan dapat pecah sehingga cairan allantois akan mengalir keluar. Sementara kantong amnion yang berisi fetus telah masuk ke dalam pelvis dan menyembul sedikit dari celah vulva. Jika kontraksi uterus terus berjalan, kepala dan kaki depan fetus akan masuk ke dalam ruang pelvis maka terjadilah rangsangan ke pusat dan sumsum tulang punggung yang diteruskan berupa refleksi ke urat daging perut dan diafragma. Bila urat daging perut dan diafragma terlibat dan berkontraksi bersama-sama myometrium maka stadium persiapan selesai dilanjutkan dengan stadium pengeluaran fetus.

2.1.6.2. Stadium Pengeluaran Fetus

Stadium kedua ini bila tidak terjadi hambatan akan berlangsung sangat singkat. Stadium persiapan berakhir dengan tersembulnya kantong allantois keluar dari vulva. Kantong ini dapat tetap intak atau dapat pula sobek sehingga cairannya mengalir keluar. Tetapi jika kontraksi uterus terus berlangsung, kantong amnion akan masuk ke ruang pelvis beserta fetusnya dan akan mendesak kantong allantois lebih keluar dan pecah. Selanjutnya kantong amnion menyembul keluar.

Kantong amnion berwarna abu-abu mengkilat, lebih tebal dan lebih kuat, tidak mudah pecah. Besarnya kantong amnion pada sapi bisa sebesar tinju sampai sebesar kelapa dan berayun-ayun beberapa lama sampai perejanan kuat terjadi.

Jika fetus telah masuk ke ruang pelvis maka fetus merupakan benda padat yang menimbulkan keregangan pada ruang pelvis maupun jalan keahiran (servik, vagina, vulva). Rangsangan yang diterima oleh gerbang pelvis ini akan diteruskan ke susunan saraf pusat selanjutnya timbul refleks merejan yang kuat yang dilakukan secara bersamaan oleh myometrium, urat daging perut dan diafragma. Dengan perejanan yang semakin kerap dan kuat ini, fetus dalam jalan kelahiran didorong kuat untuk keluar. Mula-mula kantong amnion pecah cairan mengalir keluar yang mempermudah fetus meluncur keluar dari jalan kelahiran.

Kuda, sapi, domba dan kambing mempunyai tahap dan stadium pengeluaran fetus hampir sama. Yang berbeda adalah pada babi, anjing dan kucing. Pada babi sebelum melahirkan akan berputar-putar dalam kandang mencari tempat yang aman, kemudian berbaring. Jika perejanan perut terlihat maka kantong allantois mulai tersembul keluar dari vulva dan pecah disusul penyembulan kantong amnion berwarna putih keabu-abuan, mengkilat dan bertahan lama di vulva dengan perejanan kuat fetus keluar setelah kantong amnion pecah.

2.1.6.3. Stadium pengeluaran plasenta

Beberapa saat sebelum proses keahiran fetus dimulai, yaitu pada tahap permulaan vili-vili plasenta di beberapa tempat telah mengalami degenerasi. Proses degenerasi berjalan terus sambil uterus berkontraksi selama tahap permulaan. Setelah fetus lahir dan tali pusar putus, volume darah dalam vili-vili turun dengan cepat, dan selanjutnya vili-vili menjadi kempes dan mengkeret. Setelah fetus lahir uterus tetap berkontraksi tetapi tak sehebat saat pengeluaran fetus. Kontraksi uterus yang tak terlalu keras ini masih cukup kuat untuk melepaskan plasenta fetalis dari endometrium, disamping itu volume uterus berangsur-angsur menjadi kecil. Pengurangan volume dan kontraksi uterus ini menyebabkan kripta-kripta endometrium tempat pertautan vili plasenta menjadi dangkal sehingga mudah terlepas dan membawa plasenta lebih mendekati servik.

Hormon yang memegang peranan dalam pengeluaran plasenta adalah estrogen dan oksitosin. Keduanya memacu uterus untuk berkontraksi. Oksitosin juga berperan membantu turunnya susu dari alveoli ke dalam saluran susu maka aktivitas anak yang menyusu juga membawa efek disekresikannya oksitosin yang membantu pengeluaran plasenta..

Pengeluaran plasenta pada kuda, sapi, kerbau, kambing dan domba karena *pengaruh mekanik* dan *pengaruh hormonal*. Pengaruh mekanik ialah pertama, karena beratnya bagian-bagian plasenta yang menggantung di luar vulva dan kedua, tarikan hewan ketika induk hewan

menjilat bahkan menggigit dan menarik serta memakan plasenta tsb. Faktor hormonal ialah pengaruh estrogen dan oksitosin dalam memacu uterus untuk kontraksi dan memperkecil volume uterus sehingga plasenta terdorong ke dalam lumen servik .

Waktu yang diperlukan untuk mengeluarkan plasenta berbeda-beda untuk setiap spesies hewan. Semakin sehat induk hewan semakin pendek waktu yang diperlukan. Pada sapi potong yang mempunyai kesempatan bergerak lebih banyak maka stadium pengeluaran plasenta berlangsung 0,5 – 1 jam. tetapi pada sapi perah yang lebih banyak dikandangkan pengeluaran plasenta berlangsung 1 – 8 jam. Pada domba, kambing dan kuda memakan waktu 0,5 – 3 jam.

Setelah plasenta dikeluarkan, servik mulai mengeluarkan lendir yang banyak mengandung leukosit, bersifat mucous dan berfungsi sebagai sumbat servik untuk mencegah masuknya kuman dari vagina atau vulva ke uterus.

2.1.6.4. Hormon yang berperan dalam proses kelahiran

Oksitosin

Oksitosin dinyatakan sebagai hormon yang memegang peranan penting dalam merangsang uterus untuk memulai berkontraksi. Tetapi pada penelitian selanjutnya memberikan hasil yang meragukan, pada induk hewan menjelang melahirkan bila dilakukan hipofisektomi yang diharapkan proses kelahiran tidak akan terjadi karena sumber oksitosin

tidak ada ternyata tetap terjadi kelahiran normal. Penelitian lain menyebutkan kadar oksitosin sama dengan pada fase kebuntingan muda hanya pada saat tahap perejanan untuk mengeluarkan fetus kadar oksitosin meningkat. Dapat disimpulkan bahwa tahap persiapan bukan disebabkan oleh rangsangan oksitosin melainkan oleh hormon lain yang belum diketahui.

Rangsangan apa yang diterima hipofisis anterior hingga kadar oksitosin meningkat. Dasarnya adalah pada saat fetus meregangkan servik untuk membuka lumennya terjadi rangsangan syaraf yang diteruskan ke otak menuju hipotalamus terutama pada nukleus supraopticus dan paraventricularis untuk memproduksi oksitosin selanjutnya dialirkan ke hipofisis posterior dan keluar melalui peredaran darah menuju urat daging uterus.

Mengapa selama kebuntingan muda kadar oksitosin yang ada tidak menyebabkan uterus berkontraksi. Dalam suatu penelitian dikatakan bahwa peran oksitosin dalam mempengaruhi kontraksi uterus ini dipengaruhi oleh peranan estrogen dan progesteron serta peranan erisim.

Peranan estrogen dan progesteron

Progesteron menghambat daya kerja oksitosin, sedang estrogen membuat uterus menjadi sensitif terhadap rangsangan oksitosin. Saat menjelang kelahiran, persiapan kadar progesteron pada beberapa

mamalia menurun sedang kadar estrogen naik. Kedua hormon ini dihasilkan oleh plasenta.

Peranan enzim

Dalam darah primata selama kebuntingan muda didapatkan enzim oksitosinase yang berfungsi meniadakan peranan oksitosin. Pada saat menjelang kelahiran kadar enzim menurun sehingga tidak ada hambatan terhadap oksitosin sehingga terjadi oksitosin pada uterus. Teori ini kurang mendapat dukungan.

Progesteron

Progesteron merupakan hormon yang memegang peranan penting dalam menjaga kebuntingan dengan jalan mencegah terjadinya kontraksi urat daging uterus hingga uterus menjadi tenang. Jika korpus luteum di buang maka kadar progesteron akan hilang dari peredaran darah maka akan terjadi abortus. Pada saat plasenta terbentuk, maka progesteron dan estrogen akan diproduksi oleh plasenta. Perbandingan kadar progesteron dan estrogen secara biologik telah diatur oleh plasenta sedemikian rupa sehingga imbangannya menyebabkan kebuntingan dapat berlangsung baik hingga saat kelahiran. Penurunan kadar progesteron menyebabkan estrogen dominan dalam urat daging uterus serta peningkatan kadar oksitosin dalam merangsang uterus untuk memulai kontraksi.

Estrogen

Sejak plasenta terbentuk estrogen juga mulai terbentuk. Pertambahan estrogen dalam darah ada korelasi positif dengan pertambahan berat plasenta. Semakin berat plasenta semakin tinggi kadar estrogen dalam darah.

Peran estrogen dimulai sebelum terjadi kebuntingan yaitu merangsang kontraksi uterus yang berfungsi membawa semen dari servik ke tempat fertilisasi, pada saat terjadi kebuntingan, estrogen merangsang uterus untuk berkontraksi baik sendiri maupun bersama-sama oksitosin, tetapi estrogen hanya mampu merangsang kontraksi uterus sampai tingkat kontraksi lemah tidak sampai terjadi kontraksi tonus. Sedangkan oksitosin dapat merangsang uterus untuk berkontraksi secara kuat.

Peran Prostaglandin dan Hormon Lokal

Liggins dkk. (1972) yang didukung oleh Thornburn dkk.(1972) mengembangkan teori peranan hormon yang beredar dalam tubuh fetus yang telah mencapai umur tertentu dalam kandungan dan peristiwa dimulainya kontraksi urat daging uterus untuk memulai proses kelahiran. Percobaannya menggunakan domba, dibuktikan bahwa ACTH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior fetus merangsang kelenjar adrenal, selanjutnya dari kelenjar adrenal akan dihasilkan glucocorticoid dan steroid (C19). Steroid ini melalui aliran darah menuju plasenta induk dan merangsang plasenta untuk menghasilkan prostaglandin F2 alfa (PGF2 alfa) dan menaikkan kadar estrogensedangkan produksi progesteron

menurun. PGF2 alfa akan merangsang kontraksi urat daging uterus, semakin tinggi kadar PGF2 alfa semakin kuat kontraksi uterus. McCracken dkk. (1972) membuktikan bahwa PGF2 alfa yang dihasilkan uterus selain mengalir ke jantung melalui vena, juga ada yang melintas ke arteri ovarica dan mempengaruhi korpus luteum, sehingga korpus luteum berdegenerasi dan produksi progesteron menurun.

2.2. *Pregnancy Associated Substance (PAS)*

Pregnancy Associated Substance (PAS) merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah sapi bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Keberadaan PAS ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.*, 2000; Howard, 1998; Transom, 2001). Berat molekul *Pregnancy Associated Substance (PAS)* pada sapi berkisar 65-67 kD.

Pregnancy-Associated Substance dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000). PAS ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Sedangkan El Amiri *et al.* (2000) mengemukakan bahwa pada lapisan superficial dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy associated glycoproteins (PAGs)* yang merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaannya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

Antisera terhadap PAS yang dibuat pada kelinci dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan embrio mencit (DuPlants, 2000) dengan jalan menghambat proses implantasi (Barnea *et al.*, 2000) dan dapat digunakan untuk tes diagnostik kebuntingan (Hafez, 2000; Knobil *et al.*, 1988; Likes *et al.*, 2002)).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap yaitu :

1. Karakterisasi anti-PAS hasil induksi isolat protein PAS *Cotyledon* sapi perah bunting.
2. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PAS serum darah.
3. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah.
4. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal.
5. Uji validitas kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PAS serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

3.2. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 6 ekor kambing PE jantan dan 100 ekor sapi perah betina. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biomol FMIPA Unibraw, Peternakan sapi perah di UPT Ternak Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur di Tuban, Kediri dan Singosari Malang.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Metode Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PAS (Aulani'am, 2005)

3.3.1.1. Pengukuran Absorbansi Protein Standar

Blanko dipipet sebanyak 200 μ l *Glycoprotein Assay Buffer*, ditambah dengan 200 μ l larutan KIO₄ 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600 μ l *Glycoprotein Detection Reagen* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan shaker dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm.

Protein standar, disiapkan 6 buah eppendorf untuk 6 protein standar (Lysozyme, Bovine Serum Albumin, Ovalbumin, Apo-Transferrin, Fetuin dan α 1-Acid Glycoprotein). Selanjutnya dipipet 200 μ l masing-masing protein standar, ditambah dengan 200 μ l larutan KIO₄ 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600 μ l *Glycoprotein Detection Reagent* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan shaker. Selanjutnya diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm. Kandungan protein standard an kandungan karbohidrat total yang telah diketahui dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 3.1. Nilai Protein Standar an Kandungan Karbohidrat Total Berdasarkan Glikoprotein Karbohidrat *Estimation Kit 23260*

Protein	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Karbohidrat Total (%)
Blanko	0	0
Lysozyme	2,5	0
Bovine Serum Albumin	2,5	Sedikit
Ovalbumin	2,5	3,2
Apo-Transferrin	2,5	5,8
Fetuin	0,25	22,9
Fetuin	2,5	22,9
α 1-Acid Glycoprotein	0,25	41,4
α 1-Acid Glycoprotein	2,5	41,4

3.3.1.2. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PAS

Disiapkan 2 *ependorf*, 1 *ependorf* diisi 200 μ l *Glycoprotein Assay Buffer* sebagai blanko dan 1 *ependorf* diisi 10 μ l sampel isolat PAS diencerkan sampai 200 μ l dengan pelarut *Glycoprotein Assay Buffer*. Kemudian masing-masing *ependorf* ditambahkan 200 μ l Kalium Periodat 10 mM, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya masing-masing *ependorf* ditambahkan 600 μ l *Glycoprotein Detection Reagent*, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm dan diulang 3 kali.

Kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel diperoleh dengan membandingkan larutan standar proteinnya dengan menggunakan rumus (Anonymous, 1998) :

$$\text{Glikoprotein(mg/ml)} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{C protein (mg/ml)} \times \text{pengenceran}}{\text{Absorbansi standar}}$$

$$\text{Karbohidrat(mg/ml)} = \text{Kandungan glikoprotein} \times \% \text{ total karbohidrat standar}$$

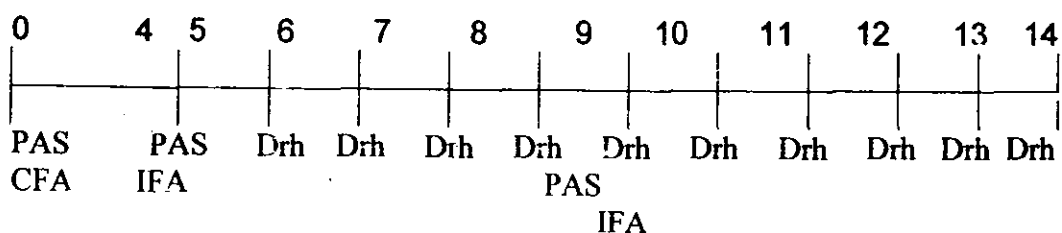
$$\text{Protein (mg/ml)} = \text{Kadar glikoprotein} - \text{Kadar karbohidrat}$$

3.3.2. Karakterisasi Anti-PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS

4.3.2.1. Metode Imunisasi Kambing dengan Isolat protein PAS

Sebanyak 6 ekor kambing PE jantan disuntik secara sub kutan dengan 150 µg isolat PAS dalam *Freund's complete adjuvant*. Penyuntikan ulang pertama dilakukan 4 minggu setelah penyuntikan pertama dengan 100 µg isolat PAS dalam *Freund's incomplete adjuvant*. Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke 1-10 setelah penyuntikan ulang pertama. Penyuntikan ulang kedua dilakukan pada minggu ke lima setelah penyuntikan ulang pertama. Darah diambil pada masing-masing kambing sebanyak 5 cc melalui *vena jugularis* untuk dianalisis titer antibodi (anti-PAS) dengan menggunakan *indirect ELISA*.

Jadwal pelaksanaan pembuatan anti-PAS
minggu ke



EPF+CFA : 150 μ g PAS dalam *Complete Freund,s Adjuvant*

EPF+IFA : 100 μ g PAS dalam *Incomplete Freund,s Adjuvant*

Drh : Pengambilan darah

3.3.2.2. Metode Purifikasi Anti-PAS dengan *Saturated Ammonium Sulphate (SAS)* (Aulanni'am, 2005)

Jemihkan cairan serum anti-PAS dari kontaminan-kontaminan lainnya dengan jalan sentrifugasi pada 17.000 g selama 15 menit, 4 $^{\circ}$ C. Ambil supernatan yang jemih dan biarkan di dalam es. Tambahkan pelan-pelan dengan volume yang sama amonium sulfat jenuh, biarkan pada 4 $^{\circ}$ C selama 2 jam. Pindahkan cairan tadi ke dalam tabung sentrifus dan putar pada 1000 rpm, 10 menit, 4 $^{\circ}$ C. Pelet dari endapan yang didapat dicuci 2 kali dengan 50 % amonium sulfat dingin. Pencucian dapat dilakukan dengan melarutkan pelet tadi ke dalam air dan selanjutnya diulangi presipitasi dengan 50 % amonium sulfat. Pelet dilarutkan dalam aquades dengan 1/10 volume cairan semula. Pindahkan larutan tersebut ke dalam tabung dialisis yang sudah dipersiapkan dan dialisa terhadap PBS pada 4 $^{\circ}$ C dengan 2 kali pergantian volume. Sentrifus dan pisahkan presipitat, aliquot dalam volume kecil dan disimpan pada - 20 $^{\circ}$ C.

3.3.2.3. Metode Pengukuran *Optical Density* (OD) Anti-PAS dengan *Indirect* ELISA (Rantam, 2003)

Microplate 96 well dilapisi dengan isolat PAS sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi pada 4 $^{\circ}$ C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan di blok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1 %, kemudian dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan anti-PAS sebanyak 100 μ l dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi *konjugate alkalin fosfatase* dan diinkubasi pada 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA reader sistem BIG-RAD pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi yang terjadi pada ELISA dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

3.3.2.4. Pengukuran Titer Anti-PAS dengan Menggunakan Kurva Standar Anti-PAS

Pengukuran titer anti-PAS dilakukan dengan mengkonversi nilai *optical density* (OD) dengan kurva standar anti-PAS yang telah diketahui konsentrasinya, seperti pada tabel di bawah ini :

Tabel 3.2. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PAS Standar

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
20	1,741
10	1,690
5	1,645
2,5	1,610
1,25	1,591

3.3.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah

3.3.3.1. Koleksi Serum Darah Sapi Perah

Darah diambil dari vena jugularis sapi perah PE 7, 14, 21 dan 28 hari pasca inseminasi buatan *disposable syringe* 10 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan 45° dan dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat ditampung pada vial dan disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C .

3.3.3.2. Diagnosis Kebuntingan dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah

Mikrotiter strip didasarkan pada *Sandwich* ELISA dengan metode sebagai berikut : *Microplate* 96 well dilapisi dengan anti- PAS sebanyak $100\ \mu\text{l}$, 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 BSA grade 5 dengan konsentrasi 1 %, kemudian dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan

dengan EPF (serum darah dari kambing yang diduga bunting) sebanyak 100 μ l dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi *konjugate alkalin fosfatase* dan diinkubasi pada 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA *reader* sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm.

3.3.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah

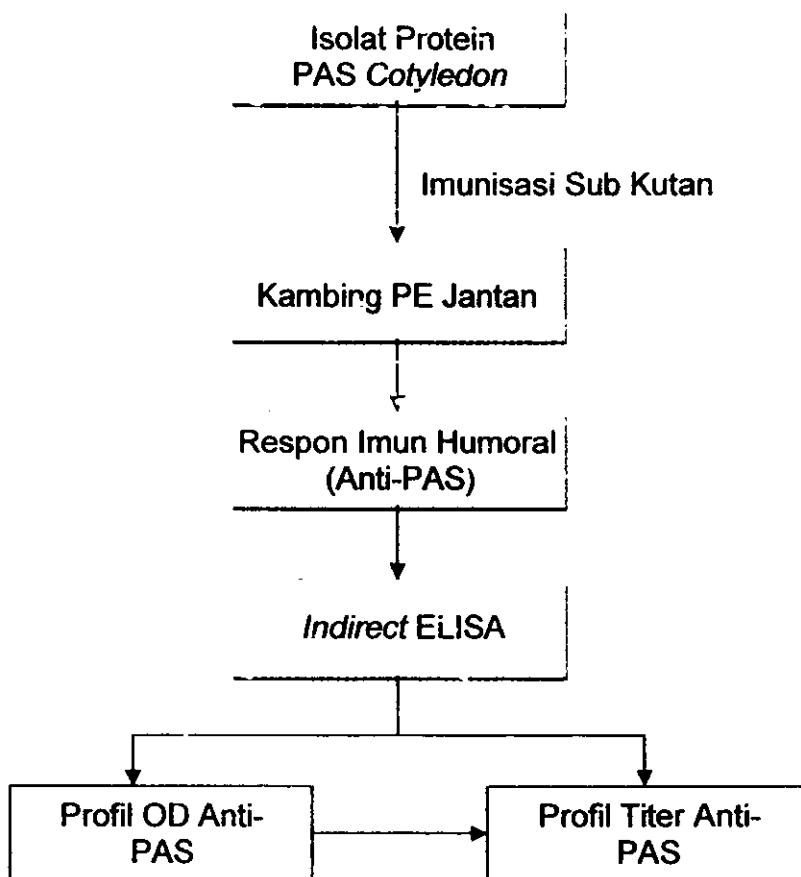
Kadar Progesteron serum darah diukur dengan *Enzyme Immunoassay* (EIA). Pada masing-masing *well* dimasukkan 25 μ l larutan standar, sampel dan kontrol. Kemudian dicampur dengan 100 μ l reagen *Progesterone-HRP conjugate*. Selanjutnya pada masing-masing *well* dimasukkan 50 μ l reagen *rabbit anti-progesterone*. dan dikocok (*shaker*) selama 30 detik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 18-25 $^{\circ}$ C selama 90 menit, kemudian dicuci 5 kali dengan *aqua distilata*. Setelah itu dimasukkan 100 μ l *stop solution* (1 N HCl) pada masing-masing *well* dan dikocok (*shaker*) selama 30 detik. Nilai absorbansi dibaca pada ELISA *reader* setelah 15 menit dengan absorbansi 450 nm.

3.3.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi Rektal

Palpasi rektal dilakukan pada umur kebuntingan 3 bulan. Pemeriksaan ini ditujukan untuk menemukan besarnya uterus bunting, fetus, letak uterus bunting dan freemitus.

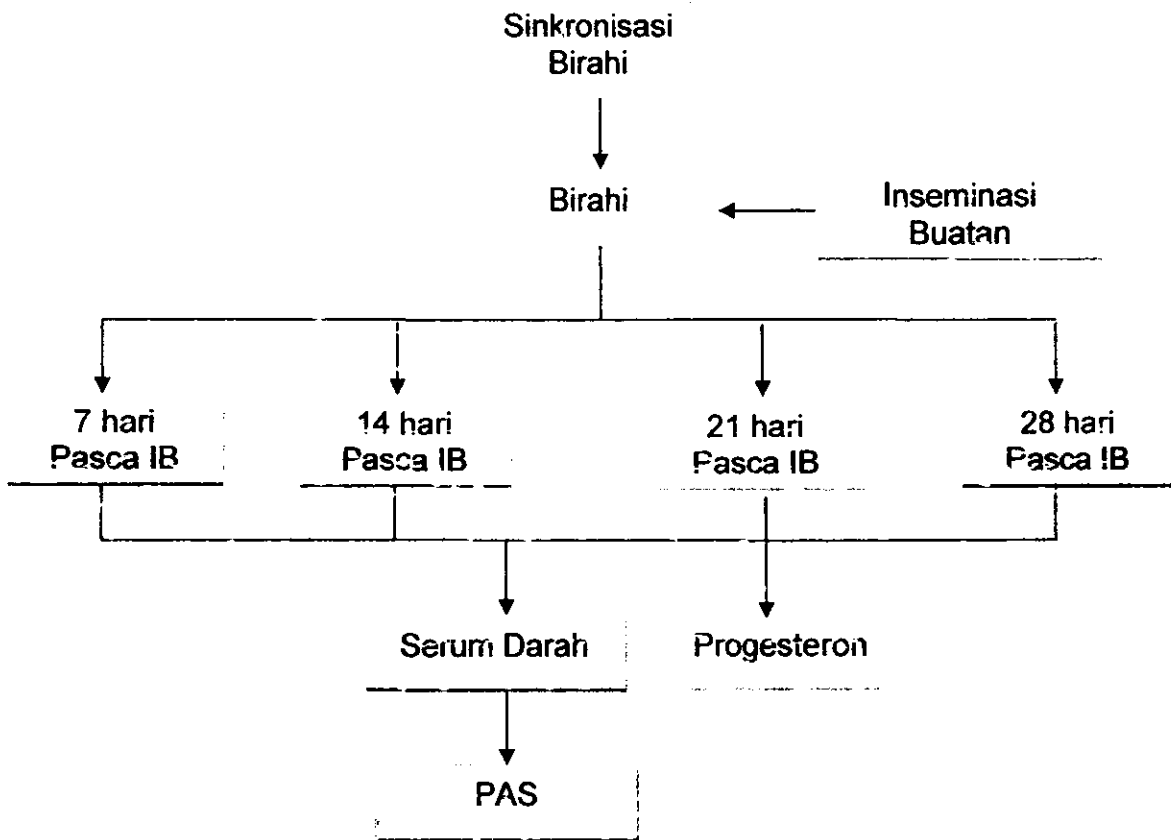
3.4. Bagan prosedur penelitian

3.4.1. Karakterisasi Anti-PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS *Cotyledon* Sapi Perah Bunting



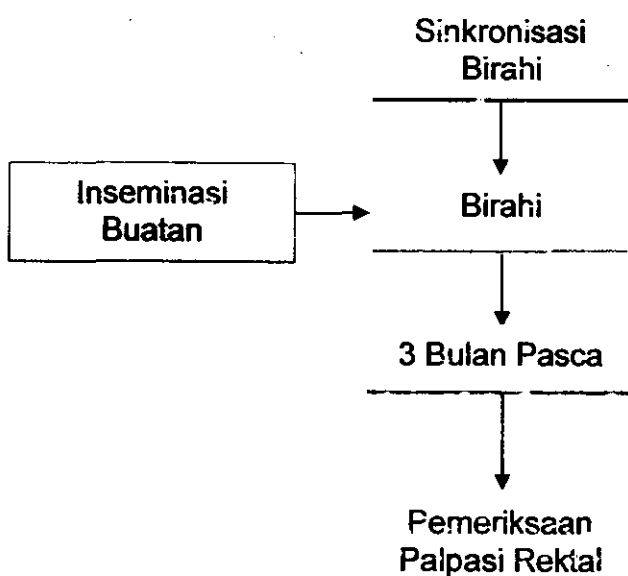
Gambar 3.1. Bagan Prosedur Karakterisasi Anti-PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS *Cotyledon* Sapi Perah Bunting

3.4.2. Diagnosis Kebuntingan dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah



Gambar 3.2. Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah

3.4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi REktal



Gambar 4.3. Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi Rektal

3.5. Analisis Data

Data penelitian yang didapat berupa kadar PAS serum darah perah pada 7, 14, 21, 28 hari pasca inseminasi buatan dan kadar progesteron pada 21 hari pasca inseminasi buatan serta hasil pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal disajikan dalam bentuk deskriptif. Data mikrotiter strip (kadar PAS serum darah) dan kadar progesteron pada hari ke 21 pasca inseminasi buatan diuji validitasnya (Broaddus *et al.*, 2005)

dengan menghitung persentase sensitifitas, spesifisitas, predeksi negatif dan positif, akurasi dengan rumus sebagai berikut :

Tabel 3.3. Uji Validitas Kebuntingan Kambing (Sensitivitas, Spesifisitas dan Akurasi)

Palpasi Rektal	Kadar PAS/Kadar Progesteron		Total
	positif bunting	tidak bunting	
Bunting	a	b	a + b
Tidak bunting	c	d	c + d
Total	a+c	b+d	

a : *true positives* (hasil palpasi abdominal bunting dan kadar PAS positif atau kadar progesteron > 1 ng/ml)

b : *false positives* (hasil palpasi abdominal tidak bunting dan kadar PAS positif atau kadar progesteron > 1 ng/ml)

c : *false negatives* (hasil palpasi abdominal bunting dan kadar PAS negatif atau kadar progesteron ≤ 1 ng/ml)

d : *true negatives* (hasil palpasi abdominal tidak bunting dan dan kadar PAS negatif atau kadar progesteron ≤ 1 ng/ml)

$$\text{Sensitivity} : \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Spesificity} : \frac{d}{c + d}$$

$$\text{Positive predictive value} : \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Negative Predictive Value} : \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Accuracy} : \frac{a + d}{A+b+c+d}$$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan hipotesis. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu :

1. Karakterisasi anti-PAS hasil induksi isolat protein PAS *Cotyledon* Sapi Perah bunting.
2. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadara PAS serum darah.
3. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah.
4. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal.
5. Uji validitas kebuntingan sapi peran dengan mengukur kadar PAS serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

4.1. Pengukuran Kadar Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein Isolat Protein PAS

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein dari isolat PAS. Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah PAS melalui uji *Western Blot*, maka

kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dilakukan dengan menggunakan *Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit 23260*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai absorbansi protein PAS pada bagian endapan sebesar 0,178 dan bagian supernatan sebesar 0,136. Nilai absorbansi protein standar dan protein PAS dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.1. Nilai Absorbansi Protein Standar dan Protein PAS

Protein	Absorbansi-1	Absorbansi-2	Abs rata-rata
Apotransferin	0.145	0.134	0.164
Fetuin	0.158	0.156	0.157
Albumin	0.164	0.153	0.158
Ovalbumin	0.115	0.165	0.140
Lisosim	0.162	0.184	0.173
α Acid Glikoprotein	0.199	0.185	0.192
Isolat PAS (supernatan)	0.126	0.146	0.136
Isolat PAS (endapan)	0,154	0,202	0,178

Penghitungan kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dengan menggunakan rumus :

$$\text{Glikoprotein} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{konsentrasi protein standar} \times \text{pengenceran}}{\text{Absorbansi standar}}$$

Sehingga kadar glikoprotein isolat PAS adalah $0,71 \times 0,25 \times 54 = 9,562$ mg/ml (supernatan) dan $0,93 \times 0,25 \times 54 = 12,516$ mg/ml (endapan).

Kadar karbohidrat : kandungan glikoprotein X % total karbohidrat standar, sehingga kadar karbohidrat isolat PAS adalah : $9,562 \times 0,414 = 3,959$ mg/ml (supernatan) dan $12,516 \times 0,414 = 5,181$ mg/ml (endapan).

Kadar protein : kandungan glikoprotein – kandungan karbohidrat, sehingga kadar protein isolat PAS adalah $9,562 - 3,959 = 5,603$ mg/ml (supernatan) dan $12,516 - 5,181 = 7,335$ mg/ml (endapan).

Hasil penghitungan diperoleh persentase kandungan protein isolat PAS *cotyledon* sapi perah adalah 58,60 % dan persentase kandungan karbohidrat isolat PAS adalah 41,40 % dengan perbandingan antara protein dan karbohidrat adalah 3:2. Hasil ini sesuai dengan pendapat Robert and Peter (1993) menyatakan bahwa kandungan karbohidrat dalam molekul glikoprotein sebesar 0.02-85 %. Oleh karena hasil penelitian ini terletak pada kisaran tersebut maka PAS yang diisolasi dari *cotyledon* kambing bunting merupakan molekul glikoprotein (Woodruff and Pangas, 2000). Oleh karena itu protein PAS dapat digunakan sebagai antigen.

4.2. Karakterisasi Anti-PAS Hasil Induksi Isolat Protein PAS *Cotyledon* Sapi Perah Bunting.

4.2.1. Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap PAS (Anti-PAS) dan Pengukuran *Optical Density* (OD) Anti-PAS

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah PAS bersifat imunogen sehingga mampu menginduksi sistem imun humoral dan

terbentuk anti-PAS. Biosintesis anti-PAS dilakukan dengan cara imunisasi pada kambing PE jantan melalui injeksi subkutan isolat PAS dosis 150 μg dalam pelarut *Freund Complete* dan injeksi ulang dengan dosis 100 μg PAS dalam pelarut *Freund Incomplete*. Sera yang diperoleh diperiksa dengan *indirect ELISA*. Nilai *Optical Density* (OD) dapat dilihat pada lampiran 1. Sedangkan rata-rata *optical density* dari pengambilan darah ke 1-10 setelah *booster* pertama dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.2. Rataan *Optical Density* Anti-PAS (pengenceran 10 x) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isoiat PAS

Pengambilan darah	Rataan Absorbansi	Pengambilan darah	Rataan Absorbansi
B1	0,196	B6	0,251
B2	0,322	B7	0,334
B3	0,548	B8	0,584
B4	0,317	B9	0,350
B5	0,190	B10	0,208

Keterangan :

B1-10 : Minggu pertama sampai ke sepuluh setelah *booster* pertama

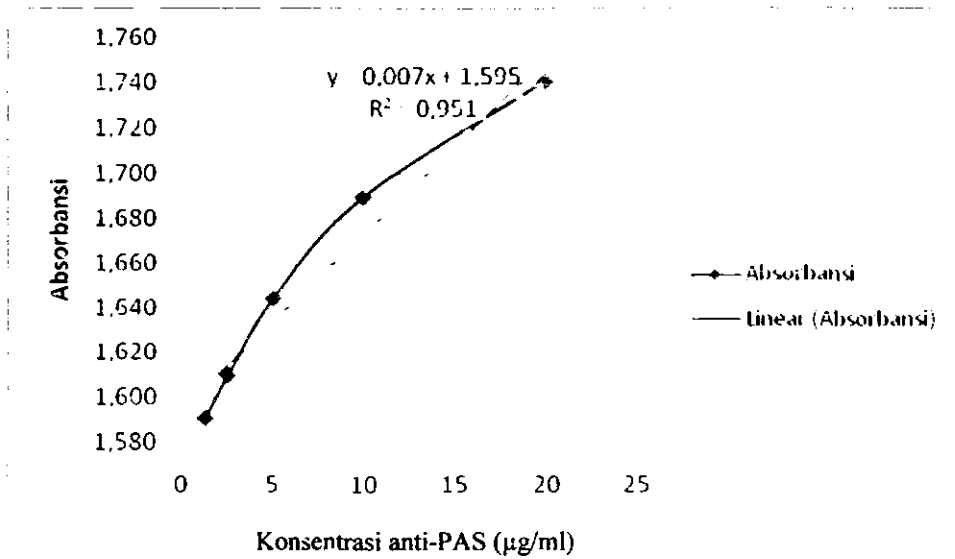
4.2.2. Pengukuran Titer Anti-PAS dengan Kurva Standar

Titer anti-PAS diperoleh dengan mengkonversikan nilai *Optical Density* (OD) dengan kurva standar anti-PAS seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.3. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PAS Standar

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
20	1,741
10	1,690
5	1,645
2,5	1,610
1,25	1,591

Berdasarkan titer anti-PAS standar dan nilai absorbansinya, maka diperoleh gambaran kurva standar anti-PAS dan persamaan regresi liniernya sebagai berikut:



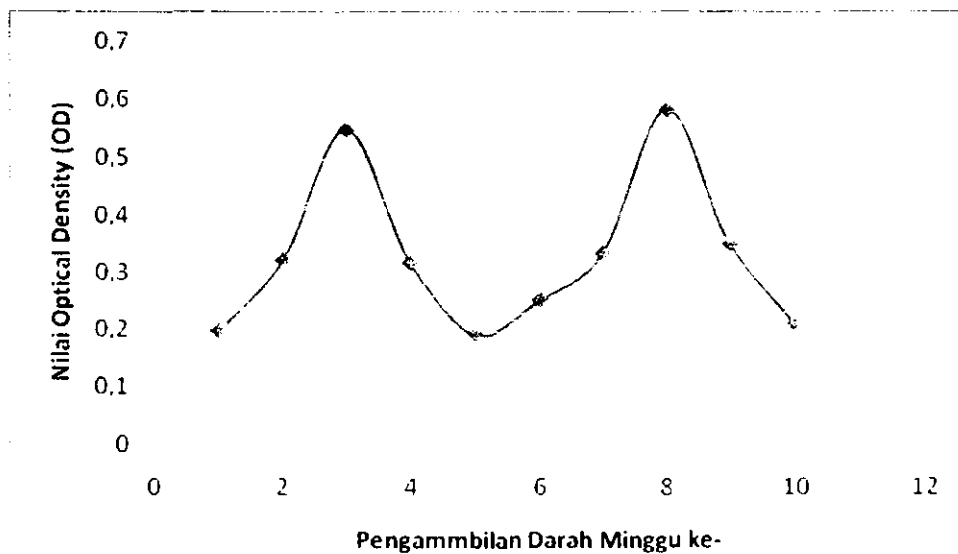
Gambar 4.1. Grafik Kurva Standar Anti-PAS

Hasil titer anti-PAS setelah mengkonversi nilai *optical density* dengan rumus $Y=0,007X+1,595$ dapat dilihat lampiran 2., sedangkan rata-rata titer anti-PAS dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.4. Rataan Titer Anti-PAS ($\mu\text{g/ml}$) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS

Pengambilan darah	Rataan anti-PAS ($\mu\text{g/ml}$)	Pengambilan darah	Rataan anti-PAS ($\mu\text{g/ml}$)
B1	56,62	B6	131,19
B2	232,14	B7	249,05
B3	555,00	B8	606,91
B4	225,24	B9	272,38
B5	44,76	B10	69,76

Gambaran titer anti-PAS pada minggu ke 1-10 setelah *booster* pertama dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.2. Titer Anti-PAS pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS

Hasil pengukuran titer anti-PAS dan rataannya seperti tertera pada tabel 5.4. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa titer anti-PAS terjadi peningkatan dari minggu pertama sampai minggu ke 3 setelah *booster* pertama. Pada minggu ke 4 mulai terjadi penurunan dan mencapai angka terendah pada minggu ke 5. Pada minggu ke 5 dilakukan *booster* ke 2, setelah *booster* ini diikuti peningkatan titer kembali sampai minggu ke 8 dan mulai menurun kembali pada minggu ke 9 dan 10.

Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi. Imunisasi kelinci dengan isolat protein PAS akan memberikan respon dengan terbentuknya anti-PAS. Induksi anti-PAS diduga melalui respon imun humoral. Respon imun spesifik terbagi atas respon imun humoral dan respon imun seluler. Respon imun humoral adalah respon terhadap imunogen ditandai dengan dihasilkannya antibodi terlarut.

Mekanisme terbentuknya anti-PAS dapat dijelaskan sebagai berikut, protein PAS masuk ke dalam tubuh akan diproses dalam *Antigen Presenting Cell (APC)* dan dipresentasikan ke reseptor pada sel Tc dan Th yang masing-masing berhubungan dengan *Major Histocompatibility Complex* kelas I dan II (MHC I dan II). APC memproduksi dan melepas sitokin (IL-1) yang merangsang sel T untuk berproliferasi dan berdeferensiasi.

Aktivasi sel T oleh protein PAS menghasilkan sel T memori yang dapat memberikan respon sekunder terhadap antigen yang sama. Setelah dirangsang sel T memori akan memproduksi sitokin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF γ dan GM-CSF). Aktivasi berulang dari sel T memori mengakibatkan diferensiasi sel Th menjadi sel T yang memproduksi sitokin yang terbatas, Th1 dan Th2. Sel Th1 memproduksi sitokin seperti IFN γ , IL-2, TNF, sedangkan sel Th2 memproduksi sitokin seperti IL-3, IL-4, IL-5 dan IL-10. Sel Th1 lebih berperan pada reaksi seluler sedangkan sel Th2 lebih berperan pada reaksi humoral.

Sel Th yang dirangsang melepas sitokin yang mengaktifkan sel B dalam 3 tingkat yaitu aktivasi, proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi Ig. IL-1 dikenal sebagai *B cell differentiation factor (BCDF)* dan IL-5 sebagai *B cell growth factor (BCGF)*. BCDF yang dilepas sel T merangsang sel B yang sudah mengikat protein PAS dan membelah diri menjadi sel plasma yang mampu memproduksi anti-PAS. Sedangkan BCGF merangsang sel B yang sudah mengikat protein PAS untuk berproliferasi.

4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah

Diagnosis kebuntingan dilakukan dengan mikrotiter strip, pemeriksaan progesteron dan palpasi rektal. Prinsip kerja mikrotiter strip didasarkan pada *Sandwich ELISA* (antibodi penangkap antigen). Hasil

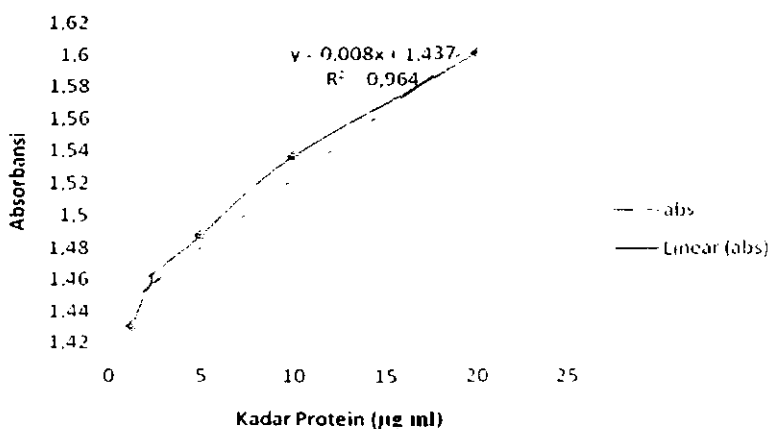
mikrotiter strip positif bila terjadi perubahan warna kuning dari larutan yang ada didalam sumuran mikrotiter.

Perubahan warna yang terjadi mengindikasikan bahwa protein ada dalam serum darah. Perubahan warna dibaca dengan spektrofotometer dengan λ 540 nm dan hasil *optical density* nya (OD) dikonversikan dengan kurva standar protein PAS seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.5. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein PAS Standar

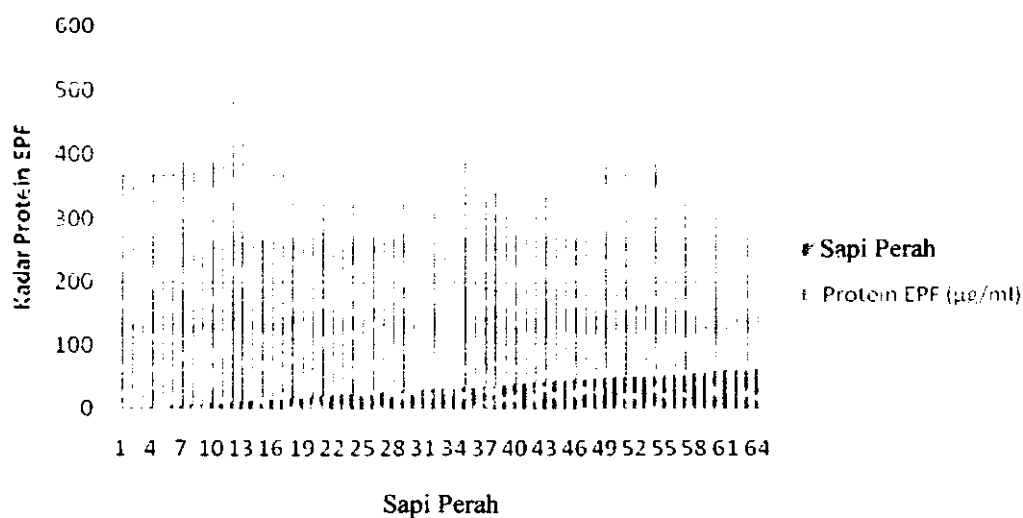
konsentrasi µg/ml	Absorbansi
20	1,601
10	1,537
5	1,488
2,5	1,463
1,25	1,431

Kurva standar protein PAS dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.3. Grafik Kurva Baku Protein PAS

Nilai absorbansi (pengenceran 20x) dan kadar protein PAS serum darah sapi perah pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 pasca inseminasi dapat dilihat pada lampiran 2. Sebanyak 27 ekor sapi perah (27 %) di dalam darahnya sudah ada PAS Pada hari ke 14 pasca inseminasi buatan. Sedangkan pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan, sebanyak 65 ekor sapi perah di dalam darahnya sudah ada PAS. Gambaran kadar protein PAS hasil penelitian dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Gambar 4.4. Grafik Kadar Protein PAS Sapi Perah 21 Hari Pasca Inseminasi Buatan

Pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 hari pasca inseminasi buatan diperoleh hasil mikrotiter strip masing-masing 0 ekor, 27 ekor, 65 ekor dan 65 ekor. Rataan kadar protein PAS serum darah sapi perah yang diperoleh pada hari 7, 14, 21 dan 28 pasca inseminasi buatan adalah 0 µg/ml, 113,801 µg/ml, 370,221 µg/ml dan 716,317 µg/ml.

Xie *et al.* (1996) mendeteksi PAS pada induk sapi sejak umur kebuntingan tiga minggu. Konsentrasi PAS dilaporkan mencapai optimal

sebelum proses kelahiran. Gonzales *et al.* (2000) menemukan bahwa konsentrasi PAS sapi mencapai maksimal pada usia kebuntingan 8 minggu dan mulai menurun pada minggu ke 12-14 yang selanjutnya konstan sampai partus. Sementara itu, Vandaele *et al.* (2005) berhasil mendeteksi substansi ini pada umur kebuntingan tiga sampai empat minggu. Dilaporkan pula konsentrasi PAS mulai menurun drastis setelah empat minggu post partum.

Deteksi kebuntingan secara dini sangat bermanfaat digunakan sebagai alat untuk mengelola ternak lebih lanjut. Ternak yang tidak bunting dipisahkan dengan yang bunting lebih awal untuk mendapatkan perlakuan sesuai dengan status fisiologisnya. Ternak yang bunting diberi makanan sesuai dengan kebutuhan perkembangan fetus yang ada dalam kandungan, sedangkan ternak yang tidak bunting segera dievaluasi status kesehatan reproduksinya. Bila ternak masih memungkinkan untuk diperbaiki status reproduksinya maka perlu penanganan khusus agar secepatnya bisa bunting kembali. Namun bila hasil evaluasi tidak memungkinkan untuk dipelihara lebih lanjut maka ternak bisa digemukkan untuk diambil dagingnya atau langsung di potong.

Deteksi kebuntingan lebih awai pada ternak khususnya ternak penghasil susu akan bermanfaat secara ekonomis karena apabila ternak tidak bunting maka akan mempengaruhi kelangsungan dan jumlah produksi susu. Jarak kelahiran yang panjang sangat tidak efisien karena

akan menurunkan efisiensi reproduksi dalam hal menghasilkan keturunan yang secara tidak langsung akan menghambat perkembangan populasi.

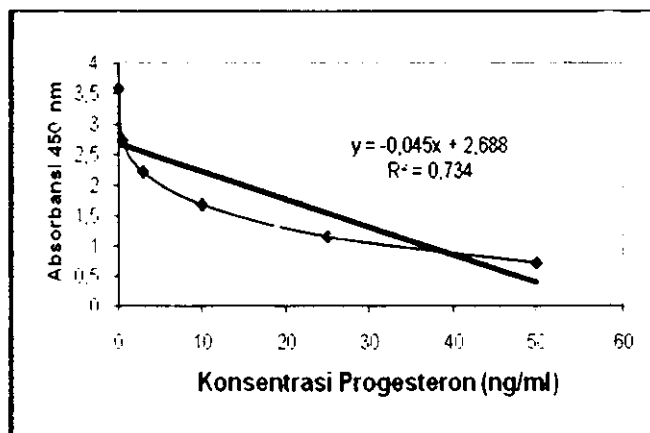
4.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Peraih dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah

Pemeriksaan kadar progesteron dilakukan pada 21 hari pasca inseminasi buatan. Gambaran absorbansi progesteron standar dan kadar progesteron darah dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.6. Kadar Progesteron Standar dan Nilai Absorbansinya

Progesteron standar (ng/ml)	Absorbansi
0	3,576
0,5	2,73
3	2,215
10	1,679
25	1,148
50	0,718

Gambaran hubungan kadar progesteron standar dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.5. Grafik Kurva Standar Progesteron

Sebanyak 69 ekor sapi perah menunjukkan kadar progesteron darahnya lebih dari 1 ng/ml yang berarti mengindikasikan bunting dan ada 31 ekor sapi perah dengan kadar progesteron dibawah 1 ng/ml atau tidak bunting. Nilai absorbansi dan kadar progesteron serum darah sapi perah hari ke 21 pasca inseminasi buatan kambing dapat dilihat pada lampiran 3.

Pada hewan bunting progesteron dihasilkan oleh *corpus luteum graviditatum* dan dipertahankan terus sampai menjelang kelahiran. *Corpus luteum* dibentuk setelah proses ovulasi terjadi. Proses ovulasi melibatkan reaksi umpan balik dari hormon-hormon yang diproduksi oleh ovarium yaitu estradiol dan progesteron. Menjelang hewan birahi kadar estradiol dalam darah tinggi sehingga menyebabkan umpan balik positif untuk keluarnya LH-RH dari hipotalamus. Akibat rangsangan LH-RH menyebabkan hipofisis anterior memproduksi LH yang berfungsi untuk proses ovulasi (Hafez, 2000). Pre-ovulatory LH surge menginduksi hilangnya reseptor LH pada sel-sel folikel sampai terjadi proses desensitisasi, tetapi dalam waktu beberapa hari oleh pengaruh prolaktin sel-sel corpus luteum berisi penuh dengan reseptor LH yang penting untuk produksi steroid (Austin and Short, 1984).

Luteinizing Hormon (LH) merupakan hormon protein dalam melakukan regulasi sel melalui pengikatan pada reseptor spesifik dari membran sel *corpus luteum* dengan mengontrol aktivitas enzim *adenylate cyclase*. Enzim ini bertanggung jawab terhadap katalisasi konversi *adenosin triphosphate* (ATP) menjadi *cyclic adenosin mono phosphate*

(cAMP) dan *pyrophosphate*. Hal ini menyebabkan peningkatan kadar cAMP. cAMP bereaksi dengan enzim *proteinkinase* yang mempunyai dua sub unit yaitu sub unit regulator dan sub unit katalitik. Bila cAMP berikatan dengan sub unit regulator maka akan menyebabkan disosiasi dari dua sub unit tersebut. Bila cAMP berikatan dengan sub unit regulator maka sub unit katalitik akan dihambat. Bila sub unit katalitik bebas maka akan aktif untuk mengkatalisasi fosforilasi satu atau lebih protein spesifik. Fosforilasi yang terjadi dalam inti akan mempengaruhi informasi genetik DNA untuk memproduksi enzim spesifik yang mempengaruhi transkripsi RNA sehingga akan mempengaruhi sintesis mRNA baru di dalam sitoplasma dan akan mensintesis protein baru yang berperan penting dalam pembentukan enzim untuk biosintesis steroid (Ismudiono, 1999).

Pregnancy Associated Substances (PAS) selama kebuntingan berperan untuk memelihara *corpus luteum* dengan jalan menstimulasi produksi prostaglandin E2 (PGE2). Prostaglandin E2 akan meningkatkan sintesis cAMP sehingga akan meningkatkan produksi progesteron di dalam *corpus luteum* selama kebuntingan (Karen *et al.* 2001).

Uterus sangat membutuhkan peran progesteron untuk perlekatan embryo dan perkembangan membran fetus. Pada kambing dan tidak pada domba, *corpus luteum* merupakan sumber utama penghasil progesteron selama kebuntingan. Menurut Partodihardjo (1992) progesteron mempunyai tiga fungsi utama pada uterus. Pertama, progesteron menghambat kontraksi miometrium untuk menjamin kelangsungan hidup

blastocyst dalam uterus. Elanjutnya progesteron menghambat fungsi *oxytocin* pada miometrium sehingga fetus yang berkembang di dalam uterus tidak dikeluarkan. Kedua, progesteron merangsang tumbuhnya kelenjar-kelenjar uterus untuk memproduksi susu uterus (*histotroph*) yang sangat dibutuhkan *blastocyst* sebelum implantasi. Ketiga, pada saat implantasi selalu diikuti oleh proses perkembangan sel-sel permukaan endometrium untuk menerima *blastocyst* yang disebut *deciduoma*. Tanpa adanya rangsangan progesteron *deciduoma* tidak akan terbentuk.

4.5. Diagnosis Kebuntingan Kambing dengan Palpasi Rektal

Palpasi rektal dilakukan pada kambing 90 hari pasca inseminasi buatan. Hasil palpasi rektal didapatkan 64 ekor sapi perah dinyatakan bunting. Hubungan kadar protein serum darah, kadar progesteron dan palpasi rektal dapat dilihat pada lampiran 4.

5.6. Analisis Data

Data hasil diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PAS serum darah, progesteron serum darah dan palpasi rektal dibandingkan untuk digunakan uji validitas (sensitivitas, spesifisitas dan akurasi) seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.7. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan mengukur kadar PAS Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Hasil Pengukuran PAS	
	Warna Kuning (Bunting)	Tidak Berwarna (Tidak Bunting)
Bunting	62	2
Tidak bunting	3	33
Total	65	35

Sensitivitas : $62 : 64 = 96,88 \%$

Spesifisitas : $33 : 36 = 91,67 \%$

Positive predictive value : $62 : 65 = 95,39\%$

Negative predictive value : $33 : 35 = 94,29 \%$

Akurasi : 95%

Tabel 4.8. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Melihat Kadar Progesteron Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Abdominal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Kadar Progesteron	
	> 1 ng/ml (positif bunting)	≤ 1 ng/ml (tidak bunting)
Bunting	64	2
Tidak bunting	5	29
Total	69	31

Sensitivitas : $64 : 66 = 96,96 \%$

Spesifisitas : $29 : 34 = 85,29 \%$

Positive predictive value : $64 : 69 = 92,75 \%$

Negative predictive value : $29 : 31 = 93,55\%$

Akurasi : 93%

Tabel 4.9. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Peah dengan Mengukur Kadar PAS Serum Darah pada 14 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Hasil Pengukuran PAS	
	Warna Kuning (Bunting)	Tidak Berwarna (Tidak Bunting)
Bunting	27	37
Tidak bunting	1	35
Total	28	72

Sensitivitas : $27 : 64 = 42,19 \%$

Spesifisitas : $35 : 36 = 97,22 \%$

Positive predictive value : $27 : 28 = 96,43 \%$

Negative predictive value : $35 : 72 = 48,61 \%$

Akurasi : 62 %

Identifikasi awal terjadinya kebuntingan dan tidak bunting pada ternak setelah perkawinan bermanfaat untuk menentukan efisiensi reproduksi dan tingkat kebuntingan ternak dengan jalan memperpendek jarak antar beranak. Akurasi atau validasi dari suatu uji diukur dengan melihat sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif.

Sensitivitas adalah probabilitas untuk mendeteksi terjadinya kebuntingan dibandingkan dengan kejadian kebuntingan sesungguhnya. Spesifisitas adalah probabilitas hasil diagnosis yang menunjukkan tidak bunting dibandingkan dengan kejadian tidak bunting sesungguhnya. *Positive predictive value* adalah probabilitas kejadian kebuntingan sesungguhnya dibanding angka kebuntingan hasil diagnosis. *Negative predictive value* adalah probabilitas kejadian tidak bunting sesungguhnya dibanding angka kejadian tidak bunting hasil diagnosis.

Melihat hasil diagnosis kebuntingan dengan mikrotiter strip pada 21 hari pasca ibi mempunyai kemampuan uji akurasi atau validitas yang sama dengan uji progesteron pada 21 hari pasca IB. Sedangkan uji mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB menghasilkan angka sensitifitas yang rendah sehingga tidak dianjurkan untuk melakukan uji kebuntingan kambing dengan mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB tetapi dianjurkan pada 21 hari pasca IB. Hasil uji mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB mengindikasikan bahwa placenta belum terbentuk sempurna pada semua sapi perah penelitian sehingga protein PAS yang diproduksi oleh sel-sel binuclear trophoblast belum sepenuhnya dialirkan ke darah perifer maternal. Tetapi pada 21 hari pasca IB didapatkan hasil uji akurasi atau validitas yang tinggi dikarenakan pada umur tersebut placenta sapi sudah terbentuk sehingga protein PAS dapat dikeluarkan ke darah perifer maternal dan dapat dideteksi dengan anti-PAS yang ada pada mikrotiter strip. Hasil diagnosis kebuntingan kambing dengan uji mikrotiter strip pada 21 hari pasca IB menghasilkan angka akurasi sedikit lebih baik dari uji kebuntingan kambing dengan mengukur kadar progesteron serum darah.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu : protein PAS bersifat imunogen yang dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti-PAS dan anti-PAS yang dihasilkan dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan kambing dengan metode PAS mikrotiter strip (*Sandwich ELISA*).

Berdasarkan kesimpulan umum dapat ditarik subkesimpulan sebagai berikut :

1. kadar glikoprotein, karbohidrat, protein PAS masing-masing sebesar 9,562 mg/ml (supernatan) dan 12,516 mg/ml (endapan), 3,959 mg/ml (supernatan) dan 5,181 mg/ml (endapan), 5,603 mg/ml (supernatan) dan 7,335 mg/ml (endapan).
2. Protein PAS dari *cotyledon* kambing bunting mampu menginduksi terbentuknya anti-PAS.
3. Anti-PAS dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan pada kambing.
4. Diagnosis kebuntingan pada 21 hari pasca IB dengan menggunakan PAS mikrotiter strip memperoleh hasil angka akurasi atau validasi lebih baik dibanding pemeriksaan kadar progesteron serum darah.

Kesimpulan di atas membuktikan bahwa hipotesis penelitian dapat diterima yaitu ada perbedaan tingkat keberhasilan diagnosis kebuntingan sapi perah antara PAS mikrotiter strip dan progesteron serum darah.

5.2. S a r a n

Berdasarkan hasil dan kesimpulan dapat diambil suatu saran sebagai berikut :

1. PAS mikrotiter strip dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan kambing di lapangan. Meskipun telah diketahui bahwa diagnosis kebuntingan dengan PAS mikrotiter strip mempunyai angka akurasi atau validasi yang tinggi namun perlu dilakukan uji coba diagnosis kebuntingan sapi perah pada kondisi di lapangan.
2. PAS mikrotiter strip dapat digunakan sebagai model untuk diagnosis kebuntingan pada hewan mamalia lain.

Daftar Pustaka

- Austyn J.M. and K.J. Wood. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. 1st Ed. Oxford University Press. Pp. 695
- Barnea, E.R. 2000. Early Pregnancy: Biology and Medicine. Early Pregnancy Volume IV. pp. 165-175
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10: Implications for Understanding Its Role. *J. Reprod. Fertil.* 1: 28-32
- Ciarke, 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
- Clarke, F.M., H. Morton, B.E. Ralfe and G.J.A. Clunie. 1980. Partial Characterization of Early Pregnancy Factor in The Sheep. *J. Reprod. Immunol.* 2:151-162
- Clarke, F.M and S. Wilson. 1982. Biochemistry of Early Pregnancy Factor. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinskas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 407-412
- Cruz, Y.P., L. Selwood, H. Morton and A.C. Cavanagh. 2001. Significance of Serum Early Pregnancy Factor Concentrations During Pregnancy and Embryonic Development in *Sminthopsis Macroura* (Spencer)(Marsupialia: Dasyuridae). *J. Reprod. Fert.* 121: 933-939
- Darnell J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2nd Ed. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York. Pp. 711-716
- Direktur Jendral Peternakan. 2006. Produksi Daging, Telur dan Susu. http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm
- DuPlants, L.J. 2000. Early Pregnancy Factor. *Lifeissues.net*. Kochi, Japan. All Rights Reserved. pp. 1-2
- El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-Mboko and J.F. Beckers. 2000. Pregnancy-Associated Substances In Bos Taurus and Bos Taurus Indicus. *Theriogenology* 53:283
- El Amiri B, B Remy, NM De Sousa and JF Beckers. 2004. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high level ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:169-181
- Garbayo JM, B Remy, JL Alabart, J Folch, R Wattiez, P Falmagne and JF Beckers. 1998. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biology of Reproduction* 58:109-115
- Garbayo JM, JA Green, M Manikkam, JF Beckers, DO Kiesling, AD Early and RM Roberts. 2000. Genetics, gene regulation and expression. *Molecular Reproduction and Development* 57:311-322

- Gonzales F., J Sulon, JM Garbbayo, M Batista, F Cabrera, Po Calero, A Gracia and JF Backers. 2000. Secretory Profiles of Pregnancy-Associated Glycoproteins at Different Stages of Pregnancy in the Goat. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 35 : 79
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincutt Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Heyman, Y., P. Chavatte, N. melo de Sousa, F. Constant, M. Guillomot, X. Vignon and J.F. Beckers. 2004. 37 Pregnancy Associated Substances (PAS) Profiles During The Peri-Implantation Period in Recipients Carrying Bovine Somatic Clones : Preliminary Results. *Reprod, Fertility and Development* 17 (2) 168-169.
- Howard, P.J. 1998. Morning After Pills: How Do They Prevent Pregnancy ? *Lancet* 352: 422-428.
- Hunter, R.P.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung, Penerbit Universitas Udayana. Hal. 353-357.
- Karen A, P Kovacs, JF Beckers and O Szenci. 2003. Review article pregnancy diagnosis in sheep: review of the most practical methods. *Acta Vet. BRNO* 70:115-126
- Likes, R.I. 2002. *Pregnancy Diagnosis*. Department of Emergency Medicine, Darnall Army Community Hospital. pp. 1-9
- Morton, H., B. Ralfe and A. Cavanagh. 1982. Early Pregnancy Factor, Biology and Clinical Significance. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinkas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 391-405
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ke Tiga. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Perenyi, Zs., H. Desbuleux, J. Sulon, H. Bangamboko, N.M. Sousa, B. El Amiri, O. Szenci and J.F. Beckers. 2002. Pregnancy Associated Glycoprotein Profiles of 5 Heifers Measured By Three Radioimmunoassay Systems. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.* 6(1), 5-6.
- Robert, K and A. Peter. 1993. *Harper's Biochemistry*. 23 rd edition. Preble Hall International Inc. USA
- Sousa, N.M., B. Remy, B. El Amiri, J.R. de Figueiredo, H. Bangamboko, P.B.D. Goncalves and J.F. Beckers. 2002. Characterization of Pregnancy Associated Substances Extracted from Zebu (*Bos indicus*) Placental Removed at Different Gestational Periods. *Reprod.Nutr.Dev.* 42, 227-241.
- Sudardjad S. 2005. *Operasional Program Terobosan Menuju Kecukupan Daging Sapi 2005*. Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Toelihere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Temak*. Penerbit Angkasa bandung.

- Transom, G. 2001. Early Pregnancy Factor (EPF)-Background and Prospects. Research Report, Cbio Limited. pp. 1-9
- Vandaele L, S Verberckmoes, S De Cat, B El Amiri, J Sulon, L Duchateau, A Van Soom and JF Beckers. 2004. 141 effect of number of lambs, their sex and birth weight on ovine pregnancy-associated substances (ov PAS) concentrations. *Reproduction, Fertility and Development* 16(2): 192-193
- Wide L. 1962. An Immunological Method for the Assay of Human Chorionic Gonadotrophin. *Acta Endocrinologica. Supplement 70. Periodica. Copenhagen.*
- Wilson, S., R. McCarthy and F.M. Clarke. 1983. In Search of Early Pregnancy Factors. Isolation of Active Polypeptides from Pregnant Ewe's Sera. *J. Reprod. Immunol.* 5:275—286
- Xie SC, BG Low, RJ Nagel, KK Kramer, RV Anthony, AP Zoli, JF Beckers and RM Roberts. 1991. Identification on the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10247-10251

Lampiran 1. Optical Density (OD) dari Antibodi PAS Serum Darah Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS

Kambing	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	K
1	0,202	0,333	0,555	0,325	0,195	0,260	0,340	0,590	0,355	0,212	0,057
2	0,198	0,321	0,551	0,316	0,190	0,248	0,337	0,583	0,349	0,207	0,036
3	0,189	0,323	0,540	0,309	0,187	0,245	0,333	0,580	0,346	0,204	0,056
4	0,200	0,331	0,553	0,320	0,194	0,255	0,336	0,586	0,353	0,210	0,037
5	0,199	0,314	0,547	0,318	0,191	0,252	0,330	0,585	0,350	0,209	0,033
6	0,196	0,310	0,542	0,315	0,188	0,248	0,327	0,582	0,348	0,208	0,042
Rata-Rata	0,196	0,322	0,548	0,317	0,190	0,251	0,334	0,584	0,350	0,208	0,0435 ± 0,0105

Pengenceran 1:10

Keterangan :

- B-1 : Minggu pertama setelah *boosier* pertama
- B-2 : Minggu kedua *booster* pertama
- B-3 : Minggu ketiga setelah *booster* pertama
- B-4 : Minggu keempat setelah *booster* pertama
- B-5 : Minggu kelima setelah *booster* pertama
Penyunikan *booster* kedua
- B-6 : Minggu pertama setelah *booster* kedua
- B-7 : Minggu kedua setelah *booster* kedua
- B-8 : Minggu ketiga setelah *booster* kedua
- B-9 : Minggu keempat setelah *booster* kedua
- B-10 : Minggu kelima setelah *booster* kedua

Lampiran 2. Titer Antibodi PAS ($\mu\text{g/ml}$) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PAS

Kambing	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1	60,71	247,86	565,00	236,43	50,71	143,57	257,86	615,00	279,29	75,00
2	55,00	230,71	559,29	223,57	43,57	126,43	253,57	605,00	270,71	67,86
3	42,14	233,57	543,57	213,57	39,29	122,14	247,86	600,71	266,43	63,57
4	57,86	245,00	562,14	229,29	49,29	136,43	252,14	609,29	276,43	72,14
5	56,43	220,71	553,57	226,43	45,00	132,14	243,57	607,86	272,14	70,71
6	43,57	215,00	546,43	222,14	40,71	126,43	239,29	603,57	269,29	69,29
Rata- Rata	52,62	232,14	555,00	225,24	44,76	131,19	249,05	606,91	272,38	69,76

Lampiran 3. Kadar Progesteron Serum Darah Sapi Perah Hari ke 21 Pasca Inseminasi

No	Absorbansi	Kadar Progesteron (ng/ml)	Keteangan
1	0,257	4,02	Kadar Progesteron sapi bunting : >1 ng/ml
2	0,272	3,69	
3	2,382	0,80	
4	2,435	0,62	
5	2,397	0,47	
6	0,267	3,80	
7	0,254	4,09	
8	0,307	2,91	
9	0,341	2,16	
10	2,377	0,91	
11	2,440	0,51	
12	2,452	0,24	
13	0,369	1,53	
14	0,371	1,49	
15	2,391	0,60	
16	2,435	0,62	
17	2,426	0,82	
18	0,405	5,73	
19	0,405	5,73	
20	0,375	1,40	
21	2,382	0,80	
22	2,381	0,82	
23	2,080	3,51	
24	2,386	0,71	
25	0,406	5,71	
26	0,382	1,24	
27	0,376	1,38	
28	0,466	4,38	
29	2,466	0,93	
30	1,870	1,18	
31	2,428	0,78	
32	2,415	0,07	
33	0,414	5,53	
34	0,367	1,58	
35	0,365	1,62	
36	2,381	0,82	
37	0,395	5,96	
38	0,402	5,40	
39	0,404	5,76	

40	0,387	1,13
41	2,426	0,82
42	0,406	5,71
43	0,387	1,13
44	0,396	5,93
45	0,391	1,04
46	0,403	5,78
47	0,408	5,67
48	2,466	0,93
49	0,397	5,91
50	0,399	5,87
51	0,398	5,89
52	0,350	1,96
53	0,351	1,93
54	0,352	1,91
55	0,363	1,67
56	0,369	1,53
57	0,369	1,53
58	0,378	1,33
59	2,387	0,69
60	2,395	0,51
61	2,400	0,40
62	0,384	1,20
63	2,403	0,33
64	0,387	1,13
65	0,395	5,96
66	2,402	0,36
67	0,377	1,36
68	0,365	1,62
69	0,383	1,22
70	0,392	1,02
71	0,396	5,93
72	2,000	1,29
73	2,417	0,02
74	2,427	0,80
75	0,416	5,49
76	0,417	5,47
77	0,390	1,07
78	0,399	5,87
79	2,390	0,62
80	2,404	0,31
81	2,386	0,71
82	0,429	5,20
83	0,408	5,67

84	0,399	5,87
85	2,120	1,62
86	2,393	0,56
87	2,422	0,91
88	0,362	5,69
89	0,371	1,49
90	0,381	1,27
91	0,392	1,02
92	0,385	1,18
93	2,405	0,29
94	0,360	1,73
95	0,375	1,40
96	2,428	0,78
97	2,397	0,47
98	2,405	0,29
99	2,412	0,13
100	2,427	0,80

Lampiran 4. Kadar Protein PAS, Progesteron dan Pemeriksaan Palpasi Rektal Sapi Perah

Kambing	Uji Kebuntingan			
	Protein PAS ($\mu\text{g/ml}$)		Progesteron (ng/ml)	Palpasi Rektal
	14 hari Pasca IB	21 hari Pasca IB	21 hari Pasca IB	90 hari Pasca IB
1	-	370,375	4,02	+
2	-	350,375	3,69	+
3	-	-	0,80	+
4	-	-	0,62	+
5	-	340,375	0,47	+
6	140,375	377,875	3,80	+
7	147,875	387,875	4,09	+
8	137,875	400,375	2,91	+
9	120,375	372,875	2,16	+
10	-	-	0,91	-
11	-	-	0,51	-
12	-	-	0,24	-
13	-	447,875	1,53	+
14	-	477,875	1,49	+
15	-	-	0,60	-
16	-	-	0,62	-
17	117,875	320,375	0,82	+
18	127,875	385,375	5,73	+
19	137,875	507,875	5,73	+
20	-	420,375	1,40	+
21	-	-	0,80	-
22	-	-	0,82	-
23	-	-	3,51	-
24	-	-	0,71	-
25	97,875	327,875	5,71	+
26	95,375	340,375	1,24	+
27	102,875	410,375	1,38	-
28	107,875	557,875	4,38	+
29	-	-	0,93	-
30	-	-	1,18	-
31	-	-	0,78	-
32	-	-	0,07	-
33	122,875	337,875	5,53	+
34	-	327,875	1,58	+
35	-	322,875	1,62	+
36	-	-	0,82	-

37	-	365,375	5,96	-
38	-	445,375	5,40	+
39	-	345,375	5,76	+
40	-	322,875	1,13	+
41	-	-	0,82	-
42	-	330,375	5,71	+
43	-	320,375	1,13	+
44	-	360,375	5,93	+
45	-	387,875	1,04	+
46	-	365,375	5,78	+
47	-	377,875	5,67	+
48	-	-	0,93	-
49	105,375	362,875	5,91	+
50	100,375	332,875	5,87	+
51	107,875	357,875	5,89	+
52	-	347,875	1,96	+
53	-	400,375	1,93	+
54	-	330,375	1,91	+
55	-	355,375	1,67	+
56	-	342,875	1,53	+
57	-	350,375	1,53	+
58	107,875	352,875	1,33	+
59	-	-	0,69	-
60	-	-	0,51	-
61	-	-	0,40	-
62	110,375	380,375	1,20	+
63	-	-	0,33	-
64	117,875	337,875	1,13	+
65	112,875	335,375	5,96	+
66	-	-	0,36	-
67	-	327,875	1,36	+
68	-	355,375	1,62	+
69	97,875	345,375	1,22	+
70	102,875	332,875	1,02	+
71	-	322,875	5,93	+
72	102,875	380,375	1,29	-
73	-	-	0,02	-
74	-	-	0,80	-
75	112,875	342,875	5,49	+
76	105,375	377,875	5,47	+
77	120,375	457,875	1,07	+
78	110,375	467,875	5,87	+
79	-	-	0,62	-
80	-	-	0,31	-

81	-	-	0,71	-
82	-	412,875	5,20	+
83	-	380,375	5,67	+
84	-	375,375	5,87	+
85	-	-	1,62	-
86	-	-	0,56	-
87	-	-	0,91	-
88	-	370,375	5,69	+
89	-	375,375	1,49	+
90	100,375	345,375	1,27	+
91	-	322,875	1,02	+
92	-	372,875	1,18	+
93	-	-	0,29	-
94	-	330,375	1,73	+
95	-	335,375	1,40	+
96	-	-	0,78	-
97	-	-	0,47	-
98	-	-	0,29	-
99	-	-	0,13	-
100	-	-	0,80	-



