



LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

KAJIAN ANTIBODI HASIL INDUKSI EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF) SEBAGAI BAHAN ANTIFERTILITAS

Oleh:

**Dr. Drh. Pudji Sianto, M.Kes,
Drh. Erma Safitri
Drh. Abdul Samik, M.Si.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005
Nomor Urut : 6.

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005

- ANTIFERTILITY VACCINES
- PREGNANCY PROTEINS



LAPORAN PENELITIAN ILMU DASAR
TAHUN ANGGARAN 2005

KAJIAN ANTIBODI HASIL INDUKSI EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF) SEBAGAI BAHAN ANTIFERTILITAS

KKC
KK
Ap. 17/08
Sri
K

Oleh:

Dr. Drh. Pudji Sianto, M.Kes,
Drh. Erma Safitri
Drh. Abdul Samik, M.Si.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat

Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005

Nomor Urut : 6.

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DASAR**

1. a. Judul Penelitian
KAJIAN ANTIBODI HASIL INDUKSI EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF)
SEBAGAI BAHAN ANTIFERTILITAS
- b. Macam Penelitian : (V) Fundamental () Terapan () Pengembangan
- c. Katagori Penelitian : I / II / III
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap : Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. Pangkat/Gol/Nip : Lektor / IV-a / 131 570 349
- d. Jabatan sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas : Kedokteran Hewan
- f. Universitas : Airlangga
- g. Bidang Ilmu yg diteliti : Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : Tiga (3) orang
4. Lokasi Penelitian : Fakultas Kedokteran Hewan
5. Kerjasama dengan Instansi lain
- a. Nama Instansi : -
- b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : enam (6) bulan
7. Biaya yang Diperlukan : Rp. 15.000.000,-
(Lima belas juta rupiah)

Surabaya,

Mengetahui:

Dekan,
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga,

Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS.

NIP. 130 687 297

Ketua Peneliti,

Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh.

NIP. 131 570 349

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., drh.

NIP. 130 701 125

RINGKASAN**KAJIAN ANTIBODI HASIL INDUKSI EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF)
SEBAGAI BAHAN ANTIFERTILITAS**

(Pudji Srianto, Erma Safitri, Abdul Samik, 2005. 40 Halaman)

Teknologi sebagai alat dalam bidang peternakan merupakan hal yang mutlak diperlukan dalam rangka menyediakan protein hewan penyempang dengan pertambahan penduduk yang semakin meningkat. *Early Pregnancy Factor* (EPF) merupakan protein yang dihasilkan oleh induk hewan yang bunting sebagai respon imun terhadap terjadinya kebuntingan, akibatnya kejadian biologis seperti birahi dan ovulasi tidak lagi terjadi.

Anti-EPF dapat dibuat dengan cara memberikan EPF berulang pada kelinci jantan dalam pelarut Freund's komplit dan inkomplit. Anti-EPF yang diperoleh di uji keberadaannya secara kualitatif dengan menggunakan metode *dot blot* dan *western blot*, sedangkan uji kuantitatif untuk mengetahui jumlah anti-EPF dilakukan dengan uji Elisa.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi EPF dari serum mencit yang bunting, membuat anti-EPF dari kelinci jantan serta menguji biopotensi anti-EPF dalam menghambat proses implantasi pada mencit.

Dua puluh tujuh ekor mencit betina digunakan dalam penelitian untuk mengidentifikasi dan mengisolasi EPF, enam ekor kelinci lokal jantan digunakan untuk memproduksi anti-EPF dan dua puluh tujuh ekor mencit betina dibutuhkan untuk uji biopotensi anti-EPF sebagai antifertilitas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi darah mencit secara intra kardial yang berhasil menjadi serum sekitar 55% dan kurang dari 30% nya berhasil diisolasi menjadi isolat protein pada 180 kD dengan menggunakan teknik SDS-PAGE. Selanjutnya umur kebuntingan mencit dapat diketahui dari gambaran uterus mencit pasca bedah. Anti-EPF dapat dibuat dengan melakukan imunisasi EPF pada kelinci jantan dalam ajuvan Freund's dan antibodi yang timbul dapat diketahui dan diukur titernya dengan menggunakan teknik *dot blot* dan metode Elisa tidak langsung. Anti-EPF

sebagai agen antifertilitas dapat menurunkan jumlah anak sekelahiran sebesar 20 – 35 %.

Disarankan agar anti-EPF dapat digunakan sebagai agen antifertilitas yang efektif perlu mendapatkan perhatian tentang masalah dosis, aplikasi dan waktu pemberian.

SUMMARY

THE STUDY OF ANTIBODY RESULT OF INDUCTION EARLY PREGNANCY FACTOR UPON WHICH ANTIFERTILITY

Pudji Srianto, Erma Safitri, Abdul Samik
Departement of Reproduction & Gynecology Veteriner
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

Early Pregnancy Factor (EPF) represent the protein yielded by pregnant animal mains as immuned respon to the happening of pregnant, as a result occurence biological of like lechery and ovulation shall no longer be happened.

Anti Early Pregnancy Factor can be made by giving recuring EPF at masculine hare in Freund's complete adjuvant and incomplete as a booster. Anti Early Pregnancy Factor obtained its existence test qualitative by using method of dot blot, while quantitative test using indirect Elisa.

This research conducted as a mean to identify and insulation EPF from pregnant serum mice, making anti Early Pregnancy Factor from masculine hare and also test the biopotential anti Early Pregnancy Factor in pursuing process implantasi of mice.

Twenty seven female of mice used in research to identify and insulation Early Pregnancy Factor, six used masculine local hare to produced anti Early Pregnancy Factor and twenty seven required female mice to test the biopotential of anti Early Pregnancy Factor as antifertility.

Result of research indicate that the insulation of blood mice intracardially were success become the sera about 55% and less than 30% its succeed the insulation become the isolat protein of 180 kD by using technique SDS-PAGE. Hereinafter pregnant age knowable mice from pictured of uterus mice. The Anti Early Pregnancy Factor can be made by conducting to immunized the EPF of masculine hare in ajuvan Freund'S and knowable arising out antibody and measured by using technique of dot blot. and indirect method of Elisa. Anti Early Pregnancy Factor as agent antifertility can degrade the amount of birth equal to 20 - 35 %.

Suggested that anti Early Pregnancy Factor served the purpose of effective agent antifertility requiredt the attention about problem of dose, application and giving the time.

KATA PENGANTAR

Kemajuan teknologi reproduksi di bidang peternakan ternyata tidak saja bermanfaat terhadap peningkatan populasi ternak, akan tetapi juga bermanfaat terhadap pengembangan vaksin kontrasepsi yang bertujuan untuk membatasi populasi ternak.

Early Pregnancy Factor (EPF) yang pertamakali ditemukan sebagai *Pregnancy Associated Substance* ditemukan pada semua spesies setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan.

Keberadaan EPF yang merupakan antigen khusus merupakan respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan, kondisi inilah yang dipakai sebagai dasar dalam penelitian ini untuk mengembangkan anti-EPF sebagai bahan antifertilitas.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga masukan berupa kritik dan saran sangatlah kami harapkan demi sempurnanya laporan ini.

Harapan kami, penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya yang berkaitan dengan bidang reproduksi.

Surabaya, Desember 2005.

Penulis.

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I . P E N D A H U L U A N	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis Penelitian	4
BAB II . TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Biologi Reproduksi Mencit Betina	5
2.2. Early Pregnancy Factor	7
2.3. Anti- Early Pregnancy Factor.....	8
2.4. Kontrasepsi dan Imunokontrasepsi	9
2.5. Immunobloting dan ELISA tidak langsung	10
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
3.1. Tujuan Penelitian	13
3.2. Manfaat penelitian	13
BAB IV. METODE PENELITIAN	14
4.1. Isolasi dan Karakterisasi EPF	14
4.2. Pembuatan Anti-EPF	15
4.3. Uji Biopotensi Anti-EPF sebagai Antifertilitas	16
BAB V . HASIL DAN PEMBAHASAN	21
5.1. Isolasi dan Karakterisasi EPF.....	21
5.2. Pembuatan Anti-EPF.....	24
5.3. Uji Biopotensi Anti-EPF sebagai Antifertilitas....	28
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	31
6.1. Kesimpulan	31
6.2. S a r a n	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

TABEL

5.1.	Jumlah darah, jumlah serum dan total isolat protein.....	21
5.2.	Jumlah isolat EPF dengan BM 180 kD dari ketiga perlakuan .	24
5.3.	Rataan dan simpangan baku jumlah anak mencit sekelahiran... pada perlakuan kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III	28

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR

2.1.	Imunodeteksi pada Membran dengan antigen terperangkap.....	11
2.2.	Skema ELISA tidak langsung	12
4.1.	Kerangka Operasional 1.....	18
4.2.	Kerangka Operasional 2.....	19
4.3.	Kerangka Operasional 3.....	20
5.1.	Uterus mencit pada umur kebuntingan 5,10 dan 15 hari	23
5.2.	Hasil running protein ketiga serum perlakuan pada SDS-PAGE...	24
5.3.	Hasil dot blot dari 24 kali perngambilan darah.....	25
5.4.	Nilai titer antibodi perlakuan P, Q dan R yang dibaca pada panjang gelombang 405 nm.....	27
5.5.	Menghitung Jumlah Anak Sekelahiran Pada Kelompok Perlakuan	29

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN

1. Isolasi Protein dengan SDS-PAGE	35
2. Metode elektroelusi untuk protein dengan BM 180 kD	36
3. Program imunisasi pada kelinci jantan	37
4. Kegiatan pengambilan darah pada kelinci	38
5. Jumlah darah dan jumlah serum yang berhasil diperoleh.....	39
6. Titer antibodi	40
7. Jumlah anak sekelahiran	41

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teknologi sebagai alat dalam bidang peternakan merupakan hal yang mutlak diperlukan, perkembangan teknologi mendasari berbagai upaya peningkatan produksi peternakan yang pada dasarnya ditujukan untuk permenuhan kebutuhan masyarakat akan protein hewan.

Upaya peningkatan produktifitas dan reproduktifitas ternak terus digalakkan sementara itu masalah kependudukan merupakan masalah serius yang harus mendapatkan perhatian, oleh karena sangat terkait dengan penyediaan bahan makanan, pakaian dan tempat tinggal. Kegagalan penanganan masalah kependudukan dapat menimbulkan problem sosial, kelestarian sumber daya alam dan lingkungan hidup (Mustofa,2005)

Dalam dunia kedokteran hewan, penggunaan metoda kontrasepsi dan sterilisasi pada hewan lebih sering ditujukan pada hewan peliharaan seperti anjing dan kucing untuk membatasi populasinya agar tidak melebihi suatu jumlah yang dianggap dapat mengganggu manusia. Metode kontrasepsi yang digunakan adalah penggunaan preparat hormonal, sedangkan metode sterilisasi yang digunakan adalah kastrasi, vasektomi dan ovariohisterektomi (Ismudiono,1999).

Pengendalian populasi hewan dengan menggunakan metode kontrasepsi telah lama dilakukan dengan tujuan untuk menurunkan populasi satwa liar atau hewan piaraan juga dimaksudkan untuk mencegah penyebaran penyakit zoonosis.



Paterson *et al* (2002) menyebutkan bahwa imunokontrasepsi di masa mendatang akan menjadi suplemen yang penting pada program Keluarga Berencana, sebab mempunyai spesifisitas yang tinggi dan memiliki efek samping yang rendah, harga lebih murah dan pemakaiannya tidak sesering preparat kontrasepsi hormonal.

Hancock (1984) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa fertilitas pada mencit betina akan menurun dengan imunisasi menggunakan spermatozoa, selanjutnya disebutkan pula bahwa dalam penelitiannya dengan menggunakan kelinci dan mencit sebagai model menunjukkan bahwa antibodi akan terbentuk setelah penyuntikan antigen sperma, dan imunisasi dengan menggunakan spermatozoa memperlihatkan penurunan terhadap fertilitas hewan jantan maupun hewan betina.

Early Pregnancy Factor (EPF) pertama kali ditemukan sebagai *Pregnancy Associated Substance* dan dapat dideteksi pada 6 – 24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba (Cavanagh, 1996). Selanjutnya DuPlants (2000) menyebutkan bahwa EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada didalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus.

Knobil *et al.* (1988) mengindikasikan bahwa terdapat signal sistemik yang berasal dari masa embrional yang berhubungan dengan pengenalan maternal pada kebuntingan, dikenal *Early Pregnancy Factor* (EPF) implantasi. EPF pada bentuk awal merupakan sebuah molekul besar dan pada tikus berat molekulnya 180.000 Dalton.

Protein yang terbentuk pada saat kebuntingan yang berupa protein EPF ini berpotensi sebagai antigen yang dapat memproduksi anti-EPF berdasarkan berat jenis yang dimilikinya.

Goer (1993) menyatakan bahwa untuk mendeteksi keberadaan antigen dapat digunakan metode *immunoblotting* sedangkan Dunbar (1994) menyebutkan bahwa keberadaan substansi protein yang diberikan secara eksogen umumnya dapat dideteksi dengan menggunakan metoda *enzyme linked immunosorbence assay* (ELISA) dengan menggunakan anti hormon atau anti protein sebagai antibodi primer.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

1. Apakah *Early Pregnancy Factor* dapat di isolasi dan di karakterisasi dari serum darah mencit pada berbagai umur kebuntingan ?
2. Apakah imunisasi dengan isolat *Early Pregnancy Factor* pada kelinci lokal jantan dapat menimbulkan antibodi poliklonal *Early Pregnancy Factor* ?
3. Apakah uji potensi anti-*Early Pregnancy Factor* pada mencit betina dapat dipakai sebagai alternatif bahan bioaktif untuk antifertilitas ?

1.3. Hipotesis Penelitian

1. *Early Pregnancy Factor* dapat di isolasi dan di karakterisasi dari serum darah mencit pada berbagai umur kebuntingan
2. Imunisasi dengan isolat *Early Pregnancy Factor* pada kelinci lokal jantan dapat menimbulkan antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor*
3. Antibodi poliklonal *Early Pregnancy Factor* dapat digunakan sebagai alternatif bahan bioaktif untuk antifertilitas

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biologi Reproduksi Mencit Betina

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan coba yang paling banyak dipakai untuk penelitian, oleh karena memiliki berbagai kelebihan dari pada hewan coba lainnya dalam hal ukuran yang kecil, peka terhadap pemberian obat serta siklus reproduksinya yang relatif lebih pendek dibandingkan dengan mamalia lainnya (Smith dan Mangkuwidjojo, 1988).

Mencit (*Mus musculus*) betina merupakan hewan yang poliestrus, artinya dalam satu tahun mengalami beberapa kali siklus birahi, Pubertas mencit dicapai pada usia enam minggu, tergantung pada strain dan lingkungannya (Hogan *et al.*, 1986).

Partodihardjo (1992) menyebutkan bahwa sistem reproduksi hewan betina pada mencit dibagi menjadi alat kelamin primer yaitu ovarium dan alat kelamin sekunder yang merupakan saluran reproduksi hewan betina yang terdiri dari infundibulum, tuba fallopii, uterus, serviks dan vagina serta alat kelamin luar yaitu vulva yang terdiri atas klitoris, labia mayora, dan labia minora. Selanjutnya disebutkan pula bahwa tipe uterus pada mencit adalah tipe uterus dupleks.

Franson (1996) menyebutkan bahwa siklus birahi adalah periode antara satu birahi dengan birahi berikutnya dan pada umumnya terjadi secara teratur selama musim kawin. Siklus birahinya biasanya berlangsung selama 4-6 hari.

Hafez (2000) menyebutkan bahwa secara umum siklus birahi mencit terbagi menjadi empat fase yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Selanjutnya disebutkan pula bahwa fase-fase tersebut ditandai oleh :

Fase proestrus, terjadinya perubahan tingkah laku mencit yang mulai mau menerima pejantan walaupun belum melakukan kopulasi. Fase ini disebut juga sebagai fase persiapan yang ditandai dengan folikel yang membesar serta vulva yang sedikit membengkak, pada sediaan ulas vagina nampak adanya sel-sel epitel berinti berbentuk koma yang panjang, lama fase ini kurang lebih 12 jam.

Fase estrus, adalah fase terpenting dalam siklus birahi, ditandai dengan keinginan untuk menerima pejantan, folikel membesar dan mengalami pematangan, vulva bengkak. Pada preparat ulas vagina terlihat adanya sel-sel epitel yang telah mengalami kornifikasi. Fase ini berlangsung kurang lebih 12 jam.

Fase metestrus, ditandai dengan vulva yang masih agak membengkak, adanya masa perkejuan dalam vagina. Pada preparat ulas vagina terlihat adanya leukosit dan masih ada beberapa sel epitel yang mengalami kornifikasi. Mencit betina sudah tidak mau menerima pejantan. Fase ini berlangsung kurang dari 12 jam.

Fase diestrus, merupakan fase terpanjang (60 – 70 jam), fase ini ditandai dengan tidak adanya pembengkakan vulva dan pada preparat ulas vagina terlihat sel-sel epitel dan sel sel lekosit pada saat ini mencit betina tidak mau berhubungan dengan mencit jantan.

Nalbandov (1990) menyebutkan bahwa mencit merupakan hewan mamalia yang mempunyai ovulasi spontan, dimana ovulasi disebabkan oleh stimulasi hormon luteinizing. Sedangkan fertilisasi adalah proses penyatuan dua sel yaitu sel jantan (spermatozoa) dan sel betina (ovum) sehingga terjadi sel-sel baru yang bersifat diploid. Tempat fertilisasi terdapat pada bagian dari ampulla tuba fallopii (Hafez,2000). Selanjutnya Smith dan Mangkoewidjojo (1988) menyebutkan bahwa umur kebuntingan mencit biasanya berkisar antara 19 sampai 21 hari. Proses kelahiran biasanya berlangsung antara 1 – 3,5 jam dengan jumlah anak sekelahiran 4 – 8 ekor.

2.2 Early Pregnancy Factor

Knobil *et al.* (1988) mengindikasikan bahwa terdapat signal sistemik yang berasal dari masa embrional yang berhubungan dengan pengenalan maternal pada kebuntingan, dikenal *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang telah diobservasi pada limfosit dari tikus yang bunting, dimana aktivitasnya berkurang pada *rosset inhibition test* dengan sebuah anti limfosit serum dibandingkan dengan substansi yang sama pada hewan yang tidak bunting. Selanjutnya disebutkan pula bahwa terdapat dua tipe EPF yang muncul dengan karakteristik waktu pada saat kebuntingan yaitu pada pra dan pasca implantasi. EPF pada bentuk awal merupakan sebuah molekul besar dan pada tikus berat molekulnya 180.000 Dalton.

Early Pregnancy Factor merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan dalam darah kambing mulai umur kebuntingan tujuh hari (Clarke *et al.*, 1978). Berat molekul EPF pada kambing berkisar 250 kD dan

digolongkan menjadi dua yaitu EPF-A dan EPF-B, selanjutnya disebutkan pula bahwa aktivitas EPF akan menghilang jika terpisah.

El Amiri *et al.*, (2000) mengemukakan bahwa lapisan superfisial dari tropoderm ruminansia memproduksi *pregnancy associated glycoproteins* (PAGs) yang merupakan protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaannya dikaitkan dengan kebuntingan dini.

2.3 Anti- Early Pregnancy Factor

Austyn and Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk membuat antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi dari antigen yang diberikan.

Antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang teraktivasi oleh antigen. Berat molekul antibodi sekitar 150.000 Da sampai dengan 950.000 Da dan tergantung pada kelas imunoglobulinnya (Rantam, 2003).

Menurut Baratawidjaja (1998) antigen merupakan suatu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun, sedangkan imunogen adalah suatu bahan atau molekul yang dapat menimbulkan respon imun humoral atau seluler. Pada umumnya imunogen adalah juga antigen meskipun tidak selalu demikian.

Artama (1992) menyebutkan bahwa bersamaan dengan masuknya antigen ke dalam tubuh, maka perangkat imun akan memberikan respon berupa suatu kaskade reaksi yang terkenal dengan sentral imunologi dogma. Selanjutnya disebutkan pula bahwa sesuai dengan banyaknya antigen

determinan, maka suatu antigen akan menstimulasi sejumlah limfosit B yang mempunyai reseptor sesuai dengan epitop yang akan berproliferasi menghasilkan antibodi spesifik.

Wier (1990) menyebutkan bahwa protein gamaglobulin dengan aktivitas antibodi disebut dengan imunoglobulin, semua molekul imunoglobulin mempunyai struktur umum yang sama yaitu terdiri dari empat rantai polipeptida, dua rantai besar atau rantai berat dan dua rantai kecil atau rantai ringan. Selanjutnya disebutkan pula bahwa perbedaan dari masing-masing imunoglobulin tergantung pada rantai beratnya.

Pada dasarnya antibodi merupakan gama globulin yang disebut sebagai imunoglobulin atau biasa disingkat Ig dan merupakan 20% dari seluruh plasma protein dan secara umum Ig digolongkan dalam lima golongan, masing-masing diberi nama IgM, IgG, IgA, IgD dan IgE (Subowo, 1993). Imunoglobulin dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang dibentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis (Baratawidjaja, 1998). Antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap suatu antigen harus mempunyai ciri-ciri struktur yang berbeda dengan antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap antigen lain (Bellanti, 1998).

2.4 Kontrasepsi dan Imunokontrasepsi

Kontrasepsi berasal dari kata kontra dan konsepsi. Kontra berarti mencegah atau melawan, sedangkan konsepsi adalah pertemuan sel telur yang matang dengan sel spermatozoa yang akan menyebabkan kehamilan.

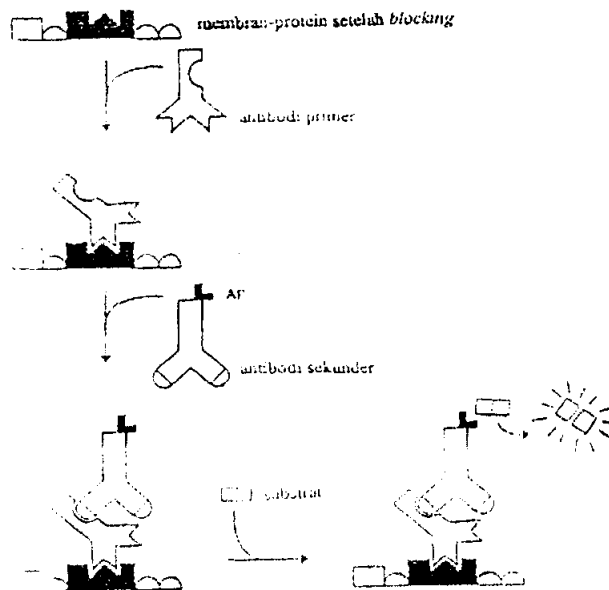
Kontrasepsi dapat dipakai untuk menunda kehamilan, menjarangkan kehamilan dan menghentikan kesuburan (Pabbadja, 1992).

Imunokontrasepsi merupakan kontrasepsi yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigen yang bertujuan dapat mencegah konsepsi. Kandidat antigen spesifik yang telah diidentifikasi untuk imunokontrasepsi adalah antigen sperma, antigen zona pellusida dan antigen oosit (Feng *et al.*, 1999).

Prinsip dasar vaksin kontrasepsi adalah menggunakan mekanisme pertahanan imun tubuh untuk menghasilkan perlindungan terhadap kehamilan atau kebuntingan yang tidak direncanakan. Tujuan utama pengembangan vaksin kontrasepsi adalah membuat imunisasi aktif terhadap sperma, ovum, sigot dan embrio dini.

2. 5 Immunoblotting dan Elisa Tidak Langsung

Salah satu metode immunoblotting yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi adalah metode dotblot, sedangkan untuk mendeteksi adanya protein dapat digunakan metode western blot (Goer, 1993). Pada dot blot antigen diteteskan pada membran nitroselulose dan di inkubasikan dalam antibodi, tanpa adanya pemisahan melalui *sodium dodecyl sulphonad polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) sehingga dot blot hanya mengetahui keberadaan antigen dan tidak memberikan informasi berat molekul.



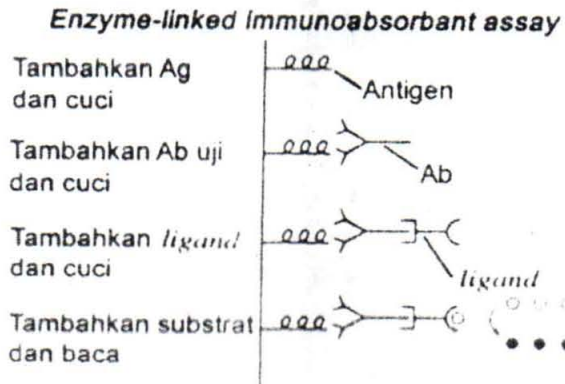
Gambar 2.1 Immunodeteksi pada membran dengan antigen terperangkap
(Sumber : Promega, 1996)

Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlmann pada tahun 1971. dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam immunoassay. Aplikasi dari metoda ini salah satunya adalah dipergunakan untuk mendeteksi antibodi dengan cara menilai absorbennya melalui *optic density* (OD) (Burgess,1995).

ELISA terbagi menjadi dua sistem, yaitu sistem homogen dan heterogen. Sistem heterogen terdapat dalam dua model yaitu, model kompetitif dan model non kompetitif Elisa.

Non kompetitif Elisa adalah sistem yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif dibandingkan dengan model yang lain. Salah satu contoh dari sistem ini adalah metode *indirect* Elisa (Rantam,2003), model ini banyak digunakan di berbagai tingkatan

laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini mudah diperoleh dan model ini tidak memerlukan keahlian khusus.



Gambar 2.2 Skema ELISA Tidak Langsung
(Sumber : Baratawidjaja, 2000)



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi *Early Pregnancy Factor* dari serum darah mencit yang bunting
2. membuat antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* dari kelinci jantan lokal
3. mengkaji biopotensi anti-*Early Pregnancy Factor* pada penghambatan proses implantasi embrio (efek antifertilitas) pada mencit betina

3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan penjelasan tentang kegunaan anti-*Early Pregnancy Factor* sebagai bahan antifertilitas, yang dalam dunia kedokteran hewan dipergunakan untuk membatasi populasi hewan peliharaan atau hewan liar sehingga dalam jumlah tertentu tidak mengganggu manusia.

Manfaat lain dari penelitian ini adalah, dengan dapat diproduksinya anti-EPF dari kelinci, kemungkinan besar anti-EPF ini dapat dimanfaatkan untuk mendiagnosis kebuntingan dini hewan atau ternak.

BAB 4

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dirancang berdasarkan rumusan masalah dan hipotesis yang telah ditentukan yaitu isolasi dan karakterisasi *Early Pregnancy Factor*, pembuatan antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* dan uji biopotensi anti-*Early Pregnancy Factor* sebagai agen antifertilitas.

4.1 Isolasi dan Karakterisasi *Early Pregnancy Factor*

Dua puluh tujuh ekor mencit betina yang telah pubertas (umur sekitar 2-2,5 bulan) disuntik dengan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ pada fase luteal dengan dosis 0,1 ml secara subkutan, enam jam kemudian mencit-mencit tersebut dikelompokkan secara acak menjadi tiga perlakuan (Perlakuan I, Perlakuan II dan Perlakuan III), masing-masing perlakuan mendapatkan sembilan ulangan dan diberi pejantan dengan sistem harem (perbandingan jantan dan betina 1:3).

- Perlakuan I : hari ke-5 setelah dicampur dengan pejantan, semua mencit dilakukan pembiusan dengan cara dimasukkan kedalam gelas erlenmeyer yang telah berisi kapas yang dibasahi dengan eter, setelah terbius, mencit-mencit tersebut diambil darahnya secara intrakardial.
- Perlakuan II : hari ke-10 setelah dicampur dengan pejantan, dilakukan hal yang sama dengan perlakuan I.
- Perlakuan III : hari ke-15 setelah dicampur dengan pejantan, dilakukan hal yang sama dengan perlakuan I.

Darah yang diperoleh dari perlakuan I, II dan III didiamkan sekitar 30 menit, kemudian di sentrifus dan serum yang diperoleh ditaruh dalam tabung Eppendorf dan disimpan dalam lemari es. Kemudian serum dari ketiga perlakuan di isolasi proteinnya didahului dengan purifikasi serum dan selanjutnya di *running* dalam SDS-PAGE (Lampiran 1).

Selanjutnya hasil *running* dari ketiga perlakuan dilakukan elektroelusi dan dialisis (Lampiran 2).

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah darah yang berhasil diambil dari semua kelompok perlakuan, jumlah serum yang berhasil diperoleh, jumlah isolat *Early Pregnancy Factor* yang diperoleh serta gambaran uterus yang bunting pada umur 5 ; 10 dan 15 hari.

4.2 Pembuatan Anti - *Early Pregnancy Factor*

Pembuatan anti-EPF dilakukan dengan menyuntikkan isolat EPF dari ketiga perlakuan pada kelinci jantan lokal. Enam ekor kelinci jantan dibagi menjadi tiga kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari dua ekor.

- Perlakuan I : dua ekor kelinci masing-masing disuntik dengan 100 μ L isolat EPF (dari PI) ditambah dengan 100 μ L *complete freund's adjuvant* secara subkutan.
- Perlakuan II : dua ekor kelinci masing-masing disuntik dengan 100 μ L isolat EPF (dari PII) ditambah dengan 100 μ L *complete freund's adjuvant* secara subkutan.

- Perlakuan III : dua ekor kelinci masing-masing disuntik dengan 100 μ L isolat EPF (dari PIII) ditambah dengan 100 μ L *complete freund's adjuvant* secara subkutan.

Selang dua minggu kemudian, perlakuan I, II dan III disuntik dengan isolat EPF I, II dan III masing-masing sebanyak 100 μ L dan ditambah dengan 100 μ L *incomplete Freund's adjuvant*. Hal ini dilakukan lagi pada empat minggu kemudian (Lampiran 3).

Pengambilan darah dilakukan melalui vena auriculares pada semua kelinci perlakuan (Lampiran 4). Kemudian untuk mengetahui apakah metode imunisasi berulang berhasil menimbulkan antibodi dilakukan uji dot blot (Lampiran 5) pada semua serum hasil pengambilan darah pada minggu ke-0; minggu ke-2; minggu ke-3; minggu ke-4; minggu ke-5; minggu ke-6; minggu ke-7 dan minggu ke-8.

Elisa tidak langsung juga dilakukan terhadap serum dari masing-masing pengambilan darah saat imunisasi untuk mengetahui titer antibodi yang timbul (Lampiran 6)

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ada tidaknya antibodi yang timbul (hasil dot blot) nilai optical density (dari Elisa)

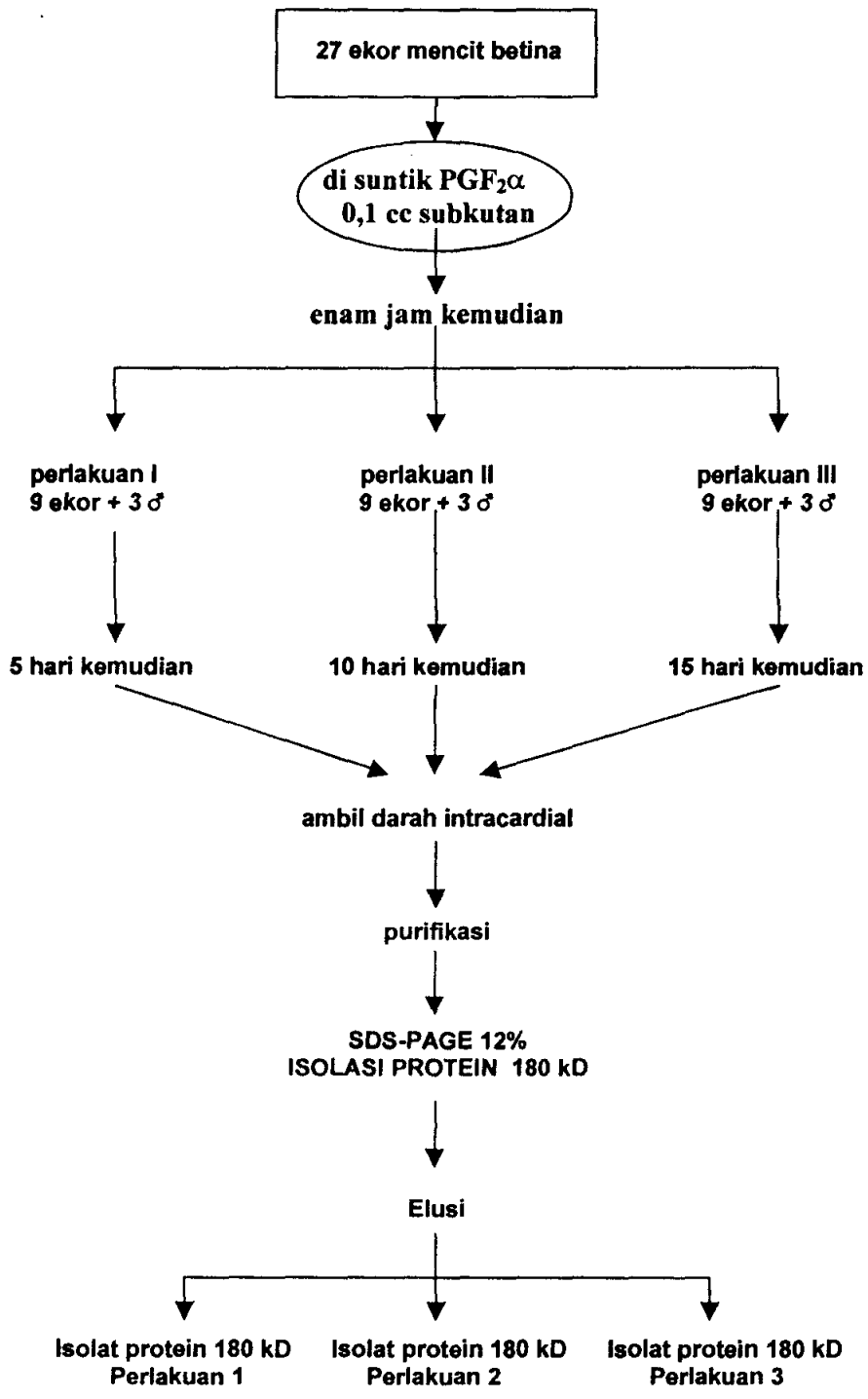
4.3 Uji Biopotensi Anti- *Early Pregnancy Factor* sebagai antifertilitas

Dua puluh tujuh ekor mencit betina yang telah pubertas digunakan untuk uji biopotensi ini. Semua mencit disuntik dengan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ pada fase luteal dengan dosis 0,1 ml/subkutan, enam jam kemudian

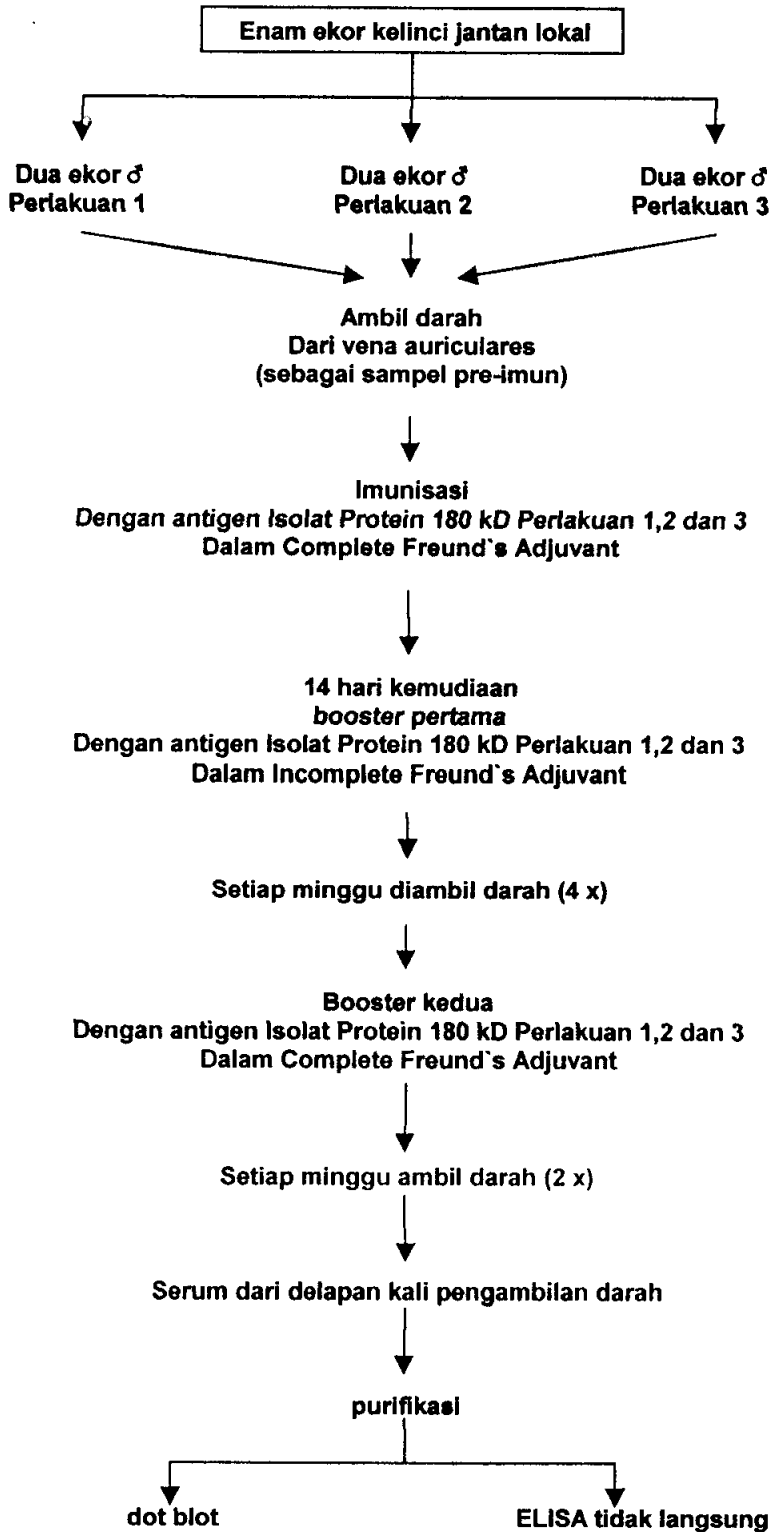
mencit-mencit tersebut dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari sembilan ulangan.

- Perlakuan 0 (kontrol) : sembilan ekor mencit betina disuntik dengan 0,1 ml PBS/subkutan kemudian dicampur dengan pejantan (dengan perbandingan 1:3)
- Perlakuan I : sembilan ekor mencit betina disuntik dengan 0,1 ml anti-EPF hasil imunisasi dengan isolat EPF PI kemudian dicampur dengan pejantan
- Perlakuan II : sembilan ekor mencit betina disuntik dengan 0,1 ml anti-EPF hasil imunisasi dengan isolat EPF PII kemudian dicampur dengan pejantan
- Perlakuan III : sembilan ekor kelinci disuntik dengan 0,1 ml anti-EPF hasil imunisasi dengan isolat EPF PIII kemudian dicampur dengan pejantan

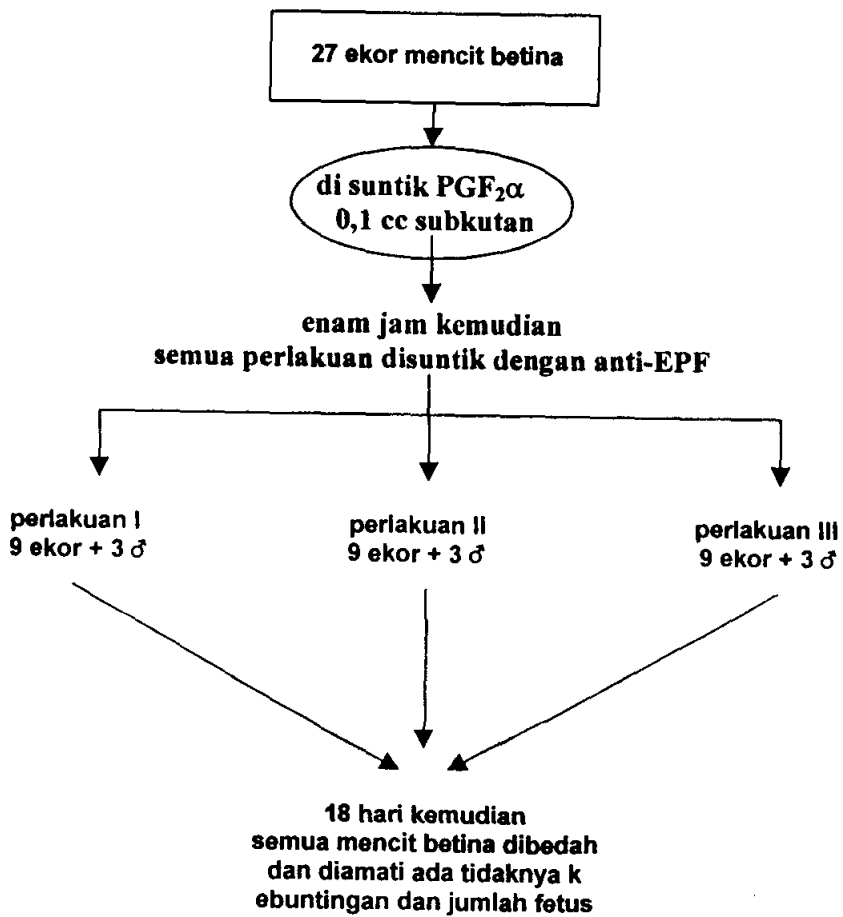
Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah anak sekelahiran yang didapatkan dari perlakuan kontrol ,I,II dan III. Analisis varian dilakukan pada penelitian ini, dan jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie,1995).



Gambar 4.1 Kerangka Operasional I



Gambar 4.2 Kerangka Operasional II



Gambar 4.3. Kerangka Operasional III

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Isolasi dan Karakterisasi *Early Pregnancy Factor*

Tujuan dari isolasi dan karakterisasi EPF adalah untuk mengetahui bahwa serum yang diambil dari mencit bunting 5, 10 dan 15 hari mengandung protein dengan berat molekul 180 kD dan protein 180 kD tersebut adalah EPF.

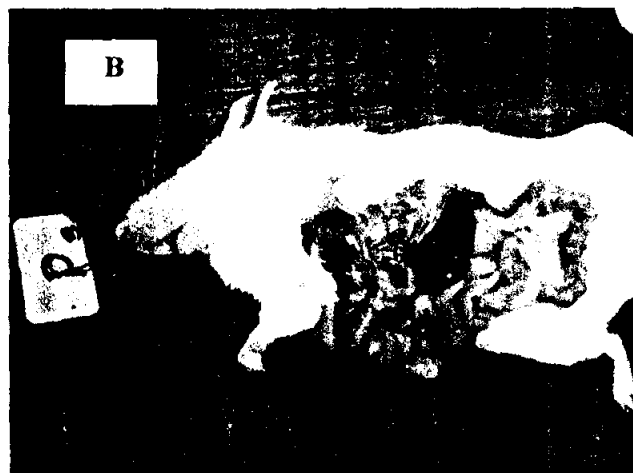
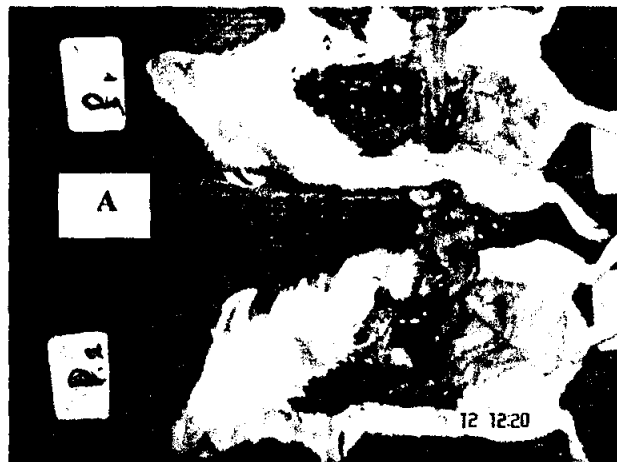
Dua puluh tujuh ekor mencit betina yang telah mencapai usia pubertas digunakan dalam penelitian ini. Mencit-mencit tersebut disuntik dengan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ dan enam jam kemudian dikawinkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:3, kemudian hari ke-5; ke-10 dan hari ke-15 semua mencit dibius dan diambil darahnya secara intra kardial.

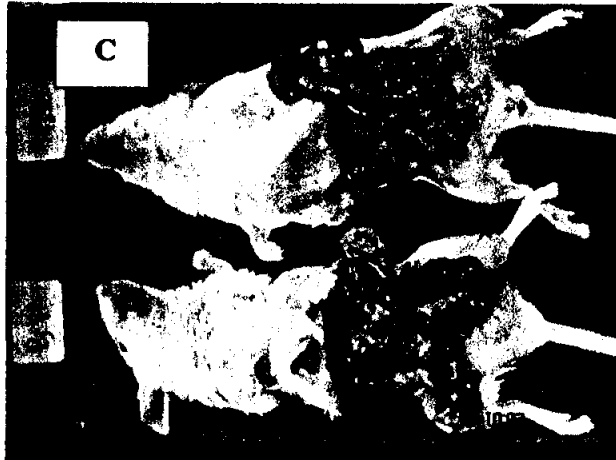
Hasil jumlah darah, jumlah serum dan foto uterus pada umur kebuntingan 5 hari, 10 hari dan 15 hari dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.1 (Lampiran 7).

Tabel 5.1. Jumlah darah, jumlah serum dari mencit-mencit perlakuan

Perlakuan	Total darah (ml)	Total serum (ml)
Bunting lima hari (n=9)	3,9	2,3
Bunting 10 hari (n=9)	4,6	2,9
Bunting 15 hari (n=9)	3,9	2,1

Dari Tabel 5.1 dapat dilihat bahwa total pengambilan darah dari sembilan ekor mencit secara intra kardial diperoleh sebanyak 3,9 ml dengan rata-rata per-ekor sebanyak 0,43 ml sehingga untuk mendapatkan serum dalam jumlah yang banyak, serum darah masing-masing perlakuan dijadikan satu. Beberapa peneliti melakukan pengambilan darah dengan menggunakan metoda intra kardial dengan cara melakukan bedah toraks. Selanjutnya untuk memastikan bahwa serum berasal dari mencit yang bunting umur 5, 10 dan 15 hari dilakukan bedah bangkai untuk melihat uterus mencit.

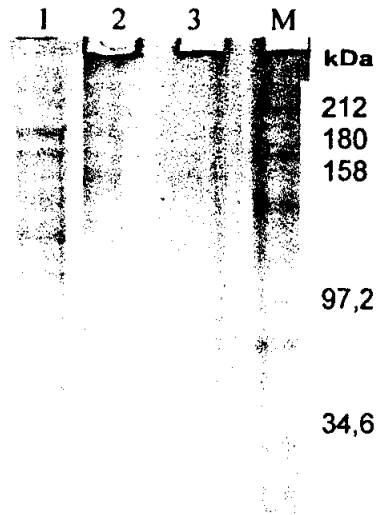




Gambar 5.1 Uterus mencit dengan umur kebuntingan 5(A), 10 (B) dan 15 (C) hari

Dari Gambar 5.1 terlihat bahwa pada umur kebuntingan 5 hari uterus nampak oedematus, belum terlihat adanya fetus, pada kebuntingan umur 10 hari fetus sudah nampak, namun masih kecil dan uterus nampak berlobi, demikian juga dengan umur kebuntingan 15 hari, lobi-lobi pada uterus makin besar dan fetus sudah mulai nampak, hal ini sesuai dengan pendapat Sukra (1981) dan Langman (1975) yang menyebutkan bahwa dengan melihat gambaran uterus mencit bunting dapat dipakai sebagai patokan umur kebuntingan.

Selanjutnya serum darah ketiga perlakuan di *running* dalam SDS-PAGE 12% untuk mendapatkan protein dengan berat molekul 180 kD. Hasil *running* dari ketiga serum perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.2 dibawah ini.



Gambar 5.2. Hasil *running* protein ketiga serum perlakuan pada SDS-PAGE

Hasil *running* protein menunjukkan bahwa pada perlakuan 1 terlihat pita protein dengan BM 180 kD sangat jelas, sedangkan dua perlakuan lain kurang begitu jelas. Jumlah isolat EPF hasil elektroelusi dari ketiga perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Jumlah isolat EPF dengan BM 180 kD dari ketiga perlakuan

Perlakuan	Jumlah Isolat EPF
Umur kebuntingan 5 hari (P)	800 μ L
Umur kebuntingan 10 hari (Q)	500 μ L
Umur kebuntingan 15 hari (R)	600 μ L

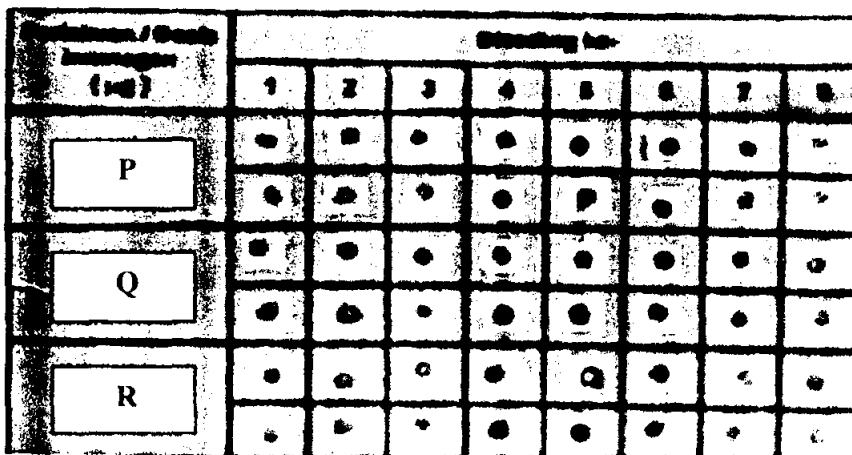
5.2 Pembuatan anti-*Early Pregnancy Factor*

Pembuatan anti-EPF bertujuan untuk membuat antibodi poliklonal terhadap EPF yang akan dipakai sebagai bahan antifertilitas. Kegiatan dalam penelitian tahap ini meliputi imunisasi pada kelinci lokal jantan

dengan menggunakan antigen isolat EPF dengan BM 180 kD kemudian dilanjutkan dengan uji dot blot untuk mengetahui apakah imunisasi yang dilakukan berhasil menimbulkan antibodi. Kemudian baru menghitung secara kuantitatif antibodi yang ditimbulkan dengan menggunakan metode Elisa tidak langsung.

Kelinci jantan yang digunakan sebanyak 6 ekor, masing-masing kelinci mendapatkan imunisasi dengan isolat EPF I, II dan isolat EPF III. Dengan demikian selama proses imunisasi berlangsung telah berhasil didapatkan sebanyak 3 x 8 hasil pengambilan darah.

Pengambilan darah atau *bleeding* dilakukan dengan menggunakan *sprit disposable* 2,5 cc dan darah diambil dari vena auriculares. Serum yang diperoleh kemudian dilakukan purifikasi, selanjutnya dilakukan uji dot blot untuk mengetahui apakah akibat imunisasi timbul antibodi. Hasil dot blot dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Hasil dot blot dari 24 kali pengambilan darah

Dari hasil dot blot (gambar 5.3) dapat dilihat bahwa pada pengambilan darah pertama, yaitu saat sebelum penyuntikan antigen beserta CFA yang

biasa disebut pre-imun, tidak nampak adanya antibodi yang timbul, hal ini juga membuktikan bahwa pre-imun dapat juga dipakai sebagai kontrol, oleh karena saat itu kelinci belum pernah terpapar oleh antigen spesifik sehingga tidak terdapat antibodi spesifik yang timbul.

Hasil dot blot juga menunjukkan bahwa anti-EPF yang dihasilkan pasca induksi EPF dapat mengenali EPF sebagai antigennya. Hal ini menunjukkan bahwa dalam serum darah kelinci telah dihasilkan anti-EPF sebagai respon imun terhadap EPF.

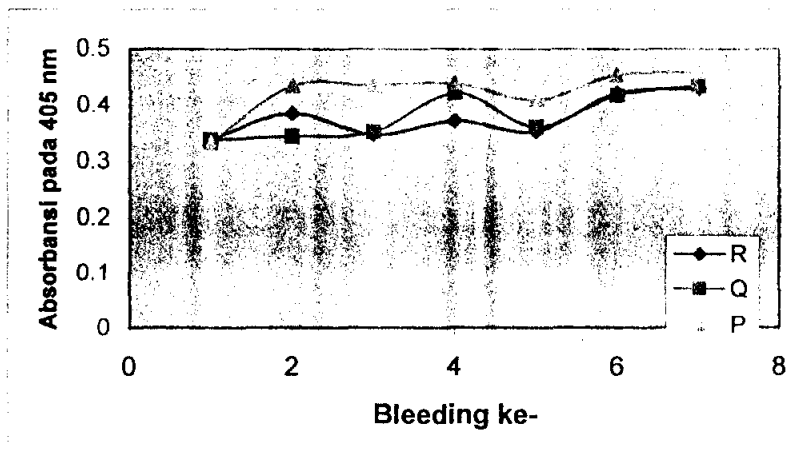
Pada bleeding ke-2 atau saat booster pertama hampir semua perlakuan sudah nampak timbulnya antibodi, dan makin tebal totalan antibodi tersebut sampai dengan bleeding yang ke-6 atau saat booster kedua.

Mekanisme terbentuknya antibodi menurut Austyn dan Wood (1993) adalah sebagai berikut : antigen non spesifik akan masuk kedalam tubuh dan akan dikenali oleh *antigen presenting cell* (APC) yang berikatan dengan sistem *major histocompatibility complex II* (MHC II) dalam hal ini adalah sel denrit yang akan mengaktivasi sel T. Sel T kemudian menjadi aktif dan akan mengeluarkan sitokin (IL-2) yang mengakibatkan sel T *helper* (Th) menjadi aktif. Sel Th inilah yang akan menyebabkan sel B memproduksi IgG dalam plasma.

Rantam (2003) menyebutkan bahwa teknik dot blot sebetulnya bisa digunakan untuk menentukan adanya antibodi secara semikuantitatif, namun demikian sebaiknya titer antibodi diukur dengan menggunakan metode Elisa tidak langsung.

Berdasarkan hasil dot blot bahwa semua perlakuan menunjukkan timbulnya antibodi pada setiap pengambilan darah, dalam penelitian ini untuk menentukan titer antibodi dengan menggunakan metode Elisa tidak langsung hanya dilakukan pada perlakuan I.

Hasil Elisa tidak langsung yang bertujuan untuk menguji spesifitas anti-EPF yang dihasilkan pasca induksi dengan EPF. Nilai titer antibodi pada perlakuan I dengan menggunakan metode Elisa tidak langsung dapat dilihat pada Lampiran 8. Sedangkan Gambar 5.4 menunjukkan titer anti-EPF dengan menggunakan metode Elisa tidak langsung.



Gambar 5.4. Nilai titer antibodi perlakuan P,Q dan R yang dibaca pada panjang gelombang 405 nm.

Hasil Elisa tidak langsung yang bertujuan untuk menguji spesifitas anti-EPF yang dihasilkan pasca induksi dengan EPF dalam ajuvan dengan antigennya yaitu EPF. Pengujian ini dapat menunjukkan titer anti-EPF yang disintesis pada imunisasi EPF dengan beberapa kali waktu pemanenan serum. Peningkatan titer ditandai melalui pembacaan optical density (OD).

Pengambilan darah pada minggu ke 5 menunjukkan titer tertinggi, yang kemudian diikuti oleh turunnya titer, hal ini disebabkan oleh karena anti-EPF yang terdapat dalam sirkulasi darah telah menuju ke sel target dimana sintesis EPF terjadi atau keberadaan EPF dalam tubuh kelinci telah berikatan dengan anti-EPF. Hal ini sesuai dengan pendapat Darnell *et al* (1990) yang menyebutkan bahwa minggu pertama dan kedua setelah penyuntikan antigen, konsentrasi IgG dalam serum akan meningkat dan kemudian akan lebih meningkat lagi setelah minggu ke lima setelah pemberian booster pada minggu ketiga akibat telah terbentuknya sel memori yang cukup banyak untuk memproduksi IgG. Selanjutnya disebutkan pula bila konsentrasi antibodi dalam darah masih tinggi dan dilakukan imunisasi maka antigen yang masuk segera diikat oleh antibodi yang beredar dalam darah.

5.3 Uji Biopotensi Anti-*Early Pregnancy Factor* sebagai antifertilitas

Hasil uji biopotensi Anti - EPF yang dilakukan pada sekelompok mencit betina dapat dilihat pada Tabel 5.3

Tabel. 5.3. Rataan dan simpangan baku jumlah anak mencit sekelahiran pada perlakuan kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III

Perlakuan	Rataan dan Simpangan Baku
Kontrol	8,44 ± 2,297 ^a
Perlakuan I	2,66 ± 1,322 ^b
Perlakuan II	2,22 ± 1,715 ^b
Perlakuan III	3,44 ± 1,236 ^b

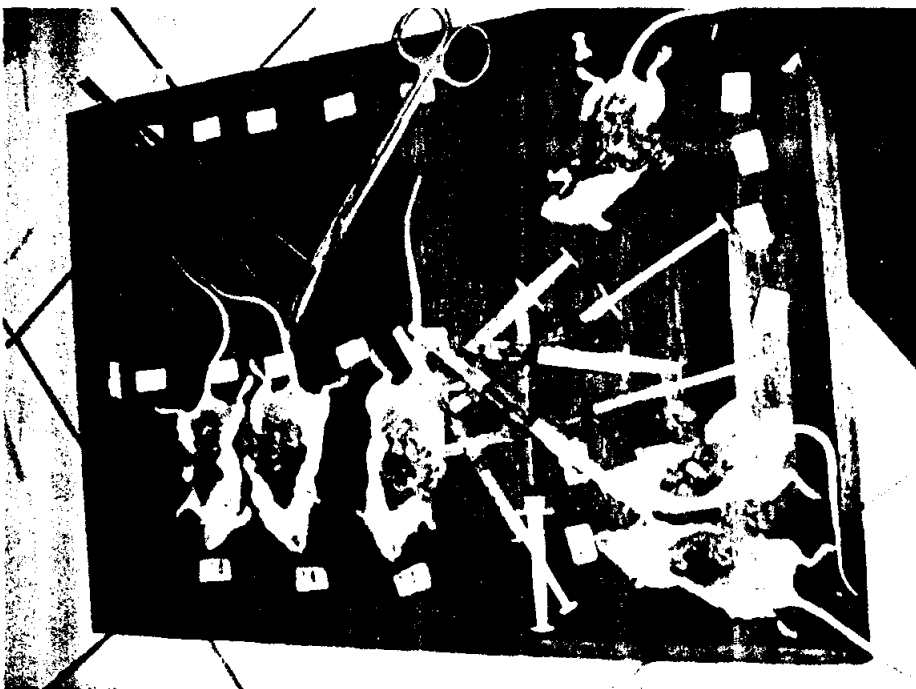
Nilai rataan pada kolom yang sama diikuti dengan superskrip yang sama tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), nilai rataan pada kolom yang sama diikuti dengan superskrip yang berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$)

Hasil uji statistik dengan menggunakan analisis varian, menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara kontrol dan perlakuan, namun

pada uji beda nyata terkecil yang dilakukan ternyata tidak terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p>0,05$).

Uji statistik menunjukkan bahwa Anti-EPF dapat menurunkan jumlah anak sekelahiran dalam tiap kelompok perlakuan, artinya Anti-EPF mampu menghambat implantasi dari blastosit untuk berkembang didalam uterus mencit betina. Namun demikian hambatan tersebut tidak dapat berjalan secara sempurna atau dengan perkataan lain anti-EPF tidak dapat menghambat implantasi secara sempurna.

Ketidak mampuan anti-EPF untuk menghambat implantasi secara sempurna menurut hemat peneliti disebabkan oleh karena dosis dari anti-EPF yang diberikan kurang besar, atau dapat juga disebabkan oleh waktu dan aplikasi pemberian anti-EPF yang kurang tepat, sehingga kerja anti-EPF kurang bisa optimal.



Gambar 5.5. Menghitung jumlah anak sekelahiran pada kelompok perlakuan

Athanasas-Platsis *et al* (1989) menyatakan bahwa imunisasi pasif pada mencit yang bunting dengan menggunakan antibodi poliklonal EPF akan mengakibatkan berkurangnya viabilitas embryo untuk melakukan implantasi, selanjutnya disebutkan pulan bahwa imunisasi dilakukan berulang kali dimulai dari 32 jam sampai dengan 56 jam post coital. Berlawanan dengan penelitian ini, peneliti hanya memberikan anti-EPF sekali dan itupun dilakukan enam jam setelah sinkronisasi birahi.

Athanasas-Platsis *et al* (1991) menyebutkan bahwa anti-EPF dalam peranannya sebagai antifertilitas ternyata lebih banyak menghambat perkembangan embrio dari sigot menjadi blastosis, akibatnya embrio tidak dapat melakukan implantasi dalam endometrium uterus. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Honta *et al*, (1995) yang menyebutkan bahwa penelitian secara invitro dari 182 embrio yang dipapar dalam anti-EPF ternyata hanya 47 buah embrio yang dapat melanjutkan perkembangannya menjadi blastosis, selanjutnya disebutkan pula bahwa pemberian anti-EPF hanya berhasil menghambat 49% kejadian implantasi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan seperti yang tersebut dibawah ini :

1. *Early Pregnancy Factor* dapat di isolasi dari mencit betina yang bunting pada umur kebuntingan 5, 10 dan 15 hari.
2. Imunisasi *Early Pregnancy Factor* yang di isolasi dari mencit betina bunting 5,10 dan 15 hari pada kelinci jantan lokal dapat menimbulkan anti- *Early Pregnancy Factor*
3. Anti-*Early Pregnancy Factor* yang diberikan secara subkutan pada mencit betina saat birahi dapat menurunkan jumlah anak sekelahiran.

6.2. Saran

Meskipun telah dapat diketahui bahwa Anti- *Early Pregnancy Factor* dapat menurunkan jumlah anak sekelahiran, namun demikian belum dapat dikatakan anti-*Early Pregnancy Factor* dapat digunakan sebagai agen antifertilitas, untuk itu disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut pemberian anti- *Early Pregnancy Factor* sebagai agen antifertilitas pada mencit dengan memperhatikan dosis, waktu pemberian dan aplikasi pemberian.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama, W.T., 1992. Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan, PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada, Jogjakarta. Hal.28 -31
- Athanasas-Platsis, S, H Morton, GF Dungleison, and PL Kaye. 1991. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo. *Reproduction. The Journal of The Society for Reproduction and Fertility.* pp.1-2.
- Athanasas-Platsis, S., K A Quinn., T Y Wong., B E Rolfe., A C Cavanagh and H Morton. 1989. Passive Immunization of Pregnant Mice against Early Pregnancy Factor causes loss of embryonic viability. *Current Status. Human Reprod. Update* 1:1-18.
- Austyn, J.M. and K.J. Wood, 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. 1st.Ed. Oxford University Press, p.695.
- Baratawidjaja, K G. 1998. *Imunologi Dasar.* Edisi ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Barnea, E R. 2000. Early Pregnancy : Biology and Medicine . Early Pregnancy Volume IV.pp.166-175.
- Bellanti,J.A., 1993. *Imunologi III.* Edisi Bahasa Indonesia. Gajah Mada University Press. Jogjakarta.
- Cavanagh, A C.1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10: Implications for Understanding Its Role. *J.Reprod.Fertil.*1:28-32.
- Dunbar, B S, 1994. Protein Blotting. A Practical Approach. The Practical Approach Series, Oxford University Press. pp. 6-9.
- DuPlants, L J. 2000. Early Pregnancy Factor. *Lifeissues.net.* Kochi. Japan All Rights Reserved. pp. 1-2.
- Frandsen, R. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak .* Cetakan Kedua. Terjemahan Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Feng, H., J.L. Sandlow, A,E, Spark and A, Sandra, 1999. Development of Immunocontraception Vaccine, Current Status. *J.Reprod.Med.* 44(9) : 756-65.
- Goer, J. 1993. *Immunochemical Techniques Laboratory Manual.* Academic Press. Harcourt Brace Javanovich. Publisher San Diego, California.

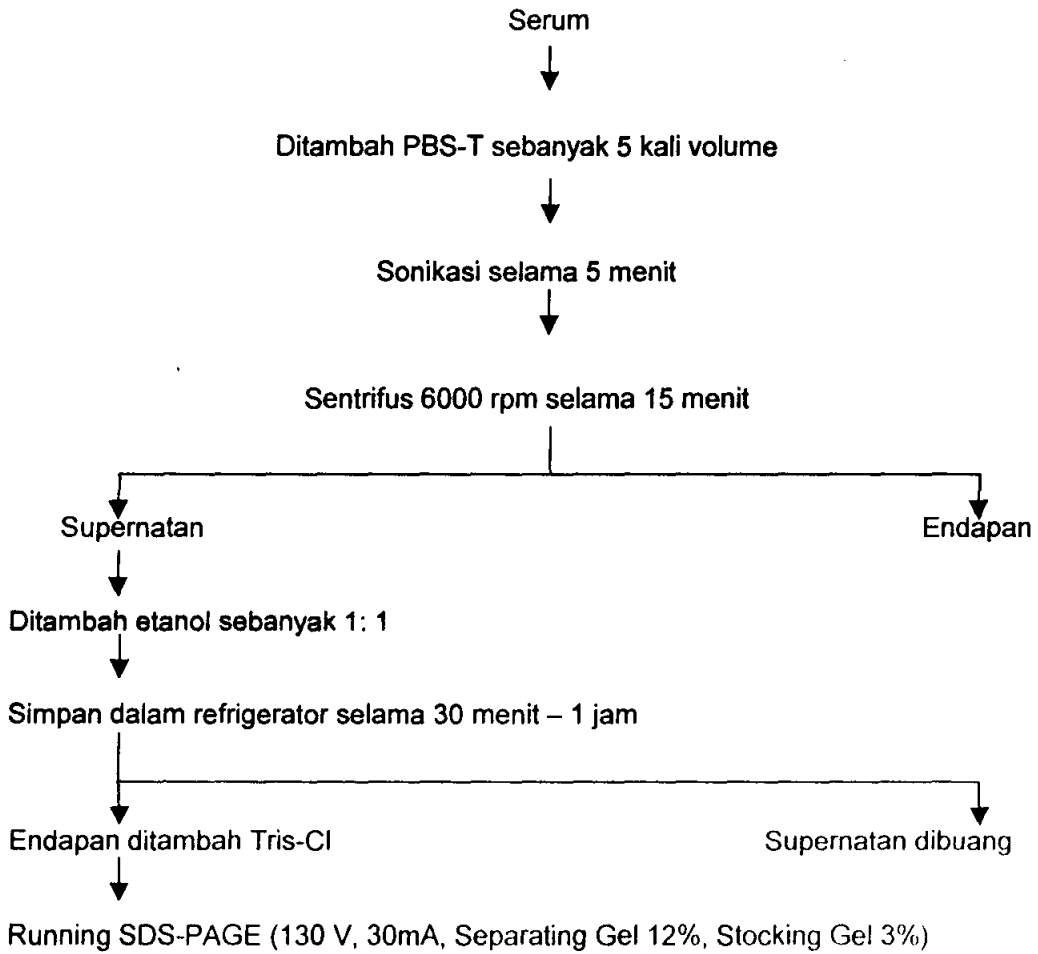
- Hafez, E.Z.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 6th.Ed. Philadelphia, Lea&Febiger.
- Hartanto, H. 2004. *Keluarga Berencana dan Kontrasepsi*. Edisi Kelima. Penerbit Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Mustofa, I. 2005. *Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Reseptor Fertilisasi (Zona Pelusida 3) Kambing sebagai Kandidat Bahan Imunokontrasepsi*. Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas*. Terjemahan Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. *Manipulating The Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- Honta, I., K Ito., J Takahashi and Y Yasuda. 1995. Influence of anti-bovine Early Pregnancy Factor antibody on embryonic development and implantation in Rats.
- Knobil, E., J.D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Maarkert and D.W. Pfaff, 1988. *The Physiology of Reproduction*. Volume 2, New York : Raven Press.
- Langman, J., 1975. *Medical Embriology*. The William and Wilkins Co. Baltimore. P. 25-104
- Pabbaja, S., 1992. *Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera untuk kader*, Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Rantam, F.A., 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya
- Smith, JB and Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Soehadji, 2005. *Menuju Era Peternakan Tinggal Landas*. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Steel, R.G.D., dan J.H. Torrie, 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*, Jakarta : Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Sukra, Y., 1981. *Kepastian Teratogenitas dalam Percobaan Binatang*. Medika 10 : 687-690.

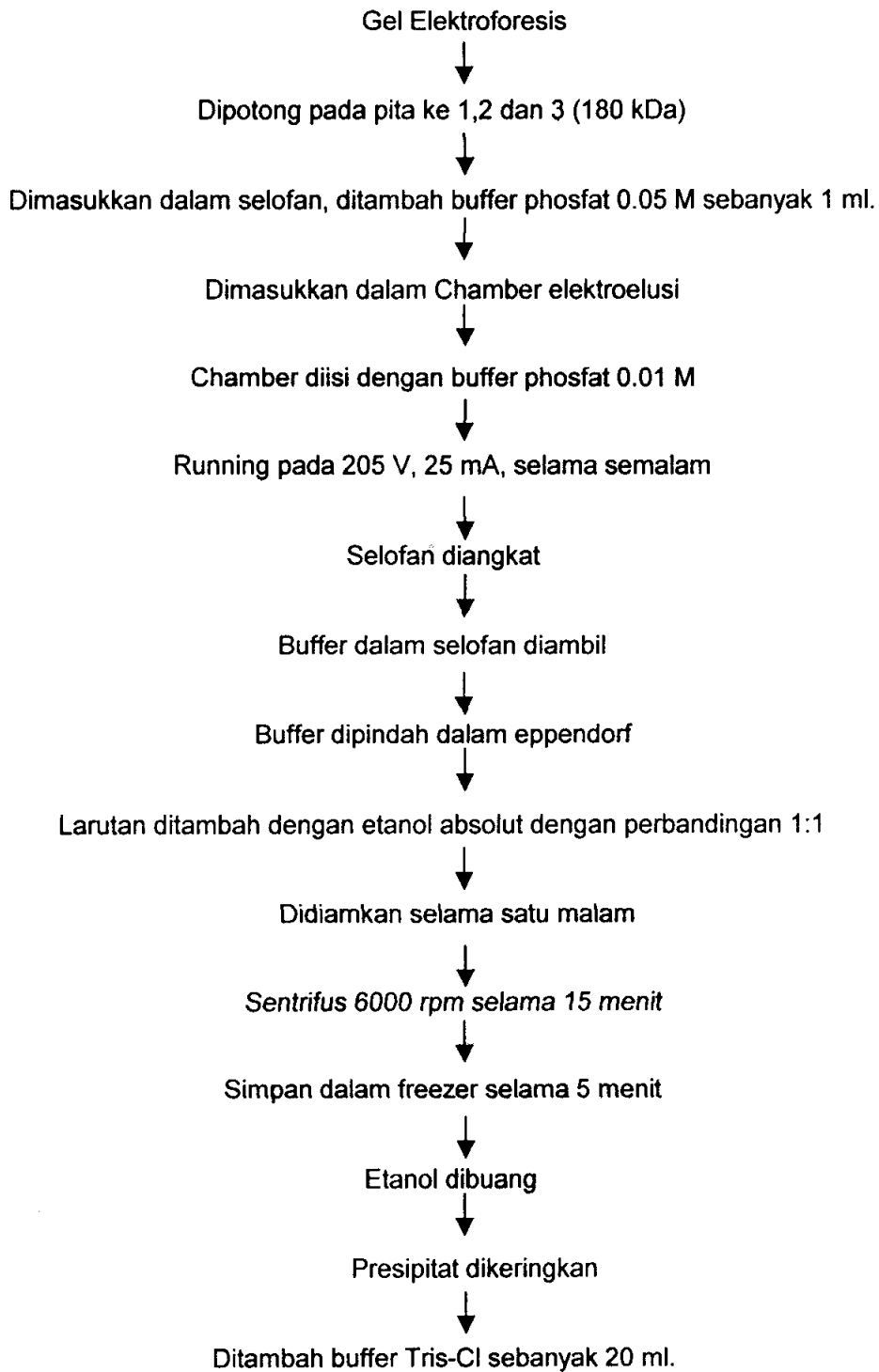
Subowo, 1993. *Imunologi*. Penerbit Angkasa. Jakarta.

Weir, D.M. 1990. *Segi Praktis Imunologi*. Penerbit Binarupa Aksara. Jakarta.

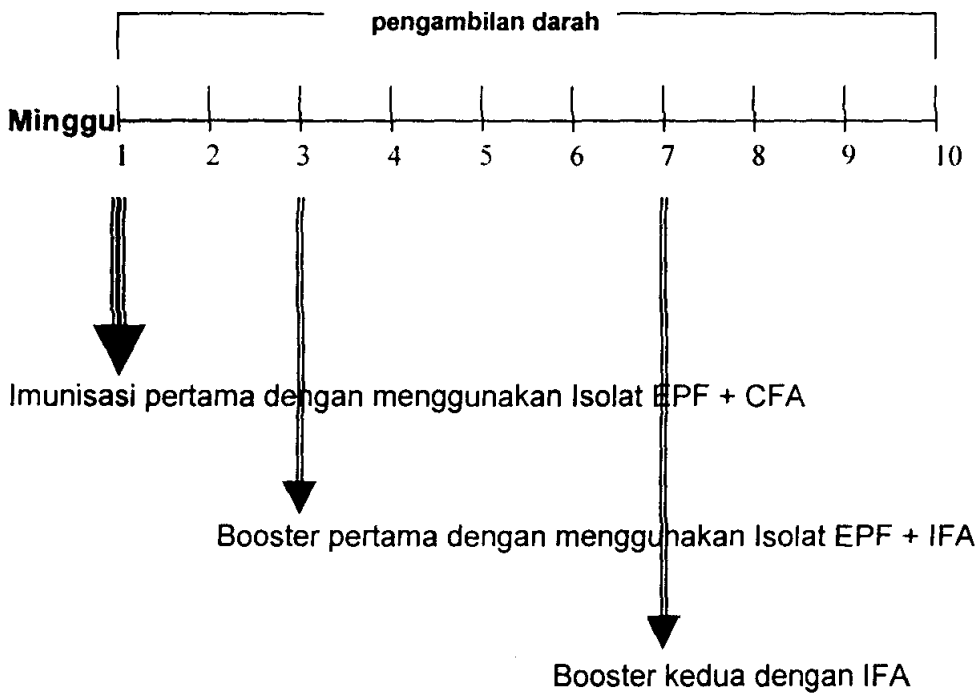
Yatim, W. 2001. *Bahan Kontrasepsi untuk Keluarga Berencana*. Laboratorium Subgenetika Balai Kesehatan. Universitas Padjadjaran. Bandung.

Lampiran 1. Purifikasi dan Isolasi Protein dengan SDS-PAGE

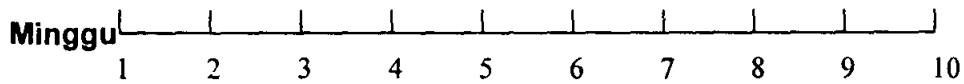


Lampiran 2. Metode Elektroelusi untuk Protein dengan BM 180 kD

Lampiran 3. Program Imunisasi Isolat protein dengan BM 180 kD dan pengambilan darah pada kelinci jantan lokal.



Lampiran 4. Kegiatan Pengambilan Darah pada Kelinci Jantan Lokal



1. pengambilan darah pertama digunakan sebagai kontrol /pre imun yang dilakukan sebelum penyuntikan antigen dengan CFA
2. pengambilan darah kedua dilakukan saat booster pertama, yaitu dua minggu setelah penyuntikan antigen dengan CFA
3. pengambilan darah ketiga, keempat, dan kelima dilakukan masing-masing satu minggu setelah booster pertama
4. pengambilan darah ke enam dilakukan pada minggu ke empat setelah booster pertama dan ketika dilakukan booster kedua
5. pengambilan darah ke tujuh dan delapan dilakukan satu dan dua minggu setelah booster kedua

Lampiran 5. Jumlah darah dan jumlah serum yang berhasil diperoleh

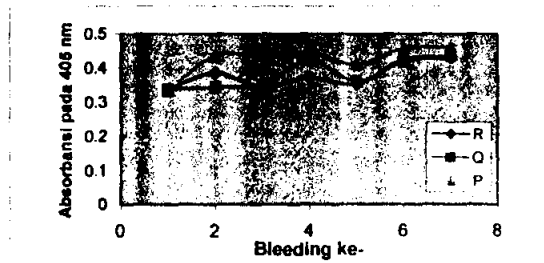
- darah diambil secara intra kardial
- setelah didiamkan 30 menit, darah disentrifus kemudian serum dipisahkan
- jumlah serum merupakan hasil penambahan serum dalam satu perlakuan

Perlakuan	No.mencit	Jumlah darah (cc)	Jumlah serum (cc)
I (bunting 5 hari)	1.	0,6	
	2.	0,7	
	3.	0,5	
	4.	lisis	
	5.	0,5	
	6.	0,4	
	7.	0,7	
	8.	0,5	
	9.	lisis	
	Total	3,90	2,3
	Rataan	0,433	
II (bunting 10 hari)	1.	0,7	
	2.	0,3	
	3.	0,5	
	4.	0,4	
	5.	0,5	
	6.	0,4	
	7.	0,6	
	8.	0,4	
	9.	0,8	
	Total	4,60	2,9
	Rataan	0,511	
III (bunting 15 hari)	1.	lisis	
	2.	0,4	
	3.	0,6	
	4.	0,3	
	5.	0,8	
	6.	0,4	
	7.	0,4	
	8.	0,5	
	9.	0,5	
	Total	3,90	2,1
	Rataan	0,433	

Lampiran 6. Titer antibodi Poliklonal EPF

PI	0.085	0.088
1:20	0.357	0.359
40	0.354	0.354
80	0.358	0.341
160	0.338	0.336
320	0.343	0.334
640	0.332	0.331

	R	Q	P
Bleeding 1	0.339	0.338	0.334
Bleeding 2	0.385	0.344	0.435
Bleeding 3	0.347	0.352	0.437
Bleeding 4	0.372	0.423	0.44
Bleeding 5	0.353	0.381	0.41
Bleeding 6	0.422	0.418	0.455
Bleeding 7	0.43	0.435	0.46



Lampiran 7. Jumlah anak sekelahiran pada perlakuan kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III.

Perlakuan	No. Mencit	Jumlah anak	Rataan
	1	11	
	2	8	
	3	10	
	4	12	
KONTROL	5	6	
	6	9	
	7	5	
	8	8	
	9	7	
	jumlah	76	8,44
	1	4	
	2	4	
	3	2	
	4	2	
PERLAKUAN I	5	3	
	6	4	
	7	0	
	8	2	
	9	3	
	jumlah	24	2,66
	1	0	
	2	3	
	3	4	
	4	0	
PERLAKUAN II	5	3	
	6	2	
	7	1	
	8	2	
	9	5	
	jumlah	20	2,22
	1	5	
	2	4	
	3	3	
	4	2	
PERLAKUAN III	5	2	
	6	5	
	7	4	
	8	2	
	9	4	
	jumlah	31	3,44

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean	Std. Deviation
KONTROL	9	5.00	12.00	76.00	8.4444	2.2973
P1	9	.00	4.00	24.00	2.6667	1.3229
P2	9	.00	5.00	20.00	2.2222	1.7159
P3	9	2.00	5.00	31.00	3.4444	1.2360
Valid N (listwise)	9					