

1024

IR - PERPISTAJAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI



**PENGARUH INFEKSI ESCHERICHIA COLI PADA SALURAN
REPRODUKSI TERHADAP FERTILITAS
MENCIT BETINA**



OLEH :

TITIEN SUTANTO

PROBOLINGGO - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1992**



SKRIPSI

**PENGARUH INFEKSI ESCHERICHIA COLI PADA SALURAN
REPRODUKSI TERHADAP FERTILITAS
MENCIT BETINA**



OLEH :

TITIEN SUTANTO

PROBOLINGGO - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1992**

PENGARUH INFEKSI ESCHERICHIA COLI PADA SALURAN
REPRODUKSI TERHADAP FERTILITAS MENCIT BETINA

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

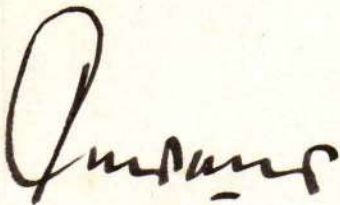
oleh

TITIEN SUTANTO

068711287

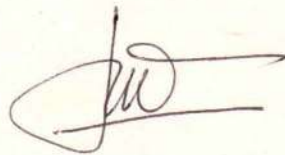
Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Dr. Ismudiono, M.S, Drh)

Pembimbing Pertama



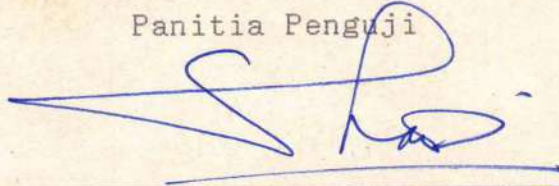
(Didik Handijatno, M.S, Drh)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

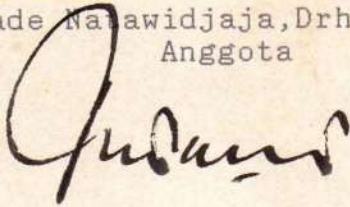
Panitia Penguji



(Soesilohadi Widjajanto, Drh., M.S.)
Ketua

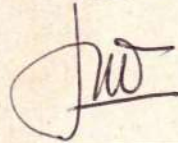


(Made Nawidjaja, Drh, M.Sc)
Anggota



(Dr. Ismudiono, Drh, M.S)

(Mas'ud Hariadi, Drh, M.Phil)
Anggota



(Didik Handijatno, Drh, M.S)

Surabaya, 8 Juli 1992

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Dr. Rochiman Sasmita, Drh, M.S

NIP. 130350739

PENGARUH INFEKSI ESCHERICHIA COLI
PADA SALURAN REPRODUKSI
TERHADAP FERTILITAS
MENCIT BETINA

Titien Sutanto

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi E. coli pada saluran reproduksi terhadap fertilitas hewan betina yang dalam penelitian ini digunakan mencit sebagai hewan percobaan.

Mencit betina sebanyak 62 ekor dan mencit jantan sebanyak 20 ekor yang berumur 6-8 minggu menjadi hewan percobaan dalam penelitian ini. Sebelum mencit diberi perlakuan terlebih dahulu ditentukan ID_{50} dengan menggunakan 42 ekor mencit betina. Sisa mencit betina sebanyak 20 ekor dibagi dalam 2 perlakuan yaitu kontrol yang diinfeksi dengan larutan PBS steril dan perlakuan yang diinfeksi dengan E. coli dosis ID_{50} . Masing-masing mencit dari kontrol dan perlakuan dikawinkan. Dua minggu kemudian diadakan pembedahan untuk diamati kebuntingan dan jumlah fetusnya.

Dengan menggunakan uji eksak Fisher untuk frekuensi kebuntingan dan uji t untuk jumlah fetus, ternyata tidak didapat perbedaan yang nyata antara perlakuan dan kontrol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat yang dilimpahkan, sehingga selesai penulisan skripsi ini.

Dengan rasa hormat, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Dr. Ismudiono, M.S, Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak Didik Handijatno, M.S, Drh selaku pembimbing kedua yang telah bersedia memberikan bimbingan, saran dan nasihat yang sangat berperan dalam penyusunan skripsi ini.

Demikian pula kepada para karyawan Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, penulis ucapkan terima kasih atas bantuan yang sudah diberikan selama penelitian berlangsung.

Kepada papa dan mama, kakak dan adik, rasa terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan atas dorongan semangat dan doanya selama penulis mencapai cita-cita.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak sempat penulis sebutkan di atas dan telah memberikan bantuan serta perhatiannya, diucapkan banyak terima kasih. Semoga Tuhan memberkati semuanya.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
<u>Escherichia coli</u>	4
Sejarah <u>E. coli</u>	4
Morfologi	4
Pertumbuhan	5
Sifat Biokimiawi	6
Struktur Antigen	6
Patogenitas	7
Proses Fertilisasi	9
Definisi Fertilisasi	9
Mekanisme Fertilisasi	9
Kegagalan Fertilisasi	12
BAB III. MATERI DAN METODA	15
Tempat dan Waktu Penelitian	15
Materi Penelitian	15
Hewan Percobaan	15
Biakan Kuman <u>E. coli</u>	15
Media Perbenihan	15
Kandang Mencit	15
Bahan dan Alat Lain	16
Metoda Penelitian	16
Persiapan	16
Penentuan Dosis Infeksi	17
Perlakuan Penelitian	19
Analisis Data	21
BAB IV. HASIL PENELITIAN	22
Hasil Isolasi dan Identifikasi Kuman	
<u>E. coli</u>	22
Hasil Penghitungan Jumlah Kuman	22
Hasil Penghitungan Lekosit 24 Jam Setelah	
Inokulasi	23

Hasil Penghitungan ID ₅₀ Dengan Cara Reed and Muench	23
Hasil Penghitungan Jumlah Fetus	24
BAB V. PEMBAHASAN	26
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	30
RINGKASAN	31
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Data Hasil Penghitungan Koloni	22
2.	Data Hasil Penghitungan Lekosit 24 Jam Setelah Inokulasi	23
3.	Data ID ₅₀	24
4.	Data Jumlah Fetus Mencit Pada Umur Kebuntingan 2 Minggu	25

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Lekosit jenis neutrofil yang tampak pada vagina smear	43
2.	Lekosit jenis stab yang tampak pada vagina smear	44
3.	Spuite dan jarum untuk menginfeksi mencit	45

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Penghitungan Jumlah Kuman	36
2.	Penghitungan ID ₅₀ Dengan Reed and Muench	37
3.	Analisis Hasil Pengamatan Kebuntingan Dengan Menggunakan Uji Eksak dari Fisher	38
4.	Analisis Hasil Jumlah Fetus Dengan Menggunakan uji t Yang Mempunyai Ulangan Tidak Sama	40
5.	Daftar : t	42
6.	Gambar lekosit jenis neutrofil yang tampak pada vagina smear	43
7.	Gambar lekosit jenis stab yang tampak pada vagina smear	44
8.	Gambar spuitedan jarum untuk menginfeksi mencit	45

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Rendahnya tingkat produksi ternak dibandingkan dengan jumlah ternak yang dibutuhkan merupakan masalah yang sering ditemui dalam bidang peternakan. Populasi ternak pada umumnya dan sapi pada khususnya selalu dipengaruhi oleh tingkat penyembelihan, tingkat kematian akibat penyakit dan tingkat kelahiran anak. Tinggi rendahnya tingkat kelahiran anak selalu berkaitan dengan masalah-masalah reproduksi. Umumnya peternak kurang memperhatikan masalah reproduksi dibandingkan masalah penyakit menular. Hal ini dapat dimaklumi karena masalah reproduksi jarang menyebabkan kematian pada ternak dibandingkan masalah penyakit menular, walaupun dapat menimbulkan kerugian yang cukup besar.

Sejak tahun 1972/1973 pemerintah Indonesia telah menggiatkan program Inseminasi Buatan (IB) pada ternak khususnya sapi, untuk meningkatkan produksi ternak. Hal ini tidak berarti telah meniadakan masalah reproduksi. Kegiatan IB secara intensif telah mengungkapkan berbagai masalah kegagalan reproduksi, salah satunya adalah ketidaksuburan atau infertilitas yang dapat menurunkan efektivitas pelaksanaan IB, misalnya pada kejadian kawin berulang (Martindah, 1988).

Kawin berulang (repeat breeders) pada sapi merupakan salah satu tipe ketidaksuburan yang ditandai dengan siklus dan periode birahi normal, tetapi kebuntingan tidak terjadi walaupun sapi tersebut dikawinkan dua kali atau lebih secara alami ataupun dengan IB. Banyak faktor penyebab dari ketidaksuburan tersebut, antara lain faktor-faktor yang ada dalam tubuh ternak itu sendiri seperti adanya radang pada uterus, kegagalan fertilisasi dan kematian embrio dini (Martindah, 1988).

Peradangan uterus dapat disebabkan oleh penyakit kelamin menular atau oleh infeksi kuman yang tidak spesifik. Menurut Poengan (1985) yang dikutip oleh Martindah (1988), kuman yang berhasil diisolasi dari sapi kawin berulang dari kelompok Gram positif yang terbanyak adalah kuman Staphylococcus aureus sebanyak 18,84%, sedangkan dari kelompok Gram negatif yang terbanyak adalah kuman Escherichia coli sebanyak 17,39%.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan di atas, penulis mengadakan penelitian tentang pengaruh infeksi Escherichia coli (E.coli) pada saluran reproduksi terhadap fertilitas atau kesuburan hewan betina yang pada penelitian ini akan dilakukan pada hewan percobaan mencit (Mus musculus).

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh infeksi E.coli pada saluran reproduksi terhadap fertilitas mencit betina yang pada penelitian ini dilihat dari frekuensi kebuntingan dan jumlah fetusnya.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan adalah infeksi kuman E.coli pada saluran reproduksi berpengaruh terhadap fertilitas mencit betina.

1.5. Manfaat Hasil Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang masalah infeksi pada alat reproduksi, khususnya infeksi oleh E. coli, karena berhubungan dengan sanitasi. Diharapkan peternak akan lebih memperhatikan sanitasi kandang dan sapi, juga dalam melakukan pertolongan pada waktu partus.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Escherichia coli/ Bacillus coli/ Bakterium coli

E.coli termasuk dalam kelompok kuman usus yang bersifat Gram negatif dan tidak berspora. Kuman ini termasuk flora normal pada usus yang sehat, tetapi bisa menjadi patogen dalam keadaan tertentu pada hewan dan manusia (Kelly and Hite, 1955).

2.1.1. Sejarah E.coli

Pertama kali ditemukan pada tahun 1885 oleh Escherich, kuman ini diisolasi dari feses anak-anak dan pada tahun 1886 telah dapat digambarkan secara lengkap. Organisme ini tersebar luas di alam dan dapat menular melalui air atau makanan yang tercemar oleh E.coli (Merchant and Packer, 1970).

2.1.2. Morfologi

E.coli berbentuk batang pendek berukuran $0,5 \mu \times 1-3 \mu$, bentuknya bervariasi dari kokoid bipolar hingga filamen panjang, biasanya terletak sendiri-sendiri atau membentuk rantai pendek. E. coli mempunyai flagela peritrichous sehingga bisa bergerak aktif. Kuman ini mudah diwarnai dengan zat warna biasa (Merchant and Packer, 1970).

2.1.3. Pertumbuhan

E.coli bersifat aerob dan fakultatif anaerob pada perbenihan yang mengandung karbohidrat yang dapat diuraikannya. Menurut kemampuannya untuk mengurai (memfermentasi) sukrosa dan salisin, E. coli dibagi atas 3 varietas (Merchant and Packer, 1970), yaitu :

- a. E. coli var. acidilactici yang tidak mengurai sukrosa ataupun salisin.
- b. E. coli var. neopolitana yang mengurai sukrosa dan salisin.
- c. E. coli var. communior yang mengurai sukrosa dan tidak mengurai salisin.

Pertumbuhan E. coli yang paling baik pada suhu 37,5°C, tetapi bisa tumbuh pada suhu 15-45°C. Derajat keasaman yang paling baik bagi pertumbuhannya adalah pada pH 7, tetapi dapat tumbuh dengan rentangan pH yang lebar.

Koloni yang tumbuh pada plat agar dapat berwarna putih kekuningan, coklat atau kuning keemasan sesuai dengan umur pupukan, basah, mengkilat, lembut, dan bulat dengan sisi yang rata. Pada media cair membentuk kekeruhan yang merata dan membentuk sedimen yang pekat.

Media yang digunakan untuk identifikasi E.coli adalah media Eosin Methylen Blue Agar (EMB). Pada media ini koloni berwarna hijau metalik dan membentuk pusat kehitaman.

2.1.4. Sifat Biokimiawi

E.coli membentuk asam dan gas dari glukosa, laktosa, fruktosa, galaktosa, arabinosa, silosa, rhamnosa dan mannitol. Kadang-kadang dapat mengurai sukrosa, raffinosa, salisin, eskulin dulsital dan gliserol. Methyl Red test positif, Voges Prosskauer negatif, katalase positif, indol positif, mereduksi nitrat dan tidak mencairkan gelatin (Merchant and Packer, 1970).

2.1.5. Struktur Antigen

Jawetz et al (1986) menyatakan bahwa Enterobakter mempunyai struktur antigen yang kompleks. Tiga kelompok utama antigen adalah antigen O (badan), antigen H (flagel), dan antigen K (kapsul).

Antigen O

Antigen O merupakan bagian paling luar dari dinding sel lipopolisakarida. Antigen ini bersifat tahan terhadap panas dan alkohol. Tiap genus Enterobacteriaceae mempunyai antigen O spesifik, tetapi tiap organisme dapat mengandung beberapa antigen O. Kuman E. coli memiliki satu atau lebih antigen O. Antigen O dapat dihubungkan dengan penyakit-penyakit manusia, misalnya tipe O dari E. coli ditemukan dalam diare atau infeksi saluran air kemih (Jawetz et al, 1986).

Antigen H

Jawetz et.al (1986) mengatakan bahwa antigen ini terletak pada flagel dan didenaturasi oleh panas dan alkohol. Penentu dalam antigen H adalah fungsi dari susunan asam amino di dalam protein flagel (flagellin).

Antigen K

Antigen kapsul ini merupakan antigen di luar antigen O pada beberapa kuman tetapi tidak pada semua jenis Enterobacteriaceae. Beberapa antigen kapsul adalah polisakarida, termasuk antigen K dari E. coli, sedang yang lainnya adalah protein. Antigen K dapat dihubungkan dengan virulensi; misalnya K₁ E. coli menonjol pada meningitis neonatal, antigen K E. coli menyebabkan perlekatan kuman pada sel-sel sebelum diare atau invasi saluran kemih (Jawetz et.al, 1986).

Menurut Soltys (1963), keganasan E. coli tergantung pada ada tidaknya antigen O dan K yang biasanya dikenal dengan somatik antigen dan terdiri dari polisakarida, lemak dan protein. Antigen-antigen ini diketahui membuat reaksi toksik pada hewan dan biasa disebut endotoksin.

2.1.6. Patogenitas

E. coli bersifat patogen di usus hanya pada bayi dan hewan-hewan yang masih sangat muda. Pada manusia dan hewan dewasa kuman ini jarang bersifat patogen di usus.

Kuman ini tidak menyebabkan penyakit, tetapi dapat membantu fungsi normal usus besar (colon) dan proses pencernaan (Soltys, 1963).

E. coli menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan, khususnya saluran urogenital, saluran empedu, paru-paru, peritoneum atau selaput otak dan menyebabkan radang pada tempat-tempat tersebut (Jawetz *et.al*, 1986).

Soltys (1963) menyebutkan bahwa pada manusia dewasa dan beberapa hewan, E. coli dapat menginvasi usus buntu, kandung empedu, rongga peritoneal, ginjal dan kandung kemih. Pada sapi dan babi dapat menyebabkan metritis dan mastitis. Kuman coliform juga penting sebagai bakteri sekunder dari luka infeksi di daerah sekitar anus.

Penyakit-penyakit pada hewan yang disebabkan E. coli misalnya pada pedet disebut Calf Disentry, White Scours atau Colibacillosis. Sedang pada ayam menyebabkan bentukan-bentukan seperti granuloma di sepanjang saluran usus yang disebut Hjarre's disease atau coli granuloma (Merchant and Packer, 1971).

2.2. Proses Fertilisasi

2.2.1. Definisi Fertilisasi

Fertilisasi atau pembuahan adalah peristiwa bersatunya sel telur dan sel mani sedemikian rupa sehingga menghasilkan sebuah sel baru yang disebut zygote (Hardjopranjoto, 1988).

Menurut Hardjopranjoto (1988), para pakar genetika menyatakan bahwa pembuahan mengandung pengertian memasukkan kromosom / DNA yang terletak di dalam inti sel mani ke dalam sel telur.

2.2.2. Mekanisme Fertilisasi

Partodihardjo (1987) mengatakan bahwa sel mani harus menempuh perjalanan dalam tubuh hewan jantan dan hewan betina untuk dapat bertemu dengan sel telur dan melakukan pembuahan.

Perjalanan sel mani dalam tubuh hewan jantan

Sel mani dan sedikit plasma semen dalam tubuh hewan jantan keluar dari tubuli seminiferi menuju vas efferent. Sel mani bergerak pelan sekali, sehingga berlangsung berhari-hari. Sel mani dan plasma setelah dari vas efferent masuk dalam duktus epididymis, dan perjalanannya lebih pelan lagi. Setelah melewati duktus epididymis, spermatozoa dan plasma masuk ke vas defferens. Sel mani

defferens. Sel mani dan plasma kemudian menerima getahan dari vesikula seminalis, bermuara ke duktus ejakulatorius dan terus menuju uretra. Terakhir, sel mani menerima getahan dari kelenjar prostat dan bulbouretralis sebelum dikeluarkan pada saat koitus (Yatim, 1982).

Perjalanan sel mani dalam tubuh hewan betina

Perjalanan sel mani dalam tubuh hewan betina mendapat hambatan yang tidak mudah. Pada sapi dan domba, semen ditumpahkan di mulut serviks pada waktu kopulasi, maka serviks merupakan hambatan perjalanan sel mani yang pertama. Semen yang ditumpahkan segera bercampur dengan lendir serviks. Lendir serviks ini membentuk serat atau jalur yang dapat mengarahkan sel mani. Sel-sel mani yang sudah masuk ke dalam serviks, tidak semuanya dapat masuk ke dalam uterus, melainkan banyak yang terperangkap dalam kript-kripta serviks (Partodihardjo, 1987).

Sel mani yang hidup, tidak secara serentak dapat masuk ke dalam uterus, tetapi secara bergelombang. Fungsi serviks selain menjadi alat seleksi juga sebagai pengatur perjalanan sel mani. Keterangan mengenai bagaimana sel mani dapat mengarungi uterus yang luas, sangat sedikit. Bila sel mani harus berenang mengarungi uterus, maka kebanyakan sel mani akan mati kehabisan energi atau sampai di tuba dalam waktu yang lama. Dalam kenyataannya, sel mani dapat ditemukan di dalam tuba

dalam waktu 5-10 menit sesudah kopulasi. Jadi dapat disimpulkan bahwa perjalanan sel mani dalam uterus dipercepat oleh gerak peristaltik dinding uterus (Partodihardjo, 1987).

Pada sapi dan domba seleksi pertama sel mani dalam tuba fallopii ialah adanya cincin mukosa yang menandai batas antara uterus dan tuba (uterotubal junction). Seleksi ke dua dalam tuba fallopii adalah isthmus, terutama di bagian batas antara isthmus dan ampula (Partodihardjo, 1987).

Perjalanan sel telur dalam tubuh hewan betina

Sel telur juga menempuh perjalanan dari ovarium ke tempat pembuahan sebelum bertemu dengan sel mani. Sel telur yang diovulasikan akan ditampung oleh infundibulum yaitu oleh bagian berbentuk jari yang disebut fimbriae. Kemungkinan sel telur akan jatuh ke rongga abdomen sedikit sekali. Hal ini dikarenakan infundibulum serta fimbriaenya, sekitar waktu ovulasi aktif bergerak mendekati dan melingkup ovarium. Ovum bergerak dari infundibulum menuju tempat pembuahan karena digerakkan oleh silia epitel dinding tuba dan gerakan otot dinding tuba (Yatim, 1982).

Proses penyatuan sel mani dan sel telur

Sel mani yang sampai di tempat pembuahan akan berusaha memasuki sel telur dengan menembus sel cumulus,

menembus zona pellucida dan menembus selaput vitteline. Sel-sel cumulus dapat ditembus karena pergerakan sel mani dan dibantu oleh enzim hyaluronidase. Zona pelucida dapat ditembus oleh karena sel mani menghasilkan enzim tertentu, misalnya enzim zona lizin pada babi. Sel mani yang berhasil menembus zona pelucida akan langsung bersentuhan dengan selaput vitteline. Selaput vitteline selanjutnya akan mengadakan vitteline blok yang mencegah masuknya sel mani lebih dari satu (Hardjopranjoto, 1988).

2.2.3. Kegagalan Fertilisasi

Proses fertilisasi dapat mengalami kegagalan, antara lain di sebabkan oleh (Noakes, 1986):

a. Pejantan yang infertil

Keadaan ini dapat diketahui dengan menyelidiki catatan breeding atau betina-betina lain yang dikawinkan dengan pejantan atau semen pejantan tersebut. Bila sebagian besar atau semua betina tidak bunting, maka pejantan tersebut harus disingkirkan (Noakes, 1986).

b. Pengelolaan Inseminasi Buatan yang tidak baik

Hal ini menyangkut mutu semen, penanganan semen dan teknik pelaksanaan IB. Olds and Seath (1954) dalam Salisbury and Van Demark (1961) menyatakan bahwa inseminator yang berpengalaman dapat menaikkan angka konsepsi.

c. Adanya lesi pada alat reproduksi

Lesi yang dimaksud, misalnya perlekatan ovarium dan bursanya, tuba fallopii dan kornua uteri atau peregangan dan pembesaran tuba. Lesi-lesi ini menyebabkan penyumbatan traktus genital dan oleh karena itu mencegah pertemuan sel mani dan sel telur, sehingga pembuahan tidak terjadi (Noakes, 1986).

d. Tidak terjadinya ovulasi dari folikel de Graaf

Folikel de graaf yang sudah matang, secara normal akan diovulasikan pada siklus estrus. Pada beberapa kasus, misalnya kekurangan hormon LH (Luteinizing Hormone), dapat menyebabkan estrus tanpa disertai ovulasi (Suripta, 1991). Folikel yang gagal diovulasi ini akan membentuk siste yang disebut siste folikuler. Siste ini dapat berbentuk tunggal atau bergerombol pada salah satu atau kedua ovarium (Kartini, 1981). Ternak yang mengalami hal ini menunjukkan gejala estrus yang berlebihan (nimfomania) karena siste tersebut mensekresi oestradiol dalam jumlah tinggi (Peters and Ball, 1986).

e. Ovulasi yang terlambat

Alam secara normal mengatur waktu pertemuan antara sel mani dan sel telur, sehingga keduanya dapat bertemu dan mengadakan pembuahan dalam kondisi prima. Pada keadaan kurangnya hormon LH, ovulasi akan terlambat atau tidak terjadi. Ovulasi yang terlambat dapat menyebabkan

kegagalan fertilisasi karena sel mani terlalu lemah untuk mengadakan fertilisasi (Noakes, 1986).

f. Lingkungan uterus yang abnormal

Lingkungan uterus yang abnormal dapat disebabkan oleh tidak seimbangnya hormon atau adanya infeksi yang kronis pada uterus. Perjalanan sel mani dan sel telur dalam tubuh betina dipengaruhi oleh keadaan hormon dari hewan tersebut. Kekurangan atau ketidak seimbangan hormon dapat menyebabkan gangguan perjalanan tersebut (Noakes, 1986).

Infeksi pada uterus dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme, baik yang spesifik maupun yang tidak spesifik. Organisme spesifik misalnya Brucella abortus, Trichomonas foetus, Vibrio foetus dapat menyebabkan endometritis akibat abortus pada fetus.

Organisme yang tidak spesifik misalnya Corynebacterium pyogenes, E. coli, Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas aeruginosa, dapat juga menyebabkan infeksi pada uterus akibat pertolongan partus atau pelaksanaan IB yang tidak lege artis (Suripta, 1991; Martindah, 1988; Palguna, 1982). Infeksi pada uterus ini dapat menyebabkan gangguan pada transpor sel mani atau menyebabkan kematian sel mani (Noakes, 1986).

BAB III

MATERI DAN METODA

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, dimulai pada tanggal 4 Nopember 1991 sampai dengan tanggal 30 Desember 1991.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipakai adalah mencit (Mus musculus) varietas Webster sejumlah 82 ekor dengan rincian 62 ekor betina dan 20 ekor jantan yang semuanya berumur 6-8 minggu.

3.2.2. Biakan Kuman E.coli

Biakan E.coli yang digunakan adalah biakan yang berumur 24 jam. Sampel untuk isolasi diambil dari feses seorang anak yang menderita diare.

3.2.3. Media Perbenihan

Media yang dipakai berupa media deferensial Eosin Methylen Blue Agar (EMB), media identifikasi Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Sulfid Indol Motility Agar (SIMA) dan Nutrient Agar (NA).

3.2.4. Kandang Mencit

Kandang yang dipakai berupa kandang kelompok sebanyak 7 buah terbuat dari bak plastik yang ditutup

kawat kasa dan diberi alas sekam. Disamping kandang kelompok, dipakai juga kandang individu sebanyak 20 buah yang dibuat dari tempat deterjen yang ditutup kasa.

3. 2.5. Bahan dan Alat Lainnya

Bahan dan alat lain yang dipakai adalah : sputite tuberculin 1 ml 10 buah dengan jarum khusus berujung tumpul, larutan PBS steril, pepton water, ose, needle, reagen kovacs, kloroform, mikroskop, gelas obyek, methanol murni, pewarna Giemsa, selotip, alkohol, kapas, pemanas bunsen, dan makanan mencit (pelet 521 untuk ayam).

3.3. Metoda Penelitian

3.3.1. Persiapan

Isolasi kuman E.coli

Sampel untuk isolasi diambil dari feses seorang anak yang menderita diare. Feses diambil dengan lidi dan dimasukkan dalam tabung berisi pepton water steril, kemudian ditanam pada media diferensial EMB Agar dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Dua puluh empat jam kemudian diambil 1 koloni dari biakan untuk diuji sifat biokimiawinya yang meliputi tes indol, H₂S, motilitas, fermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa.

Identifikasi Kuman E.coli

Identifikasi E.coli mula-mula dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk menguji apakah koloni tersebut

bersifat Gram negatif. Koloni hijau metalik dari media EMB Agar ditanam pada media identifikasi SIM Agar dan TSIA dengan menggunakan needle. Koloni tersebut adalah koloni kuman E.coli bila pada media SIM tidak membentuk H_2S yaitu tidak ada warna hitam pada media, terbentuk indol dan bersifat motil yang ditandai dengan adanya pertumbuhan menjalar ke atas. Pada media TSIA membentuk asam dan gas dari glukosa, laktosa dan sukrosa yang ditandai dengan adanya perubahan warna media dari coklat muda menjadi kuning serta tidak membentuk gas H_2S .

3.3.2. Penentuan Dosis Infeksi (ID_{50})

Penghitungan Kuman E.coli

Penghitungan kuman, dilakukan dengan cara membuat suspensi kuman dengan mencampur 8 koloni kuman dengan 1 ml pepton water lalu diinkubasi selama 3 jam pada $37^{\circ}C$. Suspensi diatas digunakan untuk membuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dengan menggunakan larutan PBS steril. Masing-masing pengenceran dan kontrol diambil 0,1 ml untuk ditanam pada media NA. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^{\circ}C$ jumlah kuman E.coli dapat dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{Pengenceran}}{n}$$

n = Jumlah pengenceran yang koloninya dapat dihitung

Infeksi E.coli pada Saluran Reproduksi Mencit Betina

Mencit betina sebanyak 42 ekor dibagi secara acak menjadi 7 grup yang memperoleh perlakuan sebagai berikut:

- Grup I : sebagai kontrol diinokulasi dengan PBS steril
- Grup II : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-1}
- Grup III : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-2}
- Grup IV : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-3}
- Grup V : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-4}
- Grup VI : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-5}
- Grup VII : diinokulasi dengan E.coli pengenceran 10^{-6}

Pengenceran kuman dibuat dengan cara yang sama dengan metode penghitungan kuman, tetapi pada penggunaan untuk inokulasi suspensi mula-mula kuman dibuat dengan mencampurkan 16 koloni kuman dan 1 ml pepton water karena dosis yang dipakai untuk inokulasi sebanyak 0,05 ml.

Cara menginokulasi mencit yaitu dengan memegang mencit dalam posisi kepala menghadap ke bawah dengan tangan kiri dan tangan kanan menginokulasikan suspensi kuman pada vagina mencit dengan menggunakan spuit dan jarum khusus.

Pengamatan Infeksi

Pengamatan infeksi dilakukan 24 jam setelah infeksi dengan membuat vagina smear. Bila pada preparat ulas vagina smear banyak terdapat lekosit (dengan kontrol sebagai pembanding), maka penilaian positif terinfeksi.

Cara pembuatan preparat ulas vagina smear adalah sebagai berikut: mencit dalam posisi kepala menghadap ke bawah dipegang dengan tangan kiri, sedang tangan kanan memegang lidi yang ujungnya dibalut kapas. Ujung kapas yang sudah dibasahi dengan PBS steril dimasukkan dengan hati-hati dalam vagina mencit sambil diputar-putar, kemudian dioleskan pada gelas obyek yang sudah ditandai dengan bujursangkar 1 cm². Olesan tersebut difiksasi dengan methanol. Setelah kering ditetesi dengan beberapa tetes zat warna Giemsa dan dibiarkan selama 30 menit, kemudian dicuci dan dikeringkan. Preparat ulas diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 450 x.

Penghitungan Dosis Infeksi (ID₅₀)

Penghitungan ID₅₀ yang dipakai adalah cara Reed and Muench. Hitchner, *et al* (1980) menyatakan rumus Reed and Muench adalah sebagai berikut :

$$PD = \frac{\% (+) \text{ pengenceran di atas } 50\% - 50\%}{\% (+) \text{ pengenceran di atas } 50\% - \% (+) \text{ di bawah } 50\%}$$

$$\text{Log } (-) \text{ titer ID}_{50} =$$

$$\text{Log } (-) \text{ pengenceran } (+) \text{ di atas } 50\% + PD$$

$$PD = \text{Proportionate Distance}$$

3.3.3. Perlakuan Penelitian

Infeksi pada Hewan Percobaan

Mencit betina sebanyak 20 ekor yang berumur 6-8 minggu dibagi secara acak menjadi 2 grup masing-masing

10 ekor yaitu grup pertama sebagai kontrol dan grup kedua mendapat perlakuan infeksi E. coli dengan dosis ID₅₀. Cara menginfeksi mencit sama dengan infeksi untuk penentuan ID₅₀ yaitu diambil 0,05 ml suspensi kuman ID₅₀ dengan spuete 1 ml kemudian diinfeksi pada alat reproduksi mencit, yaitu pada vaginanya.

Pengawinan Mencit

Setiap ekor mencit betina baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan dimasukkan dalam kandang individu 1-2 detik setelah diinfeksi. Seekor mencit jantan dimasukkan pula dalam masing-masing kandang dan diharapkan masing-masing pasangan akan kawin. Mencit jantan dikeluarkan dari kandang 5 hari setelah infeksi.

Pengamatan

Angka kebuntingan mencit dan jumlah fetusnya diamati dua minggu setelah dikawinkan yaitu dengan pembedahan. Cara pembedahan yaitu: segumpal kapas yang dibasahi dengan kloroform dimasukkan dalam stoples, kemudian satu per-satu mencit dimasukkan dalam stoples dan ditutup rapat. Setelah mencit tersebut mati, mencit dikeluarkan dan difiksasi diatas papan bedah. Pembedahan dimulai dengan menggunting kulit bagian perut (linea alba) dan dilakukan lapis demi lapis sampai isi perut dapat dilihat, kemudian dicari kornua uterinya dan diamati jumlah fetusnya.

3.4. Analisis data

Pada penelitian ini rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap . Data jumlah fetus dianalisis dengan menggunakan uji t (Kusriningrum, 1989), sedangkan frekuensi kebuntingan mencit dianalisis dengan uji eksak dari Fisher (Purnomo, 1992).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Hasil Isolasi Dan Identifikasi Kuman E.coli

Koloni hijau metalik dengan pusat kehitaman terbentuk pada media EMB. Hasil pewarnaan adalah kuman berwarna merah yang menunjukkan bahwa kuman bersifat Gram negatif. Pada media TSIA, warna media berubah menjadi kuning serta terdapat ruang kosong pada dasar tabung yang berarti kuman memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa serta membentuk asam dan gas. H_2S tidak dibentuk, terlihat dari tidak adanya warna hitam pada media. Sedangkan pada media SIM terdapat bentuk pertumbuhan menjalar ke atas yang menandakan adanya motilitas dari kuman. Tes Indol positif, terlihat adanya cincin jingga.

Dari hasil tes biokimiawi di atas dapat disimpulkan bahwa kuman tersebut adalah kuman Escherichia coli.

4.2. Hasil Penghitungan Jumlah Kuman

Tabel 1. Data Hasil Penghitungan Koloni

Pengenceran	Jumlah Koloni
10^{-6}	47
10^{-5}	115
10^{-4}	176

Dari hasil penghitungan kuman diketahui bahwa jumlah kuman setiap ml suspensi adalah $2,01 \times 10^8$ (lampiran 1).

4.3. Hasil Penghitungan Lekosit 24 Jam Setelah Inokulasi

Tabel 2. Data Hasil Penghitungan Lekosit 24 Jam Setelah Inokulasi

No	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	62	29	53	75	34	35	17
2	8	61	37	19	50	20	8
3	38	82	11	51	16	28	12
4	10	57	18	84	13	10	40
5	5	20	35	25	29	32	27
6	13	79	31	51	27	17	15
\bar{x}	22,6	54,6	30,8	50,8	28,2	23,6	19,8

Dari tiap-tiap nomer pada masing-masing pengenceran dibandingkan dengan rata-rata kontrol. Bila jumlah lekosit lebih banyak dari rata-rata kontrol, maka penilaian positif. Sebaliknya bila jumlah lekosit lebih sedikit atau sama dengan kontrol, maka penilaian negatif.

Hasil dari penghitungan lekosit ini digunakan untuk mencari ID_{50} dengan cara Reed and Muench seperti terdapat pada uraian di bawah ini.

4.4. Hasil Penghitungan ID_{50} Dengan Cara Reed and Muench

Hasil penghitungan ID_{50} dengan cara Reed and Muench adalah pada enceran $10^{-4,4}$ (lampiran 2). Pada penelitian, dosis yang dipakai adalah pada enceran 10^{-3} .

Tabel 3. Data ID₅₀

Pengen- ceran	+	-	Jumlah		Rasio +	% +
			+	-		
10 ⁻¹	5	1	23	1	23/24	96
10 ⁻²	4	2	18	3	18/21	86
10 ⁻³	5	1	14	4	14/18	78
10 ⁻⁴	4	2	9	6	9/15	60
10 ⁻⁵	3	3	5	9	5/14	36
10 ⁻⁶	2	4	2	13	2/15	13

4.5. Hasil Penghitungan Angka Kebuntingan dan Jumlah Fetus

Dari penghitungan jumlah fetus diketahui pada kelompok kontrol 6 ekor mencit bunting dan 3 ekor tidak bunting. Sedang pada kelompok perlakuan, 3 ekor mencit bunting dan 6 ekor tidak bunting.

Setelah dianalisis dengan uji eksak Fisher untuk frekuensi kebuntingan dan uji t untuk jumlah fetus ternyata tidak ada perbedaan antara perlakuan dan kontrol (lampiran 3 dan 4). Data jumlah fetus dan angka kebuntingan dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4. Data Kebuntingan dan Jumlah Fetus Mencit pada Umur Kebuntingan 2 Minggu

No	Kontrol	Perlakuan
1	(-)	8
2	10	(-)
3	10	6
4	8	(-)
5	12	11
6	6	(-)
7	(-)	(-)
8	(-)	(-)
9	10	(-)
Juml. kebunt.	6	3
Juml. mencit	9	9

BAB V

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, ternyata infeksi kuman E. coli pada saluran reproduksi terhadap fertilitas mencit tidak berbeda dalam hal frekuensi kebuntingan dan jumlah fetus.

Kemungkinan yang bisa diajukan sebagai faktor penyebab tidak adanya perbedaan tersebut adalah hewan percobaan mengalami infeksi tetapi tidak sampai menimbulkan gangguan reproduksi. Sutrisna (1986) mengatakan bahwa suatu penyakit timbul oleh karena akibat dari beroperasinya berbagai faktor baik dari agen, induk semang atau lingkungan.

Salah satu faktor yang mungkin menyebabkan tidak adanya gangguan reproduksi pada penelitian ini adalah waktu untuk menginfeksi. Pada penelitian ini tidak diamati saat periode birahi mencit yang digunakan untuk perlakuan infeksi. Bila infeksi dilakukan pada saat mencit tersebut birahi, maka kecil kemungkinannya untuk dapat menimbulkan gangguan pada reproduksi. Hal ini selaras dengan pendapat Salisbury and VanDemark (1961) bahwa daya tahan uterus untuk melawan infeksi dikendalikan oleh hormon. Selama birahi, diketahui uterus tahan terhadap infeksi, tetapi pada fase luteal uterus sangat peka terhadap infeksi. Hal tersebut dapat

berarti bahwa hormon estrogen yang banyak dikeluarkan pada waktu birahi dapat menyebabkan uterus tahan terhadap infeksi, sedangkan hormon progesteron yang dikeluarkan pada fase luteal oleh korpus luteum membuat uterus peka terhadap infeksi. Yatim (1982) menyatakan kadar estrogen yang tinggi merangsang epitel vagina maupun endometrium untuk bermitosis. Pada rodentia pertumbuhan epitel vagina disertai pula dengan penandukan. Pada fase luteal, dibawah pengaruh hormon progesteron pertumbuhan epitel ditekan dan epitel akan menipis kembali.

Salisbury and VanDemark (1961) juga mengatakan bahwa pada periode birahi lendir serviks menjadi sangat kental dan berdaya bakterisid yang mencegah terjadinya infeksi. Jadi dapat dipahami bila infeksi dilakukan pada saat mencit tersebut birahi, maka akan banyak kuman yang mati karena daya bakterisid dari lendir serviks. Banyaknya kuman yang mati tersebut menyebabkan infeksi tidak terjadi atau infeksi yang terjadi bersifat ringan hingga tidak menimbulkan gangguan reproduksi dan kebuntingan dapat berlangsung.

Kemungkinan lain yang menjadi faktor penyebab tidak adanya perbedaan dalam penelitian ini adalah kondisi hewan percobaan yang baik. Selama penelitian, hewan percobaan berada di bawah pengawasan yang baik. Kandang yang secara berkala dibersihkan, makan dan minum yang

cukup membuat hewan percobaan berada dalam kondisi yang rata-rata baik. Dalam kondisi perawatan yang baik, sulit bagi seekor hewan untuk mengalami infeksi berat hingga menimbulkan gangguan, dalam hal ini gangguan reproduksi, kecuali organisme yang menginfeksi tersebut bersifat patogen dan dalam jumlah yang besar.

Jawetz et.al (1986) juga sependapat bahwa banyak kuman coliform Gram negatif adalah oportunistis yang menimbulkan penyakit bila dapat masuk ke dalam tubuh penderita yang lemah. Jadi dapat disimpulkan bahwa kecil kemungkinannya bagi kuman coliform tersebut untuk dapat menimbulkan penyakit bila kondisi host dalam keadaan baik.

Dalam uraian di atas sudah disebutkan bahwa patogenitas dan jumlah kuman ikut menentukan terjadinya infeksi. Pada penelitian ini kuman E. coli yang digunakan mula-mula diisolasi dari seorang anak yang menderita diare. Kuman tersebut disimpan untuk keperluan penelitian ini dan ditanam di media baru bila hendak digunakan. Jadi kuman ini sudah berulang kali berpindah dari media yang satu ke media yang lainnya, sehingga sifat patogennya berkurang. Soltys (1963) berpendapat bahwa patogenitas banyak strain dari E. coli untuk hewan laboratorium adalah rendah, tetapi strain yang diisolasi

segera dari sebuah penyakit lebih patogenik daripada strain laboratorium yang sudah tua.

Dalam hal patogenitas kuman, selain berkurangnya sifat patogen dari kuman E. coli yang mengalami pupukan berulang-ulang, juga pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian antigen yang bersifat patogen dari kuman E. coli. Jadi pada penelitian ini tidak diketahui apakah kuman E. coli yang digunakan mempunyai antigen yang bersifat patogen atau tidak.

Soltys (1963) juga menyatakan seringkali suatu kuman bersifat patogen pada satu spesies hewan dan tidak patogen pada hewan yang lain. Sementara beberapa kuman yang disebut tidak patogen dapat menimbulkan perubahan patologik bila cukup banyak jumlah kuman yang dimasukkan dalam jaringan.

Banyaknya kuman yang digunakan pada penelitian ini dengan memakai ID_{50} adalah $2,01 \times 10^5$ /ml. Jumlah ini mungkin belum cukup banyak untuk dapat menimbulkan gangguan pada reproduksi mencit. Belum lagi dikurangi oleh bakteri yang mati karena efek bakterisid dari cairan serviks bila mencit yang diinfeksi dalam keadaan birahi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah : Infeksi E. coli pada saluran reproduksi tanpa memperhatikan waktu infeksi dan patogenitas kuman tidak berpengaruh terhadap fertilitas mencit betina dalam hal frekuensi kebuntingan dan jumlah fetusnya.

Saran-saran :

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memperhatikan :

1. Fase dalam siklus birahi mencit pada waktu menginfeksi mencit.
2. Kondisi hewan percobaan selama penelitian.
3. Jumlah sampel penelitian yang lebih besar, sehingga data yang diperoleh lebih akurat.

RINGKASAN

TITIEN SUTANTO. Pengaruh Infeksi E. coli pada Saluran Reproduksi terhadap Fertilitas Mencit Betina (Di bawah bimbingan DR. ISMUDIONO, M.S, Drh sebagai pembimbing pertama dan DIDIK HANDIJATNO, M.S., Drh sebagai pembimbing kedua).

Jumlah ternak dan kebutuhan ternak yang tidak seimbang merupakan masalah yang dihadapi negara berkembang. Populasi ternak selalu berhubungan dengan masalah reproduksi. Salah satu masalah reproduksi yang sering dialami oleh peternak adalah ketidaksuburan karena infeksi. Masalah ini menarik peneliti untuk mengadakan penelitian tentang infeksi E. coli pada saluran reproduksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi E. coli pada saluran reproduksi terhadap fertilitas mencit betina yang dilihat dari frekuensi kebuntingan dan jumlah fetusnya.

Mencit betina sebanyak 62 ekor dan mencit jantan sebanyak 20 ekor yang berumur 6-8 minggu dipakai dalam penelitian ini. Empat puluh dua ekor mencit betina digunakan sebagai penelitian pendahuluan untuk menentukan ID₅₀, sedang sisanya sebanyak 20 ekor dibagi dalam 2 perlakuan yaitu diinfeksi dengan larutan PBS steril sebagai kontrol dan diinfeksi dengan E. coli dosis ID₅₀.

Masing-masing mencit dari perlakuan dan kontrol dikawinkan, dan 2 minggu setelah kawin mencit betina

dibedah untuk diamati kebuntingan dan jumlah fetusnya.

Hasil yang didapat dari penelitian yang sudah dilakukan, didapatkan 6 ekor mencit bunting dari kontrol dan 3 ekor mencit bunting dari perlakuan.

Berdasarkan uji eksak dari Fisher untuk frekuensi kebuntingan dan uji t untuk jumlah fetus, tidak didapatkan perbedaan dalam frekuensi kebuntingan maupun jumlah fetusnya. Kesimpulan yang dapat diambil adalah infeksi E.coli pada saluran reproduksi tanpa memperhatikan waktu infeksi dan patogenitas kuman tidak berpengaruh terhadap fertilitas mencit betina dalam hal frekuensi kebuntingan dan jumlah fetusnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Hardjopranjoto, S. 1988. Fisiologi Reproduksi. Edisi V. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Hitchner, S. B., C. H. Chairman, H. G. Dometmuth, Purchase, and J. E. Williams. 1980. Avian Pathologist.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, and E. A. Adelberg. 1986. Review of Medical Microbiology. 16th Ed. Lange Medical Publication. California.
- Kartini, C. 1981. Beberapa Aspek Patologik Organ Reproduksi Pada Sapi Betina. FKV. IPB. Bogor.
- Kelly and Hite. 1955. Microbiology. Appleton Century Crofts Inc.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Martindah, E. 1988. Faktor-faktor Penyebab Kawin Berulang pada Sapi. Swadaya Peternakan Indonesia, Mei, No 40 : 19 - 20.
- Merchant, I. A. and R. A. Packer. 1970. Veterinary Bacteriology and Virology. 7th Ed. The Iowa state University Press, Ames, Iowa USA.
- Noakes, D. 1986. Fertility and Obstetrics in Cattle. Blackwell Scientific Publications.
- Palguna, G. 1982. Endometritis Pada Sapi yang Disebabkan oleh Streptococcus, Staphylococcus, Escherichia coli. FKV. IPB. Bogor.
- Partodihardjo, S. 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi II. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Peters, A. R. and P. J. H. Ball. 1986. Reproduction in Cattle. Butterworth & Co. Ltd.
- Purnomo, W. 1992. Analisis Data Kategorial. Penataran Metodologi Penelitian Statistika dan Komputer Lembaga Penelitian UNAIR. Surabaya.
- Salisbury and VanDemark (terj: R. Djanuar). 1961. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada

- Soltys, M. A. 1963. Bacteria and Fungi Pathogenic to Man and Animals. Bailliër Tindal and Cox. London.
- Suripta, H. 1991. Faktor-faktor Penyebab Repeat Breeding Pada Sapi. Swadaya Peternakan Indonesia, April, No 71 : 20,21 dan 46.
- Sutrisna, B. 1986. Pengantar Metoda Epidemiologi. Dian Rakyat. Jakarta.
- Yatim, W. 1982. Reproduksi dan Embriologi. Tarsito, Bandung.

L A M P I R A N

Lampiran 1. Penghitungan Jumlah Kuman

Pengenceran yang dapat dihitung:

$$10^{-6} = 47 \text{ koloni} = 4,7 \cdot 10^7$$

$$10^{-5} = 115 \text{ koloni} = 1,15 \cdot 10^7$$

$$10^{-4} = 176 \text{ koloni} = 0,176 \cdot 10^7$$

$$\text{Jumlah kuman} = \frac{(4,7 \cdot 10^7) + (1,15 \cdot 10^7) + (0,176 \cdot 10^7)}{3}$$

$$= 2,01 \cdot 10^7 / 0,1 \text{ ml}$$

$$= 2,01 \cdot 10^8 / \text{ml} \quad \checkmark$$

Lampiran 2. Penghitungan ID₅₀ Dengan Reed and Muench

$$\begin{aligned}
 PD &= \frac{\% (+) \text{ di atas } 50\% - 50}{\% (+) \text{ di atas } 50\% - \% (+) \text{ di bawah } 50\%} \\
 &= \frac{60 - 50}{60 - 35} = 0,4
 \end{aligned}$$

Log (-) titer ID₅₀

$$= \log (-) \text{ pengenceran } (+) \text{ di atas } 50\% + PD$$

$$= 4 + 0,4 = 4,4$$

$$ID_{50} = 10^{4,4}$$

$$10^{4,4}$$

Lampiran 3. Analisis Hasil Pengamatan Kebuntingan Dengan Menggunakan Uji Eksak dari Fisher

	(+)	(-)	Total
P	3	6	9
K	6	3	9
Total	9	9	18

$$E = \frac{9 \times 9}{18} = 4,5$$

Tabel pengamatan :

3	6	9
6	3	9
9	9	18

$$P1 = \frac{9! \ 9! \ 9! \ 9!}{18! \ 3! \ 6! \ 6! \ 3!} = 0,15$$

2	7	9
7	2	9
9	9	18

$$P2 = \frac{9! \ 9! \ 9! \ 9!}{18! \ 2! \ 7! \ 7! \ 2!} = 0,03$$

1	8	9
8	1	9
9	9	18

$$P3 = \frac{9! \ 9! \ 9! \ 9!}{18! \ 1! \ 8! \ 8! \ 1!} = 0,002$$

0	9	9
9	0	9
9	9	18

$$P4 = \frac{9! \ 9! \ 9! \ 9!}{18! \ 0! \ 9! \ 9! \ 0!} = 0,00002$$

$$P = P1 + P2 + P3 + P4 = 0,18202$$

Pada tingkat signifikan $\alpha = 0,05$, maka H_0 diterima karena $p > 0,05$. Kesimpulan : tidak terdapat perbedaan frekuensi kebuntingan antara perlakuan dan kontrol.

Lampiran 4. Analisis Hasil Jumlah Fetus Dengan Menggunakan uji t Yang Mempunyai Ulangan Tidak Sama

Ulangan	A	B
1	10	8
2	10	6
3	8	11
4	12	
5	6	
6	10	
Total	56	25
\bar{x}	9,33	8,33

A = Kontrol

B = Perlakuan

$$\begin{aligned}
 S_A^2 &= \frac{\sum A^2 - (\sum A)^2 / n_1}{n_1 - 1} \\
 &= \frac{10^2 + 10^2 + 8^2 + 12^2 + 6^2 + 10^2 - 56^2 / 6}{5} \\
 &= 4,266
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 S_B^2 &= \frac{\sum B^2 - (\sum B)^2 / n_2}{n_2 - 1} \\
 &= \frac{8^2 + 6^2 + 11^2 - 25^2 / 3}{2} \\
 &= 6,335
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 S_{(\bar{A} - \bar{B})} &= \sqrt{S_A^2 / n_1 + S_B^2 / n_2} \\
 &= \sqrt{2,823} = 1,68
 \end{aligned}$$

$$t_{\text{hit}} = \frac{|\bar{A} - \bar{B}|}{S(\bar{A} - \bar{B})} = 0,5952$$

$$\begin{aligned} \text{d.b} &= (n_1 - 1) + (n_2 - 1) \\ &= 7 \end{aligned}$$

$t_{0,05}$ tabel dengan d.b 7 = 2,365

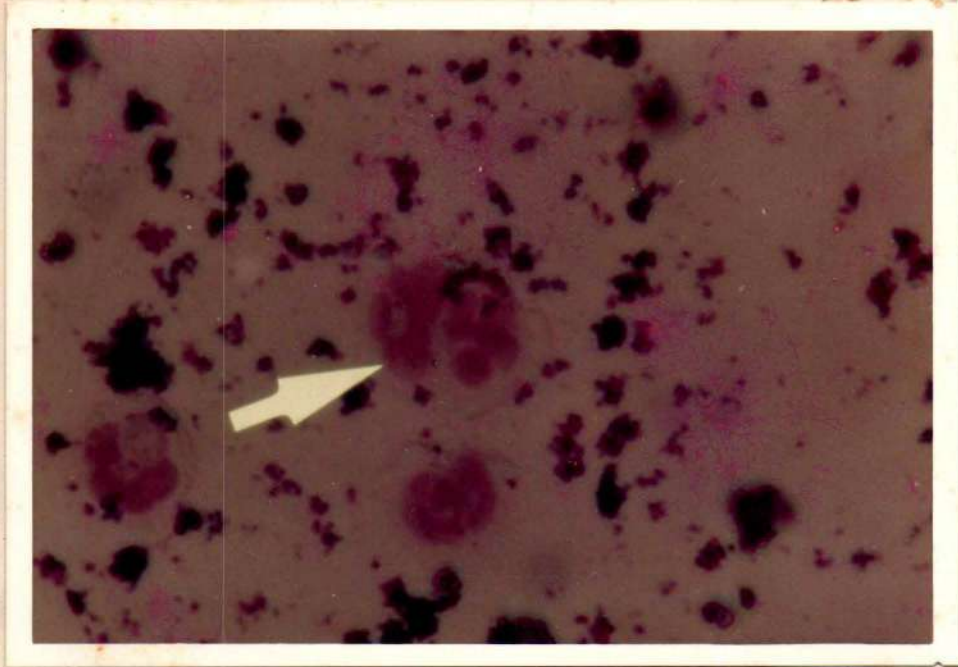
Kesimpulan yang dapat diperoleh : karena $t_{\text{tabel}} > t_{\text{hitung}}$, maka jumlah fetus antara perlakuan dan kontrol tidak berbeda nyata.

Lampiran 5. Daftar : t

derajat ——— t ———			derajat ——— t ———			derajat ——— t ———		
bebas	95%	99%	bebas	95%	99%	bebas	95%	99%
1	12.706	63.657	23	2.069	2.087	56	2.003	2.667
2	4.303	9.925	24	2.064	2.797	58	2.001	2.663
3	3.182	5.841	25	2.060	2.787	60	2.000	2.660
4	2.776	4.604	26	2.056	2.779	62	1.999	2.658
5	2.571	4.032	27	2.052	2.771	64	1.998	2.655
6	2.447	3.707	28	2.048	2.763	65	1.997	2.653
7	2.365	3.449	29	2.045	2.756	66	1.996	2.652
8	2.306	3.355	30	2.042	2.750	68	1.995	2.650
9	2.262	3.250	32	2.037	2.738	70	1.994	2.648
10	2.228	3.169	34	2.032	2.728	72	1.993	2.646
11	2.201	3.106	35	2.030	2.724	74	1.992	2.644
12	2.179	3.055	36	2.028	2.720	75	1.991	2.642
13	2.160	3.012	38	2.024	2.712	78	1.990	2.640
14	2.145	2.977	40	2.021	2.704	80	1.989	2.639
15	2.131	2.947	42	2.018	2.698	82	1.988	2.637
16	2.120	2.921	44	2.015	2.692	84	1.987	2.635
17	2.110	2.898	45	2.014	2.689	86	1.987	2.634
18	2.101	2.878	46	2.013	2.687	88	1.986	2.632
19	2.039	2.861	48	2.010	2.682	90	1.986	2.631
20	2.086	2.845	50	2.008	2.678	92	1.986	2.630
21	2.080	2.831	52	2.006	2.674	94	1.986	2.629
22	2.074	2.819	54	2.005	2.670	96	1.984	2.627
			55	2.004	2.668	100	1.982	2.626

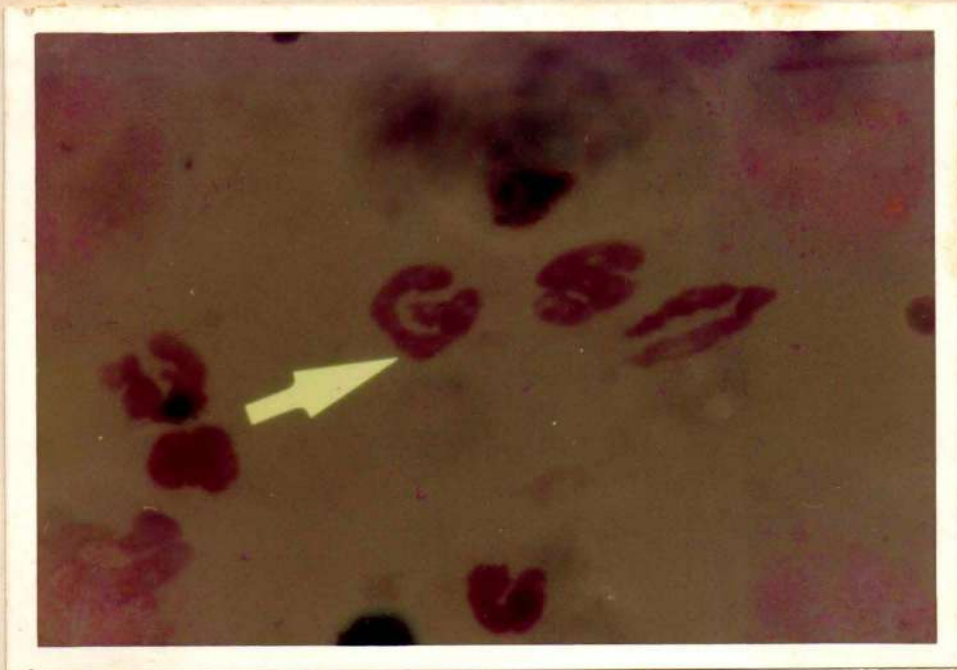
Sumber : Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Kusrieningrum. 1989.

Lampiran 6.



Gambar 1. Lekosit jenis neutrofil yang tampak pada vagina smear (Pembesaran 450 x)

Lampiran 7.



Gambar 2. Lekosit jenis stab yang tampak pada vagina smear (Pembesaran 450 x)

Lampiran 8.



Gambar 3. Spuite dan jarum untuk menginfeksi mencit