

SKRIPSI

**EFEK ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PMSG TERHADAP
JUMLAH SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*)**



Oleh :

MUH DARSONO
SRAGEN - JAWA TENGAH

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**EFEK ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PMSG TERHADAP
JUMLAH SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*)**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

MUH DARSONO

NIM 069612271

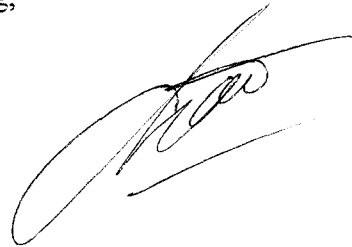
Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Rr. Sri Pantja Madyawati, M.S., Drh

Pembimbing Pertama



Chairul Anwar Nidom, 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,



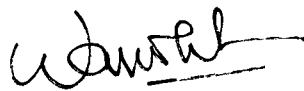
Abdul Samik, M.Si., Drh

Sekretaris



Rr. Sri Pantja Madyawati, M.S., Drh

Anggota



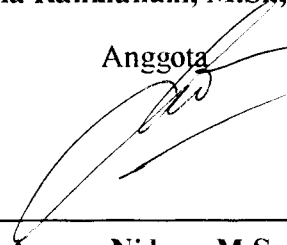
Nanik Sianita W, S.U., Drh

Ketua



Jola Rahmahani, M.Si., Drh

Anggota



Chairul Anwar Nidom, M.S., Drh

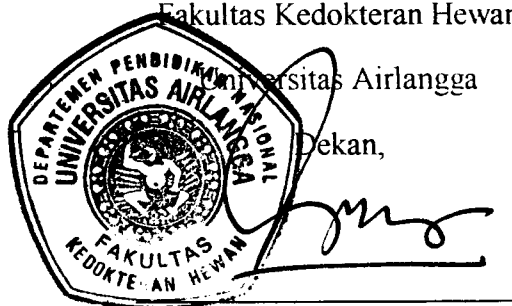
Anggota

Surabaya, 31 Juli 2001

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP. 130 687 297

**EFEK ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PMSG TERHADAP
JUMLAH SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*)**

Muh Darsono

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh Antibodi Poliklonal Anti-PMSG (Ab Po Anti-PMSG) dalam membatasi masa kerja PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*), terhadap jumlah ovulasi sel telur mencit (*Mus musculus*) hasil superovulasi. Sejumlah 35 ekor mencit betina yang dibagi menjadi 5 perlakuan, dilakukan superovulasi dengan PMSG dan 47 jam berikutnya diberikan Ab Po Anti-PMSG. Perlakuan A diberikan 0,1 ml Ab Po Anti-PMSG dengan pengenceran 1/20, perlakuan B dengan pengenceran 1/40, perlakuan C dengan pengenceran 1/80, perlakuan D dengan pengenceran 1/160 dan perlakuan E tanpa pemberian Ab Po Anti-PMSG sebagai kontrol. Disain percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (*Completely Randomized Design*). Kemudian 48 jam sejak diberikan PMSG, semua perlakuan diberikan hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) yang digunakan sebagai sumber LH (*Luteinizing Hormone*) dan dikawinkan. Semua perlakuan PMSG, Ab Po Anti-PMSG dan hCG diberikan secara *subcutan*. Sel telur dipanen (*flushing*) dengan cara merobek kantong fertilisasi. Data dianalisis menggunakan Analisis Ragam yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ 1%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat pengenceran 1/20 sampai dengan pengenceran 1/80 telah terjadi hambatan superovulasi, sedangkan pada pengenceran 1/160 masih terlihat efek superovulasi karena pada konsentrasi tersebut Ab Po Anti-PMSG sudah tidak mampu lagi membatasi masa kerja PMSG.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayahNya sehingga penyusunan karya ilmiah mengenai Efek Antibodi Poliklonal Anti-PMSG Terhadap Jumlah Sel Telur Mencit (*Mus musculus*) ini dapat terselesaikan.

Program superovulasi dengan preparat PMSG mempunyai beberapa kelemahan yaitu waktu paruhnya yang lama dan mengakibatkan ternak menjadi sulit bunting kembali, sementara pada penelitian terdahulu dikatakan Antibodi Poliklonal Anti-PMSG mampu memberikan perbaikan kondisi hormonal. Serangkaian percobaan pemberian Antibodi Poliklonal Anti-PMSG pada mencit yang disuperovulasi dan hasilnya dituangkan dalam tulisan ini.

Pada kesempatan ini dengan rasa hormat yang setinggi-tingginya penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Ibu Rr. Sri Pantja Madyawati, M.S., Drh., selaku pembimbing pertama dan Bapak Chairul Anwar Nidom, M.S., Drh., selaku pembimbing kedua yang dengan sabar memberikan saran serta nasehatnya demi kesempurnaan penyusunan karya ilmiah ini. Terima kasih juga kepada Bapak Abdul Samik, M.Si., Drh., yang telah memberikan dukungan pembiayaan dan Ibu Widjiati M.Si.,Drh., atas bantuan dan petunjuk teknis demi terselesaikannya penelitian ini.

Kepada Ibu dan Ayah tercinta, sembah sungkem penulis sampaikan atas segala susah payah membesarkan, mendidik, memberikan dorongan dan doa demi keberhasilan penulis selama ini. Terima kasih juga kepada saudara Anang, Rahmat, Mufid, Hery, Basuki, Desy, teman-teman kost, dan semua pihak yang telah membantu penulis.

Akhirnya penulis berharap semoga bantuan yang telah diberikan mendapat imbalan yang sepadan dari Allah SWT dan semoga karya ilmiah ini bisa bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan terutama dibidang Kedokteran Hewan. Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun senantiasa penulis harapkan.

Surabaya, Juli 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DARTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1.Latar Belakang Masalah.....	1
1.2.Rumusan Masalah.....	3
1.3.Tujuan Penelitian.....	3
1.4.Manfaat Penelitian.....	4
1.5.Hipotesis Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Fisiologi Reproduksi Mencit.....	5
2.2. Anatomi dan Fisiologi Ovarium.....	8
2.3. <i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG)</i>	10
2.4. <i>Human Chorionic Gonadotropin (hCG)</i>	12
2.5. Antibodi Poliklonal Anti-PMSG.....	13
BAB III MATERI DAN METODE.....	15
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.2. Materi Penelitian.....	15

3.3. Metode Penelitian	17
3.4. Peubah yang Diamati	19
3.5. Analisis Data	19
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	20
BAB V PEMBAHASAN.....	22
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	25
RINGKASAN.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Rata-rata Penghitungan Sel Telur	21
2. Analisa Hasil Pemeriksaan Uji ELISA pada Titer Antibodi ..	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kondisi Hormon FSH dan LH pada Mencit	7
2. Anatomi dan Fisiologi Ovarium	9
3. Kantung Fertilisasi Mencit	18
4. Perobekan Kantung Fertilisasi	18
5. Grafik Batang Jumlah Sel Telur Mencit	21
6. <i>Mus musculus</i> Galur BALB-C	37
7. Alat-alat <i>Flushing</i> Sel Telur	37
8. Sel Telur Mencit yang Sudah Diwarnai	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sidik Ragam Hasil Penghitungan Sel telur	31
2. Prosedur Pembuatan Ab Po Anti-PMSG	34
3. Hasil Pembacaan Titer Ab Po Anti-PMSG Setelah Diinkubasi 15 menit	35
4. Cara Kerja Uji ELISA Tidak Langsung	36

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan jaman yang selalu menghasilkan teknologi baru semakin banyak memberikan solusi untuk memenuhi kebutuhan masyarakat, termasuk konsumsi protein hewani sebagai salah satu pendukung terbentuknya generasi yang cerdas dan tangguh. Salah satu teknologi yang relatif baru tersebut adalah transfer embrio yang merupakan suatu teknik pemindahan embrio dari induk donor kepada induk resipien yang keduanya mempunyai status reproduksi yang sama.

Untuk mendapatkan jumlah embrio yang lebih banyak (superovulasi) sehingga bisa dipindahkan kepada induk resipien yang lebih banyak, maka diperlukan preparat hormon. Menurut sejarahnya, hormon diartikan sebagai zat kimia yang disintesis oleh bagian tubuh yang jelas batas-batasnya dan dibawa oleh peredaran darah atau limpa ke bagian tubuh yang lain tempat zat-zat itu menimbulkan modifikasi keadaan genetik tertentu terhadap organ-organ khusus, sehingga mempunyai pengaruh yang sangat spesifik dan selektif (Nalbandov, 1990). Lebih lanjut Armas Taboada (1990) mengemukakan bahwa hormon gonadotropin yang paling sering digunakan untuk menginduksi terjadinya superovulasi adalah *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG).

PMSG pada kambing, domba, maupun sapi mempunyai efek menyerupai *Folikel Stimulating Hormone* (FSH) yaitu merangsang pertumbuhan folikel dan sedikit *Luteinizing Hormone* (LH) menyebabkan luteinisasi sel-sel teka (Mac. Donald, 1975). Walaupun sangat potensial dalam stimulasi pertumbuhan folikel ovarium akan tetapi hasil panen embrio pada sapi donor belum begitu memuaskan karena mempunyai beberapa kelemahan. Salah satu kelemahannya adalah waktu paruh PMSG yang lebih lama dibandingkan dengan FSH karena adanya kandungan asam sialat yang tinggi dan mempunyai berat molekul yang besar. Kandungan asam sialat PMSG sebesar 10,4% (Hafez, 1993).

Lebih lanjut Bodin *et al.* (1997) mengatakan tingkatan residu PMSG sebanding dengan bertambahnya umur dan mempunyai pengaruh negatif terhadap penampilan siklus reproduksi yaitu meningkatkan kemungkinan ternak sulit bunting kembali. Pemberian Antibodi Poliklonal Anti-PMSG (Ab Po Anti-PMSG) pada waktu dan dosis yang optimal dapat menyebabkan keberhasilan superovulasi serta perbaikan kondisi hormonal (Katagiri *et al.*, 1991).

Pendapat lain seperti Vos *et al.* (1994) mengemukakan bahwa perlakuan pemberian Ab Po Anti-PMSG sebelum terjadinya *LH surge* akan menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi estradiol dalam darah. Sementara anggapan umum tentang waktu pelepasan LH tersebut menurut Monk (1987) adalah kurang lebih 49-50 jam sejak pemberian PMSG.

Untuk mengetahui pengaruh Ab Po Anti-PMSG dalam membatasi masa kerja PMSG yang masih terdapat dalam darah serta pengaruhnya terhadap respon superovulasi, maka pada penelitian ini dilakukan percobaan pengujian pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam sesudah pemberian PMSG dan menghitung jumlah sel telur yang diovulasikan.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka permasalahan yang dapat diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam setelah pemberian PMSG mampu menurunkan jumlah sel telur mencit ?
2. Apakah titer Ab Po Anti-PMSG yang diberikan berpengaruh terhadap jumlah sel telur mencit ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membantu mewujudkan keberhasilan teknologi transfer embrio tanpa adanya efek samping berupa timbulnya folikel sistik, sedangkan secara khusus penelitian ini bertujuan :

1. Mengetahui pengaruh pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam setelah pemberian PMSG terhadap penurunan jumlah sel telur mencit.
2. Mengetahui pengaruh titer Ab Po Anti-PMSG terhadap jumlah sel telur mencit.

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh manfaat: Mengetahui aplikasi dosis dan waktu pemberian Ab Po Anti-PMSG yang optimal untuk mencapai keberhasilan superovulasi serta perbaikan kondisi hormonal.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam sesudah pemberian PMSG mampu menurunkan jumlah sel telur mencit.
2. Titer Ab Po Anti-PMSG yang diberikan berpengaruh terhadap jumlah sel telur mencit.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fisiologi Reproduksi Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) adalah hewan yang umum dipakai untuk percobaan di laboratorium. Keuntungan menggunakan mencit adalah karena mempunyai ukuran tubuh yang kecil, produktifitas tinggi dan peka terhadap berbagai macam obat (Monk, 1987).

Siklus estrus mencit secara normal menurut pendapat Turner dan Bagnara (1988) senada dengan Monk (1987) yaitu bahwa lama satu siklus adalah empat hari dan pada species-species yang memiliki siklus pendek demikian umumnya ovariumnya mengandung folikel pada berbagai stadium pembentukan, juga korpus luteum dari beberapa siklus estrus sebelumnya.

Lebih lanjut Turner dan Bagnara (1988) menjelaskan bahwa siklus estrus mencit secara klinis dapat dibagi menjadi empat stadium:

a. Proestrus

Stadium ini menandakan datangnya birahi kemudian dan mempunyai ciri-ciri terjadinya involusi fungsional korpus luteum serta pembengkakan praovulasi folikel. Cairan terkumpul di dalam uterus yang selanjutnya menjadi sangat kontraktif. Preparat hapus vagina didominasi oleh sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau berbentuk lapisan.

b. Estrus

Stadium ini merupakan periode birahi dan kopulasi dimungkinkan hanya pada saat ini. Periode ini berakhir 9-15 jam dengan ciri-ciri aktivitas berlari-lari yang sangat tinggi, bergerak-geraknya telinga dan *lordosis*, atau melengkungnya punggung dalam menanggapi perlakuan manusia atau mendekatnya hewan jantan.

Di bawah pengaruh FSH, selusin atau lebih folikel ovarium tumbuh dengan cepat, uterus mengalami pembesaran progresif dan menjadi kembung karena akumulasi cairan di dalam lumen. Banyak terjadi mitosis yang mengakibatkan lapisan permukaan mukosa vagina menjadi skuamosa dan menanduk. Banyaknya sel-sel menanduk yang terkelupas ke dalam lumen vagina dalam preparat hapus vagina dipakai sebagai petunjuk estrus. Telur secara normal dilepas dari ovarium pada fase ini.

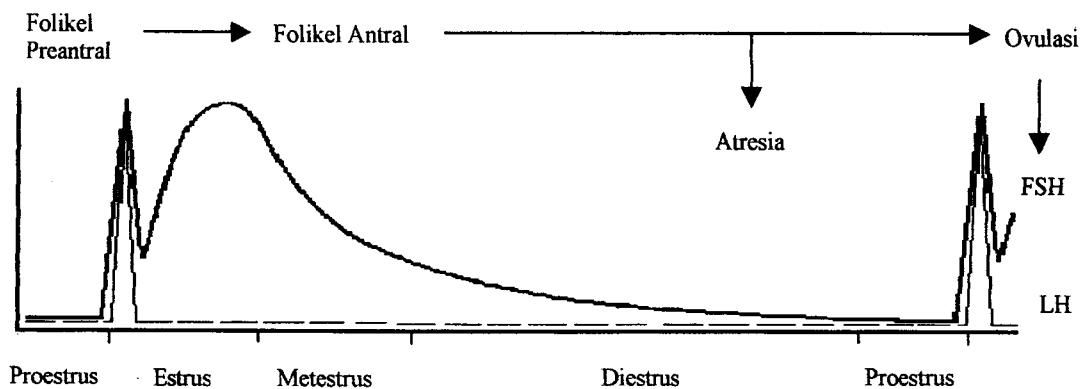
c. Metestrus

Stadium ini terjadi segera sesudah ovulasi, yang periodenya berakhir 10-14 jam dan perkawinan biasanya tidak dimungkinkan. Ovarium mengandung korpus luteum dan folikel-folikel kecil. Vaskularisasi dan kontraktilitas uterus berkurang. Banyak leukosit muncul di dalam lumen vagina bersama dengan sedikit sel-sel menanduk.

d. Diestrus

Stadium ini berlangsung paling lama yaitu sampai 60-70 jam, pada masa tersebut terjadi regresi fungsional korpus luteum. Uterus kecil, anemik dan sedikit kontraktif. Pada preparat hapus vagina tampak mukosa vagina tipis dan hampir semua terdiri dari sel-sel leukosit. Apabila terjadi kebuntingan siklus terganggu selama masa gestasi yang berakhir 20-22 hari pada tikus.

Pada keadaan siklus estrus normal, fungsi hormon FSH dan LH sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan folikel maupun proses ovulasi seperti yang tampak pada gambar 1.



Gambar 1. Kondisi hormon FSH dan LH pada berbagai fase dalam siklus estrus mencit. Sumber: Hafez, 1993.

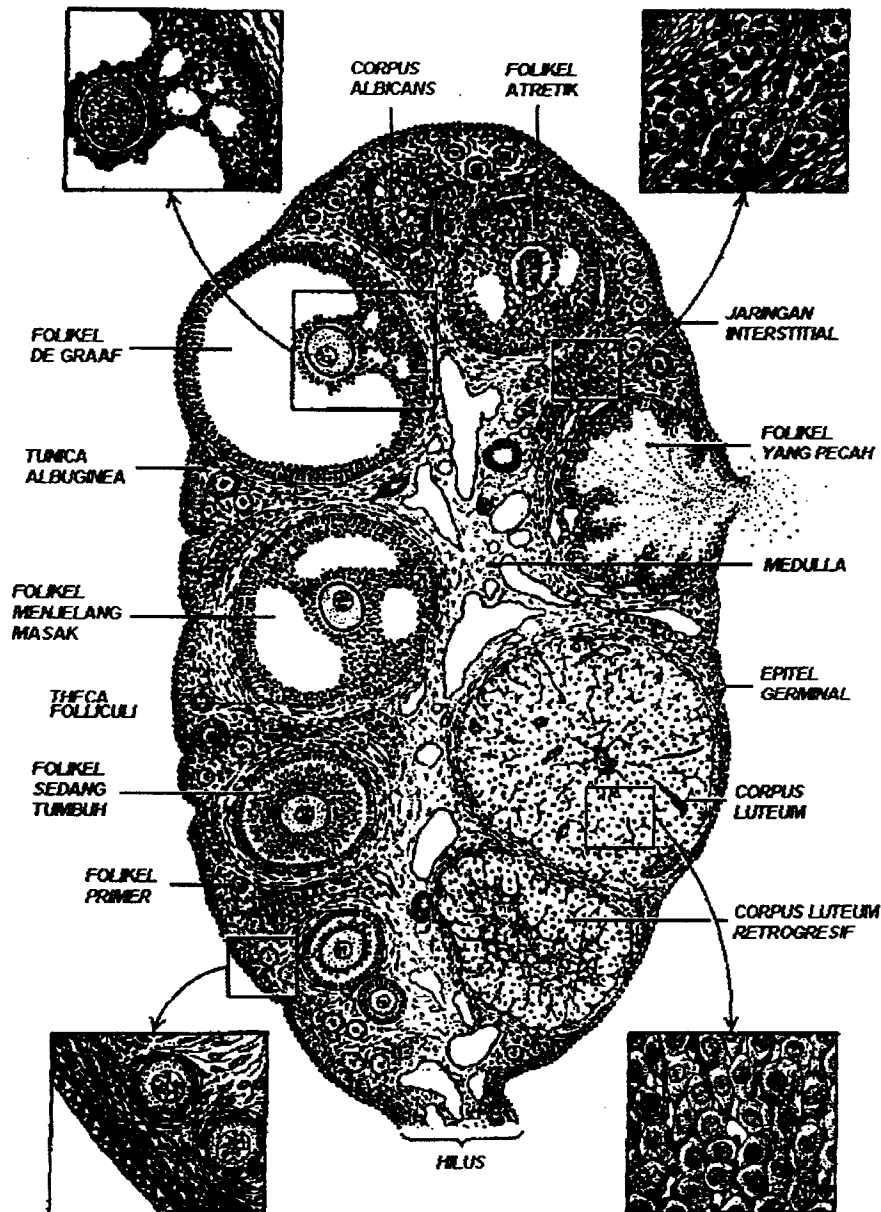
2.2 Anatomi dan Fisiologi Ovarium

Ovarium bentuknya bervariasi tergantung kepada species hewan, dari bentuk bulat telur sampai bentuk yang menyerupai kacang kara. Terdiri dari dua buah, berwarna abu-abu sampai merah muda dan permukaan yang licin pada waktu sebelum terjadinya ovulasi secara teratur. Fungsi utama ovarium adalah menghasilkan sel telur (fungsi reproduksi) dan pembentukan hormon yang mengatur saluran reproduksi, persiapan reaksi perkawinan dan mengatur sifat-sifat kelamin sekunder (fungsi endokrinologis) (Turner dan Bagnara, 1988).

Hardjopranto (1995) mengatakan bahwa ovarium pada kebanyakan mamalia yang telah mencapai dewasa kelamin di bagi menjadi dua bagian yaitu bagian luar disebut *korteks* dan bagian dalam disebut *medula*. Bagian korteks terdiri atas epitel kecambah (*germinal epithelium*), folikel dari berbagai ukuran dan tingkat pertumbuhan, korpus luteum, korpus albicans dan tunan pengikat, sedang bagian medula terdiri dari pembuluh darah, pembuluh limfe, saraf dan tunan pengikat. Ovarium memperoleh banyak darah dari arteri ovarika yang pada beberapa species ternak beranastomose dengan arteri uterina dan membentuk jala-jala kapiler di permukaan ovarium sehingga mempunyai efisiensi yang tinggi untuk aktivitas ovarium.

Epitel kecambah menyelimuti permukaan ovarium dan merupakan asal dari folikel yang selanjutnya berkembang menjadi sel telur. Pada fase pubertas sampai estrus dari setiap siklus birahi, terjadi perubahan oosit primer menjadi oosit

sekunder, ootid dan ovum sebagai sel telur yang sudah dewasa seperti tampak pada gambar 2 (Hardjopranjoto, 1995).



Gambar 2. Anatomi dan fisiologi ovarium. Tampak stadium perkembangan menuju Folikel De Graaf dari sebelah kiri, yang menurut arah jarum jam berlanjut menjadi masak dan atretik.
Sumber: Turner dan Bagnara, 1988.

Ovulasi adalah suatu proses terlepasnya sel telur (*ovum*) dari ovarium sebagai akibat pecahnya folikel yang telah masak (*Folikel de Graaf*). Mekanisme ovulasi ini distimulir oleh LH yang melepaskan histamin dan merangsang pelepasan enzim proteolitik yang melemahkan dinding folikel (Hafez, 1993).

Hunter (1995) memberikan gambaran urutan kejadian fase-fase terakhir menjelang ovulasi sebagai berikut. Fase akhir pertumbuhan folikel bersamaan waktunya dengan peningkatan akumulasi cairan antrum sehingga diameter folikel menjadi maksimum. Terjadi penurunan tekanan dalam folikel yang menyebabkan folikel menjadi lunak dan menggantung bebas. Selanjutnya akan tampak peningkatan aktifitas pembuluh darah berupa hemoragi kapiler pada sebagian besar dinding folikel, kecuali daerah bening tanpa pembuluh darah yang pada umumnya terbentuk ke arah apeks folikel. Daerah apeks tersebut kemudian mengalami penipisan dan degradasi yang menyebabkan terbentuknya lubang dan diikuti oleh keluarnya cairan folikel bersama dengan massa kumulus dan sel telur.

Suatu keadaan abnormal di mana folikel tidak pecah dan cairan folikel banyak tertimbun di dalamnya disebut kista folikel yang mungkin disebabkan karena kekurangan LH (Toelihere, 1981).

2.3 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG)

Hormon *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) adalah sebuah hormon glikoprotein yang ditemukan oleh Cole dan Hart pada tahun 1930 (Hafez,

1993). Sifat biologisnya serupa dengan campuran FSH dan LH pituitari yaitu merangsang pertumbuhan folikel dan merangsang ovulasi, tetapi sifat kimianya berbeda. PMSG mempunyai berat molekul kira-kira 64.000 dalton, lebih besar daripada berat molekul kedua gonadotropin yang lain dan memiliki kandungan asam sialat (10,4%) dan karbohidrat yang tinggi (49%)(Hafez, 1993). Berbeda dengan hCG, FSH dan LH, PMSG tetap berada di dalam darah dan limfa, tidak bisa didapatkan pada urin karena berat molekul yang besar itu sehingga tidak bisa melalui sistem filter ginjal (Supriatna, 1998).

Kandungan asam sialat yang tinggi tersebut menurut Hafez (1993) menyebabkan waktu paruh PMSG menjadi lebih lama sehingga setelah beberapa hari penyuntikan PMSG, kadarnya masih tetap tinggi dalam plasma darah (Mustofa, 1995). Kondisi demikian menurut Turner dan Bagnara (1988) juga berlaku apabila hormon tersebut disuntikkan kepada hewan lain.

PMSG dihasilkan oleh uterus yaitu mangkok endometrium (*Endometrial cup*), tidak dihasilkan oleh plasenta sebagaimana hCG (Turner dan Bagnara, 1988). Dalam peredaran darah kuda bunting hormon ini meningkat sejak hari ke-40, mencapai puncak pada hari ke-60 kemudian menurun setelah hari ke-80 dan kadarnya menjadi sangat rendah setelah hari ke-140 (Mac. Donald, 1975). Pada saat kadar PMSG di dalam darah mencapai puncaknya ternyata bersama itu pula terjadi perkembangan *endometrial cup* secara maksimum (Austin and Short, 1984).

Mekanisme kerja PMSG dalam menstimuli folikel tambahan diantaranya melalui beberapa cara yaitu folikel kecil didukung dan dipercepat pertumbuhannya menjadi folikel yang berkembang, folikel preantral ditingkatkan jumlahnya, pertumbuhan folikel antral baik yang kecil maupun yang besar ditingkatkan sehingga proporsi folikel antral yang akan mengalami atresia akan menurun, folikel atresia yang masih dalam stadium ringan diselamatkan kembali supaya dapat tumbuh berkembang dan berovulasi (Dott *et al.*, 1979 yang dikutip Supriatna, 1998).

2.4 Human Chorionic Gonadotropin (hCG)

Turner dan Bagnara (1988) menyatakan bahwa hormon ini termasuk hormon glikoprotein yang dihasilkan oleh vili khorion plasenta dan mempunyai berat molekul kira-kira 30.000 dalton. hCG mempunyai struktur kimia yang berbeda dengan LH namun mempunyai aktivitas yang sama sehingga secara komersial hCG digunakan sebagai sumber LH untuk merangsang ovulasi (Mac. Donald, 1975).

HCG tampak di dalam darah dan urin segera sesudah implantasi dan mencapai puncak kira-kira satu bulan sejak periode kebuntingan. Pada saat itu kurang lebih 100.000 R.U. (Rat Unit) dapat di sekresikan setiap hari. Setelah puncak, titer darah dan urin hormon tersebut menurun menjadi sangat rendah kadarnya dan tetap stabil sampai beberapa hari setelah parturisi. Hormon ini

mempunyai sifat luteotrofin karena memperpanjang status fungsional korpus luteum kebuntingan (*Corpus Luteum Graviditatum*) (Turner dan Bagnara, 1988).

2.5 Antibodi Poliklonal Anti-PMSG (Ab Po Anti-PMSG)

Antibodi adalah faktor yang terdapat dalam serum darah yang dapat memberikan respon kekebalan (Tizard, 1988). Menurut Harlow and Lane (1988) yang dikutip Murjito (2000) menyebutkan bahwa antigen yang dapat digunakan untuk menginduksi respon imun baik respon seluler maupun humoral disebut imunogen. Antibodi poliklonal adalah antibodi yang didapat dari perlakuan hiperimunisasi (Smith, 1995 seperti yang dikutip Samik, 2001).

Lebih lanjut Tizard (1988) menjelaskan bahwa sifat suatu bahan imunogen dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: Berat molekul, kerumitan struktur, kestabilan struktur, dan kecepatan di katabolisme tubuh. Suatu bahan mempunyai sifat imunogen yang kuat jika mempunyai berat molekul yang besar, struktur kimia yang rumit, stabil dan sulit untuk dikatabolisme tubuh. Turner dan Bagnara (1988) menyebutkan bahwa PMSG mempunyai berat molekul yang besar struktur glikoprotein (rumit) dan membutuhkan waktu metabolisme yang lama sehingga termasuk bahan yang mempunyai sifat imunogen kuat.

Samik (2001) melaporkan bahwa Kikutani (1987) membuat Ab Po Anti-PMSG dengan cara menyuntikkan PMSG secara berulang-ulang dengan selang waktu 7 hari dan pada hari ke-35 didapatkan titer antibodi yang tertinggi. Sedangkan Bodin *et al.* (1997) membuat Ab Po Anti-PMSG pada kambing dan antibodi dapat ditemukan pada hari ke-20 setelah penyuntikan PMSG.

Ab Po Anti-PMSG dapat menetralkan efek PMSG secara *in vivo* dan dapat meningkatkan kualitas embrio layak transfer (Kuran *et al.*, 1996). Pendapat senada juga disampaikan Katagiri *et al.* (1991) bahwa pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu dan dosis yang optimum dapat mendukung keberhasilan superovulasi serta perbaikan kondisi hormonal.

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Fisiologi Reproduksi dan untuk panen sel telur serta penghitungan sel telur dilakukan di Unit Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Waktu penelitian berlangsung mulai tanggal 16 Oktober 2000 sampai dengan tanggal 5 April 2001.

3.2 Materi Penelitian

a. Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini mencit (*Mus musculus*) galur BALB-C (Gambar 6) sebanyak 35 ekor mencit betina yang diperoleh dari Pusat Veterineria Farma Surabaya dengan berat badan 25-30 gram dengan umur 2,5-3 bulan yang siklus reproduksinya sudah berjalan sempurna dan 7 ekor mencit jantan dewasa yang sudah dikastrasi satu minggu sebelumnya yang digunakan sebagai pejantan pemacek.

b. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Hormon PMSG (Folligon, Intervet, Nederland), hormon hCG (Chorulon, Intervet,

Nederland), Ab Po Anti-PMSG, NaCl Fisiologis, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan Aquades Steril.

c. Peralatan

Penelitian ini mempergunakan peralatan sebagai berikut: Mikroskop fase kontras, mikroskop inverted stereo, cawan petri *disposable (nuclon)*, *sputit tuberculin*, *sputit 20 cc*, gunting, *scalpel*, pinset, pipet *pasture*, selang infus, bunzen, kapas dan alkohol 70% (Gambar 7).

d. Kandang Penelitian

Kandang untuk mencit dalam penelitian ini terdiri dari dua macam kandang: Kandang model pertama terbuat dari bak plastik dengan ukuran panjang, lebar dan tingginya masing-masing 50 x 35 x 15 cm yang ditutup dengan ram kawat dan dilengkapi tempat pakan dan minum yang digunakan sebagai kandang adaptasi dan perlakuan lain sebelum dikawinkan.

Kandang model kedua adalah seperti model pertama yang diberikan sekat sehingga setiap 1 bak plastik menjadi 4 petak, yang diperlukan sebagai kandang individual untuk proses perkawinan.

e. Makanan

Pakan yang diberikan kepada mencit adalah konsentrat berbentuk *pellet* jenis 521 untuk pakan ayam petelur yang diproduksi PT. Charoen Pokphand Indonesia dan air minum yang berasal dari PDAM Kotamadya Surabaya yang diberikan secara *adlibitum*.

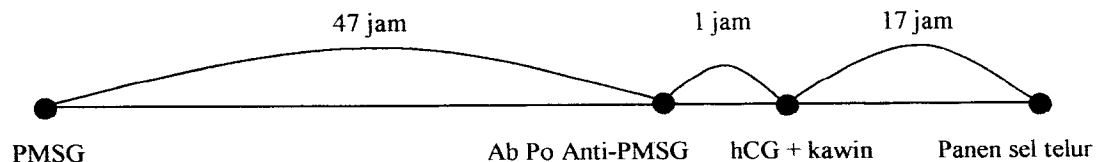
3.3 Metode Penelitian

Prosedur penelitian yang dilaksanakan adalah sebagai berikut: Mencit jantan dewasa sejumlah 7 ekor yang sudah dikastrasi satu minggu sebelumnya ditempatkan masing-masing pada kandang individual, sedangkan mencit betina sebanyak 35 ekor dipisahkan menjadi 5 kandang untuk 5 perlakuan.

Dalam penelitian ini dibedakan menjadi 5 kelompok perlakuan Ab Po Anti-PMSG yang prosedur pembuatannya seperti pada lampiran 2. Semua perlakuan PMSG, Ab Po Anti-PMSG dan hCG disuntikkan secara *subcutan* dengan 7 ulangan yang diberikan sebagaimana dosis berikut:

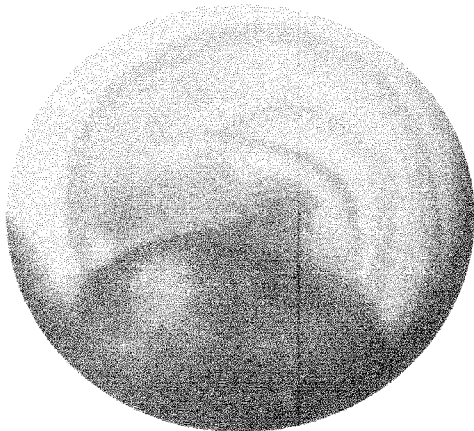
- A. PMSG 5 IU + Ab Po Anti-PMSG 0,1 ml (pengenceran 1/20) + hCG 5IU
- B. PMSG 5 IU + Ab Po Anti-PMSG 0,1 ml (pengenceran 1/40) + hCG 5IU
- C. PMSG 5 IU + Ab Po Anti-PMSG 0,1 ml (pengenceran 1/80) + hCG 5IU
- D. PMSG 5 IU + Ab Po Anti-PMSG 0,1 ml (pengenceran 1/160) + hCG 5IU
- E. PMSG 5 IU + hCG 5IU (kontrol)

Teknik penyuntikan obat di atas dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:



Tujuh belas jam setelah mencit dikawinkan, dilakukan pembedahan kemudian dipisahkan tuba fallopi dari uterus dan dicuci dengan PBS. Setelah bersih tuba fallopi ditempatkan pada cawan petri disposable (*nuclon*) dan dibedakan tiap-tiap perlakuan.

Sel telur mencit (Gambar 8) dipanen dengan cara merobek kantung fertilisasi dengan menggunakan *canula* (jarum spuit tuberculin), di bawah mikroskop fase kontras. Kemudian sel telur dihisap dengan pipet *pasture* yang telah dimodifikasi dengan selang infus, untuk dipindahkan pada *nuklon* lain yang sudah ditetesi PBS agar mempermudah dalam proses penghitungan sel telur.



Gambar 3. Kantung *Fertilisasi* Mencit



Gambar 4. Perobekan Kantung *Fertilisasi*

3.4 Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah rata-rata jumlah sel telur yang diovulasikan dari setiap perlakuan mencit dengan tingkat pengenceran yang berbeda-beda.

3.5 Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (*Completely Randomized Design*). Data yang diperoleh diuji dengan Uji F dan jika terjadi perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ 1%) (Kusriningrum, 1990).

BAB IV
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil penghitungan rata-rata jumlah sel telur pada tiap perlakuan kemudian dilakukan uji statistik dan hasilnya menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan ($p < 0,01$). Berdasarkan hasil uji statistik tersebut berarti perlakuan Ab Po Anti-PMSG yang diberikan berpengaruh terhadap jumlah sel telur mencit hasil superovulasi. Untuk lebih jelasnya mengenai hasil penghitungan rata-rata jumlah sel telur, dapat dilihat pada tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil Penghitungan Sel telur.

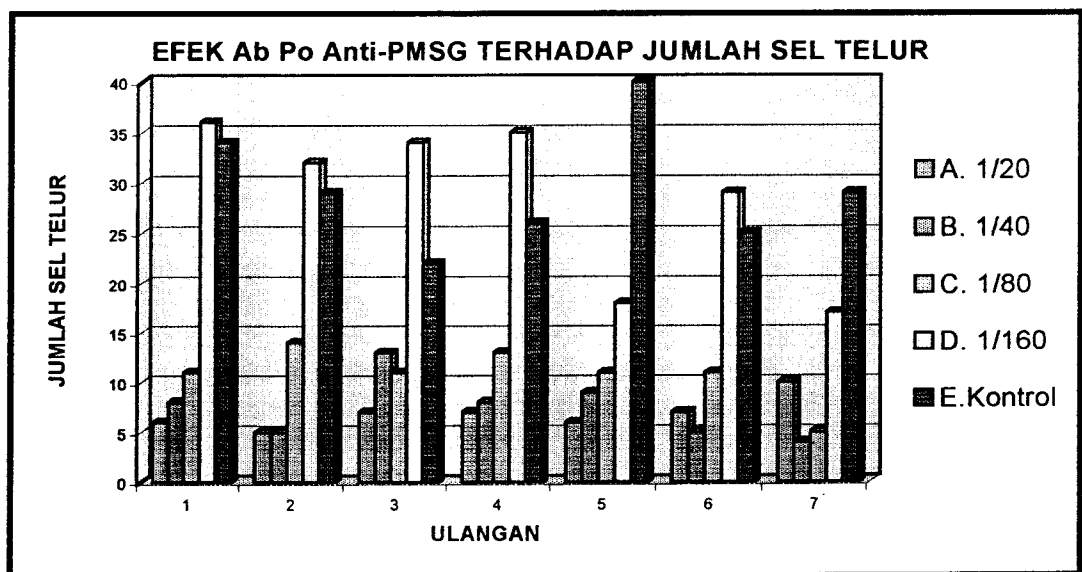
PERLAKUAN	JUMLAH MENCIT	RATA-RATA JUMLAH SEL TELUR \pm SD
A	7	6,86 \pm 1,57 ^b
B	7	7,43 \pm 3,10 ^b
C	7	10,86 \pm 2,85 ^b
D	7	28,71 \pm 7,99 ^a
E	7	29,29 \pm 6,05 ^a

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,01$).

Keterangan:

1. Perlakuan A: Dosis 0,1 ml Ab Po Anti-PMSG (pengenceran 1/20)
2. Perlakuan B: Dosis 0,1 ml Ab Po Anti-PMSG (pengenceran 1/40)
3. Perlakuan C: Dosis 0,1 ml Ab Po Anti-PMSG (pengenceran 1/80)
4. Perlakuan D: Dosis 0,1 ml Ab Po Anti-PMSG (pengenceran 1/160)
5. Perlakuan E: Tanpa Ab Po Anti-PMSG (kontrol)

Jumlah sel telur mencit hasil *flushing* dan gambarannya berdasarkan perbedaan pemberian Antibodi Poliklonal Anti-PMSG pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan pada pengenceran 1/20, 1/40, 1/80 dan 1/160 adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Grafik Batang Jumlah Perolehan Sel Telur Mencit pada Tiap Perlakuan Dengan Penyuntikan Antibodi Poliklonal Anti-PMSG

BAB V
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk membuktikan kemampuan Ab Po Anti-PMSG dalam membatasi masa kerja PMSG dan sekaligus bertujuan mengetahui aplikasi dosis dan waktu pemberian yang optimal.

Indikator yang diamati adalah sampai seberapa jauh Ab Po Anti-PMSG dengan berbagai pengenceran, masih mampu menghambat proses superovulasi, yang akan dibuktikan dari total penghitungan jumlah sel telur dalam kantong fertilisasi mencit.

Hasil yang didapat pada penelitian ini menunjukkan bahwa Ab Po Anti-PMSG dalam tingkat pengenceran 1/20 sampai dengan pengenceran 1/80, yang diinjeksikan 47 jam sejak pemberian PMSG secara statistik masih memberikan perbedaan yang sangat nyata yaitu berpengaruh menghentikan proses superovulasi. Sedangkan pada pengenceran 1/160 dan kontrol gejala superovulasi masih terjadi yang ditandai dengan jumlah sel telur yang diovulasikan lebih dari normal yang berarti pada konsentrasi tersebut Ab Po Anti-PMSG yang diinjeksikan 47 jam sejak pemberian PMSG sudah tidak mampu lagi membatasi masa kerja PMSG di dalam darah. Jumlah sel telur yang diovulasikan dalam satu siklus birahi normal adalah 6-15 sel telur (Smith dan Mangkuwidjoyo, 1988).

Pada penelitian sebelumnya Murjito (2000) menyebutkan bahwa penyuntikan Ab Po Anti-PMSG pada waktu satu jam setelah penyuntikan PMSG yang masih mampu menetralkan efek kerja PMSG dengan dosis yang optimal adalah sampai pada pengenceran 1/10, sedangkan pada penelitian ini dengan waktu 47 jam setelah pemberian PMSG menunjukkan bahwa tingkat pengenceran yang optimal adalah 1/80 (1 ml Ab Po Anti-PMSG dapat menetralsir 4000 IU PMSG). Hal ini berarti bahwa konsentrasi Ab Po Anti-PMSG yang diperlukan untuk membatasi masa kerja PMSG dalam darah konsentrasinya lebih rendah (pengenceran lebih besar).

Menurut Katagiri *et al.* (1991) residu PMSG pada tikus masih dapat terukur dalam serum darahnya pada hari ke 4-6 setelah injeksi intraperitoneal dengan 5-30 IU PMSG dan pada sapi terukur sampai 10-11 hari setelah injeksi 2500-3000 IU PMSG. Efek samping akibat masih beredarnya PMSG dalam sirkulasi darah adalah mempertinggi kejadian folikel sistik, terjadi gangguan keseimbangan hormonal, gangguan pembuahan (fertilisasi) dan pengangkutan embrio di saluran telur (Greve *et al.*, 1984 yang dikutip Supriatna dkk., 1998).

Pemberian PMSG untuk superovulasi yang diikuti dengan Ab Po Anti-PMSG dapat menurunkan jumlah folikel yang tidak diovulasikan serta meningkatkan jumlah embrio layak transfer dengan kualitas yang sangat baik (Nakajima *et al.*, 1992). Dengan dosis dan waktu penyuntikan yang tepat, Ab Po Anti-PMSG dapat digunakan pada tikus dan sapi dalam meningkatkan keberhasilan superovulasi tanpa efek samping dan mampu mengembalikan kondisi hormonal seperti semula (Katagiri *et al.*, 1991).

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam setelah pemberian PMSG mampu menurunkan jumlah ovulasi sel telur yang berarti telah membatasi masa kerja PMSG. Titer Ab Po Anti-PMSG yang diberikan berpengaruh terhadap perolehan jumlah sel telur mencit hasil superovulasi dengan tingkat pengenceran yang paling baik yaitu pengenceran 1/80.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian Ab Po Anti-PMSG pada waktu 47 jam setelah pemberian PMSG mampu menurunkan jumlah ovulasi sel telur mencit.
2. Titer Ab Po Anti-PMSG yang diberikan berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah sel telur mencit dengan tingkat pengenceran yang paling baik 1/80.

Saran yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian Ab Po Anti-PMSG terhadap kadar PMSG dalam darah.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruhnya terhadap hewan percobaan yang lain (kambing, domba dan sapi).

RINGKASAN

RINGKASAN

MUH DARSONO. Efek Antibodi Poliklonal Anti-PMSG Terhadap Jumlah Sel Telur Mencit (*Mus musculus*) di bawah bimbingan Rr. Sri Pantja Madyawati, M.S., Drh sebagai pembimbing pertama dan Chairul Anwar Nidom, M.S., Drh sebagai pembimbing kedua.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa Antibodi Poliklonal Anti-PMSG dapat membatasi masa kerja PMSG dengan parameter jumlah sel telur yang diovulasikan pada mencit hasil superovulasi.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 35 ekor mencit betina umur 2,5-3 bulan dibagi menjadi lima perlakuan dan tujuh ulangan, dilakukan superovulasi dengan PMSG dan 47 jam berikutnya diberikan Antibodi Poliklonal Anti-PMSG. Perlakuan A diberikan 0,1 ml Antibodi Poliklonal Anti-PMSG dengan pengenceran 1/20, perlakuan B dengan pengenceran 1/40, perlakuan C dengan pengenceran 1/80, perlakuan D dengan pengenceran 1/160 dan perlakuan E tanpa pemberian Antibodi Poliklonal Anti-PMSG sebagai kontrol.

Penelitian ini menggunakan disain Rancangan Acak Lengkap (*Completely Randomized Design*) dan data dianalisis menggunakan Uji F yang jika terjadi perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ 1%)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat pengenceran 1/20 sampai dengan pengenceran 1/80 Antibodi Poliklonal Anti-PMSG masih mampu membatasi masa kerja PMSG dengan indikator penurunan jumlah ovulasi sel telur, sedangkan

pengenceran 1/160 sudah tidak mampu memberikan pengaruh, yang ditandai dengan masih berjalannya proses superovulasi.

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan menggunakan Antibodi Poliklonal Anti-PMSG untuk menanggulangi efek samping pemberian PMSG pada program superovulasi pada waktu 47 jam setelah pemberian PMSG karena disamping aplikasinya yang sederhana juga cukup memerlukan konsentrasi yang rendah yaitu pengenceran 1/80, sehingga keuntungannya lebih hemat.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Armas Taboada, R. de. 1990. Embryo Transfer and Immunological Techniques in Increasing Reproductive Efficiency. Food and Agriculture Organization of United Nations. Rome. 23-30.
- Austin, C.R. and R.V. Short. 1984. Reproduction in mamalia: Hormonal Control of Reproduction. 2th. Cambridge University Press. London. New York. New Rochelle. Melbourne. Sydney. 153-194.
- Bodin, L., P.V. Drian., B. Remy., G. Brice., Y. Cognie. and J.F. Beckers. 1997. Anti-PMSG Antibody Levels in Sheep Subjected Annually to Estrus Synchronisation. *J. Reprod. Nutr.* 37(6):651-60.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Botterworths Pty Limited. Sydney. Boston. London. Durban. Singapore. Wellington. 54-75.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th. Lea and Febiger. Philadelphia. 20-143.
- Hardjopranjoto, H. S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. 19-53.
- Hunter, R. H. F. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit ITB. Bandung. 26-82.
- Katagiri, S., Y. Takahashi., M. Hishinuma., H. Kanagawa., O.Dochi and H.Takakura. 1991. PMSG Profiles in Superovulated and Anti-PMSG Antiserum Treated Mice and Heifers with Enzymeimmunoassay. *J. Theriogenologi.* 39(1):11-21.
- Knobil, E., J.D. Neill., L.L. Ewing., G.S. Greenwald., C.L. Markert. and D.W. Pfaff. 1988. The Physiology of Reproduction. Volume 2^B. Raven Press. New York. 1893-1919.
- Kuran, M., P. J. Broadbent and J. S. Hutchinson., 1996. Bovine Granulosa Cell of Potency and Specifity of Antibodies to Pregnant Mare's Serum Gonadotropin. *Eur J. Endocrinol.* 134(4):497-500.
- Kusriningrum, R. S. 1989. Dasar Rancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga. Surabaya. 1-64.

- Mac. Donald, L.E. 1975. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 2th. Lea and Febiger. Philadelphia. 247-391.
- Monk, M. 1987. *Mammalian Development*. IRL Press Limited. Oxford. England. 1-41.
- Murjito, A. 2000. *Upaya Produksi Antibodi Poliklonal Anti Pregnant Mare's Serum Gonadotropin dan Uji Efektifitasnya Pada Mencit (Mus musculus)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mustofa, I. 1995. *Pengaruh Penyuntikan PMSG dan Waktu Penyuntikan hCG yang Berbeda Terhadap Profil Estrogen dan Beberapa Variabel Reproduksi Sapi Perah*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nakajima, A., S. Hiraizumi., K. Onodera., H. Suzuki., Y. Kudo. and I. Domeli. 1992. *The Use Bovine Anti PMSG Serum in Beef Cattle After PMSG Superovulation*. *J. Vet. Med. Sci.* 54(1):95-8.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas*. 3th. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 56-342.
- Samik, A. 2001. *Uji Biopotensi Antibodi Poliklonal Anti-PMSG Pada Mencit*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Smith, J. B. dan S. Mangkuwidjoyo, 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. UI Press. Jakarta. 1-54.
- Supriatna, I., T. L. Yusuf., B. Purwantara., G. Moekti. dan L. P. Hermoadi. 1998. *Kajian Pemberian hCG Pada Sapi Perah yang Telah Disuperovulasi dengan PMSG-MoAb*. *Media Veteriner*. 5(2):15-20.
- Supriatna, I., T. L. Yusuf., B. Purwantara., G. Moekti. dan L. P. Hermoadi. 1998. *Kajian Produksi In Vitro dan Evaluasi Monoklonal Antibodi Anti-PMSG Secara Laboratoris*. *Hayati*. 6(1):1-5.
- Supriatna, I., T. L. Yusuf., B. Purwantara., G. Moekti. dan L. P. Hermoadi. 1998. *Uji Biopotensi Antibodi Anti Pregnant Mare's Serum Gonadotropin pada Sapi Perah*. *Hayati*. 5(3):73-78.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi kedua. Airlangga University Press. Surabaya. 7-137.

- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. 10th. Penerbit Angkasa. Bandung. 186-249.
- Tomaszewska, M.W., I.K. Utama., I.G. Putu. dan T.D. Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. P.T. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 96-107.
- Turner, C.D. dan J.T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum. Edisi ke-6. Airlangga University Press. Surabaya. 564-607.
- Vos, P.L., V. der Schans A., A.A. de Wit., M.M. Bevers., A.H. Willemse. and S.J. Dieleman. 1994. Effects of Neutralization of Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) Shortly Before or at Preovulatory LH Surge in PMSG-Superovulated Heifers on Follicular Function and Development. *J. Reprod. Fertil.* 100(2): 387-93.

LAMPIRAN

Lampiran 1.

**SIDIK RAGAM EFEK ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-PMSG
TERHADAP JUMLAH SEL TELUR MENCIT (*Mus musculus*)**

ULANGAN	PERLAKUAN					Σx	Σx^2
	A. 1/20	B. 1/40	C. 1/80	D. 1/160	E. Kontrol		
1.	6	8	11	36	34	95	2673
2.	5	5	14	32	29	85	2111
3.	7	13	11	34	22	87	1979
4.	7	8	13	35	26	89	2183
5.	6	9	11	18	40	84	2162
6.	7	5	11	29	25	77	1661
7.	10	4	5	17	29	65	1271
\bar{X}	6,86	7,83	10,86	28,81	29,29		
Σx	48	52	76	201	205	582	
Σx^2	344	444	874	6155	6223		14040

$$FK = \frac{(582)^2}{7 \times 5} = \frac{338724}{35} = 9677,8286$$

$$JKT = (6)^2 + (5)^2 + (7)^2 \dots + (29)^2 - FK$$

$$= 14040 - 9677,8286 = 4362,1714$$

$$JKP = \frac{(205)^2 + (201)^2 + (76)^2 + (52)^2 + (48)^2}{7}$$

$$= 3637,8857$$

$$JKS = 4362,1714 - 3637,8857$$

$$= 724,2857$$

$$KTP = \frac{JKP}{t-1} = \frac{3637,8857}{5-1} = 909,4714$$

$$KTS = \frac{JKS}{t(n-1)} = \frac{724,2857}{5(7-1)} = 24,1429$$

Sidik Ragam Uji F

S.K.	d.b.	J.K.	K.T.	F Hitung	F. Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	3637,8857	909,4714	37,6704**	2,69	4,02
Sisa	30	724,2857	24,1429			
Total	34					

Kesimpulan : Perlakuan pemberian Ab Po Anti-PMSG yang dilaksanakan dengan waktu 47 jam setelah pemberian PMSG dan dalam berbagai tingkat pengenceran memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata.

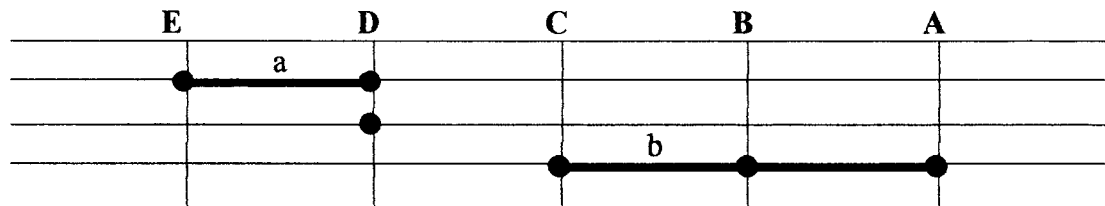
$$\begin{aligned} \text{UJI BNJ 5\%} &= Q_{5\%}(5, 30) \times \sqrt{\frac{KTS}{n}} \\ &= 4,11 \times \sqrt{\frac{24,1429}{7}} \\ &= 7,6329 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{UJI BNJ 1\%} &= Q_{1\%}(5, 30) \times \sqrt{\frac{KTS}{n}} \\ &= 5,05 \times \sqrt{\frac{24,1429}{7}} \\ &= 9,3786 \end{aligned}$$

Sidik Ragam Uji BNJ

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	$\bar{X} - A$	$\bar{X} - B$	$\bar{X} - C$	$\bar{X} - D$	BNJ 5%	BNJ 1%
E ^a	29,29	22,43**	21,86**	18,43**	0,58	7,6329	9,3786
D ^a	28,81	21,85**	21,28**	17,85**			
C ^b	10,86	4	3,43				
B ^b	7,83	0,57					
A ^b	6,86						

Pemberian Notasi



Kesimpulan: Dari hasil penghitungan sel telur dan setelah dilakukan pengolahan data dengan Uji BNJ 1% menunjukkan bahwa perlakuan A, B dan C sangat berbeda nyata dengan perlakuan D dan E.

Maka dianjurkan menggunakan Ab Po Anti-PMSG dosis C (pengenceran 1/80) karena merupakan konsentrasi yang paling rendah tetapi hasilnya tetap sama dengan konsentrasi Ab Po Anti-PMSG dosis A (pengenceran 1/20) dan B (pengenceran 1/40).

Lampiran 2.

PROSEDUR PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PMSG

Upaya pembuatan Ab Po Anti-PMSG dilakukan dengan menggunakan hewan coba lima ekor kelinci betina strain New Zealand. Satu ekor kelinci sebagai kontrol, tidak mendapat suntikan PMSG dan empat ekor kelinci yang lain sebagai perlakuan seluruhnya diberikan injeksi PMSG 100 I.U. dalam pelarut Freund *complete* dan diulang sebanyak empat kali dengan 75 I.U. dalam pelarut *incomplete*.

Penyuntikan dilakukan dengan cara *subcutan* dan setiap ulangan diberikan selang waktu 7 hari. Darah diambil secara *intracardial* pada hari ke-35 untuk memeriksa titer Ab Po Anti-PMSG yang timbul dengan menggunakan prosedur Uji ELISA tidak langsung (lampiran 7).

Pembacaan titer antibodi dilakukan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm setelah sampel diinkubasi selama 15 menit, 30 menit, 45 menit dan 60 menit (lampiran 3-6). Pembacaan titer antibodi dinyatakan dengan metode positif atau negatif dan hasilnya bisa dipakai sebagai patokan bila titer pada kelompok kontrol < 0,2. Titer antibodi positif apabila menunjukkan nilai yang lebih besar dari rata-rata kontrol negatif (*cut of value*, COV). Nilai COV untuk ukuran besar sampel antara 10-100 ditentukan dengan rata-rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($\bar{X} + 2-3 SD$).

Hasil pemeriksaan Uji ELISA (setelah 15 menit inkubasi) menunjukkan bahwa titer antibodi yang tertinggi dihasilkan oleh kelinci ke-4 seperti tampak pada tabel 2. berikut:

Tabel 2. Analisis Hasil Pemeriksaan Uji ELISA pada Titer Antibodi

KELINCI	TITER ANTIBODI PADA BERBAGAI PENGECERAN								COV
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	
A	0,581*	0,514*	0,385*	0,343*	0,225	0,223	0,204	0,248	0,323
B	0,817*	0,706*	0,549*	0,384*	0,383*	0,240	0,288	0,179	
C	0,827*	0,707*	0,628*	0,492*	0,420*	0,280	0,259	0,204	
D	1,207*	0,922*	0,920*	0,744*	0,730*	0,549*	0,385*	0,307	
E(Kontrol)	0,198	0,195	0,197	0,181	0,168	0,130	0,169	0,157	

Keterangan:

- ◆ Tanda bintang (*) menyatakan titer antibodi yang positif karena lebih besar dari nilai COV.
- ◆ Pemeriksaan Uji ELISA pada waktu 30, 45 dan 60 menit setelah inkubasi dinyatakan negatif karena didapatkan nilai titer kontrol negatifnya lebih besar dari 0,2.
- ◆ Titer antibodi yang tertinggi tersebut yang kemudian dipakai pada penelitian ini.

Lampiran 3. Hasil Pembacaan Titer Antibodi Poliklonal Anti-PMSG Setelah Diinkubasi 15 menit.

Bio-Tek Instruments

Assay: Quick Read Date: 12/04/00 Lot: _____
 Wavelength: 405 Time: 02:49:48AM Operator: _____
 Temp: _____ Plate ID: _____

COMMENTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
CALL												
CalcOD	0.581	0.514	0.385	0.343	0.225	0.223	0.204	0.248	0.273	0.121	0.119	0.118
Well	SMP1	SMP9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
RSLT												
B												
CALL												
CalcOD	0.817	0.706	0.549	0.384	0.383	0.240	0.288	0.197	0.176	0.197	0.154	0.186
Well	SMP2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
RSLT												
C												
CALL												
CalcOD	0.627	0.707	0.628	0.492	0.420	0.260	0.259	0.204	0.213	0.155	0.138	0.120
Well	SMP3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
RSLT												
D												
CALL												
CalcOD	1.207	0.922	0.920	0.744	0.730	0.549	0.385	0.289	0.307	0.209	0.169	0.221
Well	SMP4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
RSLT												
E												
CALL												
CalcOD	0.198	0.216	0.202	0.181	0.168	0.130	0.169	0.377	0.209	0.137	0.123	0.157
Well	SMP5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85	SMP93
RSLT												
F												
CALL												
CalcOD	0.971	0.947	0.695	0.529	0.409	0.308	0.227	0.390	0.149	0.134	0.136	0.243
Well	SMP6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86	SMP94
RSLT												
G												
CALL												
CalcOD	0.201	0.248	0.146	0.148	0.116	0.114	0.124	0.114	0.199	0.116	0.130	0.116
Well	SMP7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87	SMP95
RSLT												
H												
CALL												
CalcOD	0.191	0.145	0.117	0.187	0.144	0.490	0.515	0.132	0.116	0.265	0.219	0.280
Well	SMP8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88	SMP96
RSLT												

Lampiran 4.

CARA KERJA UJI ELISA TIDAK LANGSUNG

I. Coating antigen:

- Hormon PMSG diencerkan dengan *buffer coating* sehingga diperoleh konsentrasi 5 Unit/100 μ l.
- Ambil 100 μ l larutan tersebut dimasukkan setiap sumuran mikroplat ELISA.
- Inkubasi selama semalam (\pm 18 jam) pada suhu 4⁰ C.
- Cuci sumuran mikroplat dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.

II. Blocking:

- *Buffer blocking* (BCA) sebanyak 150 μ l ditambahkan ke setiap sumuran.
- Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰ C.
- Cuci sumuran mikroplat dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.

III. Inkubasi serum:

- Ab Po Anti-PMSG diencerkan dengan *buffer blocking* menjadi 1/10, 1/20, 1/40, ... s/d 1/40960.
- Ambil 100 μ l dari tiap pengenceran dan dimasukkan setiap sumuran mikroplat ELISA.
- Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰ C.
- Cuci sumuran mikroplat dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.

IV. Inkubasi konjugat:

- Konjugat *goat-anti-rabbit* yang dilabel enzim *alkali fosfatase* diencerkan dengan *buffer blocking* sehingga diperoleh pengenceran 1/2000.
- Ambil 100 μ l larutan tersebut dimasukkan setiap sumuran mikroplat ELISA.
- Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰ C.
- Cuci sumuran mikroplat dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.

V. Inkubasi substrat:

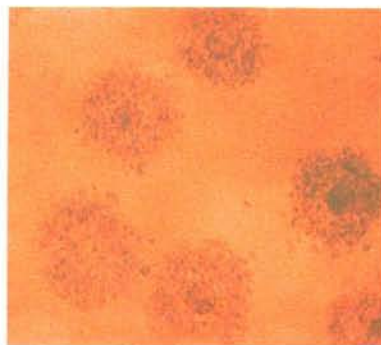
- Substrat 4-NPP (*Nitro Phenyl Phosphate*) dilarutkan dengan *buffer substrat*.
- Ambil 100 μ l larutan tersebut dimasukkan setiap sumuran mikroplat ELISA.
- Inkubasi selama 30-90 menit dalam ruang gelap pada suhu 37⁰ C.
- Tambahkan larutan *stopper* (NaOH) sebanyak 50 μ l pada setiap sumuran untuk menghentikan reaksi.
- Nilai *absorban* dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.



Gambar 6. Hewan Coba (mencit) yang Digunakan Dalam Penelitian.
Mus musculus Galur BALB-C.



Gambar 7. Alat-alat *Flushing* Sel telur Mencit.



Gambar 8. Sel Telur Mencit yang Sudah Diwarnai.