



**LAPORAN PENELITIAN
DIPA PENERIMAAN NEGARA BUKAN PAJAK
TAHUN ANGGARAN 2005**

**DETEKSI KEBUNTINGAN KAMBING DENGAN
MELIHAT PROTEIN SPESIFIK KEBUNTINGAN
EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF)**

Oleh:

**Abdul Samik, M.Si., Drh.
Erma Safitri, M.Si., Drh.
Gracia Angelina Hendarti, Drh.**

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

Dibiayai oleh Dana Penerimaan Negara Bukan Pajak Tahun 2005,
Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga
Nomor 4683/J03/PP/2005
Tanggal 4 Juli 2005
Nomor Urut : 37

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005



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

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248,
5995247 Fax. (031) 5962066, E-mail: infolemlit@unair.ac.id - <http://lppm.unair.ac.id>

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1.	Judul Penelitian	:	Deteksi Kebuntingan Kambing dengan Melihat protein Spesifik Kebuntingan Early Pregnancy Factor (EPF)		
	a. Macam Penelitian	:	<input type="checkbox"/> Fundamental	<input type="checkbox"/> Terapan	<input type="checkbox"/> Pengembangan
	a. Katagori Penelitian	:	<input type="checkbox"/> I	<input type="checkbox"/> II	<input type="checkbox"/> III
2.	Kepala Proyek Penelitian	:	Abdul Samik, M.Si., Drh.		
	a. Nama lengkap dan gelar	:	Abdul Samik, M.Si., Drh.		
	b. Jenis Kelamin	:	Laki-laki		
	c. Pangkat/Gol/NIP	:	Penata Tk I/III d/131925904		
	d. Jabatan Sekarang	:	Lektor		
	e. Fakultas/Puslit/urusan	:	Kedokteran Hewan		
	f. Universitas/Ins/Akademi	:	Universitas Airlangga		
	g. Bidang ilmu yang diteliti	:	Biologi Reproduksi		
3.	Jumlah Tim Peneliti	:	Tiga orang		
4.	Lokasi Penelitian	:	Pternakan kambing Wono Salam Jombang Laboratorium Fisiologi Reproduksi FKH Unair		
5.	Kerjasama dg Instansi Lain	:	-		
	a. Nama Instansi	:	-		
	b. Alamat	:	-		
6.	Jangka Waktu Penelitian	:	5 bulan		
7.	Biaya yang diperlukan	:	Rp 6.000.000,00		
8.	Seminar Hasil Penelitian	:	-		
	a. Dilaksanakan Tanggal	:	-		
	b. Hasil Penelitian	:	<input type="checkbox"/> Baik Sekali	<input type="checkbox"/> Baik	<input type="checkbox"/> Kurang
		:	<input type="checkbox"/> Sedang	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Surabaya,



Mengetahui/Mengesahkan
a.n. Rektor

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

(Signature)
Prof.Dr.H. Sarmanu, M.S.
NIP 130 701 125

RINGKASAN

**DETEKSI KEBUNTINGAN KAMBING DENGAN MELIHAT
PROTEIN SPESIFIK KEBUNTINGAN *EARLY
PREGNANCY FACTOR* (EPF)**

Abdul Samik, Erma Safitri, Gracia Angelina Hendarti

Bagian Reproduksi Veteriner Universitas Airlangga Surabaya
Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya 60115, Telp. 031-5992785

Jawa Timur merupakan propinsi di Indonesia yang memiliki ternak potong dengan populasi tertinggi dan juga merupakan pemasok kebutuhan daging terbesar secara nasional. Program pembibitan dirasakan sebagai kebutuhan yang sangat mendesak oleh karena itu berdasarkan pengamatan lalu lintas ternak terutama pengeluaran ternak ke luar propinsi cukup besar sehingga dikhawatirkan untuk masa mendatang populasi ternak di Jawa Timur makin berkurang. Melihat kenyataan atau kondisi tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga populasi ternak bisa terjaga.

Kendala yang sering dihadapi peternak adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai.

Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi dan sinkronisasi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang tepat.

Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah mengidentifikasi *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari serum kambing bunting 1-4 bulan dan menentukan tingkat keberhasilan diagnosa kebuntingan berdasarkan adanya EPF serum kambing.

Penelitian ini dilakukan di peternakan kambing Wono Salam Kabupaten Jombang. Serum darah diambil dari vena jugularis dan serum dipisahkan untuk digunakan dalam identifikasi adanya EPF. Pemisahan protein dengan steroid yang ada pada serum darah dilakukan dengan penambahan methanol (1:5). Protein serum yang sudah bebas dari steroid diidentifikasi adanya EPF dengan menggunakan SDS-PAGE. Setelah ditemukan protein EPF pada pita SDS-PAGE yang disesuaikan dengan berat molekul dari protein marker maka dilanjutkan untuk memotong protein EPF dengan teknik elektroelusi. Hasil dari elektroelusi ditera kadar proteinnya dengan metode biuret. Peubah yang diamati adalah adanya EPF serum darah kambing bunting dan data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji BNT.

Pita-pita protein EPF serum darah kambing bunting yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker ada empat pita dengan BM antara 43-67 kDa. Rataan kadar protein EPF serum darah kambing bunting pada umur kebuntingan 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan masing-masing adalah 6128 µg/ml, 10208 µg/ml, 14916 µg/ml dan 10848 µg/ml.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa EPF dapat dideteksi pada kambing bunting pada umur kebuntingan 1-4 bulan dengan kadar tertinggi pada umur kebuntingan 3 bulan.

Saran yang dapat diajukan adalah adanya EPF dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan secara laboratoris, namun supaya lebih praktis, efisien, mudah dan cepat penggunaan tes kebuntingan dilapangan maka perlu penelitian lebih lanjut untuk membuat tes kebuntingan EPF paper strip berdasarkan reaksi imunologis dari EPF dan anti-EPF.

Dibiayai oleh DIPA PNBP Universitas Airlangga,

No kontrak: 688 /JO3.2/PG/2005, Tanggal 5 Juli 2005

KATA PENGANTAR

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

Terima kasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian dengan dana DIPA PNBP Universitas Airlangga tahun 2005.

Kepada para sejawat anggota peneliti kami ucapkan terima kasih atas kerjasamanya dan juga kepada peternak kuda di Surabaya yang dengan rela hati memberikan fasilitas ternaknya untuk kelancaran proses penelitian ini.

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

Surabaya, Oktober 2005

Peneliti

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
1.5. Hipotesis Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Siklus Reproduksi Kambing.....	5
2.1.1. Pubertas.....	5
2.1.2. Siklus Birahi..	6
2.1.3. Perkawinan.....	10
2.1.4. Kebuntingan dan Diagnosis Kebuntingan.....	11
2.2. Early Pregnancy Factor.....	14
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Hewan-Coba, Bahan dan Alat Penelitian.....	16
3.3. Metode Penelitian	16
3.3.1. Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan pada Kambing ...	16
3.3.2. Koleksi EPF Serum Darah Kambing Bunting	17
3.3.3. Identifikasi EPF dengan SDS-PAGE	17
3.3.4. Metoda Isolasi EPF dengan Elektroelusi	18
3.3.5. Pemeriksaan Isolate EPF dengan Biuret	18
3.4. Peubah Penelitian	19
3.5. Analisis Data	19
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1 Identifikasi EPF dengan SDS-PAGE.....	20
4.2 Pemeriksaan Protein EPF dengan Metode Biuret.....	21
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
5.1 Kesimpulan	24

5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Lama siklus birahi, lama birahi dan ovulasi	7
2	Jumlah spermatozoa kambing yang dibutuhkan pada saat inseminasi	10
3	Hasil pemeriksaan kadar protein isolat EPF dengan metode biuret	21
4	Rataan kadar protein EPF serum darah kambing bunting	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Pita-pita protein EPF dari serum darah kuda bunting	20
2	Alat SDS-PAGE..... ..	29
3	Alat Spektrofotometer..... ..	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		
1	Hasil analisis statistik ANOVA dan BNT dari kadar EPF kambing.....	28
2	Alat SDS-PAGE dari Biorad dan Spektrofotometer.....	30

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan cenderung menurun. Hal ini disebabkan oleh adanya banyaknya permintaan akan protein hewani yang berasal dari daging ternak sapi, kambing dan domba namun tidak diimbangi dengan peningkatan populasi ternak tersebut.

Jawa Timur merupakan propinsi di Indonesia yang memiliki ternak potong dengan populasi tertinggi dan juga merupakan pemasok kebutuhan daging terbesar secara nasional. Program pembibitan dirasakan sebagai kebutuhan yang sangat mendesak oleh karena itu berdasarkan pengamatan lalu lintas ternak terutama pengeluaran ternak ke luar propinsi cukup besar sehingga dikhawatirkan untuk masa mendatang populasi ternak di Jawa Timur makin berkurang. Melihat kenyataan atau kondisi tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga populasi ternak bisa terjaga.

Kendala yang sering dihadapi peternak adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai.

Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang

meliputi deteksi birahi dan sinkronisasi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang tepat.

Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

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

Selama ini yang telah dilakukan untuk mendiagnosa dini kebuntingan kambing adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dini dengan menggunakan substansi non spesifik seperti progesterone dan estrone sulphate dengan menggunakan teknik RIA (Nalbandov, 1990) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA (Anonymous, 1984).

Keberadaan protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) dapat digunakan untuk pengembangan metode baru melalui riset ini yang bertujuan untuk diagnosa kebuntingan dini pada kambing yang dapat dilakukan secara cepat, mudah dan murah.

1.2. Rumusan Masalah

Akakah diagnosa kebuntingan pada kambing dapat ditentukan dengan melihat adanya protein awal kebuntingan *early pregnancy factor* (EPF) ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

- Mengidentifikasi *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang merupakan protein awal kebuntingan dari serum darah kambing.
- Menentukan tingkat keberhasilan diagnosa kebuntingan berdasarkan EPF.

1.4. Manfaat Penelitian

- Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan EPF serum darah kambing bunting sebagai bahan diagnosa kebuntingan dini pada kambing
- Peternak kambing, dapat digunakan tes ini untuk mendeteksi kebuntingan dini pada kambing sehingga dapat mengukur tingkat reproduktifitasnya.
- Sebagai model untuk mengkaji EPF dari ternak ruminansia lain sebagai bahan diagnostik tes kebuntingan dini.

1.5. Hipotesis Penelitian

Protein awal kebuntingan *early pregnancy factor* (EPF) dapat digunakan untuk diagnosa kebuntingan pada kambing

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Siklus Reproduksi Kambing

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

2.1.1. Pubertas

Pubertas atau dewasa kelamin ialah periode kehidupan makhluk jantan dan betina dimana proses-proses reproduksi mulai terjadi yang ditandai oleh kemampuan untuk pertama kalinya memproduksi benih. Kejadian pubertas didasari oleh penyesuaian secara bertahap antara peningkatan aktivitas gonadotropik dan kemampuan gonad secara simultan dalam steroidogenesis dan gametogenesis. Pubertas pada domba dan kambing dicapai pada umur 6-7 bulan.

Sebelum masa pubertas, terjadi sekresi androgen dari kelenjar adrenal, androstendion, dehidroepiandrosteron dan dehidroepiandrosteron sulfat. Ini tidak berhubungan dengan perubahan dalam sekresi kortisol dan aldosteron dari

kelenjar adrenal. Pada saat dimulai pubertas, konsentrasi gonadotropin dalam sirkulasi meningkat baik dalam peningkatan amplitudo maupun frekuensi dari impuls periodik dari gonadotropin.

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

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

2.1.2. Siklus Birahi

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

Panjang siklus birahi pada domba adalah 16-17 hari dan kambing 20-21 hari. Secara lengkap panjang siklus birahi, lama birahi dan waktu ovulasi dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 1. Lama siklus birahi, lama birahi dan ovulasi

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

* Dari dimulainya birahi

** Setelah birahi berakhir

*** Sebelum akhir birahi

Siklus birahi secara kasar dapat dibagi menjadi empat periode menurut perubahan-perubahan yang tampak maupun yang tidak tampak dari luar selama siklus birahi yaitu: proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh FSH. Folikel yang sedang bertumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung hormon estrogen yang lebih banyak. Hormon estrogen inilah yang akan mempengaruhi suplai darah ke saluran alat kelamin dan meningkatkan pertumbuhannya. Vulva agak membengkak dan vestibulum menjadi berwarna kemerahan karena adanya kongesti pembuluh darah. Bagian vagina dan cerviks membesar karena pembengkakan sel-sel mukosa dan dimulailah sekresi

lendir dari saluran serviks. Proestrus pada kambing berlangsung selama 2 - 3 hari. Pada periode ini biasanya kambing akan menolak bila dinaiki pejantan maupun sesama betinanya, tetapi akan berusaha menaiki betina yang lainnya (Jumping heat).

Periode estrus merupakan masa keinginan kawin, periode ini ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik. Kambing akan sering mengembik dan biasanya tidak tenang, nafsu makan dan memamah biak menurun. Vulva makin membengkak dan mukosa vulva berwarna merah keunguan. pengeluaran lendir yang terang tembus kurang begitu jelas. Selama periode ini folikel terus berkembang dengan cepat. Gejala fisik yang jelas tampak dari luar dan sudah diketahui oleh peternak adalah 3 A (Abang, Abuh dan Anget). Apabila kambing betina tersebut dilepas dipandangan maka akan mencari pejantan untuk mengawininya dan akan menaiki sesama betina. Kambing yang tepat berada pada periode birahi ini apabila dikumpulkan dengan sesama betina akan memperlihatkan tingkah diam bila dinaiki (Standing heat). Gejala ini adalah yang terpenting dari gejala-gejala yang lain. Ekor biasanya dikibas-kibaskan dan lendir transparan menggantung atau melekat pada pangkal ekor. Vulva membengkak, lunak, oedematous dan relaks.

Pada pemeriksaan vaginal, mukosa vagina merah dan oedematous. Lendir birahi tidak begitu banyak yang terdapat di dalam vagina berasal dari sel-sel selaput lendir serviks dibawah pengaruh estrogen. Pada puncak birahi viskositas lendir tersebut paling rendah dan elastistasnya pengalirannya paling tinggi, apabila lendir tersebut dioleskan tipis pada gelas obyek dan dikeringkan,

maka NaCl yang terlihat dalam kadar tinggi akan berkristalisasi dan memberikan pola aborisasi yang khas. Os servikalis eksterna berwarna merah jambu, oedematous, agak mengendor dan membuka pada waktu estrus. Pembuatan preparat ulas vagina selama proestrus dan estrus menunjukkan peningkatan jumlah sel-sel yang berkornifikasi, tetapi variasi perubahan tersebut terlampau besar antara individu kambing sehingga cara ini tidak dapat dipakai sebagai indikasi birahi. Kira-kira 3 jam setelah perkawinan jumlah leukosit meningkat pesat. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya semen di dalam alat reproduksi hewan betina.

Metestrus ditandai dengan berhentinya birahi yang tiba-tiba. Pada periode ini terjadi ovulasi dengan pecahnya folikel dan rongga folikel secara berangsur-angsur akan mengecil, pengeluaran lendir dari serviks juga telah berhenti.

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

2.1.3. Perkawinan

Inseminasi harus dilakukan pada bagian kedua periode birahi, yaitu antara 12 sampai 18 jam sesudah pertama kali terlihat birahi. Birahi pada kambing dan domba dapat terjadi secara alami dan buatan dengan dilakukan gertak dan sinkronisasi birahi. Birahi ditandai dengan adanya ternak gelisah, napsu makan semakin berkurang, mencoba menaiki teman-temannya dan mau dinaiki teman-temannya, ekor dikibas-kibaskan, sering urinasi dan bibir kelamin membengkak, berlendir dan kemerah-merahan. Spermatozoa tahan hidup selama 30 jam di dalam saluran kelamin betina.

Jumlah spermatozoa yang dibutuhkan untuk inseminasi pada berbagai tempat deposisi dapat dilihat pada table di bawah ini :

Tabel 2. Jumlah spermatozoa kambing yang dibutuhkan pada saat inseminasi

TEMPAT DEPOSISI	TIPE SEMEN			VOLUME INSEMINASI
	SEGAR	DIENCERKAN	BEKU	
Vagina	300	Tdk efektif	Tdk efektif	0,3-0,5 ml
Servik	100	150	180	0,05-0,2 ml
Uterus	60	60	60	0,05-0,1 ml

Alat-alat inseminasi terdiri dari speculum yang terbuat dari pipa gelas berukuran panjang 18 cm dan diameter 2 cm; pipet inseminasi yang terbuat dari spet disposable 1 ml; pipet inseminasi disambung dengan plastik sheath atau pipa stainless; sebagai alat penerang dapat dipakai lampu senter.

Pelaksanaan inseminasi kambing diperlukan beberapa tenaga. Satu orang menjepit kambing pada bagian punggung, dua orang mengangkat kaki belakang,

satu orang membuka vagina untuk melakukan inseminasi dan satu orang memegang senter untuk menerangi mencari lubang servik. Sewaktu inseminasi, pipet inseminasi diisi lebih dulu dengan sejumlah semen yang dibutuhkan. Speculum dilicinkan dengan vaselin dan dimasukkan hati-hati ke dalam vagin. Dengan bantuan senter penerang, speculum dapat dimasukkan sehingga tepat di depan mulut servik. Pipet inseminasi dimasukkan melalui speculum untuk menembus lubang servik dan sperma disemprotkan perlahan-lahan dan hati-hati di dalam servik.

2.1.4. Kebuntingan dan Diagnosis Kebuntingan

Kambing termasuk golongan hewan poliestrus bermusim, yaitu golongan hewan yang menunjukkan gejala birahi beberapa kali dalam satu musim kelamin. Lama siklus birahi pada kambing 21-22 hari dengan lama birahi 24-36 jam dan lama kebuntingan 153-157 hari (Toelihere, 1981).

Pemeriksaan kebuntingan pada kambing dan domba dapat dilakukan dengan deteksi tidak timbulnya birahi kembali dalam satu siklus birahi, palpasi abdominal, palpasi rektal abdominal, laparotomi, radiografi, ektomografi, ultrasonic dopler dan pemeriksaan hormonal (Partodihardjo, 1983). Sedangkan menurut Hunter (1995) pemeriksaan kebuntingan pada kambing dapat dilakukan dengan berbagai teknik : ultrasonografi, radiografi, pemeriksaan progesterone, pemeriksaan abdomen, palpasi abdomen dan pemeriksaan antigen kebuntingan untuk mendeteksi antigen khusus yang dihasilkan oleh embrio dalam darah

Diagnosa kebuntingan dengan cara pengamatan tidak timbulnya birahi sudah lama dikenal. Pada teknik ini disarankan untuk memakai pejantan pengusik sebagai pendeteksi birahi.

Teknik pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi abdominal dilakukan pada usia kebuntingan 100 hari. Pemeriksaan ini dilakukan dengan cara pemeriksa berdiri disamping induk, palpasi dilakukan dengan kedua tangan secara bersamaan pada abdomen induk. Diagnosa kebuntingan dengan teknik ini mempunyai nilai kecermatan 80 %.

Diagnosa kebuntingan secara palpasi rectal abdominal dibutuhkan alat yang terbuat dari plastik yang berukuran 1,5 X 50 cm dengan ujung yang agak membulat. Alat tersebut dimasukkan kedalam rektum sedalam 30-35 cm, kemudian digerak-gerakkan ke atas, bawah, kiri dan kanan hingga ditemukan obstruksi, palpasi dilakukan pada abdomen terutama pada daerah obstruksi. Diagnosa kebuntingan dengan teknik dapat dilakukan pada usia kebuntingan 60 hari dan mempunyai nilai kecermatan 97 %.

Diagnosa kebuntingan dengan teknik laparotomi mempunyai nilai kecermatan 100 % pada usia kebuntingan 42 hari. Induk yang akan diperiksa dipuaskan dahulu selama 12-18 jam, kemudian diberi preparat penenang (Xylazine). Anastesi local disuntikkan disepanjang linea alba hingga daerah sekitar ambing. Insisi dibuat sepanjang 5-6 cm, dengan 2-3 jari tangan masuk ke dalam rongga abdomen untuk mencari uterus.

Diagnosa kebuntingan secara radiografi dapat dilakukan pada usia kebuntingan 38 hari. Dengan pemeriksaan ini akan terlihat pembesaran uterus.

Pada pemeriksaan ke 65 hari usia kebuntingan akan terlihat tulang rangka, sedangkan pada usia 70 hari kebuntingan akan memberi nilai kecermatan 100 %.

Diagnosa kebuntingan dengan ektomografi dilakukan dengan menggunakan dua alat, yaitu satu berfungsi sebagai sumber sinar ultra dan satu lagi sebagai alat visualisasi yang berfungsi mengubah gelombang suara menjadi gelombang cahaya, kemudian akan ditangkap oleh layar. Pemeriksaan kebuntingan dengan cara ini pada kambing baru dapat dilakukan pada usia kebuntingan 30 hari, tetapi akan lebih baik pada hari ke 35. Pemeriksaan pada hari ke 42 akan terlihat jumlah fetus dan placenta. Ketepatan pemeriksaan kebuntingan dengan cara ini sebesar 100 %.

Pemeriksaan kebuntingan dengan ultrasonic dopler diperlukan dua alat yaitu unit utama yang merupakan bagian yang dapat menyaring dan memperkuat suara pantulan sehingga dapat didengar, dan bagian probe yang ditempelkan pada abdomen. Teknik pemeriksaan dengan cara ini yaitu induk kambing ditelentangkan dengan bagian ventral abdomen yang telah dicukur bulunya pada 5-7 cm anterior mammae, kira-kira 2,5 cm di kanan-kiri linea alba, diolesi minyak jagung dan probe ditempelkan. Pemeriksaan dinyatakan positif bila terdengar suara detak jantung fetus atau denyut pembuluh darah umbilikalis. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan pada usia kebuntingan 60-90 hari dengan nilai kecermatan 40-80 %.

Diagnosa kebuntingan secara hormonal dilakukan untuk mendeteksi adanya hormon progesterone dalam plasma dan oestron sulphate dalam air susu. Pemeriksaan progesterone plasma dilakukan pada usia kebuntingan 21-24 hari.

Kambing yang bunting mempunyai kadar progesterone plasma 1-5 ng/ml sedangkan yang tidak bunting kurang dari 1 ng/ml. Sedangkan pemeriksaan oestron sulphate dilakukan pada usia kebuntingan 30-50 hari dengan kadar sebesar lebih dari 1 ng/ml, sedangkan pada kambing yang tidak bunting sebesar 0-90 pg/ml susu.

2.2. *Early Pregnancy Factor*

Early Pregnancy Factor (EPF) merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah kambing bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Keberadaan EPF ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.*, 2000; Howard, 1998; Transom, 2001). Berat molekul *Early Pregnancy Factor* pada kambing berkisar 47-90 kD dan digolongkan menjadi dua yaitu EPF-A dan EPF-B. Aktivitas EPF akan hilang bila terpisah (Clarke *et al.*, 1980; Clarke and Wilson, 1982; Wilson *et al.*, 1983) EPF-A dihasilkan oleh saluran sel telur dan EPF-B dihasilkan oleh ovarium (Morton *et al.*, 1982; Cruz *et al.*, 2001).

EPF pertamakali ditemukan sebagai *pregnancy-associated substance* dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000). EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Sedangkan El Amiri *et al.* (2000) mengemukakan bahwa pada lapisan superficial dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy associated glycoproteins* (PAGs) yang

merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaanya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

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

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di peternakan kambing di Wono Salam Kabupaten Jombang, penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai dengan September 2005.

3.2. Hewan Coba, Bahan dan Alat Penelitian

Pada penelitian ini digunakan lima ekor kambing peranakan etawa bunting muda dengan umur kebuntingan 1-5 bulan.

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah serum darah kambing bunting, methanol, PBS, running gel, butanol, whatman paper, stacking gel, e buffer, lainli buffer, pewarna silver, BSA, pereaksi bjuret, aquades.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah disposable syringe, tabung reaksi, sentrifuge, miliphore, vial, freezer, SDS PAGE, comb, kuvet spektrofotometer, spektrofotometer Bausch-Lombs.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Sinkronisasi birahi dan Inseminasi Buatan pada Kambing

Sebanyak 5 ekor kambing digunakan dalam penelitian ini. Sinkronisasi birahi dilakukan dengan menggunakan hormon $PGF2\alpha$ secara intra vulva dengan dosis 5 mg per ekor. Pengamatan birahi dilakukan dengan melihat gejala birahi yang timbul yaitu vulva merah, bengkak, basah dan lendir serviks. Inseminasi

buatan dilakukan dengan menggunakan semen beku setelah 12-18 jam tanda birahi tampak.

3.3.2. Koleksi EPF Serum Darah Kambing Bunting

Darah diambil dari vena jugularis kambing bunting dengan umur kebuntingan yang berbeda (1-5 bulan) dengan menggunakan *disposable syringe* 20 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan 45^o dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat lalu disaring menggunakan milifur 0.22 µm. Serum yang didapat ditampung pada vial dan disimpan dalam freezer dengan suhu - 20^oC atau dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan methanol dengan perbandingan 1:5 dan dikocok selama 3 menit kemudian didiamkan 15-20 menit sampai terdapat 2 lapisan cairan. Supernatan diambil dengan *disposable syringe* sebanyak 5 ml dan dimasukkan dalam vial 10 ml untuk dibuat sediaan kering beku. Sebelum digunakan untuk uji selanjutnya perlu ditambahkan PBS sebanyak 5 ml.

3. 3.3. Identifikasi EPF dengan SDS-PAGE

Masukkan running gel ke dalam alat SDS-PAGE melalui dinding kira-kira kurang dari batas atas. Tambahkan butanol kira-kira 1 ml dan biarkan selama 25 menit. Kemudian butanol dibuang setelah gel membeku dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan *Whatman paper*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh dan setelah itu dimasukkan *comb* dan

ditunggu sampai betul-betul set (25 menit). Selanjutnya *comb* diambil dan bersihkan sisa-sisa gel dengan e buffer. Sampel (serum kambing bunting) sebanyak 15 μ l dan dicampur dengan 5 μ l laimili buffer dan dipanaskan 100 $^{\circ}$ C selama 5 menit. Kemudian 10 μ l sampel dimasukkan ke lubang cetakan dengan tip 200 μ l. Cetakan dimasukkan ke alat biorad, power supply di starter dengan kekuatan 125 V, 40 mA selama 1 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan *buffer* dan hasilnya divisualisasikan dengan pewarnaan silver atau langsung ditransfer ke membran nitoselulose.

3.3.4. Metode Isolasi EPF dengan Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong nilon. Kemudian dimasukkan dalam block glass yang mengandung PBS dan dilanjutkan dengan sterei selama 24 jam, setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan perwarnaan silver, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Setelah itu dilakukan uji Biuret untuk mengetahui titer dari protein tersebut.

3.3.5. Pemeriksaan Isolat EPF dengan Metode Biuret

Kadar total protein ditentukan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar protein (BSA). Dipersiapkan tiga kuvet spektrofotometer, kuvet pertama diberi tanda S sebagai kuvet sample yang akan

diukur. Dalam kuvet S dimasukkan 0,05 ml isolat eCG dan 2,5 ml pereaksi biuret. Kuvet kedua diberi tanda ST sebagai kuvet standar, dimasukkan 0,05 ml larutan standar protein dan 2,5 ml pereaksi biuret. Kuvet ketiga diberi tanda BL (blanko) dimasukkan 2,5 ml pereaksi biuret dan 0,05 ml aquades. Ketiga kuvet tersebut didiamkan selama 30 menit dan kemudian dibaca pada spektrofotometer Bausch-Lombs spektronik 20 dengan panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan : Kadar total protein ($\mu\text{g/ml}$) $\Rightarrow Y = 5.10^{-5}X$

Keterangan : Y = Nilai absorbansi
X = Kadar protein ($\mu\text{g/ml}$)

3.4. Peubah Penelitian

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar protein EPF yang diperiksa dengan metode biuret.

3.5. Analisis Data

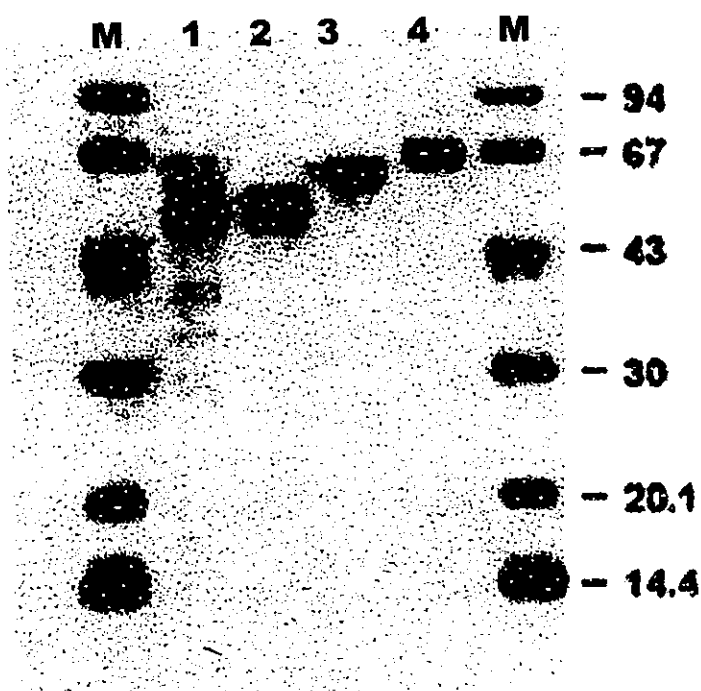
Data yang didapat ditabulasikan dan dianalisis dengan menggunakan uji F yang dilanjutkan dengan uji BNT.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Identifikasi EPF dengan SDS-PAGE

Hasil SDS-PAGE dari serum darah kambing bunting dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 1. Pita-pita protein EPF dari serum darah kambing bunting

Pita-pita protein serum darah kambing bunting yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker ada empat pita protein dengan BM antara 43-67 kDa. Pita-pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul EPF yang ditemukan oleh Atkinson et al. (1993) berkisar

43-75 kDa. Sedangkan Xie et al. (1996) menemukan berat molekul EPF kambing antara 47-90 kDa. Demikian juga hasil penelitian Karen et al. (2003) dan Garbayo et al. (1998) melaporkan penemuannya bahwa BM EPF kambing ada tiga yaitu 55 kDa, 59 kDa dan 67 kDa. El Amiri et al. (2004) melakukan analisis imunoreaktif dengan SDS-PAGE dan menemukan BM dari EPF kambing berkisar 55-66 kDa. Pita-pita protein dengan berat molekul tersebut dielektroelusi supaya terpisah dengan protein lain dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar protein tersebut dengan metode biuret.

4.2. Pemeriksaan Protein EPF dengan Metode Biuret

Hasil pemeriksaan protein isolat EPF dengan metode biuret dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3. Hasil pemeriksaan kadar protein isolat EPF dengan metode biuret

Kambing	Umur Kebuntingan							
	1 Bulan		2 Bulan		3 Bulan		4 Bulan	
	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP
1	0,313	6260	0,470	9400	0,783	15660	0,563	11260
2	0,346	6920	0,519	10380	0,692	13840	0,554	11080
3	0,332	6640	0,532	10640	0,796	15920	0,598	11960
4	0,257	5140	0,463	9260	0,720	14400	0,514	10280
5	0,284	5680	0,568	11360	0,738	14760	0,483	9660
Rata-rata	0,306	6128	0,510	10208	0,746	14916	0,542	10848

Keterangan : Abs : Absorbansi
 KP : Kadar Protein ($\mu\text{g/ml}$)

Berdasarkan tabel 3 di atas didapatkan rata-rata absorbansi protein EPF serum darah kambing bunting 1 bulan, 2 bulan, 3 bulan dan 4 bulan masing-masing 0,306; 0,510; 0,746 dan 0,542 sedangkan rata-rata kadar protein EPF serum darah kambing bunting masing-masing adalah 6128 $\mu\text{g/ml}$, 10208 $\mu\text{g/ml}$, 14916 $\mu\text{g/ml}$ dan 10848 $\mu\text{g/ml}$.

Rataan dan simpangan baku kadar protein EPF serum darah kambing bunting dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 4. Rataan kadar protein EPF serum darah kambing bunting

No.	Umur Kebuntingan	N	Rataan
1	1 bulan	5	^a 6128 \pm 721,75
2	2 bulan	5	^b 10208 \pm 879,61
3	3 bulan	5	^c 14976 \pm 1785,90
4	4 bulan	5	^b 10848 \pm 996,58

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Berdasarkan analisis statistik ANOVA (lampiran 1) terdapat perbedaan kandungan kadar protein EPF serum darah sesuai umur kebuntingan kambing. Kadar protein EPF semakin meningkat pada umur kebuntingan 1-3 bulan dan mulai menurun pada umur kebuntingan 4 bulan. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Cavanagh (1996) bahwa EPF pertamakali ditemukan sebagai *pregnancy-associated substance* dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba.

Sedangkan DuPlants (200) mengatakan bahwa EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partu.

Secara statistik kadar protein EPF pada umur kebuntingan 2-4 bulan tidak berbeda nyata namun bila antara umur kebuntingan 1 bulan dengan umur kebuntingan 2 dan 4 bulan ada perbedaan yang nyata. Demikian juga antara umur kebuntingan 1 bulan dengan umur kebuntingan 3 bulan terdapat perbedaan yang nyata. Gonzales et al. (2000) menyatakan bahwa kadar EPF akan terus naik sampai mencapai kadar maksimal pada umur kebuntingan 8 minggu dan mulai menurun pada umur kebuntingan 12-14 minggu, kemudian kadarnya konstan sampai kelahiran.

Perbedaan kadar protein EPF dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jumlah anak dan berat lahir (Vandaele et al., 2003). Kadar EPF lebih banyak ditemukan pada kambing bunting dengan jumlah anak lebih dari satu dibanding hanya satu anak. Demikian juga dengan bangsa dan total berat lahir yang lebih besar berkorelasi positif terhadap kadar EPF dibanding dengan total berat lahir yang lebih rendah. Sedangkan umur induk dan jenis kelamin anak yang dilahirkan tidak berpengaruh terhadap kadar EPF (Vandaele et al., 2005).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa Early Pregnany Factor (EPF) dapat dideteksi pada kambing bunting pada umur kebuntingan 1-4 bulan.

1.2. S a r a n

Saran yang dapat diajukan adalah adanya EPF dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan secara laboratoris, namun supaya lebih praktis, efisien, mudah dan cepat penggunaan tes kebuntingan dilapangan maka perlu penelitian lebih lanjut untuk membuat tes kebuntingan EPF paper strip berdasarkan reaksi imunologis dari EPF dan anti-EPF.

DAFTAR PUSTAKA

- Atkinson Y.H., K.J. Gogolin-Ewens, E.F. Hounsel, M.J. Davies, M.R. Brandon and R.F. Seamark. 1993. Characterization of Placentation-Specific Binucleate Cell Glycoproteins Possessing a Novel Carbohydrate. *J Biol Chem.* 268: 26679-26685
- Barnea, E.R. 2000. Early Pregnancy: Biology and Medicine. *Early Pregnancy Volume IV.* pp. 166-175
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10: Implications for Understanding Its Role. *J. Reprod. Fertil.* 1: 28-32
- Clarke, F.M., H. Morton and G.J.A. Clunie. 1978. Detection and Separation of Two Serum Factors Responsible for Depression of Lymphocyte Activity in Pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 32:318-323
- Clarke, F.M., H. Morton, B.E. Ralfe and G.J.A. Clunie. 1980. Partial Characterization of Early Pregnancy Factor in The Sheep. *J. Reprod. Immunol.* 2:151-162
- Clarke, F.M and S. Wilson. 1982. Biochemistry of Early Pregnancy Factor. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinskas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 407-412
- Cruz, Y.P., L. Selwood, H. Morton and A.C. Cavanagh. 2001. Significance of Serum Early Pregnancy Factor Concentrations During Pregnancy and Embryonic Development in *Sminthopsis Macroura* (Spencer)(Marsupialia: Dasyuridae). *J. Reprod. Fert.* 121: 933-939
- DuPlants, L.J. 2000. Early Pregnancy Factor. *Lifeissues.net.* Kochi, Japan. All Rights Reserved. pp. 1-2
- El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-Mboko and J.F. Beckers. 2000. Pregnancy-Associated Glycoproteins In *Bos Taurus* and *Bos Taurus Indicus*. *Theriogenology* 53:283
- El Amiri B., B. Remy, N.M. De Sousa and J.F. Beckers. 2004. Isolation and Characterization of Eight Pregnancy-Associated Glycoprotein Present at High Levels in the Ovine Placenta between Day 60 and Day 100 of Gestation. *Reprod Nutr Dev.* 44(3): 169-181

- Garbayo J.M., B. Remy, J.L. Alabart, J. Folch, R. Wattiez, P. Falmagne and J.F. Beckers. 1998. Isolation and Partial Characterization of a Pregnancy-Associated Glycoprotein Family from the Goat Placenta. *Biol Reprod.* 58(1): 109-115
- Gonzales F., J. Sulon, J.M. Garbayo, M. Batista, F. Cabrera, P.O. Calero, A. Gracia and J.F. Beckers. 2000. Secretory Profiles of Pregnancy-Associated Glycoproteins at Different Stages of Pregnancy in the Goat. *Reproduction in Domestic Animals.* Vol 35. p 79.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals.* 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Howard, P.J. 1998. Morning After Pills: How Do They Prevent Pregnancy ?. *Lancet* 352: 422-428.
- Hunter, R.P.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik.* Penerbit ITB Bandung, Penerbit Universitas Udayana. Hal. 353-357.
- Karen A., J.F. Beckers, J Sulon, N.M. De Sousa, K. Szabados, J. Reczigel and O. Szenci. 2003. Early Pregnancy Diagnosis in Sheep by Progesteron and Pregnancy-Associated Glycoprotein Tests. *Theriogenology.* 59(9): 1941-1948
- Likes, R.L. 2002. *Pregnancy Diagnosis.* Department of Emergency Medicine, Darnall Army Community Hospital. pp. 1-9
- Morton, H., B. Ralfe and A. Cavanagh. 1982. Early Pregnancy Factor, Biology and Clinical Significance. In: *Pregnancy Proteiins*, Edited by J.G. Greedzinkas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 391-405
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan.* Cetakan ke Tiga. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika.* Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Toelihere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak.* Penerbit Angkasa Bandung.
- Transom, G. 2001. *Early Pregnancy Factor (EPF)-Background and Prospects.* Research Report, Cbio Limeted. pp. 1-9

- Vandaele L., S. Verberckmoes, B. El Amiri, J. Sulong, L. Duchateau, A. Van Soom, J.F. Beckers. 2003. Effect of Number of Lambs, Their Sex and Birth Weight on Ovine Pregnancy-Associated Glycoprotein (ovPAG) Concentration. *Reproduction, Fertility and Development*. 16(2):192-193
- Vandaele L., S. Verberckmoes, S. DeCat, B. El Amiri, J. Sulong, L. Duchateau, A. Van Soom and J.F. Beckers and A. de Kruif. 2005. Use of a Homologous Radioimmunoassay (RIA) to Evaluate the Effect of Maternal and Foetal Parameters on Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) Concentration in Sheep. *Theriogenology*. 63(7):1914-1924
- Wilson, S., R. McCarthy and F.M. Clarke. 1983. In Search of Early Pregnancy Factors. Isolation of Active Polypeptides from Pregnant Ewe's Sera. *J. Reprod. Immunol*. 5:275—286
- Xie S., R.J. Nagel, J. Green, J.F. Beckers and R.M. Roberts. 1996. Trophoblast Specific Processing and Phosphorylation of Pregnancy-Associated Glycoprotein-1 in Day 15 to 25 Sheep Placenta. *Biol Reprod*. 54(1): 122-129

Lampiran 1. Hasil analisis statistic ANOVA dan BNT dari kadar EPF kambing

Oneway**Descriptives**

EPF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
bunting 1 bln	5	6128.00	721.75	322.78	5231.83	7024.17	5140.00	6920.00
bunting 2 bln	5	10208.00	879.61	393.38	9115.82	11300.18	9260.00	11360.00
bunting 3 bln	5	14976.00	1785.90	729.09	13369.22	16540.78	13840.00	15920.00
bunting 4 bln	5	10848.00	996.58	498.29	9625.81	13374.19	9660.00	14760.00
Total	20	10525.00	3288.57	735.35	8985.90	12064.10	5140.00	15920.00

ANOVA

EPF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	181373840.000	3	60457946.667	40.129	.000
Within Groups	24105260.000	16	1506578.750		
Total	205479100.000	19			

Post Hoc Tests

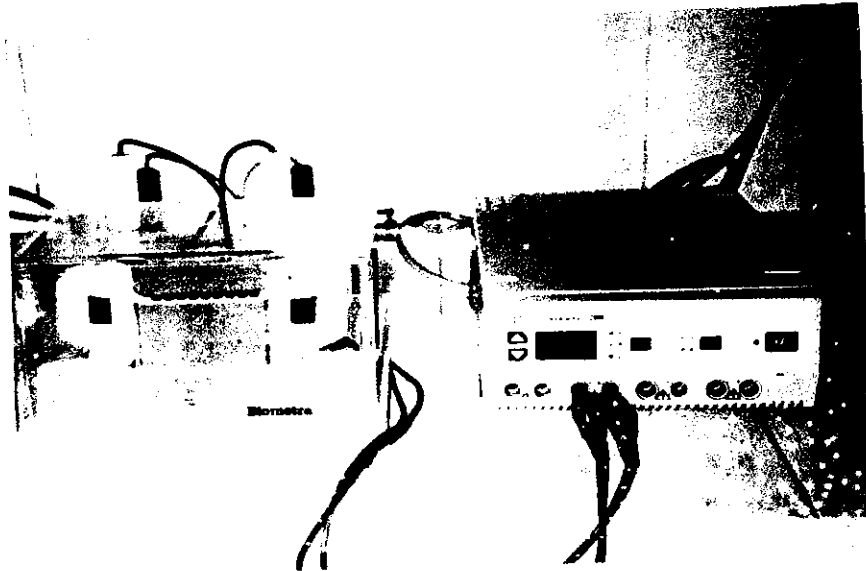
Multiple Comparisons

Dependent Variable: EPF
LSD

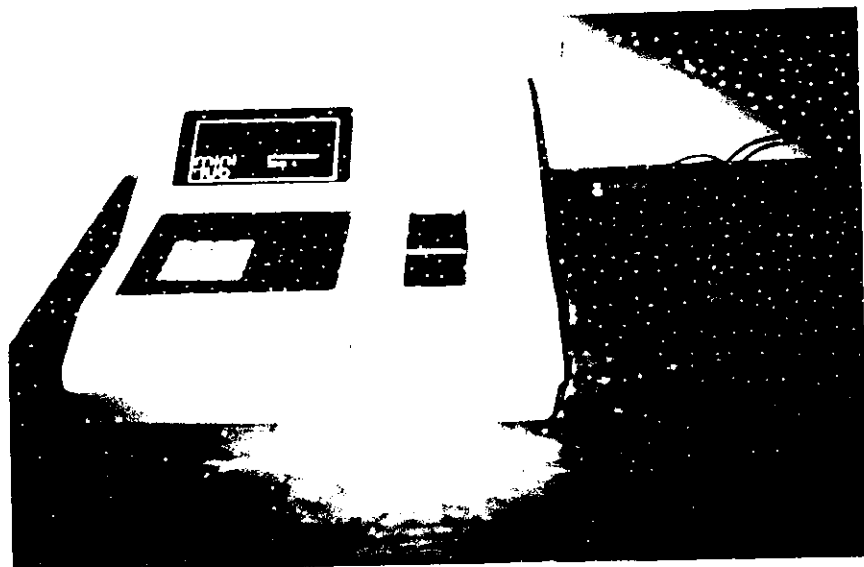
(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
bunting 1 bln	bunting 2 bln	-4080.0000(*)	776.29344	.000	-5725.6686	-2434.3314
	bunting 3 bln	-8827.0000(*)	823.38353	.000	-10572.4951	-7081.5049
	bunting 4 bln	-5372.0000(*)	743.24438	.000	-6947.6077	-3796.3923
bunting 2 bln	bunting 1 bln	4080.0000(*)	776.29344	.000	2434.3314	5725.6686
	bunting 3 bln	-4747.0000(*)	823.38353	.000	-6492.4951	-3001.5049
	bunting 4 bln	-1292.0000	743.24438	.101	-2867.6077	283.6077
bunting 3 bln	bunting 1 bln	8827.0000(*)	823.38353	.000	7081.5049	10572.4951
	bunting 2 bln	4747.0000(*)	823.38353	.000	3001.5049	6492.4951
	bunting 4 bln	3455.0000(*)	792.30117	.000	1775.3965	5134.6035
bunting 4 bln	bunting 1 bln	5372.0000(*)	743.24438	.000	3796.3923	6947.6077
	bunting 2 bln	1292.0000	743.24438	.101	-283.6077	2867.6077
	bunting 3 bln	-3455.0000(*)	792.30117	.000	-5134.6035	-1775.3965

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 2. Alat SDS-PAGE dari Biorad



Gambar 2. Alat SDS-PAGE



Gambar 3. Alat Spektrofotometer