

**SKRIPSI**

**PENERAAN KADAR ISOLAT PROTEIN  
EARLY PREGNANCY FACTOR SERUM DARAH  
KAMBING BUNTING PERANAKAN ETTAWA  
DENGAN METODE BIURET**



Oleh :

**SRI DANAR DANA**

NIM. 060333121

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**Lembar Pengesahan**

**PENERAAN KADAR ISOLAT PROTEIN *EARLY PREGNANCY FACTOR*  
SERUM DARAH KAMBING BUNTING PERANAKAN ETTAWA  
DENGAN METODE BIURET**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk menempuh gelar

Sarjana kedokteran hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

**SRI DANAR DANA**  
**NIM.060333121**

Menyetujui,

Komisi Pembimbing



**(Djoko Legowo, M.Kes., Drh.)**  
Pembimbing Pertama



**(DR. Pudji Srianto, M.Kes., Drh.)**  
Pembimbing Kedua

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**PENERAAN KADAR ISOLAT PROTEIN *EARLY PREGNANCY FACTOR*  
SERUM DARAH KAMBING BUNTING PERANAKAN ETTAWA  
DENGAN METODE BIURET**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar disuatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 6 September 2007

SRI DANAR DANA  
NIM.060333121

**Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian**

**Tanggal : 24 Agustus 2007**

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

**Ketua : Prof.H.Mas'ud Hariadi,Ph.D,M.Phill,drh.**

**Sekretaris : Dr.Imam Mustofa,M.Kes.,drh.**

**Anggota : Trilas Sardjito,M.Si.,drh.**

**Pembimbing I : Djoko Legowo,M.Kes.,drh.**

**Pembimbing II : Dr.Pudji Srianto,M.Kes.,drh.**

Telah diuji pada

Tanggal: 06 September 2007

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof.H.Mas'ud Hariadi,Ph.D,M.Phill,drh.

Anggota : Dr.Imam Mustofa,M.Kes.,drh.

Trilas Sardjito,M.Si.,drh.

Djoko Legowo,M.Kes.,drh.

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

Surabaya, 07 September 2007

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



  
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.  
NIP. 130.687.305

# **The Measurement of *Early Pregnancy Factor (EPF)* Isolated Protein Level of Pregnant Ettawa Crossbred Goat Blood Serum by The Biuret Method**

Sri Danar Dana

## **ABSTRACT**

The aim of this research was to know the level of Early Pregnancy factor (EPF) in blood serum of pregnant Ettawa crossbred goat by the biuret method. This research was descriptive laboratories.

Blood serum collected from five pregnant Ettawa crossbred goat with age of pregnancy around two month. The blood samples were taken directly from jugular vein. Serum was taken from the blood by centrifugation and than stored frozen, than protein in the serum was measured by biuret and tested using 540λ Bausch-Lommb's spectrometer.

The result showed that EPF level average was  $11.182 \pm 1.116$  µg/ml. the highest and the lower level of EPF in this research were  $12.450 \pm 1.116$  µg/ml and  $9.780 \pm 1.116$  µg/ml. the result indicated that EPF level was increased in pregnant goat. It could be concluded that biuret method can be used to measure the level of EPF in blood.

Keyword: EPF, Ettawa crossbred goat, Biuret method.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucap rasa syukur kehadirat Allah SWT atas taufik dan hidayah-Nya, karena dengan limpahan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul;

**“Peneraan Kadar Isolat Protein Early Pregnancy Factor Serum Darah Kambing Bunting peranakan Ettawa dengan Metode Biuret”** ini dengan baik, yang merupakan salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Airlangga Surabaya.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan teima kasih sebesar-besarnya kepada :

Bapak Prof.DR.Ismudiono, M.S.,Drh. selaku mantan dekan dan Dosen wali yang telah banyak member dorongan, dukungan, saran serta bimbingan.

Ibu Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Djoko Legowo, M.Kes., Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak DR. Pudji Srianto. M.Kes., Drh. selaku pembimbing kedua yang senantiasa menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan membimbing denga penuh kesabaran, penih perhatian dan senantiasa mendorong semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.

Bapak Abdul Samik, M.Si., Drh atas bimbingan dan kesempatan yang telah diberikan untuk mengikuti penelitian ini.

Rasa terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan kepada seluruh keluarga yang terhormat Bapak dan Ibu tercinta serta adikku atas limpahan dan curahan kasih sayang, perhatian, dorongan semangat, doa dan segala yang telah dilakukan kepada penulis.

Ucapan terima kasih ini juga ditujukan pada sahabatku Kholik, Abid, David, Faiz, Faris, Yosi, Teguh, Deddy dan drh. Syailin , drh. Gunawan yang selalu menghibur, menemani dan memberikan masukan serta kritikan setiap hari, serta teman-teman transfer angkatan 2003.

Semua pihak yang secara tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesaikan tulisan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu masukan, kritik dan saran sangatlah diharapkan bagi perbaikan tulisan ini. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Amien.

Surabaya, 6 September 2007

Penulis,

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
HALAMAN PERNYATAN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR SINGKATAN .....	x
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kambing Peranakan Ettawa (PE).....	5
2.2 Siklus Reproduksi dan Birahi.....	5
2.3 Fertilisasi dan Kebuntingan.....	6
2.4 <i>Early Pregnancy Factor</i> (EPF).....	7
2.4.1 Tinjauan Tentang EPF.....	7
2.3.2 Bioassay EPF.....	12
2.5 Imunoassay Untuk Identifikasi Ikatan Antigen-Antibodi EPF .....	14
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	15
3.1 Jenis Penelitian .....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.3 Materi Penelitian.....	15
3.3.1 Hewan Penelitian.....	15
3.3.2 Bahan Penelitian.....	15
3.4 Metode penelitian .....	18
3.4.1 Tahapan Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan Pada Kambing.....	18
3.4.2 Tahapan Koleksi EPF Serum Darah kambing Bunting.....	18
3.4.3 Tahapan Isolasi EPF Serum Darah Kambing Bunting.....	19
3.4.4 Penentuan Kadar Total Protein Isolat EPF Metode Biuret .....	20
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	23
BAB 5 PEMBAHASAN.....	24

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	26
6.1 Kesimpulan.....	26
6.2 Saran.....	26
RINGKASAN.....	27
DAFTAR PUSTAKA .....	29
LAMPIRAN.....	34

## **DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1. Konsentrasi PAG Kambing Bunting.....	13
Tabel 4.1. Hasil pemeriksaan kadar isolate protein EPF pada serum darah kambing bunting dua bulan Peranakan Ettawa dengan metode biuret.....	24

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 3.1. Peralatan IB dan Sinkronisasi.....	17
Gambar 3.2. Pengambilan darah melalui vena jugularis.....	18
Gambar 3.3. Serum darah.....	19
Gambar 3.4. Spektrofotometer Bausch-Lombs Spektronik 20 untuk peneraan EPF.....	20

## DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
EPF	: <i>Early Pregnancy Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
kDa	: kilo Dalton
OD	: <i>Optical Dencity</i>
PAG	: Pregnancy Specific Protein
PSP	: Pregnancy Specific Protein
SAS	: <i>Saturated Amonium Sulfat</i>
SDS PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulphonat Polycrilamide Gel Electrophoresis</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Banyaknya permintaan akan protein hewani asal hewan, khususnya daging sapi dan kambing yang tidak diimbangi dengan peningkatan produktivitasnya, mengakibatkan terus menurunnya jumlah populasi ternak-ternak tersebut secara nasional.

Hasil survey pertanian Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2001, menunjukkan bahwa di propinsi Jawa Timur terjadi penurunan populasi beberapa ternak yaitu, kuda sebesar 3,24 %, sapi perah 5,86 %, kerbau 5 %, dan domba 0,36 %. Sementara itu, beberapa ternak yang lain meskipun mengalami kenaikan, namun angkanya masih jauh dari yang diharapkan, yaitu masing-masing 0,02 % untuk sapi potong, dan 0,56 % untuk kambing (BPS, 2001).

Salah satu kendala untuk meningkatkan produktivitas dalam budidaya kambing adalah pengendalian tingkat reproduktivitasnya. Kendala tersebut antara lain adalah kesulitan dalam mengenali tanda-tanda kebuntingan secara dini, yang mengakibatkan rendahnya prosentase kebuntingan (Putro, 2004).

Hingga saat ini upaya pengembangan dan pencarian metode-metode baru untuk deteksi kebuntingan dini pada ternak masih terus dilakukan. Sebuah metode yang relatif lebih cepat, akurat, murah dan mudah dilakukan di lapangan merupakan tujuan yang ingin dicapai.

Peneraan terhadap peningkatan kadar progesterone serum dengan *radioimmunoassay* (RIA) dari betina bunting, dapat dikatakan merupakan metode

deteksi kebuntingan paling cepat yang pernah ada selama ini, dimana umur kebuntingan dapat ditentukan sejak hari ke 21 atau 22. Namun akurasi dari metode ini masih dianggap rendah, mengingat bahwa peningkatan progesterone juga terjadi pada hewan yang tidak bunting, yaitu selama fase luteal dalam siklus birahi (Hafez, 2000).

Saat ini telah ditemukan substansi yang lebih spesifik yang terbentuk selama masa kebuntingan, yang dikenal sebagai *Early Pregnancy Factor* (EPF) (Hafez, 2000). EPF merupakan antigen yang keberadaannya timbul sebagai suatu respon imun akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.* 2000; Howard, 1998; Transom, 2001).

Substansi ini diproduksi oleh sel-sel *binucleat* dari *tropoblast* (Xie *et al.*, 1997; Garbayo *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1999). Sedangkan El Amiri *et al.*(2000), mengemukakan bahwa pada lapisan *superficial* dari *tropoderm* ruminansia memproduksi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAGs) yang merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaannya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

Berdasarkan asumsi bahwa EPF merupakan suatu antigen, maka identifikasi keberadaan senyawa tersebut dengan antibodi anti EPF, diharapkan dapat digunakan sebagai metode alternatif yang lebih akurat dalam deteksi kebuntingan dini pada kambing.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berapakah kadar *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada kambing Peranakan Ettawa bunting dengan metode biuret?

## 1.3. Landasan Teori

EPF pertama kali ditemukan sebagai *pregnancy-associated substance* dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies diantaranya pada, mencit, manusia, babi, dan domba (Cavangh, 1996; Du Plants, 2000). EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (Du Plants, 2000).

*Early Pregnancy Factor* (EPF) merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah kambing bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). EPF merupakan antigen yang keberadaannya timbul sebagai suatu respon imun akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.* 2000; Howard, 1998; Transom, 2001).

Substansi ini diproduksi oleh sel-sel *binucleat* dari *trophoblast* (Xie *et al.*, 1997; Garbayo *et al.*, 1998; Beckers *et al.*, 1999). Sedangkan El Amiri *et al.* (2000), mengemukakan bahwa pada lapisan superficial dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAGs) yang merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaannya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

Hasil karakterisasi protein EPF dengan SDS-PAGE dan *Western Blot* menunjukkan bahwa berat molekul protein EPF terletak antara 42,7 – 66,4 kDa

(Szafranska *et al.*, 2003). Samik dan Safitri (2007) melaporkan bahwa berat molekul protein EPF pada kambing PE berkisar antara 42,7 – 66,4 kDa.

Berat molekul EPF kambing berkisar antara 43 kDa hingga 67 kDa, dan merupakan famili dari *aspartic proteinase* yang pada umumnya tidak mempunyai aktivitas enzim (Green *et al.*, 2000; Karen *et al.*, 2003).

Dilaporkan pula bahwa, berat molekul *Early Pregnancy Factor* pada kambing berkisar pada 250 kDa 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).

Perenyi *et al.* (2002) menemukan tiga molekul EPF sebagai PAG (*Pregnancy Associated Glycoprotein*) dengan berat molekul 55, 59 dan 62 kDa dan El Amiri *et al.* (2003) menemukan berat molekul PAG 55, 57, 59 kDa.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Mengetahui kadar *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan metode biuret.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan EPF pada serum darah kambing bunting untuk mendeteksi kebuntingan pada kambing peranakan ettawa.

## **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1. Kambing Peranakan Ettawa (PE)**

Kambing PE merupakan hasil persilangan antara kambing Ettawa (Jamnapari) dengan kambing kacang (Djanah, 1988). Dewasa ini pengembangan kambing perah PE mulai populer di pedesaan. Secara ekonomis kambing PE sangat efisien mengubah bahan pakan bermutu rendah menjadi daging dan susu (Sarwono, 2001).

Menurut Mulyono (2003) kambing PE memiliki ciri-ciri antara lain: hidung atas melengkung, telinga menggantung kebawah dan sedikit kaku panjangnya 15-30 cm, warna bulu bervariasi antara hitam, putih dan cokelat. Kambing jantan mempunyai bulu yang tebal agak panjang di bawah leher dan pundak, sedangkan bulu kambing betina agak panjang terdapat di bagian bawah ekor kearah garis kaki, bobot badan hidup kambing PE jantan sekitar 40 kg sedangkan PE betina sekitar 35 kg.

### **2.2. Siklus Reproduksi dan Birahi**

Siklus reproduksi adalah siklus perkembangbiakan hewan betina setelah mencapai masa pubertas. Siklus ini akan berulang tiap satu jangka waktu tertentu, sehingga merupakan kurun waktu antara beranak sampai beranak berikutnya.

Satu siklus reproduksi dibagi menjadi tiga fase yaitu fase Pregraviditas, meliputi proses birahi, ovulasi, kopulasi dan fertilisasi. Fase Graviditas, meliputi proses-proses implantasi, plasentasi dan kebuntingan. Fase Postgraviditas,

meliputi proses-proses pengeluaran foetus, pengeluaran sekundinae dan laktasi (Hardjopranto, 1987).

Siklus birahi diatur oleh mekanisme endokrin dan neuroendokrin meliputi hormone-hormon dari hipotalamus, gonadotropin dan hormon steroid yang disekresikan oleh ovarium dan testis.

Pengaturan sekresi hormone gonadotropin selama siklus birahi diperlukan untuk keseimbangan antara reaksi hormone-hormon yang kompleks (Hafez, 1993; Ismudiono, 1999).

Selama siklus birahi terjadi perubahan-perubahan fisiologis dari alat kelamin hewan betina. Perubahan ini berkesinambungan satu sama lain hingga kemudian terulang kembali sama seperti perubahan awal. Lama siklus birahi pada kambing berkisar antara 20-21 hari. Siklus birahi dibagi menjadi empat fase, antara lain: Proestrus, Estrus, Metestrus, dan Diestrus (Hafez, 1993).

### **2.3. Fertilisasi dan Kebuntingan**

Apabila sel telur diovulasikan dari ovarium dan bertemu dengan sel spermatozoa di dalam ampulla tuba falopii maka pada saat itu sudah dinyatakan terjadi kebuntingan. Secara klinis, kebuntingan tersebut baru dihitung mulai saat kambing betina tidak lagi menunjukkan gejala birahi kembali pada siklus birahi berikutnya. Lama periode kebuntingan pada kambing berlangsung selama 149 hari atau berkisar antara 143-151 hari (Mahaputra, 2001).

Fertilisasi akan menghasilkan individu yang diploid yaitu yang memiliki  $2n$  kromosom, satu  $n$  kromosom berasal dari sel jantan dan satu  $n$  kromosom

berasal dari betina. Fertilisasi adalah proses timbal balik dan bersifat spesies spesifik yang dapat menstimulir sel telur untuk mengadakan pembelahan dan perkembangan lebih lanjut (Hunter, 1995). Perkembangan selanjutnya disebut morula yang mencapai uterus kemudian berkembang menjadi blastula (blastosis) yang terdiri dari banyak sel yang masing-masing sel disebut blastomer. Blastula adalah suatu bentuk bola yang berongga yang terdiri dari lapisan sel-sel yaitu tropoblast yang menyelimuti blastosel (*blastocoel*). Massa sel tropoblast yang terletak di posisi dalam menjulur ke dalam blastosel dan akhirnya membentuk badan embrio, dalam proses ini terbentuk tiga lapisan kecambah. Ketiga lapisan kecambah tersebut adalah *ectoderm* (kulit bagian luar), *endoderm* (kulit bagian dalam), dan *mesoderm* (kulit bagian tengah) (Ismudiono, 1999).

## **2.4. Early Pregnancy Factor (EPF)**

### **2.4.1. Tinjauan tentang EPF**

EPF merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan dalam darah induk kambing sejak umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Menurut Cavanagh (1996), EPF pertama kali ditemukan sebagai *pregnancy associated* dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti manusia, mencit, babi dan domba.

Tahun 1982, Butlet *et al.* memisahkan dua protein spesifik kebuntingan (PSP A dan B) dari membrane plasenta sapi. PSPA diidentifikasi sebagai  $\alpha$ -fetoprotein, yang tidak hanya terbatas pada kebuntingan, sementara PSP-B ditetapkan sebagai spesifik plasenta (Garbayo *et al.*, 1998).

El Amiri *et al.* (2000) mengemukakan bahwa pada lapisan *superficial* dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAGs) yang merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaannya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

PAG-1 dikenal sebagai *pregnancy-specific protein B* (PSP-B). Glikoprotein tersebut (PSPB atau PAG) bisa terdeteksi dalam sirkulasi maternal pada minggu ke tiga setelah kebuntingan (Xie *et al.*, 1996). Keduanya bisa terdeteksi pada darah maternal saat sel-sel binukleat tropoblast plasenta fetus mulai bermigrasi dan berfusi dengan sel-sel endometrium membentuk fetometernal *syncytium* (Karen *et al.*, 2003). PAG dimurnikan dari plasenta sapi perah dan juga ditemukan dalam serum darah maternal segera setelah implantasi embrio (El Amiri *et al.*, 2004).

PAG yang diduga berkaitan erat dengan *bovine* PSPB, diisolasi pada 1982 oleh Butler *et al* pada domba, PAG disebut ovPAG atau oPSPB teridentifikasi melalui tiga pendekatan berbeda (El Amiri *et al.*, 2004). Glikoprotein oPAG yang secara imunologis berhubungan dengan bPAGI dan PSP-B telah diisolasi dari kotiledon fetus domba kemudian disebut oPAGI dan oPSP-B (Garbayo *et al.*, 1998).

PAG-1 bisa digunakan sebagai penanda biokimia untuk kebuntingan dan bisa dideteksi dalam darah maternal pada tiga minggu setelah konsepsi (Xie *et al.*, 1996). EPF tersisa dalam sirkulasi maternal hingga sekitar minggu terakhir kebuntingan tetapi selalu menghilang dari serum sebelum proses kelahiran (Duplants, 2000). oPAG disintesa oleh sel-sel binukleat tropoblas (Green *et al.*,

2000; Karen *et al.*, 2001). PSP-B disekresi oleh sel-sel binukleat trophoctoderm fetus (Karen *et al.*, 2001). Pada sapi perah dan domba, PAG-1 merupakan produk sel-sel tropoblas binukleat yang merupakan komponen-komponen invasive dari plasenta (Xie *et al.*, 1996).

Pada sapi perah, konsentasi PAG meningkat hingga mencapai maksimum 2,5 µg/ml sebelum melahirkan (Xie *et al.*, 1996). Konsentrasi oPAG terdeteksi dari sejumlah domba betina pada minggu ke tiga dan pada semua domba betina pada minggu keempat setelah perkawinan. Konsentrasi oPAG diduga dipengaruhi oleh jumlah fetus dan jenis kelamin fetus. Domba betina yang mengandung dua fetus memiliki konsentrasi oPAG lebih tinggi daripada yang mengandung satu fetus. Domba betina yang mengandung beberapa fetus jantan memiliki konsentrasi opAG yang tinggi daripada yang mengandung beberapa fetus betina. Setelah melahirkan, level PAG menurun cepat hingga mencapai nilai basal pada minggu keempat postpartum (Karen *et al.*, 2001).

Menurut Gonzalez *et al.* (2004) konsentrasi PAG pada kambing bunting (n=64), berdasarkan hari setelah pengelompokan (Day after breeding), dapat dilihat pada tabel dibawah ini;

Tabel 2.1 Konsentrasi PAG kambing bunting

Day after breeding	PAG concentration (µg/ml; mean ± S.E.M)
20	1,53 ± 0,16
22	4,16 ± 0,26
24	6,87 ± 0,35
26	20,96 ± 1,93

Sumber: Gonzalez *et al.* (2004)

PAG pasca struktural mirip dengan pepsin yang termasuk aspartat proteinase, selain pepsin, chymosin, rennin dan cathepsin D dan E juga termasuk aspartat proteinase (Xie *et al.*, 1996). Namun demikian sebagian besar PAG tampaknya merupakan enzim tak aktif karena substitusi asam amino di sekeliling tempat katalitik (El Amiri *et al.*, 2004).

PAG-1 *bovie* adalah glikoprotein asal dari 67 kDa. Perkiraan massa molekuler relatifnya sangat beragam, dari 47 hingga 90 kDa, meski polipeptida dewasa diperkirakan panjangnya tidak lebih dari 330 asam amino (Xie *et al.*, 1996). PAG pertama kali disebutkan sebagai glikoprotein 67 kDa asam dengan titik-titik isoelektrik berbeda (El Amiri *et al.*, 2004). oPAG memiliki berat molekuler antara 43 hingga 67 kDa (Xie *et al.*, 1997).

Xie *et al.*, (1996) mengidentifikasi cDNA untuk boPAG-1 dan ovPAG-1 dan mampu menarik rangkaian asam amino dari kedua protein tersebut. Seperti diprediksikan dari cDNAnya ovPAG-1 dan boPAG-1 adalah asam amino 382 dan 380 dengan bobot molekuler 42985 dan 42852. Struktur-struktur tersebut meliputi rangkaian sinyal residu 15 dan 38-residue-pro-peptide, sehingga bobot molekuler dari polipeptida matang tersebut secara teoritis sekitar 36806 dan 36731 untuk ovPAG-1 dan bo-PAG-1. Xie *et al.*, (1997a) mengidentifikasi sembilan molekul yang berbeda dari PAG pada plasenta domba namun hasil studi biokimia hanya menggolongkan empat molekul yang berbeda. Dan hanya satu molekul memberikan rangkaian terminal N yang sama (El Amiri *et al.*, 2004). Meski demikian, penambahan karbohidrat ke empat tempat potensial untuk

glikolisasi yang mengangkat N bisa memberikan peningkatan ukuran (Xie *et al.*, 1996).

Cavanagh (1996) berpendapat bahwa EPF dapat merangsang sel-sel sistem kekebalan maternal. Ini mungkin merupakan bagian dari mekanisme penolakan fetus yang dianggap benda asing oleh tubuh induk. Antigen-antigen yang mirip secara serologis telah ditemukan pada domba, dan beberapa lainnya pada *ungulate* pemamah biak (Xie *et al.*, 1996). Antigen-antigen yang secara serologis mirip dengan PSP-B dan PAG-1 telah ditemukan pada pemamah biak lain, termasuk bagal dan rusa ekor putih, kambing gunung, rusa merah, kambing Alpine Perancis, bison, rusa besar, sejenis rusa besar (elk), rusa dataran gersang, dan rusa sika. Secara imunologis antigen yang berhubungan dengan PAG sebelumnya telah terdeteksi dalam serum kambing bunting. Protein yang disekresi oleh plasenta, saat terdeteksi dalam sirkulasi periperal induk, bisa menjadi inikator berguna bagi kebuntingan dan kesehatan fetus (Garbayo *et al.*, 1998).

Meski peran PAG masih tidak diketahui, beberapa studi komparatif menunjukkan bahwa PAG memiliki kemampuan mengikat peptida, bahkan ketika tidak terjadi aktifitas katalitik. Fungsinya bisa meliputi pengikatan dan transport peptida bioaktif. Reaksi antigen tersebut tampak melalui teknik RIA dengan antiserum terhadap oPAG1 (Garbayo *et al.*, 1998).

El Amiri *et al.*, (2000) berpendapat bahwa upaya-upaya untuk memurnikan molekul-molekul PAG yang diekspresikan pada awal kebuntingan belum berhasil dilakukan karena tingginya proporsi lipoprotein yang muncul pada plasenta muda, menghambat gel-gel kromatografi untuk fraksionasi. Di samping

itu, belum diketahui apakah PAG yang diekspresikan pada awal kebuntingan dapat digunakan untuk uji kebuntingan pada domba.

EPF dalam serum maternal sebelum implantasi bukanlah sebagai produk zigot tetapi merupakan respon maternal akibat adanya zigot sebagai faktor ovum. Hanya sedikit yang diketahui tentang faktor ovum kecuali bahwa faktor ovum memiliki massa molecular yang relatif kecil dan disekresi oleh ovum atas penetrasi sperma. Produksinya terus berlangsung hingga tahap *blastocyst* dari perkembangan embrio (DuPlants, 2000).

Penemuan EPF memperjelas bahwa sistem maternal dipersiapkan untuk implantasi dan keberhasilan kebuntingan. EPF diperlukan pada tahap awal kebuntingan untuk perkembangan embrionik. Ini merupakan tolok ukur serum paling dini untuk menandai fertilisasi positif dan konsepsi. EPF merupakan immunosupresan karena kemampuannya melepaskan faktor-faktor yang menekan respon kekebalan maternal terhadap fetus asing. EPF dalam serum terbukti menjadi penanda kehadiran embrio. Jika demikian, EPF mungkin memiliki aplikasi potensial besar, misalnya dalam mengontrol efek-efek perusakan-diri terhadap penyakit autoimun atau penerimaan organ dan jaringan cangkok (Cavanagh, 1996).

#### **2.4.2. Bioassay EPF**

*Bioassay* untuk EPF didasarkan pada demonstrasi oleh Bach dan Antonie pada tahun 1968, bahwa antilimfosit serum (ALS) immunosupresif bisa menghambat secara *in vitro* formasi Rosette spontan antara limfosit dan sel-sel

darah merah heterogen. EPF diekspresikan sebagai titer inhibisi Rosette dengan nilai lebih dari 16 yang mengindikasikan kebuntingan positif. Rangkaian Uji hambatan Rosette ini cukup kompleks dan mahal, disamping hasilnya sulit untuk segera diinterpretasikan (DuPlant, 2000).

Modifikasi untuk deteksi EPF diperkenalkan setelah terbukti bahwa limfosit, yang di inkubasi dalam EPF, memberi hambatan Rosette yang lebih besar dibanding daripada limfosit dari donor yang sama tanpa di inkubasikan pada EPF (Cavanagh, 1996).

Cavanagh (1996) mengemukakan EPF terdeteksi dalam serum semua mamalia yang diuji, dalam 24-48 jam setelah fertilisasi bila dihubungkan dengan kesehatan embrionik, EPF dapat dideteksi pada serum 12 jam setelah transfer embrio dan menghilang 24-48 jam setelah kematian atau pengeluaran embrio. Selain digunakan untuk diagnosis awal kebuntingan, deteksi EPF bisa sangat berguna untuk membedakan antara kegagalan pembuahan dan kegagalan implantasi, seperti dalam pemantauan kebuntingan beresiko.

Produksi EPF tidak dibatasi pada kebuntingan namun bisa dideteksi dalam serum pasien dan binatang yang menderita tumor. Produksi *in vitro* dikaitkan dengan pertumbuhan; hal ini memuncak selama fase logaritmik proliferasi sel dan berhenti setelah tertahannya atau terjadinya diferensiasi induksi pertumbuhan (Cavanagh 1996).

Cavanagh (1996) melakukan produksi antibody monoklonal yang bisa dipakai sebagai agen-agen penetral spesifik dalam eksperimen *in vitro* dan *in vivo*,

dengan antigen yang dimurnikan. Teknik monoklonal dengan menggunakan seleksi klon-klon spesifik hanya menghasilkan antibodi spesifik terhadap EPF.

Cavanagh (1996) berpendapat bahwa EPF diperlukan pada pembelahan pertama embrio, sementara efeknya lebih nampak sebagai respon maternal daripada pada embrio itu sendiri. Di samping itu, EPF diperlukan untuk keberhasilan implantasi embrio dan untuk pembentukan dan pertumbuhan lebih lanjut sel-sel tumor yang ditransplantasikan. EPF diproduksi langsung pada pertumbuhan tropoblas dan proliferasi sel-sel tumor dan dapat dihambat oleh kultur *in vitro* dengan antibodi-antibodi anti-EPF. Ini merupakan penanda faktor pertumbuhan autokrin klasik dan mengimplikasikan bahwa EPF berperan dalam proses pembaruan jaringan normal.

## **2.5. Immunoassay Untuk Identifikasi Ikatan Antigen-Antibodi EPF**

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlmann pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam *immunoassay*. Aplikasi dari metode ini salah satunya adalah dipergunakan untuk mendeteksi antibodi dengan cara menilai absorbansi cahayanya melalui *Optic Density* (OD) (Burgess, 1995).

ELISA terbagi menjadi dua sistem yaitu sistem homogen dan heterogen. Sistem heterogen terdapat dua metode yaitu kompetitif dan non kompetitif ELISA. Non kompetitif ELISA adalah sistem yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif dibandingkan model sistem yang lain. Salah satu contoh dari sistem ini adalah metode *indirect* ELISA (Rantam, 2003).

Menurut Rantam (2003), model ini banyak digunakan di berbagai laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini tersedia dan mudah dibeli dipasaran. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus. Antibodi dapat dideteksi dengan cara antigen diikatkan pada benda padat kemudian ditambah antibodi kedua (*conjugated*) yang bertanda enzim (peroksidase). Langkah terakhir adalah dengan menambahkan substrat kromogenik yang menimbulkan warna akibat bereaksi dengan enzim. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikatkan dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari.

## **BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **3.1. Jenis Penelitian**

Penelitian ini bersifat deskriptif laboratories dan merupakan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kadar Early Pregnancy factor (EPF) pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan metode biuret.

### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Invitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Peternakan CV. Musika Devisi Peternakan, Wonosalam Jombang. Pelaksanaan penelitian ini dimulai 17 Februari 2006 sampai 30 Juli 2006.

### **3.3. Materi Percobaan**

#### **3.3.1. Hewan Penelitian**

Hewan percobaan yang digunakan adalah lima kambing Peranakan Etawa (PE) bunting.

#### **3.3.2. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan berupa isolate protein EPF dari serum kambing bunting. Beberapa reagen kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah: Tween-20 (Biorad, cat. 170-6531); Phosphat Buffer Salin-Tween (PBS-T,

pH 7,4); Amonium Persulfat (APS, Biorad, cat 161-0700); Bovin Serum Albumin (BSA, B 4287); buffer tris-glisin; buffer fosfat; bis acrilamid (plus one, cat. 17-13041); poliakrilamid (Promega, V311A); Sodium Dodecyl Sulfonat (SDS, Biorad, cat. 161-0301); TEMED (Sigma); mercaptoeathanol (Biorad, cat. 161-0710); Commasie Brilliant Blue R250 (Sigma C-7920); Bromophenol blue (Merck, 8122-0025); marker protein (Biorad); Glisin (Sigma G7403); Ampholite (Sigma, A10043); Ethanol (Merck); Methanol (Merck, 822158); *Complete Freund's Adjuvant* (CFA, Sigma F585) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA, Sigma F5506). Anti-Goat-IgG AP conjugate (Promega); Anti-Rabbit-IgG AP (Biorad, S3831); Diethanolamine (Sigma, D0683); pNPP (para-Nitro-Phenylphosphatm Sigma N9389); Membran Nitroselulosa (Sigma, M0250). Hormon PGF<sub>2a</sub> (Lutalyse™ Dinoprost trometthamin 5 mg/ml Pharmacia N. VI S.A Puurs – Belgium), Antibodi Monoklonal EPF (Knoxville, TN), Semen beku, Alkohol 70%, dan kapas.

Sejumlah peralatan yang digunakan berupa *disposable syringe* 1 ml, 5 ml dan 20 ml (Terumo Co., Europe), tabung reaksi *venoject* 5 ml, 10 ml dan 20 ml, rak tabung *venoject*, peralatan untuk laboratorium seperti *SDS-PAGE*, *Elusi*, *Western Blotting*, serta uji *ELISA*; meliputi mikropelat bentuk datar “U”, pipet eppendroof 20-200 µl dan 1-10 µl, waterbath, freezer -40 C, refrigerated centrifuge, centrifuge vortexer, pH meter merk Schoot-Gerate tipe CG 820, *Autoclave*, Biorad electrophoresis (Vertikal dan Horisontal), mikropipet, up-mikropipet, kantong dialisis / selofan (Sigma, D9652), dot blotter (Biorad),

transfer blotter (Biorad), ELISA *plate* dan *reader* (biorad), Gun inseminasi, pipa fiber, kamera.

### 3.4. Metode Penelitian

#### 3.4.1. Tahap Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan pada Kambing

Sebanyak 5 ekor kambing di Peternakan CV. Musikal Devisi Peternakan, Wonosalam Jombang digunakan dalam penelitian ini. Sinkronisasi birahi dilakukan dengan menggunakan hormone PGF<sub>2α</sub> secara intra vulva dengan dosis 5 mg per ekor. Pengamatan birahi dilakukan dengan melihat gejala birahi yang timbul yaitu vulva merah, bengkak, basah dan lender serviks. Inseminasi buatan dilakukan dengan menggunakan semen beku setelah 12-18 jam tanda birahi tampak. Peralatan IB dan sinkronisasi dapat dilihat pada Gambar 3.1 dibawah ini.



Gambar 3.1. Gambar Peralatan IB dan Sinkronisasi

#### 3.4.2. Tahap Koleksi EPF Serum Darah Kambing Bunting

Darah diambil dari vena jugularis induk kambing bunting dengan umur kebuntingan dua bulan menggunakan *disposable syringe* 20 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan 45<sup>0</sup> dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian *disentrifuge* dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat disaring dengan milifur

0,22  $\mu\text{m}$ , kemudian ditampung pada vial dan disimpan dalam *freezer* bersuhu  $-20^{\circ}\text{C}$  atau dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan methanol dengan perbandingan 1 : 5 atau dikocok selama tiga menit kemudian didiamkan 15-20 menit sampai terdapat dua lapisan cairan. *Supernatant* diambil dengan *disposable syringe* sebanyak 5 ml dan dimasukkan dalam vial 10 ml untuk dibuat sediaan kering beku. Bahan ini merupakan sediaan untuk dianalisis pada SDS-PAGE maupun *Western Blot*. Tahap koleksi EPF dari serum darah kambing bunting dapat dilihat pada gambar 3.2 dibawah ini:



Gambar 3.2. Pengambilan darah melalui vena jugularis

### 3.4.3. Tahap Isolasi EPF Serun Darah Kambing Bunting

Serum yang diduga mengandung EPF ditambahkan *Saturation Amonium Sulfat* jenuh (*SAS*) 50% dengan perbandingan 1:1. Kemudian dihomogenisasi dengan pengadukan selama satu menit, didiamkan selama 10 menit pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$ . Proses *homogenisasi* diulang tiga kali. Serum ini kemudian *disentrifugasi* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit, *supernatant* dibuang, bahan *presipitat* ditambahkan *SAS* 50% 10 kali volume serum, dihomogenkan selanjutnya disentrifugasi lagi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. *Supernatant* dibuang, *presipitat* ditambahkan *buffer Fosfat* 0,05 M pH 7 dengan

volume yang sama, dimasukkan dalam kedalam *selofan*, diberi label, selanjutnya diikat. Kemudian direndam dalam *buffer Fosfat* 0,01 M pH 7, *dihomogenkan* dalam keadaan dingin (suhu  $\pm 5$  °C) selama 24 jam, kemudian *buffer* diganti dengan *buffer Fosfat* 0,01 M yang baru dan dibiarkan selama enam jam. Larutan luat *selofan* kemudian diuji dengan larutan BaDI<sub>2</sub>, apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO<sub>4</sub> maka *dialysis* dapat dihentikan. Hasil *dialysis* kemudian diangkat dan disimpan pada suhu -20 °C.



Gambar 3.3. Serum darah

#### 3.3.4. Penentuan Kadar Total Protein Isolat EPF Metode *Biuret*

Penentuan kadar total protein menggunakan reagen *biuret* dengan penambahan larutan standar protein (*Biuret*). Dipersiapkan tiga kuvet spektrofotometer, kuvet pertama diberi tanda S yang merupakan kuvet sample yang akan diukur. Dalam kuvet S dimasukkan 0,05 ml isolat protein EPF yang diperiksa dan 2,5 ml pereaksi *biuret*. Kuvet kedua diberi tanda ST yang merupakan kuvet standar, dimasukkan 0,05 ml larutan standar protein (*Biuret*), 2,5 ml pereaksi *biuret* dan 0,05 ml aquades. Dan pada kuvet yang ketiga yang merupakan blanko diberi tanda BL, dimasukkan 2,5 ml pereaksi *biuret* dan 0,05 ml aquades. Kemudian ketiga kuvet tersebut didiamkan selama 30 menit dan

selanjutnya dibaca pada spektrofotometer Bausch-Lombs spectronik 20 dengan panjang gelombang 540 nm (Samik, 1989).

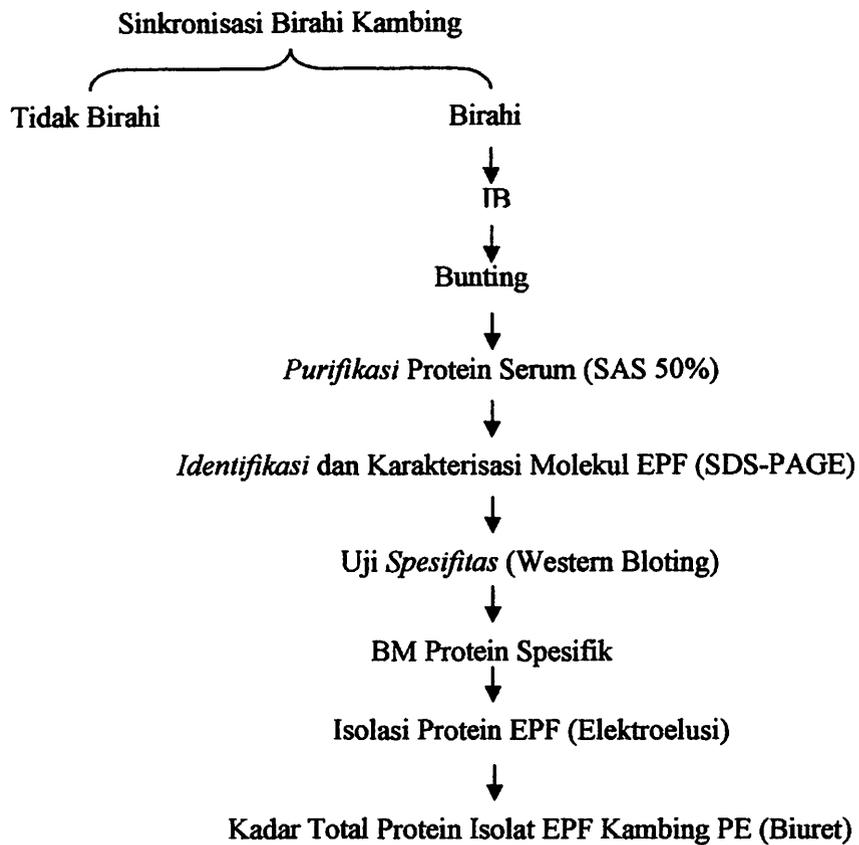
Penentuan Kadar Total Protein dengan rumus :

$Y = 5.10^{-5} \cdot X \mu/ml$ , artinya Y adalah nilai absorbansi sedangkan X adalah kadar protein (Aulanni'am, 2004). Jenis spektrofotometer yang digunakan dalam pemeriksaan ini dapat dilihat pada Gambar 3.3 dibawah ini:

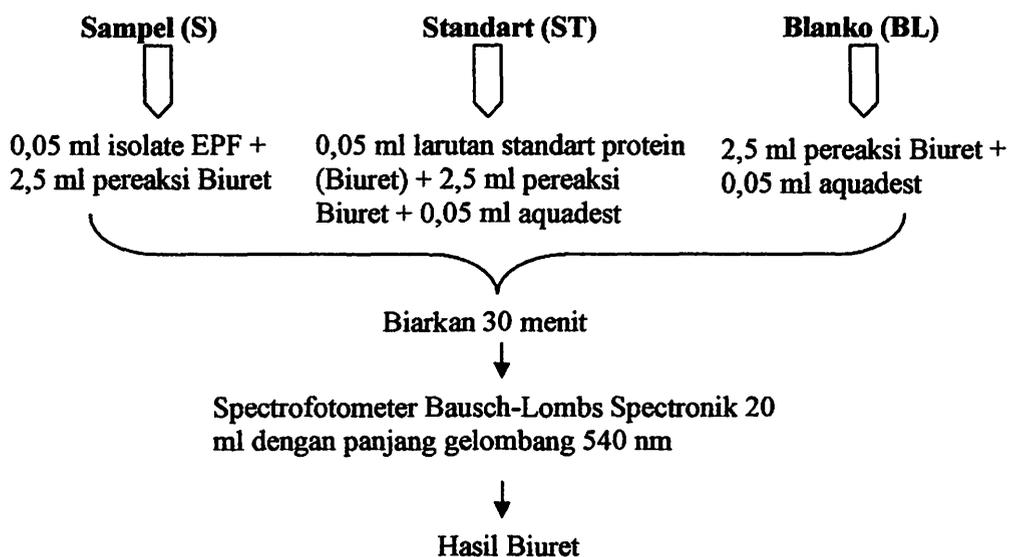


Gambar 3.4. Spektrofotometer Bausch-Lombs Spektronik 20 untuk peneraan EPF

### A. Alur Skema Penelitian



### B. Skema Penentuan Kadar Total Protein Isolat dengan Metode Biuret



## BAB 4 HASIL PENELITIAN

Bagian ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang relevan dengan tujuan dan hipotesisnya. Penyajian data hasil penelitian disajikan dalam bentuk table dan gambar yang disusun sesuai dengan metode penelitian.

Karakterisasi yang dilakukan pada bab ini adalah data tentang kadar isolat protein *early Pregnancy Factor* (EPF) pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan metode biuret. Sebelum menggunakan pemeriksaan dengan metode biuret ini, Protein yang akan diperiksa dipastikan dahulu apakah protein yang akan diperiksa adalah EPF melalui uji *western blot*, maka hasil elusi dari uji *western blot* baru diperiksa dengan metode biuret (Samik, 2007).

Tabel 4.1. Hasil Pemeriksaan kadar isolate protein EPF pada serum darah kambing dua bulan Peranakan Ettawa dengan metode biuret

Kambing	Kadar isolate protein EPF ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	9.780
2	10.450
3	11.980
4	11.160
5	12.450
Rataan dan Simpangan baku	11.182 $\pm$ 1.116

## BAB 5 PEMBAHASAN

Pemeriksaan kadar isolat protein *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada serum darah dari lima kambing bunting Peranakan Ettawa yang digunakan sebagai sampel dengan metode biuret. Penentuan kadar protein tersebut dibaca pada spektrofometer Bausch-Lombs spectronik 20 dengan panjang gelombang 540 nm (Samik, 1989), yang menggunakan rumus  $Y = 5.10^{-5} \cdot X \mu/ml$ , artinya Y adalah nilai absorbansi sedangkan X adalah kadar protein (Aulanni'am, 2004).

Berdasarkan data hasil pemeriksaan dengan metode biuret, dapat dibuktikan bahwa EPF dapat ditemukan pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan umur kebuntingan dua bulan, mempunyai kadar rata-rata  $11.182 \pm 1.116 \mu g/ml$ . Gonzalez *et al.* (2004) menyatakan bahwa kadar EPF pada serum darah kambing bunting yang positif, hasil dari sel trophoblast apabila tidak melebihi  $1,5 \mu g/ml$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa kadar EPF dengan metode Biuret adalah hasil dari sel trophoblast. Sel tersebut pada ruminansia yang akan berkembang menjadi plasenta fetalis (kotiledon) memproduksi EPF yang berupa *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAGs) (El Amri *et al.*, 2000). PAGs pasca struktural mirip dengan pepsin yang termasuk aspartat proteinase (Xie *et al.*, 1996). Namun demikian sebagian besar PAGs tampaknya merupakan enzim tak aktif karena substansi asam amino di sekeliling tempat katalitik (El Amiri *et al.*, 2004). PAGs terdeteksi pada darah maternal saat sel-sel endometrium membentuk fetometernal *syncytium* (Karen *et al.*, 2003), sehingga EPF yang berupa *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAGs) akan berada dalam sirkulasi maternal

selama adanya masa kebuntingan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Karen et al. (2000), yang menyatakan bahwa PAG terdeteksi dari sejumlah domba betina pada minggu ke tiga dan pada semua domba betina pada minggu keempat setelah perkawinan. Setelah melahirkan, level PAGs menurun cepat hingga mencapai nilai basal pada minggu keempat postpartum.

## **BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapat kesimpulan bahwa metode biuret dapat mendeteksi kadar *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada kambing Peranakan Ettawa bunting, dengan kadar rata-rata  $11.182 \pm 1.116 \mu\text{g/ml}$ .

### **6.2. Saran**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dijelaskan dan kesimpulan yang telah dibuat, dapat disarankan bahwa metode biuret dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk mendiagnosa kebuntingan dan diperlukan penelitian lebih lanjut, dengan memeriksa kadar EPF pada serum darah kambing PE dari berbagai umur kebuntingan, untuk membuktikan bahwa EPF dapat digunakan untuk mendiagnosa kebuntingan dini.

## RINGKASAN

Salah satu kendala untuk meningkatkan produktivitas dalam budidaya kambing adalah pengendalian tingkat reproduktivitasnya. Kendala tersebut antara lain adalah kesulitan dalam mengenali tanda-tanda kebuntingan secara dini, yang mengakibatkan rendahnya prosentase kebuntingan (Putro, 2004).

Saat ini telah ditemukan substansi yang lebih spesifik yang terbentuk selama masa kebuntingan, yang dikenal sebagai *Early Pregnancy Factor* (EPF) (Hafez, 2000). PAG-1 (EPF) pada sapi perah dan domba merupakan produk sel-sel trophoblast binukleat yang merupakan komponen-komponen invasif dari plasenta (Xie *et al.*, 1996).

Berdasarkan asumsi bahwa EPF merupakan suatu antigen, diharapkan dapat digunakan sebagai metode alternatif yang lebih akurat dalam deteksi kebuntingan dini pada kambing.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui kadar *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan metode biuret.

Hasil Pemeriksaan Peneraan kadar EPF dengan metode Biuret pada serum darah kambing bunting Peranakan Ettawa dengan umur kebuntingan dua bulan, mempunyai kadar rata-rata  $11.182 \pm 1.116 \mu\text{g/ml}$ . Gonzalez *et al.*, (2004) menyatakan bahwa kadar EPF pada serum darah kambing bunting yang positif hasil dari sel trophoblast apabila kadarnya melebihi  $1,5 \mu\text{g/ml}$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa kadar EPF dengan metode Biuret adalah hasil dari sel

trophoblast. Sel tersebut pada ruminansia yang akan berkembang menjadi plasenta fetalis (kotiledon) memproduksi EPF yang berupa Pregnancy Associated Glycoprotein (PAGs) (El Amri et al., 2000). PAGs pasca struktural mirip dengan pepsin yang termasuk aspartat proteinase, selain pepsin, chymosin, rennin dan cathepsin D dan E juga termasuk aspartat proteinase (Xie *et al.*, 1996).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kadar *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada kambing Peranakan Ettawa bunting dua bulan dapat ditera dengan metode biuret, dengan kadar rata-rata  $11.182 \pm 1.116 \mu\text{g/ml}$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Cetakan pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal. 28-45.
- Barnea, E.R. 2000. Early Pregnancy: Biology and Medicine. Early Pregnancy Volume IV. Pp. 166-175
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosa Penelitian. Gadjah Mada University Press. Hal.163-167
- Beckers J.F.,P.V Drion, J.M Garbayo, Z Perenyi, A Zarrouk, J Sulon, B Remy and O Szenci. 1999. Pregnancy Associated Glycoprotein in Ruminants: Inactive members of the Aspartic Proteinase Family. Acta Vet Hung. 47(4):461-469
- Badan Pusat Stastitik. 2001. Jawa Timur Dalam Angka.
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperorin 10: Implication for Understanding Its Role. Journal of The Society for Reproduction and Fertily-Reviews of Reproduksi Volume I pp. 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
- Cruz, Y.P., L Selwood, H. Morton and A.C. Cavanagh. 2001. Significance of Serum Early Pregnancy Factors Concentration During Pregnancy and

Embrionik Development in Sminthopsis Macroura (Spencer) (Marsupialia Dasyuridae). *J. Reprod. Fert.* 121: 933-939

Djanah, D. 1988. *Beternak Kambing*. Penerbit Yasaguna. Jakarta. Hal: 7-8, 16-17

DuPlants, L.J. 2000. *Early Pregnancy Factor*. Lifeissues.net. kochi, Japan. All Right Reserved. Pp. 1-2

El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-Mboko and J.F. Beckers. 2000. *Pregnancy-Associated Glycoprotein in Bos Taurus and Bos Taurus Indicus*. *Theriogenology* 53:283

El Amiri, B., B. Remy, N.M Sousa, J.F. Becker. 2004. *Isolation and Characterizations of Eight Pregnancy-Associated Glycoprotein Present at High Level in The Ovine Placenta Between Day 60 and Day 100 of Gestation*. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 169-181

Ensminger, M.E., J.E Oldfield and W.W Heinemann. 1990. *Feed & Nutrition*. 2<sup>nd</sup> Ed. The Ensminger Publishing Company, California. Pp 88-93

Fradson, R.D. 1991. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi Pertama. Gadjamada University Press. Yogyakarta.

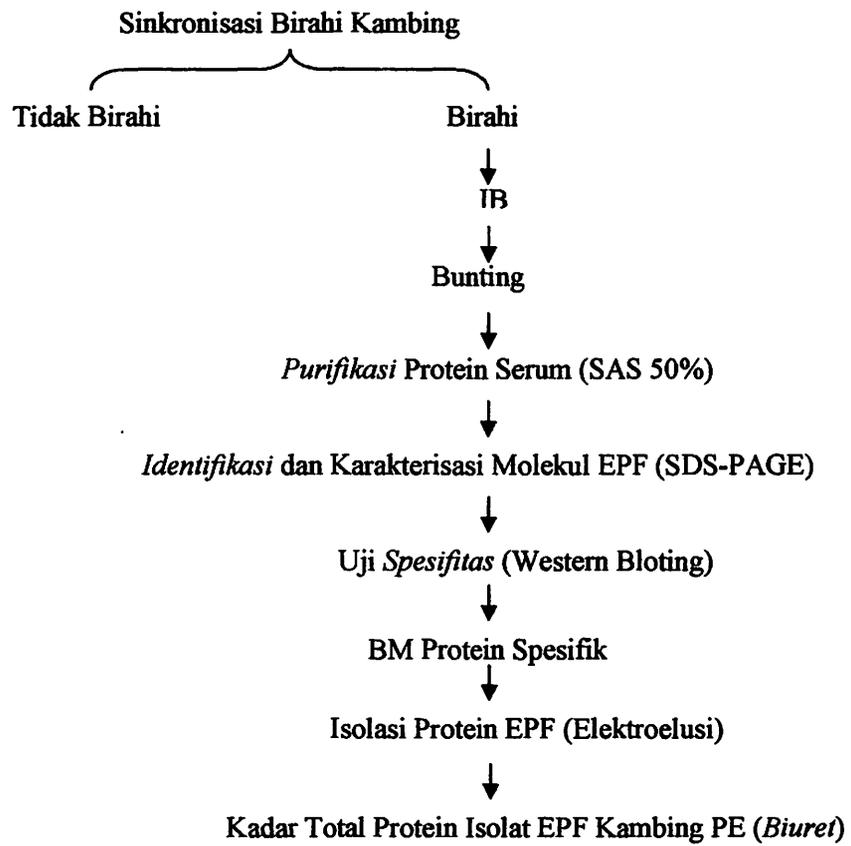
Garbayo, J.M., B. Remy, J.L Alabart., J. Folch, R. Wattiez, P.Falmange, and J.F Beckers. 1998. *Isolation and Partial Characterization of Pregnancy Associated Glycoprotein Family From The Goat Placenta*. *Biol. Reprod.* 58: 109-115

Gonzalez, F., F. Canbera, M. Batista, N. Rodrigues, D. Alamo, J. Sulon, J.F. Becker, A. Gracia. 2004. *A Comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays*. *Theriogenology*. 62: 1108-1115

- Green, J.A., S. Xie, X. Quan, B. Bao, X. Gan, N. Mathialagan, J.F Beckers, and R.M Robert. 2000. Pregnancy Associated Glycoproteins Exhibit Spatially and Temporally Distinct Expressions Pattern During Pregnancy. *Biol Reprod.* 62: 1624-1631
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup>.Ed. Lippicontt Wiliams & Wilkins. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia. 172-181
- Harjopranto, S. 1982. *Physiologi Reproduksi*. Edisi Kedua. Cetakan ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Harjopranto, S. 1987. *Pembuahan In Vitro dan Transfer Embrio*. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Howard, P.J.1998. Morning After Pills: How Do They Prevent Pregnancy ?. *Lancet* 352: 422-428
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB. Bandung. 13-26, 41-45, 74-104
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Edisi Kedua. Diktat Kuliah Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Karen, A., P. Kovacs, J.F Becker, and O. Szenci. 2001. Pergnancy Diagnosis in Sheep: Review of The Most Practical Methods. *Acta Vet. Brno* 70: 115-126
- Karen, A., J.F Becker, J. Sulon, N.M Sousa, K. Szabados, Reczigel, and O. Szenci. 2003. Early Pregnancy Diagnosis in Sheep By Progesterone and Pregnancy Associated Glycoprotein Test. *Theriogenology* 59 (9): 1941-1948. (Abstract).

- Karnen, G.B. 2001. *Imunology Dasar Edisi 4*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-23
- Mahaputra, L. 2001. *Ilmu Kebidanan Veteriner. Edisi II. Cet kedua*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Morton, H., B. Ralfe and A. Cavanag. 1982. *Early Pregnancy Factor, Biologi and Clinical Significant*. In : *Pregnancy Protein*, Editor by J.G. Greedzinkans, B. Teiner and M. Seppala. Akademik Press, New York. Pp. 391-405
- Mulyono, s. 2003. *Teknik Pembibitan Kambing dan Domba*. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta.
- Putro, P.P. 2004. *Lokakarya Sapi Potong: Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit Hewan Menular Strategis dalam pengembangan Usaha Sapi Potong*. Bagian Reproduksi dan Obstertri, Fak. Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Poernomo, B., Widjianti, M. Mafruchati, E.M. Luqman, E.D. Masithah, A.T Mukti 2004. *Penuntun Embriologi*. Penebar Pustaka Melati. Surabaya.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi. Cetaka 1*. Airlangga Ubniversity Press. Surabaya.
- Restiadi, T.I. 2002. *Selaput Fetus dalam Buku Ajar Ilmu Kebidanan Fakultas Kedokteran hewan Universitas Airlangga*. Surabaya.
- Samik, A. 1989. *Hubungan Umur Sapi, Bulan Laktasi dan Produksi Susu dengan Kadar Total Protein, Albumin, Total Globulin dan Globulin Serum Darah*

- Sapi Frisian Holstein. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal: 25-32
- Samik, A., E. Safitri. 2007. Karakterisasi Early Pregnancy Factor (EPF) dan Uji Spesifitas Antibodi Anti-EPF Kambing peranakan Ettawa. Media Kedokteran Hewan. Veterinary Medicine Journal.
- Sarwono, B. 2001. Beternak Kambing Unggul. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta. 8.
- Szafranska B, G Panasiewicz, M Majewska and J.F beckers. 2003. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 497-516
- Toelihere, M.R. 1981. Ilmu Kemajiran ternak. Edisi Pertama. Penerbit Angkasa Bandung.
- Transom, G. 2001. Early Pregnancy Factor (EPF)-Background and Prospects. Research Report, Cbio Limited. Pp. 1-9
- Xie, S., R.J Nagel, J. Green, J.F Beckers, and R.M Robert. 1996. Trophoblast Specific Processing and Phophorylation of Pregnancy Associated Glycoprotein-1 In Day 15 to 25 Sheep Placenta. *Biol Reprod.* 54: 122-129
- Xie, S., J.A Green, B. Bao, J.B Bixby, B. Szafranska, J.C DeMartini, S. Hecht, and R.M Robert. 1997. The Diversity and Evolutionary Relationships of The Pregnancy Associated Glycoprotein An Aspartic Proteinase subfamily Consisting of Many Trophoblast expressed Genes. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 94: 12809-12816

**Lampiran 1. Alur Skema Penelitian**

**Lampiran 2. Skema Penentuan Kadar Total Protein Isolat dengan Metode****Biuret**