

**LAPORAN PENELITIAN**

**HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2008**



**PENENTUAN EPITOP PREGNANCY SPECIFIC PROTEIN B  
(PSPB) UNTUK MODEL PENGEMBANGAN TES  
DIGNOSTIK KEBUNTINGAN MAMALIA**

OLEH

ABDUL SAMIK  
AULANI'AM  
ERMA SAFITRI  
ROSA TRI HERTAMAWATI

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
DESEMBER 2008**

Dibiayai DP2M Ditjen Dikti Depdiknas  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008  
Tanggal 5 Maret 2008

**HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
PERGURUAN TINGGI TAHUN 2008**

Judul Kegiatan/Riset : Penelusuran Epitop *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) Untuk Model Pengembangan Tes Diagnostik Kebuntingan Mamalia

**Ketua Peneliti**

- Nama Lengkap : Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
- Jenis Kelamin : Laki-Laki
- Pangkat/Golongan : Penata Tk. I / III-d
- NIP : 131 925 904
- Jabatan : Lektor
- Fakultas : Kedokteran Hewan

Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (2007-2008)

Tahun Pelaksanaan : 2008

Biaya : Rp. 35.000.000,00

Surabaya, 5 Desember 2008

Ketua Peneliti,



Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh  
NIP 131 925 904

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh  
NIP 130 687 305

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, Drh.  
NIP. 131 873 004

## RINGKASAN

**PENENTUAN EPITOP PREGNANCY SPECIFIC PROTEIN B  
(PSPB) UNTUK MODEL PENGEMBANGAN TES  
DIGNOSTIK KEBUNTINGAN MAMALIA**

Oleh

Abdul Samik\*, Aulani'am\*\*, Erma Safitri\*, Rosa Tri Hertamawati\*\*\*

\* Bagian Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya

\*\* Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang

\*\*\* Poltek Negeri Jember

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan cenderung menurun. Propinsi Jawa Timur sejak tahun 1999 sampai 2003 terjadi penurunan populasi ternak besar yaitu kuda turun 3,24 %, sapi perah 5,86 %, kerbau 5 % sedangkan sapi potong naik 0,02 %.

Demikian juga untuk kebutuhan konsumsi susu nasional masih jauh dari cukup. Kebutuhan konsumsi susu nasional pada tahun 2006 sebesar 896.791 ton/tahun. Sedangkan produksi susu nasional pertahun sebesar 577.626 ton, sehingga masih terdapat kekurangan produksi susu nasional sebesar 319.165 ton/tahun (Direktur Jendral Peternakan, 2005).

Melihat kenyataan atau kondisi peternakan tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga kebutuhan daging dan susu nasional bisa terpenuhi. 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 awal yang tepat dan akurat.

Diagnosa kebuntingan dini pada sapi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) 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 sapi 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.

Dengan melihat *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) maka tujuan umum dari penelitian ini adalah pengembangan metode baru tes kebuntingan dini yang didasarkan pada reaksi antigen dan antibodi yang berlabel dengan menggunakan teknik *indirect Sandwich* ELISA (antibodi penangkap antigen).

Tujuan khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah membuktikan protein PSPB mampu menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PSPB dan mengkaji peran antibodi terhadap PSPB sebagai bahan diagnostik kebuntingan dini sapi perah.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair dan UPT Ternak Branggahan Kediri, UPT ternak Singosari Malang, UPT Ternak Tuban dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut : Karakterisasi anti-PSPB hasil induksi isolat protein PSPB *Cotyledon* sapi perah bunting, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah, Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal dan Uji validitas kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer anti-PSPB terjadi peningkatan dari minggu pertama sampai minggu ke 3 setelah *booster* pertama. Pada minggu ke 4 mulai terjadi penurunan dan mencapai angka terendah pada minggu ke 5. Pada minggu ke 5 dilakukan *booster* ke 2, setelah *booster* ini diikuti peningkatan titer kembali sampai minggu ke 8 dan mulai menurun kembali pada minggu ke 9 dan 10.

Pada pemeriksaan kadar PSPB serum darah ditemukan sebanyak 14 ekor sapi perah (28 %) di dalam darahnya sudah ada PSPB Pada hari ke 14 pasca inseminasi buatan. Sedangkan pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan, sebanyak 32 ekor sapi perah (64 %) di dalam darahnya sudah ada PSPB.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu : protein PSPB bersifat imunogen yang dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti-PSPB dan anti-PSPB yang dihasilkan dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan kambing dengan metode PSPB mikrotiter strip (*Sandwich* ELISA).

Berdasarkan kesimpulan umum dapat ditarik subkesimpulan sebagai berikut :

1. Protein PSPB dari *cotyledon* kambing bunting mampu menginduksi terbentuknya anti-PSPB.



2. Anti-PSPB dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan pada kambing.
3. Diagnosis kebuntingan pada 21 hari pasca IB dengan menggunakan PSPB mikrotiter strip memperoleh hasil angka akurasi atau validasi lebih baik dibanding pemeriksaan kadar progesteron serum darah.

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN .....	iv
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan Umum .....	4
1.3.2. Tujuan Khusus .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1. Manfaat Ilmiah .....	4
1.4.2. Manfaat Praktis .....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Siklus Reproduksi Sapi .....	6
2.1.1. Pubertas .....	6
2.1.2. Siklus Birahi .....	7
2.1.3. Perkawinan .....	11
2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur .....	12
2.1.3.2. Transpor Gamet .....	13
2.1.3.3. Transpor Spermatozoa .....	13
2.1.3.4. Transpor Spermatozoa Pada Serviks .....	15
2.1.3.5. Transpor Spermatozoa Dalam Uterus .....	16
2.1.3.6. Transpor Spermatozoa Dalam Oviduks .....	17

2.1.3.7. Kontrol Endokrin Terhadap Transpor Sperma .....	17
2.1.3.8. Hiperaktivasi Dari Motilitas Spermatozoa.....	18
2.1.4. Kebuntingan .....	19
2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta .....	20
2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan.....	22
2.1.4.3. Peranan Hormon Dalam Proses Kebuntingan .....	25
2.1.5. Diagnosis Kebuntingan.....	26
2.1.5.1. Palpasi Rektal .....	27
2.1.5.2. Penggunaan USG .....	27
2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron .....	28
2.1.5.4. Penggunaan Radiografi .....	28
2.1.5.5. Penggunaan Antigen Embro .....	29
2.2. <i>Pregnancy Specific Protein B (PSPB)</i> .....	29
2.3. Produksi Antibodi Poliklonal .....	30
2.3.1. Antibodi Poliklonal .....	30
2.3.2. Hewan Coba, Dosis Injeksi dan Teknik Pengambilan Darah	31
2.3.3. Immunoassay untuk Identifikasi Antigen-Antibod.....	32
BAB III. METODE PENELITIAN .....	34
3.1. Rancangan Penelitian .....	34
3.2. Sampel Penelitian .....	34
3.3. Metode Penelitian .....	35
3.3.1. Metode Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PSPB .....	35
3.3.1.1. Pengukuran Absorbansi Protein Standar .....	35
3.3.1.2. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PSPB .....	36
3.3.2. Karakterisasi Antibodi PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB.....	37
3.3.2.1. Metode Imunisasi Kambing dengan Isolat Protein PSPB .....	37
3.3.2.2. Metode Purifikasi Antibodi PSPB dengan <i>Saturated</i> <i>Ammonium Sulphate (SAS)</i> .....	38
3.3.2.3. Metode Pengukuran <i>Optical Density (OD)</i> Antibodi PSPB	

dengan <i>Indirect</i> ELISA .....	39
3.3.2.4. Pengukuran Titer Antibodi PSPB dengan Menggunakan Kurva Standar Antibodi PSPB.....	39
3.3.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah .....	40
3.3.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah.....	41
3.3.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal .....	41
3.4. Bagan Prosedur Penelitian .....	42
3.4.1. Karakterisasi Antibodi PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB <i>Cotyledon</i> SapiPerah Bunting .....	42
3.4.2. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah dan Pengukuran Kadar Progesteron Serum Darah .....	43
3.4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal .....	44
3.5. Analisis Data .....	44
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	46
4.1. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PSPB .....	46
4.2. Karakterisasi Antibodi PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB <i>Cotyledon</i> Sapi Perah Bunting .....	48
4.2.1. Pembuatan Antibodi Poliklonal Terhadap PSPB (Antibodi PSPB) dan Pengukuran <i>Optical Density</i> (OD) Antibodi PSP.....	48
4.2.2. Pengukuran Titer Antibodi PSPB dengan Kurva Standar....	49
4.3. Diagnosis Kebuntingan Kambing dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah .....	53
4.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah .....	56

4.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah Dengan Palpasi Rektal .....	59
4.6. Analisis Data .....	59
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>63</b>
5.1. Kesimpulan .....	63
5.2. S a r a n .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>65</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>67</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Lama Siklus Birahi, Lama Birahi dan Ovulasi .....	8
Tabel 3.1.	Nilai Protein Standar dan Kandungan Karbohidrat Total Berdasarkan Glikoprotein Karbohidrat <i>Estimation</i> Kit 23260	36
Tabel 3.2.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PSPB Standar ...	40
Tabel 3.3.	Uji Validitas Kebuntingan Sapi Perah (Sensitivitas dan Spesifisitas) .....	45
Tabel 4.1.	Nilai Absorbansi Protein-Protein Standar dan Protein PSPB	47
Tabel 4.2.	Rataan <i>Optical Density</i> Anti-PSPB (pengenceran 10 X) pada Kambing Setelah Mendapatkan Imunisasi Isolat PSPB .....	49
Tabel 4.3.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PSPB Standar ...	49
Tabel 4.4.	Rataan Titer Anti-PSPB ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB .....	50
Tabel 4.5.	Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein PSPB Standar .....	53
Tabel 4.6.	Kadar Progesteron Standar dan Nilai Absorbansinya .....	56
Tabel 4.7.	Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur PSPB Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB .....	60
Tabel 4.8.	Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB .....	60
Tabel 4.9.	Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah pada 14 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB .....	61

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1.	Bagan Prosedur Karakterisasi Antibodi PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB <i>Cotyledon</i> Sapi Perah Bunting	42
Gambar 3.2.	Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah.....	43
Gambar 3.3.	Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Metode Palpasi Rektal .....	44
Gambar 4.1.	Grafik Kurva Standar Anti-PSPB .....	50
Gambar 4.2.	Titer Antibodi PSPB pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB.....	51
Gambar 4.3.	Grafik Kurva Baku Protein PSPB .....	54
Gambar 4.4.	Grafik Kadar Protein PSPB Sapi Perah Pada Hari ke 21 Pasca Inseminasi Buatan .....	54
Gambar 4.5.	Grafik Kurva Standar Progesteron .....	56



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	<i>Optical Density</i> (OD) dari Antibodi PSPB Serum Darah Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB .....	67
Lampiran 2.	Titer antibodi PSPB ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB.....	68
Lampiran 3.	Nilai Absorbansi (pengenceran 20 X) dan Kadar Protein PSPB Serum Darah Sapi Perah .....	69
Lampiran 4.	Kadar Progesteron Serum Darah Sapi Perah Hari ke 21 Pasca Inseminasi .....	71
Lampiran 5.	Hubungan Kadar Protein PSPB, Progesteron dan Pemeriksaan Palpasi Rektal Sapi Perah.....	73

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Pembangunan peternakan pada dasarnya adalah untuk menyediakan pangan asal ternak baik kualitas maupun kuantitas yang turut berperan mendorong peningkatan kualitas sumber daya manusia dari segi pemenuhan protein hewani. Kebutuhan protein hewani asal ternak nasional 6 gram/kapita/hari namun pada tahun 2006 baru tercapai 5,34 gram/kapita/hari (Ditjennak, 2006).

Peta populasi ternak nasional diwarnai oleh laju pertumbuhan yang beragam, pertumbuhan ternak selama 20 tahun terakhir (1987-2006) secara umum menunjukkan laju pertumbuhan positif. Namun laju pertumbuhan ternak besar cenderung menurun terutama periode 10 tahun terakhir (1997-2006). Populasi sapi menurun -1,22 % rata-rata per tahun, kerbau menurun -3,17 % rata-rata per tahun. Populasi kambing Indonesia pada tahun 2006 sebesar 13.082.000 ekor dengan laju pertumbuhan populasi kambing pada periode 10 tahun terakhir (1997-2006) terjadi peningkatan 0,45 % rata-rata per tahun dan pada tahun 2006 produksi daging kambing sebesar 53.700 ton. (Ditjennak, 2006).

Upaya menghindari penurunan laju pertumbuhan ternak dan peningkatan produktivitas dengan melakukan perbaikan asas kelestarian sumberdaya ternak nasional (populasi), asas keseimbangan (suplai-permintaan) dan asas kemandirian (mengurangi impor). Asas kelestarian sumberdaya ternak akan terkait dengan aspek peningkatan kelahiran, memperpendek jarak antar kelahiran, penurunan

kematian, pengendalian pemotongan betina dan pejantan unggul (Sudardjad, 2005).

Salah satu upaya untuk memperpendek *calving interval* adalah melakukan diagnosis kebuntingan secara dini setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Secara laboratoris diagnosis kebuntingan dilakukan dengan melihat substansi non spesifik yang ada dalam darah, urin dan air susu induk selama kebuntingan seperti progesteron dan estron sulfat (Hafez, 2000). Namun pemeriksaan ini masih banyak kendala karena mahalnya biaya dan lamanya waktu diagnosis.

Sampai saat ini masih terus dilakukan pengembangan dan pencarian metode alternatif untuk diagnosis kebuntingan dini ternak yang relatif lebih cepat, akurat, murah dan mudah dilakukan di lapangan. Pengembangan metode diagnosis kebuntingan dini ternak dapat dilakukan dengan melihat substansi spesifik yang terdapat dalam darah induk yaitu *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) (Hafez, 2000).

*Pregnancy Specific Protein B* merupakan protein spesifik yang berperan penting pada proses implantasi dan kebuntingan dengan memelihara *corpus luteum graviditatum* untuk menghasilkan hormon progesteron (Karen *et al.*, 2001).

*Placentoma* pada golongan mamalia tersusun atas *placenta maternalis* (*carunculae*) dan *placenta foetalis* (*cotyledon*). *Pregnancy Associated Substances* diproduksi oleh *placenta foetalis* (*cotyledon*) setelah proses implantasi dan tetap

berada di dalam darah induk bunting sampai partus dan menghilang empat minggu setelah partus (DuPlants, 2000).

Penelitian yang akan dilakukan pada tahap ini adalah pembuatan antibodi terhadap PSPB (Anti-PSPB) pada hewan kambing, purifikasi anti-PSPB dengan metode *Saturation Ammonium Sulphate* (SAS), peneraan titer anti-PSPB dengan *indirect* ELISA dan sinkronisasi birahi pada sapi perah.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul sebagai berikut :

- 1.2.1. Apakah isolat protein PSPB *cotyledon* sapi perah bunting bersifat imunogen sehingga dapat menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PSPB ?
- 1.2.2. Apakah antibodi terhadap PSPB dapat digunakan sebagai bahan diagnostik untuk uji kebuntingan pada sapi perah ?
- 1.2.3. Apakah ada perbedaan hasil diagnosis kebuntingan sapi perah dengan menggunakan PSPB mikrotiter strip dibandingkan dan pemeriksaan kadar progesteron darah ?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan bahwa protein PSPB mampu menginduksi respon imun humoral yang ditandai terbentuknya anti-PSPB

dan membuktikan anti-PSPB yang dihasilkan mampu mengenali protein PSPB dari serum darah sapi perah bunting sebagai dasar pengembangan salah satu tes kebuntingan dini pada sapi perah.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1. Membuktikan protein PSPB dalam menginduksi terbentuknya antibodi terhadap PSPB.
2. Mengkaji peran antibodi terhadap PSPB sebagai bahan diagnostik kebuntingan dini pada sapi perah.
3. Membuktikan bahwa diagnosis kebuntingan sapi perah dengan menggunakan PSPB mikrotiter strip lebih baik dari pemeriksaan kadar progesteron.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Manfaat Ilmiah**

Penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat di bidang ilmu peternakan dan khususnya ilmu kedokteran hewan, antara lain :

1. Memberikan informasi ilmiah peran PSPB sebagai antigen yang bersifat imunogen dan mampu menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya antibodi terhadap PSPB.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang teknik mikrotiter strip yang didasarkan pada reaksi ikatan anti-PSPB dan protein PSPB untuk diagnosis kebuntingan sapi perah

#### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat praktis di bidang peternakan antara lain :

1. Dapat digunakan sebagai diagnosis kebuntingan secara mudah dan cepat oleh peternak sapi perah.
2. Dapat digunakan sebagai model untuk diagnosis kebuntingan dini pada hewan mamalia lain.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Siklus Reproduksi Sapi

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 (Ismudiono, 1999).

##### 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 sapi dicapai pada umur 8-13 bulan (Hafez, 2000).

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 (Ismudiono, 1999).

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*) (Hunter, 1995).

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. Dilain pihak, kadar estrogen hanya meningkat pada babi 11 hari setelah lahir, pada waktu folikel antral pertama tampak, sementara sekresi gonadotropin dimulai 3 minggu sebelumnya (Hafez, 2000).

### **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 sapi berkisar 20-21 hari. Secara lengkap panjang siklus birahi, lama birahi dan waktu ovulasi dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. 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 sapi berlangsung selama 2 - 3 hari. Pada periode ini biasanya sapi akan menolak bila dinaki pejantan maupun sesama betinanya, tetapi akan berusaha menaiki betina yang lainnya (Jumping heat) (Partodihardjo, 1992).

Periode estrus merupakan masa keinginan kawin, periode ini ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik. Sapi akan sering menguak 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 sapi betina tersebut dilepas dipadangan maka akan mencari pejantan untuk mengawininya dan akan menaiki sesama betina. Sapi 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 diangkat dan lendir transparan menggantung atau melekat pada pangkal ekor. Vulva membengkak, lunak, oedematous dan relaks (Partodihardjo, 1992).

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 obyektif 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 (Hafez, 2000).

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 (Partodihardjo, 1992).

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 (Hafez, 2000).

### 2.1.3. Perkawinan

Di samping harus diketahui cara inseminasi yang paling baik, perlu juga diperhatikan waktu inseminasi yang tepat. Oleh karena banyak sekali faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk berhasilnya program inseminasi ini, seperti umur ovum yang pendek, begitu juga dengan daya hidup spermatozoa yang teratas (Anonymous, 1986). Walaupun umur spermatozoa lebih panjang dari pada umur ovum akan tetapi spermatozoa di dalam saluran alat kelamin betina perlu mengalami perubahan-perubahan terlebih dahulu sebelum spermatozoa itu dapat membuahi ovum (Djanuar, 1985). Balai Inseminasi Lembang (1984) membagi saat inseminasi menjadi lima katagori yaitu; terlalu cepat, baik, baik sekali, sedang dan terlambat. Selanjutnya disebutkan pula bahwa kemungkinan konsepsi (kebuntingan) bila diinseminasi pada saat-saat ; 1). permulaan birahi adalah 44 %, 2). pertengahan birahi 82 %, 3). akhir birahi 75 %, 4). enam jam sesudah birahi 62.5 %, 5). 12 jam sesudah birahi 32.5 %, 6). 18 jam sesudah birahi 28 %, 7). 24 jam sesudah birahi 12 %, 8). 36 jam sesudah birahi 8 % dan 48 jam sesudah birahi 0 %.

Penelitian yang dilakukan oleh Pusat Inseminasi Buatan dan penelitian tandingannya memiliki hasil yang hampir sama. Hasil tersebut pada umumnya menunjukkan angka konsepsi yang lebih rendah dari pada angka konsepsi tertinggi bila sapi-sapi tersebut dikawinkan pada awal birahi atau lebih dari enam jam sesudah birahi. Hasil tertinggi akan didapatkan bila sapi-sapi tersebut dikawinkan terhitung diantara pertengahan birahi sampai akhir birahi. Menurut anjuran Trimberer (1948) dibuat suatu patokan, bila sapi itu mulai birahi pada

waktu sore hari sesudah jam 12.00 siang supaya dikawinkan sebelum jam 12.00 pada hari berikutnya.

### 2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur

Lapisan massa cumulus oophorus yang mengandung oosit dan sel corona menempel pada stigma sehingga mudah disentuh oleh kinosilia dari fimbriae. Mula-mula ovum ditranspor dengan sendirinya melalui ostium dan kemudian beberapa milimeter dari ampula gerakannya dipengaruhi oleh silia.

Mekanisme fisiologik penangkapan sel telur yang baru diovulasikan oleh oviduk, bergantung pada beberapa faktor: 1. Struktur yang khas fimbriae dari infundibulum dan hubungannya dengan permukaan ovarium pada saat ovulasi; 2. Pola pembebasan cumulus oophorus yang terdapat pada sel telur pada waktu ovulasi; 3. Biofisik yang terkandung dalam cairan folikuler yang mempengaruhi cumulus oophorus dan; koordinasi kontraksi dari fimbriae dan ligamen utero ovarica (Partodihardjo,1992).

Pada waktu ovulasi, fimbriae penuh dengan darah sehingga mendekatkan pada permukaan ovarium oleh aktivitas otot dari mesotubarium. Fimbriae dan infundibulum terdiri dari struktur erektil yang kaya akan pembuluh darah dan jaringan otot. Selama estrus aliran darah ke fimbriae meningkat, sehingga menyebabkan tepi atau ujung dari fimbriae menjadi oedematus. Aktivitas kontraktil dari fimbriae, oviduk dan ligamen sebagian dikordinasi oleh mekanisme hormonal dimana didalamnya terlibat perbandingan estrogen dan progesteron.

### 2.1.3.2. Transpor Gamet

Sel Spermatozoa dan sel telur mammalia mengalami beberapa perubahan maturasi sebagai persiapan untuk fertilisasi. Sel spermatozoa dan sel telur mempunyai selang waktu hidup (fertil life) yang relatif pendek (20-48 jam), terjadinya fertilisasi bergantung terutama pada transpor dari gamet di dalam saluran reproduksi betina. Transpor gamet di dalam saluran reproduksi betina merupakan kerja dari kontraksi saluran tersebut yang diatur oleh sistem saraf pusat, refleks dan aktivitas hormonal. Substansi farmakologik aktif dalam semen merangsang dan mengendalikan kontraksi saluran reproduksi betina. Silia dari oviduk dan sekresinya, serviks, uterotubal junction dan ampulary isthmus junction memegang peranan yang belum jelas (Salisbury dkk., 1985).

### 2.1.3.3. Transpor Spermatozoa

Setiap spesies hewan berbeda tempat deposit semen di dalam saluran reproduksi betina pada waktu kopulasi. Pada sapi dan domba, karena volume semen yang kecil maka didepositkan di ujung kranial dari vagina dan sebagian di serviks. Pada kuda dan babi yang besar volumenya, didepositkan melalui kanalis servikalis yang relakasi ke dalam uterus (Salisbury dkk., 1985).

Sel spermatozoa dalam transportnya terbilang unik, karena ditranspor melalui beberapa cairan yang berbeda fisiologik dan biokimianya misalnya, cairan testis, cairan epididimis, seminal plasma, cairan vagina, mukus serviks, cairan uterus, cairan oviduk dan cairan peritoneal (Hafez, 2000).



Faktor fisiokemikal dan imunologik dalam vagina dan serviks pada waktu inseminasi memegang peranan penting dalam daya kehidupan spermatozoa dan transpor ke uterus dan oviduk. Sekresi vagina menyebabkan spermatozoa tidak bergerak selama 1-2 jam setelah inseminasi. Plasma seminal memainkan peranan penting dalam transpor dan fisiologik spermatozoa (Partodihardjo, 1992).

Dikenal tiga tahapan dalam transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina yaitu transpor sperma secara cepat, kolonisasi dan lambat. Transpor cepat dilakukan segera setelah inseminasi, sel spermatozoa akan menembus jonjot-jonjot lendir serviks yang kemudian secara cepat ditranspor melalui kanalis servikalis. Fase ini berlangsung 2 - 10 menit dan dibantu oleh motilitas spermatozoa, demikian juga peningkatan aktivitas kontraksi dari myometrium dan mesosalpinx selama koitus. Beberapa spermatozoa segera mencapai ostium serviks 1,5-3 menit setelah inseminasi. Jadi beberapa spermatozoa dapat mencapai tempat pembuahan secara cepat. Diketahui bahwa pembuahan terjadi hanya bila sejumlah tertentu spermatozoa sampai pada tempat pembuahan (Partodihardjo, 1992).

Transpor spermatozoa juga dilakukan secara berkoloni. Sejumlah kumpulan spermatozoa terjebak dalam lipatan mukosa yang kompleks dari kriptas serviks. Proses ini didorong oleh kenyataan bahwa jonjot dari lendir serviks menolong spermatozoa langsung ke kriptas serviks dimana reserve tersebut dibentuk. Walaupun beberapa sel leukosit diproduksi pada serviks tetapi masih lebih sedikit daripada yang terdapat pada vagina dan uterus. Pelepasan dari sel spermatozoa yang terjadi secara berkoloni ini penting bagi fertilitas. Timbunan sel

sermatzoa paling banyak terdapat pada oviduk. Spermatozoa menningalkan serviks melalui transpor aktif (motilitas) dan transpor pasif melalui kontraksi serviks dan uterus (Partodihardjo, 1992).

Pada spesies hewan dimana semen diejakulasikan pada kornua uteri, timbunan spermatozoa terjadi di utero tubal junction, seperti misalnya pada babi, atau pada kelenjar uterus seperti pada anjing. Pada beberapa spesies hewan transportasi spermatozoa dipengaruhi oleh prostaglandin yang terdapat dalam semen (Salisbury dkk., 1985).

Transpor spermatozoa secara pelan terjadi setelah timbunan spermatozoa pada reservoir telah cukup. transpor ini berjalan secara pelan bergantung pada motilitas spermatozoa dan aktivitas kontraksi myometrium dan mesosalphinx.

#### **2.1.3.4. Transpor Spermatozoa pada Serviks**

Mukosa serviks penuh dengan alur-alur dan celah-celah kript) yang mempunyai beberapa fungsi: a) Menerima spermatozoa yang menembus untuk fertilisasi dan menghambat migrasi pada suatu fase dari siklus. b) Merupakan tempat reservoir spermatozoa. c) Melindungi spermatozoa dari lingkungan vagina yang tidak cocok dan dari fagositosis leukosit. d) Memberikan energi yang diperlukan spermatozoa. e) Sebagai saringan spermatozoa yang cacat atau tidak motil. f) Kemungkinan berperan dalam kapsitasi spermatozoa (Salisbury dkk., 1985).

Lendir serviks yang berkumpul pada vagina, mengandung cairan yang berasal dari endometrium, oviduk, folikel dan peritoneal. Selain itu juga

mengandung lekosit, reruntuhan sel-sel dari uterus dan serviks serta epitel vagina. Lendir serviks pada saat ovulasi, terbentuk dari makromolekul yang merupakan ikatan dari unit yang terdiri dari 100 - 1000 mikromolekul. Mikromolekul tersebut berangka oligosakarida dan ikatan asam sialat. Molekul organik dengan berat rendah termasuk gula (glukose, maltose dan mannose) serta asam amino. Lendir serviks juga mengandung protein, mikro elemen dan enzim. Keseimbangan fisiologik dari steroid yang berasal dari ovarium penting dalam inisiasi dan mempertahankan populasi spermatozoa dalam serviks setelah inseminasi, terutama setelah sinkronisasi birahi. Ketidakseimbangan hormon progesteron dan estrogen dapat mempengaruhi transport spermatozoa dengan melalui cara mempengaruhi kuantitas dan kualitas terciptanya dari sekresi lendir serviks atau motilitas dari saluran reproduksi (Hafez,2000).

#### **2.1.3.5. Transpor Sperma dalam Uterus**

Aktivitas kontraksi dari vagina dan myometrium memegang peranan utama dalam transpor spermatozoa melalui uterus. Sejumlah besar spermatozoa menyerbu kedalam kelenjar uterus. Hal ini merangsang endometrium mengeluarkan lekosit yang akan memfagosit sejumlah spermatozoa hidup maupun yang mati (Partodihardjo, 1992).

#### **2.1.3.6. Transpor Sperma dalam Oviduk**

Oviduk mempunyai fungsi yang unik dalam transpor spermatozoa dan sel telur, dimana kedua fungsi transpor yang berlawanan tersebut dapat dijalankan

secara simultan. Pola dan kecepatan transpor spermatozoa di dalam oviduk dikontrol oleh beberapa mekanisme seperti peristaltik dan antiperistaltik dari otot oviduk, kontraksi yang kompleks dari lipatan mukosa oviduk dan mesosalphinx, cairan yang ada dan aliran balik yang ditimbulkan oleh aliran silia. Pada oviduk burung dara, dan kura-kura, terdapat dua sistem kinosilia yang satu mengarah pada ovarium dan yang lainnya mengarah pada kloaka.

Pola transpor spermatozoa melalui oviduk diselenggarakan oleh peristaltik dan antiperistaltik otot dan kontraksi dari lipatan mukosa serta mesosalphinx. Frekuensi dan amplitudo kontraksi dari otot oviduk sirkular dan longitudinal mesosalphinx dan mesotubarium dikontrol oleh hormon-hormon dari ovarium, adrenergik dan nonadrenergik, serta beberapa komponen plasma seminal seperti prostaglandin. Pola dan amplitudo kontraksi bervariasi pada tempat (segmen) yang berbeda dari oviduk. Pada Isthmus, kontraksi peristaltik dan antiperistaltik bersifat segmental dan hampir menerus (bersinambungan), sedangkan pada ampulla gelombang kontraksi peristaltik berlangsung segmental dan lebih lemah. Spermatozoa ditranspor ke ampulla dengan cara perubahan relaksasi dari ampullary-Isthmus junction atau oleh gerakannya sendiri, sampai sekarang belum diketahui (Partodihardjo, 1992).

#### **2.1.3.7. Kontrol Endokrin terhadap Transpor Spermatozoa**

Hormon-hormon yang berasal dari ovarium diketahui memengaruhi transpor spermatozoa pada saluran reproduksi betina. Hormon yang berasal dari ovarium mempengaruhi a) struktur dan ultrastruktur serta aktivitas sekresi dari

epitel serviks, uterus dan oviduk. b) aktivitas kontraksi dari otot uterotusbal. c) Kualitas dan kuantitas karakteristik dari sekresi lendir servik dan sekresi uterus serta oviduk. Perubahan-perubahan juga terjadi pada kandungan protein, aktivitas enzim, komposisi elektrolit, tegangan permukaan dan konduktivitas dari cairan tersebut. Peningkatan dari sejumlah estrogen endogen selama fase preovulasi atau pemberian sintetik estrogen akan menyebabkan perubahan pada lendir servik dimana akan lebih encer. Transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina juga dikontrol oleh hormon oksitosin dan sistem syaraf simpatik serta para simpatik. Epinephrin, acetylcholin, histamin dan beberapa vaso konstriktor berpengaruh dalam kontraksi uterus, tetapi pengaruhnya ringan (Partodihardjo, 1992)

#### **2.1.3.8. Hiperaktivasi dari Motilitas Spermatozoa**

Kecepatan spermatozoa dan pola motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh tempat /segmen dari saluran reproduksi betina dimana spermatozoa tersebut ditranspor. Percepatan spermatozoa terjadi terutama pada oviduk mendekati waktu ovulasi dan mungkin berkaitan dengan kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom. Secara normal spermatozoa ditahan pada isthmus dari oviduk. Karakteristik fisik dari isthmus adalah sempitnya lumen, viskositas lendir isthmus, temperatur lokal yang lebih rendah, gerak dari silia prouterin dan kontraksi otot oviduk. Interaksi fisiologik antara spermatozoa dan lingkungan isthmus termasuk mempengaruhi motilitas spermatozoa. Keaktifan berenang spermatozoa juga dapat dipengaruhi dengan mengencerkan media yang terdapat

pada isthmus dengan cara memberikan media buatan atau cairan ampula. Bila pyruvat terdapat dalam media tersebut, hiperaktivitas flagela dirangsang, tidak demikian bila hanya glukosa saja yang terdapat pada media tersebut. Ion  $K^+$  dan pyruvat mempunyai kebalikan terhadap motilitas spermatozoa. Bila konsentrasi ion  $K^+$  ditingkatkan, maka akan menghambat sedangkan bila piruvat meningkat, maka akan merangsang motilitasnya. Hal ini penting bagi penyiapan media untuk fertilisasi invitro (Hafez, 2000).

Keasaman (pH) cairan pada saluran reproduksi betina berbeda-beda. pH dari vagina umumnya adalah asam yaitu sekitar 4.0; lendir serviks 8.4; uterus 7.8; cairan ovikuk 7.1-7.3 pada fase folikuler dan 7.5-7.8 pada fase luteal.

#### 2.1.4. Kebuntingan

Periode kebuntingan dimulai dengan pembuahan dan berakhir dengan dilahirkannya anak yang hidup. Pertumbuhan dan perkembangan individu baru selama kebuntingan merupakan hasil perbanyakan, pertumbuhan, perubahan susunan serta fungsi sel. Peristiwa tadi mempengaruhi perubahan-perubahan tertentu, beberapa diantaranya merupakan ciri dari tahap perkembangannya (Toelihere, 1985).

Perkembangan anak dalam kandungan berlangsung terus menerus, namun kebuntingan dinyatakan terdiri dari tiga tahap yaitu : periode ovum, periode embrio dan periode fetus.

Periode ovum adalah periode yang dimulai dari fertilisasi sampai implantasi, periode embrio dimulai dari implantasi sampai saat dimulainya

pembentukan alat-alat tubuh bagian dalam. Kemudian disambung dengan periode fetus yaitu periode yang dimulai dari terbentuknya alat-alat bagian dalam, bagian ekstrimitas sampai dilahirkan (Menurut Robert, 1956). Sedangkan menurut Hafez (1974) mengatakan bahwa periode ovum dimulai dari ovum diovulasikan sampai terjadi fertilisasi, Periode embrio dimulai sejak terjadi fertilisasi, implantasi sampai terbentuknya alat-tubuh bagian dalam dan selanjutnya disebut periode fetus.

#### **2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta**

Setelah terjadi implantasi embrio pada bagian endometrium uterus, selanjutnya terjadi pertautan trophoblast kedalam endometrium. Nutrisi awal untuk embrio adalah berasal dari uterine milk (histotroph/ susu uterus). Seiring dengan perkembangan embrio maka terbentuk jalinan tenunan tubuh embrio dengan induknya yang berfungsi untuk penyaluran nutrisi dari induk ke fetus dan membuang zat-zat yang dikeluarkan oleh anak menuju induk. Jalinan ini disebut plasenta. Plasenta terbagi menjadi tiga bagian yaitu bagian dalam yang menyelubungi fetus disebut amnion, bagian yang terdapat diantara chorion dan amnion adalah alantois. Selaput yang menyelubungi fetus di bagian terluar disebut chorion (Toelihere, 1985).

Chorion adalah bagian lapis paling luar dari trophoblast. Terbentuknya jaringan plasenta karena penjalaran trophoblast amat tergantung dari spesies hewan. Pada sapi, kambing dan domba lapis sel paling luar dari trophoblast yang bersentuhan dengan epitel karunkula segera melarutkan sel-sel epitel vili



trophoblast, sedang pada permukaan endometrium yang tidak didapati karunkula tidak terjadi pembentukan plasenta. Plasenta yang terbentuk pada *sapi, kambing dan domba* disebut Cotyledonaria. Pada *babi dan kuda*, endometriurnya tidak mempunyai karunkula, maka plasenta yang terbentuk dari hubungan superficial dari epitel endometrium dengan epitel chorion. Bentuk plasenta ini disebut Difusa. Dua tipe lain dari plasenta adalah Zonaria terdapat pada *anjing* dan Diskoidalis terdapat pada *kera*, manusia, tikus, marmot, kelincifez, (Hafez, 2000).

Berdasarkan struktur histologisnya, tipe plasenta dapat dibedakan antar spesies berdasarkan jumlah lapisan tenunan sel yang memisahkan aliran darah induk dan aliran darah anak. Epitheliochoriale adalah plasenta difusa dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh dua lapis epitel, dua lapis endotel dan dua lapis tenunan pengikat dari induk dan dari anak. Syndesmochoriale pada plasenta cotyledonaria, yang mempunyai satu lapis tenunan epitel lebih tipis dari epiteliochoriale. Endotheliochoriale pada plasenta zonaria dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel dari anak yaitu endotel, tenunan pengikat dan tenunan epitel trophoblast, sedang dari induk hanya satu tenunan sel endotel saja. Hemochoriale adalah plasenta diskoidale dimana darah anak dan induk dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel yang semuanya berasal dari trophoblast. Hemoendotelial pada plasenta diskoidale (kelinci) yaitu darah induk dan anak hanya dipisahkan oleh satu lapis tenunan sel endotel dari pembuluh darah anak (Hafez, 2000).

Lama kebuntingan dihitung sejak fertilisasi sampai lahir, oleh karena fertilisasi tidak dapat diketahui dengan tepat, biasanya kebuntingan dimulai sejak

perkawinan yang terakhir sampai terjadi kelahiran. Periode kebuntingan dihitung mulai saat fertilisasi sampai kelahiran. Berdasarkan hal ini maka perhitungan yang dipakai peternak tidak tepat bisa lebih panjang beberapa jam samapi beberapa hari. Terjadinya fertilisasi pada setiap spesies tidak sama, misalnya pada sapi terjadi 11 sampai 15 jam setelah inseminasi. Lama kebuntingan dipengaruhi oleh faktor-faktor maternal, genetik, fetus dan lingkungan (Patodihardjo, 1992).

Pembesaran volume uterus pada permulaan kebuntingan sebagian besar disebabkan oleh penambahan cairan amnion dan alantois. Pada pertengahan kebuntingan penambahan volume cairan sama dengan volume fetus. Sedang pada kebuntingan akhir, volume uterus sebagian besar dipenuhi oleh fetus.

#### **2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan**

##### ***Vulva dan Vagina***

Setelah fertilisasi, vulva dan vagina belum mengalami perubahan, pada saat umur kebuntingan 6 – 7 bulan terlihat edema vulva terutama pada sapi dara dan pada sapi yang telah beranak edema vulva baru terlihat pada umur kebuntingan 8,5 – 9 bulan. Perubahan vagina terlihat adanya penambahan vaskularisasi mukosa vagina (Partodihardjo, 1992).

##### ***Servik***

Perubahan pada servik terjadi setelah fertilisasi yaitu kripta-kripta servik menghasilkan lendir kental, semakin tua umur kebuntingan semakin kental lendir

yang dihasilkan. Perubahan lain adalah terjadi kontraksi tonus dari muskulatur servik menjelang kelahiran. Pada sapi, 2 – 5 hari sebelum partus otot servik merileks dan servik mulai terbuka (Partodihardjo, 1992).

### *Uterus*

Perubahan yang terjadi pada uterus setelah fertilisasi adalah peningkatan vaskularisasi pada endometrium, kelenjar-kelenjarnya tumbuh lebih panjang dan berkelok serta akan menghasilkan susu uterus (*histotroph*), muskulatur uterus lebih tenang karena pengaruh progesteron. Setelah implantasi penyaluran nutrisi dari induk ke anak serta zat buangan dari anak ke induk lebih lancar karena adanya hubungan yang lebih erat dari tropoblas dengan pembuluh darah pada endometrium. Karena perluasan tropoblas, maka uterus juga mengalami pertumbuhan muskulatur dan jaringan kolagen (Partodihardjo, 1992).

Pada sapi, kuda dan kerbau, pada umur kebuntingan 90 hari kornua bunting mulai turun. Kebuntingan 4 bulan apex kornua yang mengandung fetus telah sampai ke dasar rongga abdomen. Kebuntingan 5 bulan, dasar rongga abdomen seluruhnya dipenuhi uterus yang bunting. Dengan bertambahnya umur kebuntingan maka jarak dinding uterus dengan rektum menjadi bertambah dekat dan pada kebuntingan 9 bulan dinding uterus dan rektum saling bersentuhan. Setelah pertukaran nutrisi melalui pembuluh darah berlangsung baik, pertumbuhan embrio menjadi lebih cepat. Tidak ada spesies yang mempunyai struktur pembuluh darah dalam plasentanya yang bersifat langsung dari anak ke induk, selalu ada lapisan tenunan yang menyekat aliran darah anak dan aliran darah

induk, fungsi penyekat ini untuk menyeleksi zat-zat yang mengalir dari induk ke anak. Untuk melindungi sekat dari kerusakan karena terjadinya kenaikan tekanan darah induk atau anak, maka dalam plasenta terdapat sistem *shunt* yaitu hubungan tembus dari kapiler ke kapiler (Hafez. 2000).

### Ovarium

Setelah ovulasi terbentuklah kawah bekas folikel yang pecah disebut *korpus haemorrhagicum* atau *korpus rubrum*. Selanjutnya terjadi proses luteinisasi dari sel granulosa dan sel teka membentuk sel-sel baru disebut sel lutein, sel lutein berproliferasi dan akhirnya memenuhi seluruh kawah dan membentuk jendolan diatas permukaan ovarium disebut *korpus luteum*.

Pada sapi dan domba, korpus luteum tumbuh pada hari ke-5 – 6 setelah ovulasi. Bila tidak ada kebuntingan, korpus luteum akan diregresikan oleh prostaglandin F2 alfa yang dihasilkan oleh endometrium uterus. Selanjutnya korpus luteum yang tidak berfungsi akan berdegenasi dan berubah menjadi jaringan ikat berwarna putih mengkilap disebut *korpus albican*. Bila terjadi kebuntingan maka korpus luteum tetap berfungsi dan disebut korpus luteum graviditatum dan akan berfungsi terus hingga akhir kebuntingan, terjadi pada sapi, domba, kambing, babi dan kerbau (Partodihardjo, 1992).

Pada kuda, korpus luteum awal hanya berfungsi sampai bulan ke-5. Pada hari ke-40 ovarium kuda membentuk 10 – 15 folikel yang beberapa diantaranya ovulasi. Kuda tidak mengalami birahi karena CL yang pertama masih berfungsi menghasilkan progesteron. Dari folikel ini muncul CL baru yang jumlah cukup

banyak satu ovarium bisa mengandung 3 – 5 CL baru. Korpus luteum baru ini disebut CL asesoris. Pada bulan ke-5, CL lama maupun CL asesoris akan regresidan pada bulan ke-7 CL tinggal sisa-sisanya, progesteron untuk merawat kebuntingan seluruhnya dihasilkan oleh plasenta. Pada akhir masa kebuntingan aktivitas ovarium dalam membentuk folikel meningkat sehingga kadar estrogen yang dihasilkannya juga meningkat, hal ini menyebabkan kuda yang hendak melahirkan menjadi birahi, tetapi secara klinis tidak terlalu jelas karena diimbangi dengan adanya progesteron dalam peredaran darah (Hafez, 2000).

#### **2.1.4.3. Peranan Hormon dalam Proses Kebuntingan**

Kelenjar endokrin yang terlibat dalam fase kebuntingan adalah korpus luteum, folikel, plasenta, hipotalamus, dan hipofisa. Kelenjar endokrin pendukung adalah tyroid dan adrenal. Hipotalamus dan hipofisa merupakan kelenjar pengatur sedang yang memegang peranan utama adalah korpus luteum, penghasil progesterone, plasenta, penghasil progesterone dan estrogen dan folikel sebagai penghasil estrogen ( hanya jelas pada kuda, pada spesies lain yang bunting tidak ada folikel tumbuh) (Partodihardjo, 1992).

Korpus luteum memegang peranan penting untuk pertumbuhan makhluk hidup, mulai implantasi sampai pertengahan kebuntingan. Hampir semua ternak bunting, plasentanya memproduksi estrogen. Hal ini dapat dianalisa dari urin. Kuda, urinenya mengandung estron, estradiol 17 alfa dan beta. Kambing dan domba, didapatkan estradiol 17 alfa. Pada babi diemukan estron dan pada sapi, estron dan estradiol 17 alfa (Salisbury dkk., 1985).

Pada kuda, plasentanya menghasilkan steroid dan gonadotropin (PMSG). PMSG berperan menghasilkan folikel, setelah ovulasi akan membentuk korpus luteum asesoris yang akan menghasilkan progesterone untuk memelihara kebuntingan. Pada kebuntingan tua, CL akan regresi, kadar progesterone akan menurun terutama menjelang kelahiran sedang kadar estrogen akan meningkat sesuai dengan penambahan plasenta. Pola kenaikan kadar estrogen dan berat plasenta terjadi pada semua ternak tetapi tidak berlaku bagi progesteron. Pada wanita, progesterone tetap tinggi sampai kelahiran, sedang pada ternak menurun menjelang kelahiran (Salisbury dkk., 1985).

#### **2.1.5. Diagnosis Kebuntingan**

Tanda umum terjadinya kebuntingan pada ternak adalah tidak kembalinya birahi setelah dikawinkan (*Non return*) tetapi hal ini ada kemungkinan tidak bunting tetapi adanya korpus luteum persisten atau gangguan hormonal lainnya.

Karena keinginan manusia untuk mengetahui kebuntingan hewannya secara dini setelah dikawinkan maka ada beberapa teknik untuk mengetahui kebuntingan pada ternak.

1. Palpasi Rektal
2. Penggunaan Ultrasonographi (USG)
3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron
4. Penggunaan Radiografi
5. Pemeriksaan Antigen Embrio

### 2.1.5.1. Palpasi Rektal

Pemeriksaan kebuntingan yang paling umum dilakukan adalah palpasi ovarium dan uterus dengan tangan yang dimasukkan lewat rektum. Tujuan palpasi rektal adalah mendeteksi adanya pembesaran uterus yang bunting, memeriksa adanya fetus, arteri uterina media serta kotiledon yang membesar. Palpasi ovarium ditujukan untuk mengetahui adanya CL.

Pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal dapat dilakukan pada umur kebuntingan 35 hari tetapi diagnosis semakin akurat setelah 45 – 60 hari kebuntingan. Palpasi rektal ini dapat dilakukan pada sapi, kerbau dan kuda, sedang pada domba dan kambing untuk diagnosis kebuntingan dapat dengan cara palpasi abdominal.

### 2.1.5.2. Penggunaan USG

Fraser *et al.*(1968) telah menggunakan alat periksa (*ultrasonid*) yang ditempelkan pada abdomen untuk mendeteksi fetus mulai kebuntingan 9 minggu. Prinsip *ultrasound* adalah suara ultra dengan frekuensi sangat tinggi dan panjang gelombang sangat pendek yang dipantulkan dari benda yang bergerak ke sumber transmisi dengan frekuensi yang sedikit berubah. Ini memungkinkan untuk mendeteksi aspek pulsus fetus (jantung atau tali pusar), arteri uterus. Sinyal ultrasonik yang dipantulkan dari benda yang bergerak itu biasanya diperkeras dan dianalisis dengan pendengaran, dapat diubah menjadi gambaran visual pada layar monitor. Angka keberhasilan alat ini dalam mendiagnosa kebuntingan sampai 93%.

### 2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron

Pemeriksaan dengan mengetahui konsentrasi hormon progesteron bisa menggunakan sampel dari air susu atau plasma darah. Konsentrasi progesteron dalam air susu biasanya sejajar dengan yang ada dalam darah. Pemeriksaan dengan sampel air susu hanya cocok untuk sapi perah sedang untuk sapi dara dan potong kurang sesuai. Pemeriksaan progesteron dalam air susu dapat dilakukan pada hari ke-21 – 24 setelah inseminasi. Uji negatif ternyata 85 – 100% tepat pada hari ke 24 sedang uji positif hanya 80%.

Pengukuran konsentrasi progesteron dalam plasma darah perifer dilakukan dalam upaya mendeteksi perbedaan dalam fungsi ovarium antara ternak bunting dan tidak bunting. Pemeriksaan dapat dilakukan pada hari ke 17 – 18 kebuntingan dengan angka keberhasilan 85%. Pemeriksaan konsentrasi progesteron baik dari air susu maupun plasma darah dapat dilakukan dengan teknik *Radioimmuno Assay (RIA)*.

### 2.1.5.4. Penggunaan Radiografi

Radiografi fetus didasarkan atas deteksi proses penulangan dengan memakai sinar X setelah hari ke-50 masa perkembangan fetus, angka keberhasilannya 90 – 95% pada tiga bulan setelah kawin. Tidak ada pengaruh yang merusak dari teknik ini pada induk atau anak domba, dapat digunakan untuk mendeteksi anak kembar dua atau tiga tetapi alat ini jarang digunakan karena mahal.



### 2.1.5.5. Pemeriksaan Antigen Embrio

Pendekatan lain yang dapat memenuhi syarat pendugaan untuk tes kebuntingan pada sapi adalah dengan mendeteksi adanya antigen khusus yang dihasilkan oleh embrio. Antigen khusus ini mungkin dihasilkan oleh lapisan sel tropoblas dan dapat dideteksi keberadaannya dalam darah induk.

## 2.2. *Pregnancy Specific Protein B (PSPB)*

*Pregnancy Specific Protein B (PSPB)* merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah sapi bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Keberadaan PSPB ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.*, 2000; Howard, 1998; Transom, 2001). Berat molekul *Pregnancy Specific Protein B (PSPB)* pada sapi berkisar 65-67 kD.

*Pregnancy Specific Protein B* dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000). PSPB 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 keberadaannya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

Antisera terhadap PSPB 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)).

## **2.3. Produksi Antibodi Poliklonal**

### **2.3.1. Antibodi Poliklonal**

Produksi serum hiperimun (anti serum) yang mengandung antibodi dapat dilakukan melalui imunisasi terhadap hewan dengan suatu imonogen spesifik. Antibodi didapat dengan jalan mengumpulkan sampel darah dari hewan yang diimunisasi. Antibodi yang didapat dari hiperimunisasi dikenal sebagai antibodi poliklonal (Karnen, 2001; Smith, 1995).

Smith (1995) berpendapat bahwa faktor-faktor yang terlibat dalam mengoptimalkan respon imun adalah sifat alam imunogen, pelarut, hewan, rute injeksi dan protokol dosis. Polipeptida besar dan protein dengan berat molekul lebih besar dari 5000 Dalton (D) atau 5 Kilo Dalton (kDa) dapat merangsang respon imun yang kuat. Chard (1982) menyebutkan bahwa preparat hormon dengan berat molekul yang besar mempunyai sifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antigen untuk dapat menginduksi timbulnya antibodi spesifik terhadap antigen tersebut.

Pelarut *Freund* lengkap masih dianggap sebagai salah satu dari pelarut paling kuat yang dikenal. Pelarut *Freund* terdiri atas campuran minyak mineral dan pengelmusi, baik dengan micobakteria (pelarut *Freund* lengkap) atau tanpa

micobakteria (pelarut *Freund* tidak lengkap). Pelarut *Freund* lengkap merangsang respon antibodi yang kuat untuk waktu yang lama dengan jalan membebaskan tetes-tetes emulsi secara perlahan dan merangsang fungsi makrofag (Smith, 1995).

Menurut Harlow and Lane (1988) pemilihan pelarut sangat mempengaruhi rute injeksi. Bila menggunakan pelarut yang diserap lambat terutama pelarut minyak seperti *Freund*, harus diusahakan penderitaan hewan dibuat minimum. Dosis imunogen yang dianjurkan untuk kambing atau hewan coba adalah 50-1000 µg per imunisasi. Kerr and Thorpe (1994) menyebutkan dosis yang lebih spesifik untuk kelinci, yaitu 50-250 µg per imunisasi.

Keberadaan antibodi terhadap *Early Pregnancy Factor* (EPF) diidentifikasi dengan uji ELISA. Prinsip ELISA didasarkan pada dua pengamatan yaitu pertama, antibodi dan beberapa antigen dapat menempel pada piringan plastik polistirin dan kemampuan imunologisnya tetap terjaga secara penuh. Kedua, antigen dan antibodi dapat diikatkan pada enzim dan kompleks yang terbentuk masih tetap berfungsi penuh, baik secara imunologis maupun enzimatik. Reaksi antara antigen dan antibodi pada ELISA dipengaruhi oleh kerja enzim. Enzim yang digunakan meliputi β-Galaktosidase, glucose oksidase, peroksidase dan alkalin fosfatase (Pelczar *et al.*, 1988).

### **2.3.2. Hewan Coba, Dosis Injeksi, dan Teknik Pengambilan Darah**

Pemilihan spesies hewan didasarkan pada jumlah serum yang dibutuhkan dan hewan coba yang tersedia. Pada kebanyakan penelitian menggunakan kelinci

karena daya tahan tinggi, mudah dalam pengambilan darah Lebih dari 100 ml darah dapat dikumpulkan per-minggu tanpa pengaruh yang jelek (Burgess, 1995).

Menurut Burgess (1995) dosis antigen yang dianjurkan untuk imunisasi awal antara 10-100  $\mu\text{g}$ . Dosis antigen yang lebih rendah akan menghasilkan antibodi dengan afiditas lebih tinggi daripada dosis antigen yang lebih tinggi. Jika dosis pada imunisasi I diberikan dalam *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) maka imunisasi ulang (*Booster*) diberikan dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk menghindari reaksi hipersensitivitas yang hebat pada hewan coba. Booster diberikan dengan selang waktu paling sedikit 4 minggu. Pengambilan darah dapat dilakukan satu minggu kemudian dan booster selanjutnya diberikan dengan interval 3-6 minggu tergantung kepada kekuatan respon. Menurut Tizard (1988) rute yang terbaik dalam pemberian antigen dalam CFA adalah secara subkutan atau intra dermal.

#### **2.4. Immunoassay Untuk Identifikasi Ikatan Antigen-Antibodi**

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 III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap yaitu :

1. Karakterisasi anti-PSPB hasil induksi isolat protein PSPB *Cotyledon* sapi perah bunting.
2. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah.
3. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah.
4. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal.
5. Uji validitas kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

#### **3.2. Sampel Penelitian**

Penelitian ini menggunakan 2 ekor kambing PE jantan dan 50 ekor sapi perah betina. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Laboratorium Biomol FMIPA Unibraw, Peternakan sapi perah di UPT Ternak Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur di Tuban, Kediri dan Singosari Malang.

### 3.3. Metode Penelitian

#### 3.3.1. Metode Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PSPB

##### 3.3.1.1. Pengukuran Absorbansi Protein Standar

Blanko dipipet sebanyak 200  $\mu$ l *Glycoprotein Assay Buffer*, ditambah dengan 200  $\mu$ l larutan KIO<sub>4</sub> 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600  $\mu$ l *Glycoprotein Detection Reagen* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan shaker dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm.

Protein standar, disiapkan 6 buah eppendorf untuk 6 protein standar (Lysozyme, Bovine Serum Albumin, Ovalbumin, Apo-Transferrin, Fetuin dan  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein). Selanjutnya dipipet 200  $\mu$ l masing-masing protein standar, ditambah dengan 200  $\mu$ l larutan KIO<sub>4</sub> 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600  $\mu$ l *Glycoprotein Detection Reagent* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan shaker. Selanjutnya diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm. Kandungan protein standard an kandungan karbohidrat total yang telah diketahui dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 3.1. Nilai Protein Standar an Kandungan Karbohidrat Total Berdasarkan Glikoprotein Karbohidrat *Estimation Kit 23260*

Protein	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Karbohidrat Total (%)
Blanko	0	0
Lysozyme	2,5	0
Bovine Serum Albumin	2,5	Sedikit
Ovalbumin	2,5	3,2
Apo-Transferrin	2,5	5,8
Fetuin	0,25	22,9
Fetuin	2,5	22,9
$\alpha$ 1-Acid Glycoprotein	0,25	41,4
$\alpha$ 1-Acid Glycoprotein	2,5	41,4

### 3.3.1.2. Pengukuran Kandungan Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein PSPB

Disiapkan 2 *ependorf*, 1 *ependorf* diisi 200  $\mu$ l *Glycoprotein Assay Buffer* sebagai blanko dan 1 *ependorf* diisi 10  $\mu$ l sampel isolat PSPB diencerkan sampai 200  $\mu$ l dengan pelarut *Glycoprotein Assay Buffer*. Kemudian masing-masing *ependorf* ditambahkan 200  $\mu$ l Kalium Periodat 10 mM, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya masing-masing *ependorf* ditambahkan 600  $\mu$ l *Glycoprotein Detection Reagent*, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 550 nm dan diulang 3 kali.



Kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel diperoleh dengan membandingkan larutan standar proteinnya dengan menggunakan rumus (Anonymous, 1998) :

$$\text{Glikoprotein(mg/ml)} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{C protein (mg/ml)} \times \text{pengenceran}}{\text{Absorbansi standar}}$$

$$\text{Karbohidrat(mg/ml)} = \text{Kandungan glikoprotein} \times \% \text{ total karbohidrat standar}$$

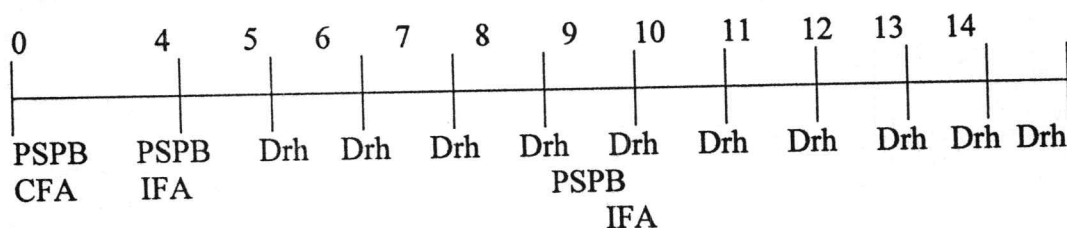
$$\text{Protein (mg/ml)} = \text{Kadar glikoprotein} - \text{Kadar karbohidrat}$$

### 3.3.2. Karakterisasi Anti-PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB

#### 4.3.2.1. Metode Imunisasi Kambing dengan Isolat protein PSPB

Sebanyak 2 ekor kambing PE jantan disuntik secara sub kutan dengan 150 µg isolat PSPB dalam *Freund's complete adjuvant*. Penyuntikan ulang pertama dilakukan 4 minggu setelah penyuntikan pertama dengan 100 µg isolat PSPB dalam *Freund's incomplete adjuvant*. Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke 1-10 setelah penyuntikan ulang pertama. Penyuntikan ulang kedua dilakukan pada minggu ke lima setelah penyuntikan ulang pertama. Darah diambil pada masing-masing kambing sebanyak 5 cc melalui *vena jugularis* untuk dianalisis titer antibodi (anti-PSPB) dengan menggunakan *indirect ELISA*.

Jadwal pelaksanaan pembuatan anti-PSPB  
minggu ke



PSPB+CFA : 150  $\mu$ g PSPB dalam *Complete Freund,s Adjuvant*

PSPB+IFA : 100  $\mu$ g PSPB dalam *Incomplete Freund,s Adjuvant*

Drh : Pengambilan darah

### 3.3.2.2. Metode Purifikasi Anti-PSPB dengan *Saturated Ammonium Sulphate* (SAS)

Jernihkan cairan serum anti-PSPB dari kontaminan-kontaminan lainnya dengan jalan sentrifugasi pada 17.000 g selama 15 menit, 4  $^{\circ}$ C. Ambil supernatan yang jernih dan biarkan di dalam es. Tambahkan pelan-pelan dengan volume yang sama amonium sulfat jenuh, biarkan pada 4  $^{\circ}$ C selama 2 jam. Pindahkan cairan tadi ke dalam tabung sentrifus dan putar pada 1000 rpm, 10 menit, 4  $^{\circ}$ C. Pelet dari endapan yang didapat dicuci 2 kali dengan 50 % amonium sulfat dingin. Pencucian dapat dilakukan dengan melarutkan pelet tadi ke dalam air dan selanjutnya diulangi presipitasi dengan 50 % amonium sulfat. Pelet dilarutkan dalam aquades dengan 1/10 volume cairan semula. Pindahkan larutan tersebut ke dalam tabung dialisis yang sudah dipersiapkan dan dialisa terhadap PBS pada 4  $^{\circ}$ C dengan 2 kali pergantian volume. Sentrifus dan pisahkan presipitat, aliquot dalam volume kecil dan disimpan pada - 20  $^{\circ}$ C.

### 3.3.2.3. Metode Pengukuran *Optical Density* (OD) Anti-PSPB dengan *Indirect ELISA*

*Microplate* 96 well dilapisi dengan isolat PSPB sebanyak 100  $\mu$ l, kemudian diinkubasi pada 4  $^{\circ}$ C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan di blok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1 %, kemudian dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan anti-PAS sebanyak 100  $\mu$ l dan diinkubasi pada suhu 37  $^{\circ}$ C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi *konjugate alkaline fosfatase* dan diinkubasi pada 37  $^{\circ}$ C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi yang terjadi pada ELISA dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

### 3.3.2.4. Pengukuran Titer Anti-PSPB dengan Menggunakan Kurva Standar Anti-PSPB

Pengukuran titer anti-PSPB dilakukan dengan mengkonversi nilai *optical density* (OD) dengan kurva standar anti-PSPB yang telah diketahui konsentrasinya, seperti pada tabel di bawah ini :

Tabel 3.2. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PSPB Standar

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi
20	1,741
10	1,690
5	1,645
2,5	1,610
1,25	1,591

### 3.3.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah

#### 3.3.3.1. Koleksi Serum Darah Sapi Perah

Darah diambil dari vena jugularis sapi perah 7, 14, 21 dan 28 hari pasca inseminasi buatan dengan menggunakan *disposable syringe* 10 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan  $45^\circ$  dan didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat ditampung pada vial dan disimpan dalam freezer dengan suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 3.3.3.2. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah

Mikrotiter strip didasarkan pada *Sandwich* ELISA dengan metode sebagai berikut : *Microplate* 96 well dilapisi dengan anti- PSPB sebanyak 100  $\mu\text{l}$ , kemudian diinkubasi pada  $4^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan di blok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1 %, kemudian dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan EPF (serum darah dari kambing

yang diduga bunting) sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi *konjugate alkaline fosfatase* dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm.

#### **3.3.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah**

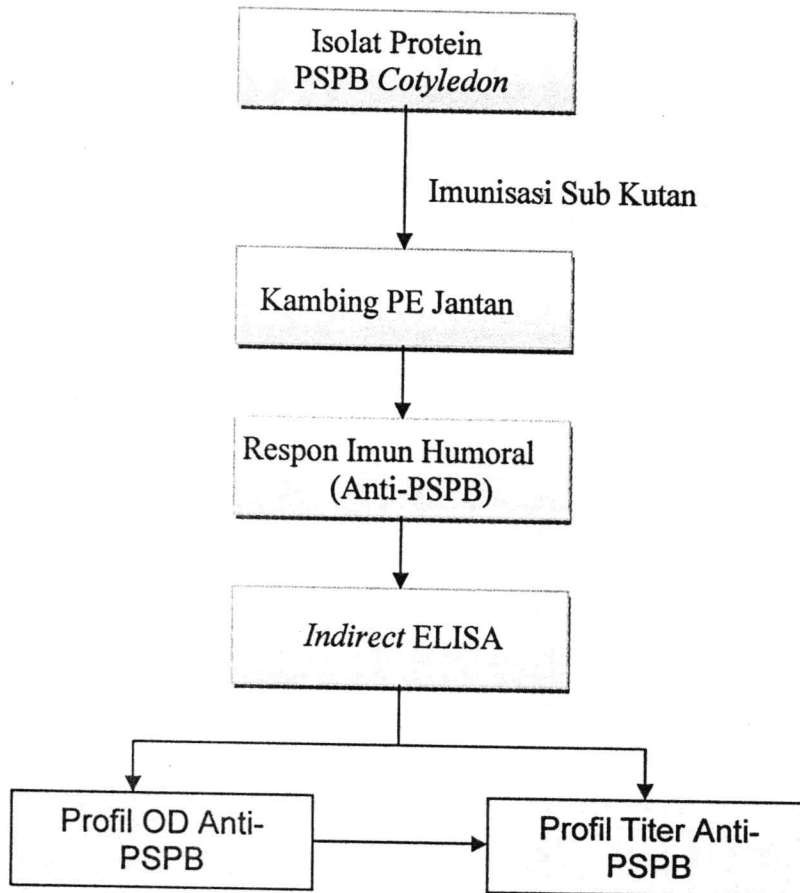
Kadar Progesteron serum darah diukur dengan *Enzyme Immunoassay* (EIA). Pada masing-masing *well* dimasukkan 25 µl larutan standar, sampel dan kontrol. Kemudian dicampur dengan 100 µl reagen *Progesterone-HRP conjugate*. Selanjutnya pada masing-masing *well* dimasukkan 50 µl reagen *rabbit anti-progesterone*. dan dikocok (*shaker*) selama 30 detik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 18-25 °C selama 90 menit, kemudian dicuci 5 kali dengan *aqua distilata*. Setelah itu dimasukkan 100 µl *stop solution* (1 N HCl) pada masing-masing *well* dan dikocok (*shaker*) selama 30 detik. Nilai absorbansi dibaca pada ELISA reader setelah 15 menit dengan absorbansi 450 nm.

#### **3.3.5. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi Rektal**

Palpasi rektal dilakukan pada umur kebuntingan 3 bulan. Pemeriksaan ini ditujukan untuk menemukan besarnya uterus bunting, fetus, letak uterus bunting dan freemitus.

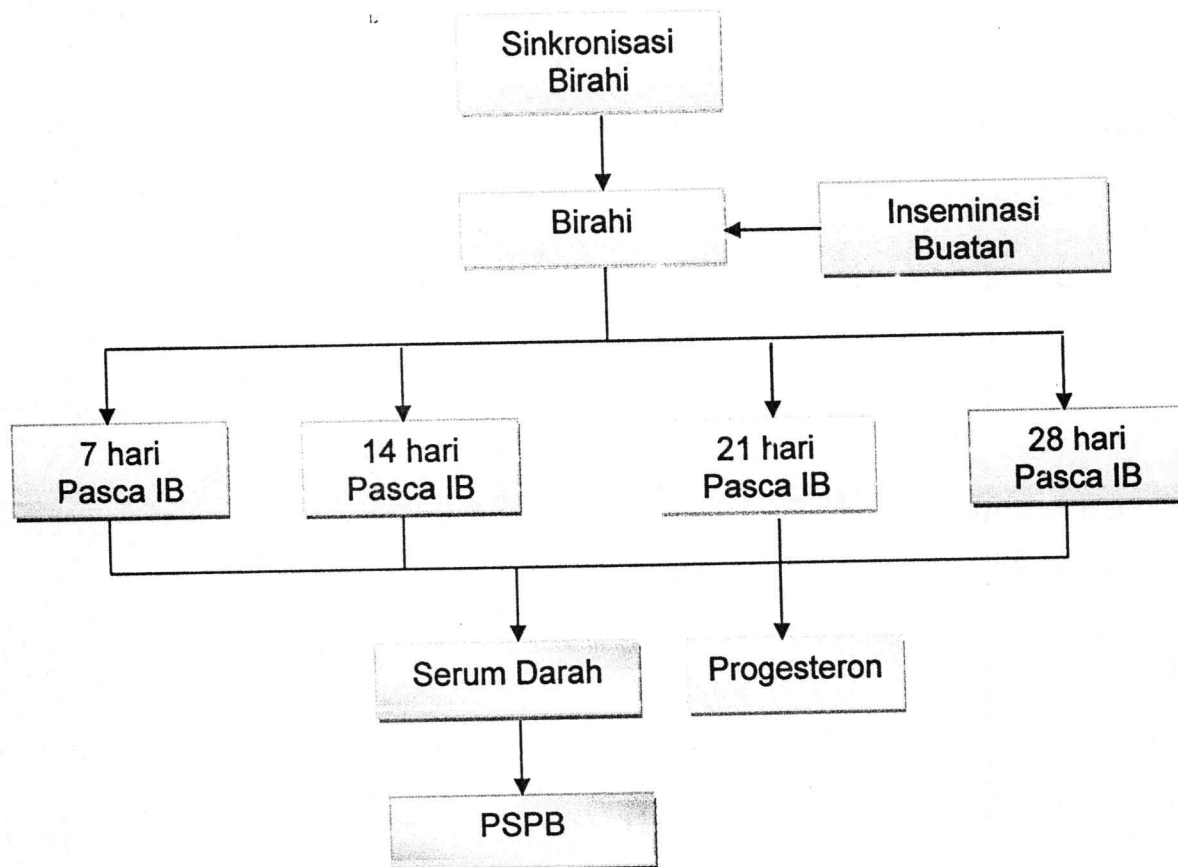
### 3.4. Bagan prosedur penelitian

#### 3.4.1. Karakterisasi Anti-PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB *Cotyledon* Sapi Perah Bunting



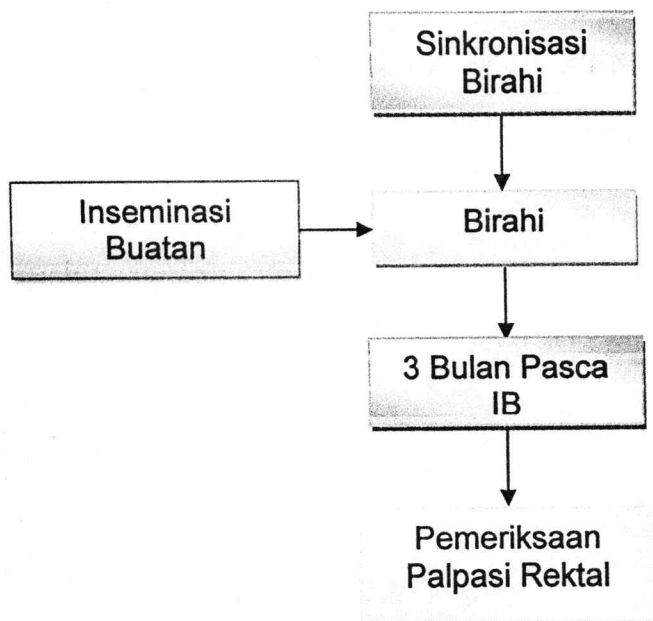
Gambar 3.1. Bagan Prosedur Karakterisasi Anti-PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB *Cotyledon* Sapi Perah Bunting

**3.4.2. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah**



Gambar 3.2. Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah dan Pengukuran Progesteron Serum Darah

### 3.4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi REktal



Gambar 4.3. Bagan Prosedur Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Palpasi Rektal

### 3.5. Analisis Data

Data penelitian yang didapat berupa kadar PSPB serum darah perah pada 7, 14, 21, 28 hari pasca inseminasi buatan dan kadar progesteron pada 21 hari pasca inseminasi buatan serta hasil pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal disajikan dalam bentuk deskriptif. Data mikrotiter strip (kadar PSPB serum darah) dan kadar progesteron pada hari ke 21 pasca inseminasi buatan diuji validitasnya (Broaddus *et al.*, 2005) dengan menghitung persentase sensitifitas, spesifisitas, predeksi negatif dan positif, akurasi dengan rumus sebagai berikut :



Tabel 3.3. Uji Validitas Kebuntingan Kambing (Sensitivitas, Spesifisitas dan Akurasi)

Palpasi Rektal	Kadar PSPB/Kadar Progesteron		Total
	positif bunting	tidak bunting	
Bunting	a	b	a + b
Tidak bunting	c	d	c + d
Total	a+c	b+d	

- a : *true positives* (hasil palpasi abdominal bunting dan kadar PSPB positif atau kadar progesteron > 1 ng/ml)
- b : *false positives* (hasil palpasi abdominal tidak bunting dan kadar PSPB positif atau kadar progesteron > 1 ng/ml)
- c : *false negatives* (hasil palpasi abdominal bunting dan kadar PSPB negatif atau kadar progesteron ≤ 1 ng/ml)
- d : *true negatives* (hasil palpasi abdominal tidak bunting dan dan kadar PSPB negatif atau kadar progesteron ≤ 1 ng/ml)

$$\text{Sensitivity} : \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Spesificity} : \frac{d}{c+d}$$

$$\text{Positive predictive value} : \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Negative Predictive Value} : \frac{d}{b+d}$$

$$\text{Accuracy} : \frac{a+d}{A+b+c+d}$$

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan hipotesis. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai dengan tahapan penelitian yaitu :

1. Karakterisasi anti-PSPB hasil induksi isolat protein PSPB *Cotyledon* Sapi Perah bunting.
2. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadara PSPB serum darah.
3. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar progesteron serum darah.
4. Diagnosis kebuntingan sapi perah dengan palpasi rektal.
5. Uji validitas kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah, mengukur kadar progesteron serum darah dan palpasi rektal.

#### 4.1. Pengukuran Kadar Glikoprotein, Karbohidrat dan Protein Isolat Protein PSPB

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein dari isolat PSPB. Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah PSPB melalui uji *Western Blot*, maka kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dilakukan dengan menggunakan *Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit 23260*. Hasil yang diperoleh

menunjukkan bahwa nilai absorbansi protein PSPB pada bagian endapan sebesar 0,178 dan bagian supernatan sebesar 0,136. Nilai absorbansi protein standar dan protein PSPB dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.1. Nilai Absorbansi Protein Standar dan Protein PSPB

Protein	Absorbansi-1	Absorbansi-2	Abs rata-rata
Apotransferin	0.145	0.184	0.164
Fetuin	0.158	0.156	0.157
Albumin	0.164	0.153	0.158
Ovalbumin	0.115	0.165	0.140
Lisosim	0.162	0.184	0.173
<b><math>\alpha</math> Acid Glikoprotein</b>	<b>0.199</b>	<b>0.185</b>	<b>0.192</b>
<b>Isolat PSPB (supernatan)</b>	<b>0.126</b>	<b>0.146</b>	<b>0.136</b>
<b>Isolat PSPB (endapan)</b>	<b>0,154</b>	<b>0,202</b>	<b>0,178</b>

Penghitungan kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein dengan menggunakan rumus :

$$\text{Glikoprotein} = \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{konsentrasi protein standar} \times \text{pengenceran}}{\text{Absorbansi standar}}$$

Sehingga kadar glikoprotein isolat PSPB adalah  $0,71 \times 0,25 \times 54 = 9,562$  mg/ml (supernatan) dan  $0,93 \times 0,25 \times 54 = 12,516$  mg/ml (endapan).

Kadar karbohidrat : kandungan glikoprotein  $\times$  % total karbohidrat standar, sehingga kadar karbohidrat isolat PSPB adalah :  $9,562 \times 0,414 = 3,959$  mg/ml (supernatan) dan  $12,516 \times 0,414 = 5,181$  mg/ml (endapan).

Kadar protein : kandungan glikoprotein – kandungan karbohidrat, sehingga kadar protein isolat PSPB adalah  $9,562 - 3,959 = 5,603$  mg/ml (supernatan) dan  $12,516 - 5,181 = 7,335$  mg/ml (endapan).

Hasil penghitungan diperoleh persentase kandungan protein isolat PSPB *cotyledon* sapi perah adalah 58,60 % dan persentase kandungan karbohidrat isolat PAS adalah 41,40 % dengan perbandingan antara protein dan karbohidrat adalah 3:2. Hasil ini sesuai dengan pendapat Robert and Peter (1993) menyatakan bahwa kandungan karbohidrat dalam molekul glikoprotein sebesar 0.02-85 %. Oleh karena hasil penelitian ini terletak pada kisaran tersebut maka PSPB yang diisolasi dari *cotyledon* kambing bunting merupakan molekul glikoprotein (Woodruff and Pangas, 2000). Oleh karena itu protein PSPB dapat digunakan sebagai antigen.

#### **4.2. Karakterisasi Anti-PSPB Hasil Induksi Isolat Protein PSPB *Cotyledon* Sapi Perah Bunting.**

##### **4.2.1. Pembuatan Antibodi Poliklonal terhadap PSPB (Anti-PSPB) dan Pengukuran *Optical Density* (OD) Anti-PSPB**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah PSPB bersifat imunogen sehingga mampu menginduksi sistem imun humoral dan terbentuk anti-PSPB. Biosintesis anti-PSPB dilakukan dengan cara imunisasi pada kambing PE jantan melalui injeksi subkutan isolat PSPB dosis 150  $\mu$ g dalam *pelarut Freund Complete* dan injeksi ulang dengan dosis 100  $\mu$ g PSPB dalam *pelarut Freund Incomplete*. Sera yang diperoleh diperiksa dengan *indirect* ELISA. Nilai *Optical Density* (OD) dapat dilihat pada lampiran 1. Sedangkan rata-rata *optical density* dari

pengambilan darah ke 1-10 setelah *booster* pertama dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.2. Rataan *Optical Density* Anti-PSPB (pengenceran 10 x) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB

Pengambilan darah	Rataan Absorbansi	Pengambilan darah	Rataan Absorbansi
B1	0,200	B6	0,254
B2	0,327	B7	0,339
B3	0,553	B8	0,587
B4	0,321	B9	0,352
B5	0,193	B10	0,210

Keterangan :

B1-10 : Minggu pertama sampai ke sepuluh setelah *booster* pertama

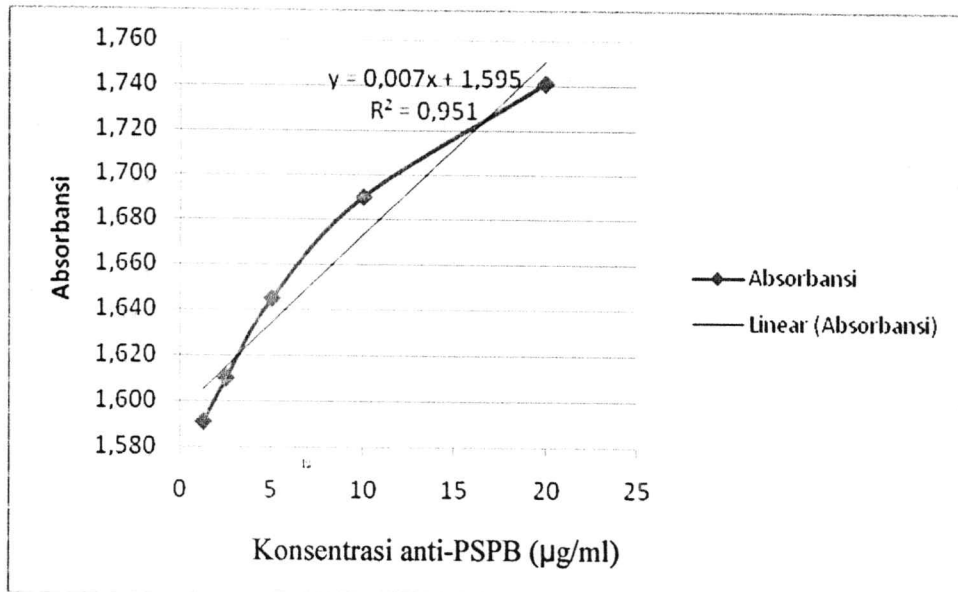
#### 4.2.2. Pengukuran Titer Anti-PSPB dengan Kurva Standar

Titer anti-PSPB diperoleh dengan mengkonversikan nilai *Optical Density* (OD) dengan kurva standar anti-PSPB seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.3. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi dari Anti-PSPB Standar

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi
20	1,741
10	1,690
5	1,645
2,5	1,610
1,25	1,591

Berdasarkan titer anti-PSPB standar dan nilai absorbansinya, maka diperoleh gambaran kurva standar anti-PSPB dan persamaan regresi liniernya sebagai berikut:



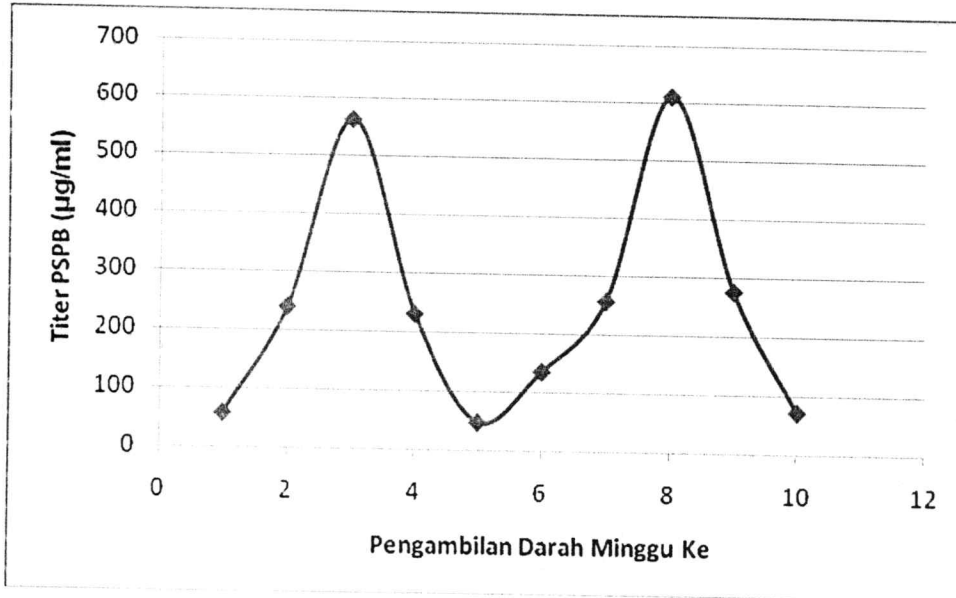
Gambar 4.1. Grafik Kurva Standar Anti-PSPB

Hasil titer anti-PSPB setelah mengkonversi nilai *optical density* dengan rumus  $Y=0,007X+1,595$  dapat dilihat lampiran 2., sedangkan rata-rata titer anti-PSPB dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.4. Rataan Titer Anti-PSPB (µg/ml) pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB

Pengambilan darah	Rataan anti-PSPB (µg/ml)	Pengambilan darah	Rataan anti-PSPB (µg/ml)
B1	57,59	B6	135,00
B2	239,29	B7	255,72
B3	562,15	B8	610,00
B4	230,00	B9	275,00
B5	47,14	B10	71,43

Gambaran titer anti-PSPB pada minggu ke 1-10 setelah *booster* pertama dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



**Gambar 4.2. Titer Anti-PSPB pada Kambing Setelah Mendapat Imunisasi Isolat PSPB**

Hasil pengukuran titer anti-PSPB dan rataannya seperti tertera pada tabel 4.4. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa titer anti-PSPB terjadi peningkatan dari minggu pertama sampai minggu ke 3 setelah *booster* pertama. Pada minggu ke 4 mulai terjadi penurunan dan mencapai angka terendah pada minggu ke 5. Pada minggu ke 5 dilakukan *booster* ke 2, setelah *booster* ini diikuti peningkatan titer kembali sampai minggu ke 8 dan mulai menurun kembali pada minggu ke 9 dan 10.

Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi. Imunisasi kambing dengan isolat protein PSPB akan

memberikan respon dengan terbentuknya anti-PSPB. Induksi anti-PSPB diduga melalui respon imun humoral. Respon imun spesifik terbagi atas respon imun humoral dan respon imun seluler. Respon imun humoral adalah respon terhadap imunogen ditandai dengan dihasilkannya antibodi terlarut.

Mekanisme terbentuknya anti-PSPB dapat dijelaskan sebagai berikut, protein PSPB masuk ke dalam tubuh akan diproses dalam *Antigen Presenting Cell* (APC) dan dipresentasikan ke reseptor pada sel Tc dan Th yang masing-masing berhubungan dengan *Major Histocompatibility Complex* kelas I dan II (MHC I dan II). APC memproduksi dan melepas sitokin (IL-1) yang merangsang sel T untuk berproliferasi dan berdeferensiasi.

Aktivasi sel T oleh protein PSPB menghasilkan sel T memori yang dapat memberikan respon sekunder terhadap antigen yang sama. Setelah dirangsang sel T memori akan memproduksi sitokin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\gamma$  dan GM-CSF). Aktivasi berulang dari sel T memori mengakibatkan deferensiasi sel Th menjadi sel T yang memproduksi sitokin yang terbatas, Th1 dan Th2. Sel Th1 memproduksi sitokin seperti IFN $\gamma$ , IL-2, TNF, sedangkan sel Th2 memproduksi sitokin seperti IL-3, IL-4, IL-5 dan IL-10. Sel Th1 lebih berperan pada reaksi seluler sedangkan sel Th2 lebih berperan pada reaksi humoral.

Sel Th yang dirangsang melepas sitokin yang mengaktifkan sel B dalam 3 tingkat yaitu aktivasi, proliferasi dan deferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi Ig. IL-1 dikenal sebagai *B cell differentiation factor* (BCDF) dan IL-5 sebagai *B cell growth factor* (BCGF). BCDF yang dilepas sel T merangsang sel B yang sudah mengikat protein PSPB dan membelah diri menjadi sel plasma yang



mempu memproduksi anti-PSPB. Sedangkan BCGF merangsang sel B yang sudah mengikat protein PSPB untuk berproliferasi.

#### 4.3. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah

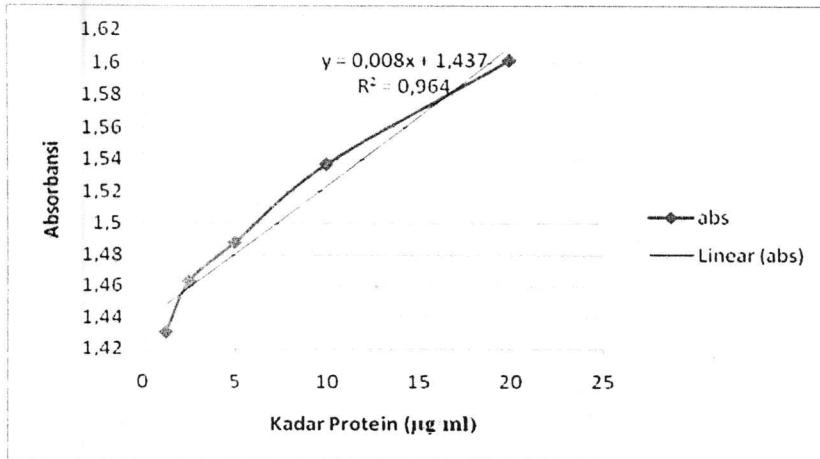
Diagnosis kebuntingan dilakukan dengan mikrotiter strip, pemeriksaan progesteron dan palpasi rektal. Prinsip kerja mikrotiter strip didasarkan pada *Sandwich ELISA* (antibodi penangkap antigen). Hasil mikrotiter strip positif bila terjadi perubahan warna kuning dari larutan yang ada didalam sumuran mikrotiter.

Perubahan warna yang terjadi mengindikasikan bahwa protein ada dalam serum darah. Perubah warna dibaca dengan spektrofotometer dengan  $\lambda$  540 nm dan hasil *optical density* nya (OD) dikonversikan dengan kurva standar protein PSPB seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.5. Konsentrasi dan Nilai Absorbansi Protein PSPB Standar

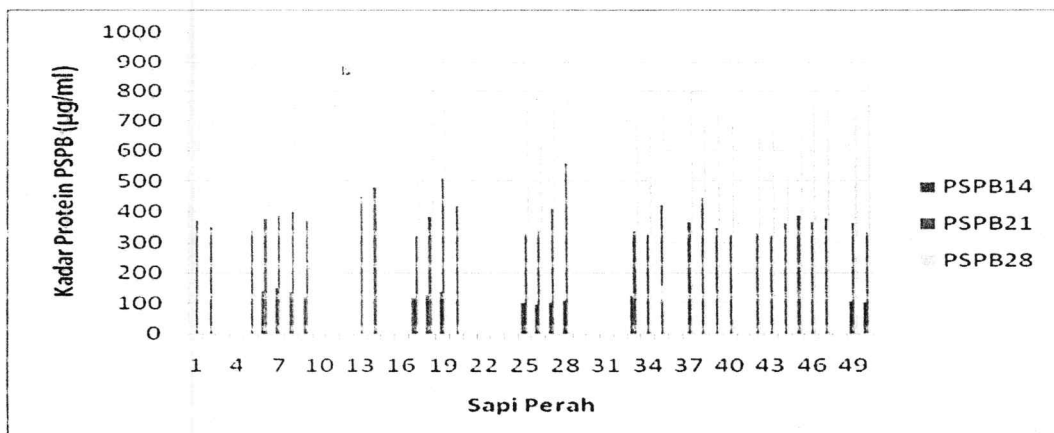
konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	Absorbansi
20	1,601
10	1,537
5	1,488
2,5	1,463
1,25	1,431

Kurva standar protein PSPB dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.3. Grafik Kurva Baku Protein PSPB

Nilai absorbansi (pengenceran 20x) dan kadar protein PSPB serum darah sapi perah pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 pasca inseminasi dapat dilihat pada lampiran 3. Sebanyak 14 ekor sapi perah (28 %) di dalam darahnya sudah ada PSPB Pada hari ke 14 pasca inseminasi buatan. Sedangkan pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan, sebanyak 32 ekor sapi perah (64 %) di dalam darahnya sudah ada PSPB. Gambaran kadar protein PSPB hasil penelitian dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Gambar 4.4. Grafik Kadar Protein PSPB Sapi Perah 14, 21 dan 28 Hari Pasca Inseminasi Buatan

Xie *et al.* (1996) mendeteksi PSPB pada induk sapi sejak umur kebuntingan tiga minggu. Konsentrasi PSPB dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Gonzales *et al.* (2000) menemukan bahwa konsentrasi PSPB sapi mencapai maksimal pada usia kebuntingan 8 minggu dan mulai menurun pada minggu ke 12-14 yang selanjutnya konstan sampai partus. Sementara itu, Vandaele *et al.* (2005) berhasil mendeteksi substansi ini pada umur kebuntingan tiga sampai empat minggu. Dilaporkan pula konsentrasi PSPB mulai menurun drastis setelah empat minggu post partum.

Deteksi kebuntingan secara dini sangat bermanfaat digunakan sebagai alat untuk mengelola ternak lebih lanjut. Ternak yang tidak bunting dipisahkan dengan yang bunting lebih awal untuk mendapatkan perlakuan sesuai dengan status fisiologisnya. Ternak yang bunting diberi makanan sesuai dengan kebutuhan perkembangan fetus yang ada dalam kandungan, sedangkan ternak yang tidak bunting segera dievaluasi status kesehatan reproduksinya. Bila ternak masih memungkinkan untuk diperbaiki status reproduksinya maka perlu penanganan khusus agar secepatnya bisa bunting kembali. Namun bila hasil evaluasi tidak memungkinkan untuk dipelihara lebih lanjut maka ternak bisa digemukkan untuk diambil dagingnya atau langsung di potong.

Deteksi kebuntingan lebih awal pada ternak khususnya ternak penghasil susu akan bermanfaat secara ekonomis karena apabila ternak tidak bunting maka akan mempengaruhi kelangsungan dan jumlah produksi susu. Jarak kelahiran yang panjang sangat tidak efisien karena akan menurunkan efisiensi reproduksi dalam

hal menghasilkan keturunan yang secara tidak langsung akan menghambat perkembangan populasi.

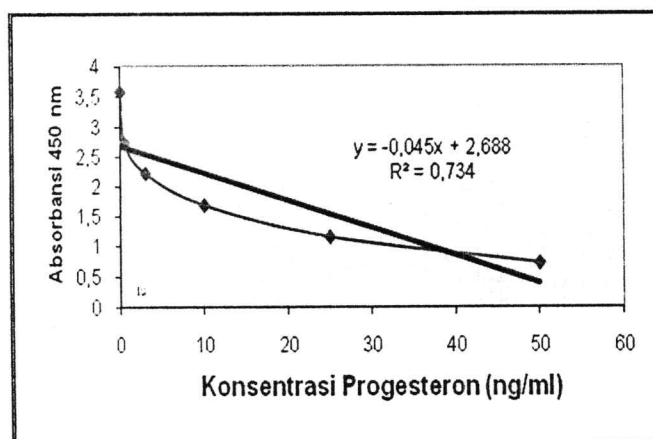
#### 4.4. Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Mengukur Kadar Progesteron Serum Darah

Pemeriksaan kadar progesteron dilakukan pada 21 hari pasca inseminasi buatan. Gambaran absorbansi progesteron standar dan kadar progesteron darah dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.6. Kadar Progesteron Standar dan Nilai Absorbansinya

Progesteron standar (ng/ml)	Absorbansi
0	3,576
0,5	2,73
3	2,215
10	1,679
25	1,148
50	0,718

Gambaran hubungan kadar progesteron standar dan nilai absorbansinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.5. Grafik Kurva Standar Progesteron

Sebanyak 36 ekor sapi perah menunjukkan kadar progesteron darahnya lebih dari 1 ng/ml yang berarti mengindikasikan bunting dan ada 14 ekor sapi perah dengan kadar progesteron dibawah 1 ng/ml atau tidak bunting. Nilai kadar progesteron serum darah sapi perah hari ke 21 pasca inseminasi buatan kambing dapat dilihat pada lampiran 4.

Pada hewan bunting progesteron dihasilkan oleh *corpus luteum graviditatum* dan dipertahankan terus sampai menjelang kelahiran. *Corpus luteum* dibentuk setelah proses ovulasi terjadi. Proses ovulasi melibatkan reaksi umpan balik dari hormon-hormon yang diproduksi oleh ovarium yaitu estradiol dan progesteron. Menjelang hewan birahi kadar estradiol dalam darah tinggi sehingga menyebabkan umpan balik positif untuk keluarnya LH-RH dari hipotalamus. Akibat rangsangan LH-RH menyebabkan hipofisis anterior memproduksi LH yang berfungsi untuk proses ovulasi (Hafez, 2000). Pre-ovulatory LH surge menginduksi hilangnya reseptor LH pada sel-sel folikel sampai terjadi proses desensitisasi, tetapi dalam waktu beberapa hari oleh pengaruh prolaktin sel-sel corpus luteum berisi penuh dengan reseptor LH yang penting untuk produksi steroid (Austin and Short, 1984).

Luteinizing Hormon (LH) merupakan hormon protein dalam melakukan regulasi sel melalui pengikatan pada reseptor spesifik dari membran sel *corpus luteum* dengan mengontrol aktivitas enzim *adenylate cyclase*. Enzim ini bertanggung jawab terhadap katalisasi konversi *adenosin triphosphate* (ATP) menjadi *cyclic adenosin mono phosphate* (cAMP) dan *pyrophosphate*. Hal ini menyebabkan peningkatan kadar cAMP. cAMP bereaksi dengan enzim

*proteinkinase* yang mempunyai dua sub unit yaitu sub unit regulator dan sub unit katalitik. Bila cAMP berikatan dengan sub unit regulator maka akan menyebabkan disosiasi dari dua sub unit tersebut. Bila cAMP berikatan dengan sub unit regulator maka sub unit katalitik akan dihambat. Bila sub unit katalitik bebas maka akan aktif untuk mengkatalisasi fosforilasi satu atau lebih protein spesifik. Fosforilasi yang terjadi dalam inti akan mempengaruhi informasi genetik DNA untuk memproduksi enzim spesifik yang mempengaruhi transkripsi RNA sehingga akan mempengaruhi sintesis mRNA baru di dalam sitoplasma dan akan mensintesis protein baru yang berperan penting dalam pembentukan enzim untuk biosintesis steroid (Ismudiono, 1999).

*Pregnancy Associated Substances* (PAS) selama kebuntingan berperan untuk memelihara *corpus luteum* dengan jalan menstimulasi produksi prostaglandin E2 (PGE2). Prostaglandin E2 akan meningkatkan sintesis cAMP sehingga akan meningkatkan produksi progesteron di dalam *corpus luteum* selama kebuntingan (Karen *et al.* 2001).

Uterus sangat membutuhkan peran progesteron untuk perlekatan embryo dan perkembangan membran fetus. Pada kambing dan tidak pada domba, *corpus luteum* merupakan sumber utama penghasil progesteron selama kebuntingan. Menurut Partodihardjo (1992) progesteron mempunyai tiga fungsi utama pada uterus. Pertama, progesteron menghambat kontraksi miometrium untuk menjamin kelangsungan hidup *blastocyst* dalam uterus. Elanjutnya progesteron menghambat fungsi *oxytocin* pada miometrium sehingga fetus yang berkembang di dalam uterus tidak dikeluarkan. Kedua, progesteron merangsang tumbuhnya kelenjar-

kelenjar uterus untuk memproduksi susu uterus (*histotroph*) yang sangat dibutuhkan *blastocyst* sebelum implantasi. Ketiga, pada saat implantasi selalu diikuti oleh proses perkembangan sel-sel permukaan endometrium untuk menerima *blastocyst* yang disebut *deciduoma*. Tanpa adanya rangsangan progesteron *deciduoma* tidak akan terbentuk.

#### **4.5. Diagnosis Kebuntingan Kambing dengan Palpasi Rektal**

Palpasi rektal dilakukan pada kambing 90 hari pasca inseminasi buatan. Hasil palpasi rektal didapatkan 32 ekor sapi perah dinyatakan bunting. Hubungan kadar protein PSPB serum darah, kadar progesteron dan palpasi rektal dapat dilihat pada lampiran 5.

#### **5.6. Analisis Data**

Data hasil diagnosis kebuntingan sapi perah dengan mengukur kadar PSPB serum darah, progesteron serum darah dan palpasi rektal dibandingkan untuk digunakan uji validitas (sensitivitas, spesifisitas dan akurasi) seperti terlihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 4.7. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan mengukur kadar PSPB Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Hasil Pengukuran PSPB	
	Warna Kuning (Bunting)	Tidak Berwarna (Tidak Bunting)
Bunting	30	2
Tidak bunting	1	17
Total	31	19

Sensitivitas :  $30 : 32 = 93,75 \%$

Spesifisitas :  $17 : 18 = 94,44 \%$

*Positive predictive value* :  $30 : 31 = 96,77\%$

*Negative predictive value* :  $17 : 19 = 89,47 \%$

Akurasi :  $94 \%$

Tabel 4.8. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Perah dengan Melihat Kadar Progesteron Serum Darah pada 21 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Kadar Progesteron	
	> 1 ng/ml (positif bunting)	$\leq 1$ ng/ml (tidak bunting)
Bunting	33	2
Tidak bunting	3	12
Total	36	14

Sensitivitas :  $33 : 35 = 94,29 \%$

Spesifisitas :  $12 : 15 = 80 \%$

*Positive predictive value* :  $33 : 36 = 91,67 \%$

*Negative predictive value* :  $12 : 14 = 85,71\%$

Akurasi :  $90 \%$



Tabel 4.9. Hasil Diagnosis Kebuntingan Sapi Peah dengan Mengukur Kadar PSPB Serum Darah pada 14 Hari Pasca IB dan Palpasi Rektal pada 90 Hari Pasca IB

Palpasi Rektal	Hasil Pengukuran PSPB	
	Warna Kuning (Bunting)	Tidak Berwarna (Tidak Bunting)
Bunting	13	17
Tidak bunting	1	19
Total	14	36

Sensitivitas :  $13 : 30 = 43,33 \%$

Spesifisitas :  $19 : 20 = 95 \%$

*Positive predictive value* :  $13 : 14 = 92,86 \%$

*Negative predictive value* :  $19 : 36 = 52,78 \%$

Akurasi :  $64 \%$

Identifikasi awal terjadinya kebuntingan dan tidak bunting pada ternak setelah perkawinan bermanfaat untuk menentukan efisiensi reproduksi dan tingkat kebuntingan ternak dengan jalan memperpendek jarak antar beranak. Akurasi atau validasi dari suatu uji diukur dengan melihat sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan negatif.

Sensitivitas adalah probabilitas untuk mendeteksi terjadinya kebuntingan dibandingkan dengan kejadian kebuntingan sesungguhnya. Spesifisitas adalah probabilitas hasil diagnosis yang menunjukkan tidak bunting dibandingkan dengan kejadian tidak bunting sesungguhnya. *Positive predictive value* adalah probabilitas kejadian kebuntingan sesungguhnya dibanding angka kebuntingan hasil diagnosis. *Negative predictive value* adalah probabilitas kejadian tidak bunting sesungguhnya dibanding angka kejadian tidak bunting hasil diagnosis.

Melihat hasil diagnosis kebuntingan dengan mikrotiter strip pada 21 hari pasca IB mempunyai kemampuan uji akurasi atau validitas yang sama dengan uji progesteron pada 21 hari pasca IB. Sedangkan uji mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB menghasilkan angka sensitifitas yang rendah sehingga tidak dianjurkan untuk melakukan uji kebuntingan kambing dengan mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB tetapi dianjurkan pada 21 hari pasca IB. Hasil uji mikrotiter strip pada 14 hari pasca IB mengindikasikan bahwa placenta belum terbentuk sempurna pada semua sapi perah penelitian sehingga protein PSPB yang diproduksi oleh sel-sel binuclear trophoblast belum sepenuhnya dialirkan ke darah perifer maternal. Tetapi pada 21 hari pasca IB didapatkan hasil uji akurasi atau validitas yang tinggi dikarenakan pada umur tersebut placenta sapi sudah terbentuk sehingga protein PSPB dapat dikeluarkan ke darah perifer maternal dan dapat dideteksi dengan anti-PSPB yang ada pada mikrotiter strip. Hasil diagnosis kebuntingan kambing dengan uji mikrotiter strip pada 21 hari pasca IB menghasilkan angka akurasi sedikit lebih baik dari uji kebuntingan kambing dengan mengukur kadar progesteron serum darah.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu : protein PSPB bersifat imunogen yang dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti-PSPB dan anti-PSPB yang dihasilkan dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan kambing dengan metode PSPB mikrotiter strip (*Sandwich* ELISA).

Berdasarkan kesimpulan umum dapat ditarik subkesimpulan sebagai berikut :

1. Protein PSPB dari *cotyledon* kambing bunting mampu menginduksi terbentuknya anti-PSPB.
2. Anti-PSPB dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan pada sapi perah.
3. Diagnosis kebuntingan pada 21 hari pasca IB dengan menggunakan PSPB mikrotiter strip memperoleh hasil angka akurasi atau validasi lebih baik dibanding pemeriksaan kadar progesteron serum darah.

Kesimpulan di atas membuktikan bahwa hipotesis penelitian dapat diterima yaitu ada perbedaan tingkat keberhasilan diagnosis kebuntingan sapi perah antara PSPB mikrotiter strip dan progesteron serum darah.

## 5.2. S a r a n

Berdasarkan hasil dan kesimpulan dapat diambil suatu saran sebagai berikut :

1. PSPB mikrotiter strip dapat digunakan untuk dignosis kebuntingan sapi perah di lapangan. Meskipun telah diketahui bahwa diagnosis kebuntingan dengan PSPB mikrotiter strip mempunyai angka akurasi atau validasi yang tinggi namun perlu dilakukan uji coba diagnosis kebuntingan sapi perah pada kondisi di lapangan.
2. PSPB mikrotiter strip dapat digunakan sebagai model untuk diagnosis kebuntingan pada hewan mamalia lain.

**Daftar Pustaka**

- Austin C.R. and R.V. Short. 1984. *Mechanisms of Hormon Action* in Cambridge University Press. London.
- 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. 163-167.
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10: Implications for Understanding Its Role. *J. Reprod. Fertil.* 1: 28-32
- Burgess, G.W. 1995. *Teknologi ELISA Dalam Diagnosa Penelitian*. Gadjah Mada University Press. 163-167.
- 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 Pregnancy Specific Protein B in The Sheep. *J. Reprod. Immunol.* 2:151-162
- Clarke, F.M and S. Wilson. 1982. *Biochemistry of Pregnancy Specific Protein B*. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinskas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 407-412
- Direktur Jendral Peternakan. 2006. *Produksi Daging, Telur dan Susu*. [http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi\\_infoekse\\_nak.htm](http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm)
- Djanuar, R. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Hal. 53-69.
- DuPlants, L.J. 2000. *Pregnancy Specific Protein B*. 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 Specific Protein B In Bos Taurus and Bos Taurus Indicus*. *Theriogenology* 53:283
- El Amiri B, B Remy, NM De Sousa and JF Beckers. 2004. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high level ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:169-181
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincutt Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Harlow, E and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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, P Kovacs, JF Beckers and O Szenci. 2003. Review article pregnancy diagnosis in sheep: review of the most practical methods. *Acta Vet. BRNO* 70:115-126
- Karnen, G.B. 2001. *Imunology Dasar Edisi 4*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-23.
- Kerr, M.A. and R. Thorpe. 1994. *Immunochemistry Labfax*. Bios Scientific Publisher. Academic Press. 43-80.
- 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. *Pregnancy Specific Protein B, 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.
- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan dan M.F. Pelezar. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Roberts R.M, A.D. Ealy, A.P. Alexenko, C.S. Han and T. Ezashi. 1999. *Trophoblast interferons*. *Placenta*, 20:259-264
- Salisbury, G.W., N.L vandenmark dan R. Djanuar. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Smith, J.R. 1995. *Produksi serum hiperimun*. Dalam *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*. James Cook University of North Queensland. G.W. Burgess Ed.
- Sudardjad S. 2005. *Operasional Program Terobosan Menuju Kecukupan Daging Sapi 2005*. Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Edisi Ke-2. Airlangga University Press.
- 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, S De Cat, B El Amiri, J Sulon, L Duchateau, A Van Soom and JF Beckers. 2004. 141 effect of number of lambs, their sex and birth weight on ovine pregnancy-associated substances (ov PAS) concentrations. *Reproduction, Fertility and Development* 16(2): 192-193
- Wilson, S., R. McCarthy and F.M. Clarke. 1983. In Search of Pregnancy Specific Protein B. Isolation of Active Polypeptides from Pregnant Ewe's Sera. *J. Reprod. Immunol.* 5:275—286
- Woodruff, T.K. and A. Pangas. 2000. Trend in Endocrinology and Metabolism. *Journal Reproduction* : 309-314
- Xie SC, BG Low, RJ Nagel, KK Kramer, RV Anthony, AP Zoli, JF Beckers and RM Roberts. 1991. Identification on the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10247-10251

**Lampiran 1. *Optical Density* (OD) dari Anti-PSPB serum darah kambing setelah mendapat imunisasi isolat PSPB**

Kambing	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1	0,202	0,333	0,555	0,325	0,195	0,260	0,340	0,590	0,355	0,212
2	0,198	0,321	0,551	0,316	0,190	0,248	0,337	0,583	0,349	0,207
Rata-Rata	0,200	0,327	0,553	0,321	0,193	0,254	0,339	0,587	0,352	0,210

Pengenceran 1:10

**Keterangan :**

- B-1 : Minggu pertama setelah booster pertama
- B-2 : Minggu kedua booster pertama
- B-3 : Minggu ketiga setelah booster pertama
- B-4 : Minggu keempat setelah booster pertama
- B-5 : Minggu kelima setelah booster pertama  
Penyunikan booster kedua
- B-6 : Minggu pertama setelah booster kedua
- B-7 : Minggu kedua setelah booster kedua
- B-8 : Minggu ketiga setelah booster kedua
- B-9 : Minggu keempat setelah booster kedua
- B-10 : Minggu kelima setelah booster kedua

**Lampiran 2. Titer anti-PSPB ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada kambing setelah mendapat imunisasi isolat PSPB**

Kambing	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1	60,71	247,86	565,00	236,43	50,71	143,57	257,86	615,00	279,29	75,00
2	55,00	230,71	559,29	223,57	43,57	126,43	253,57	605,00	270,71	67,86
Rata-Rata	57,59	239,29	562,15	230,00	47,14	135,00	255,72	610,00	275,00	71,43



**Lampiran 3. Nilai absorbansi (pengenceran 20x) dan kadar protein PSPB serum darah sapi perah**

Sapi Perah	Pasca Inseminasi							
	7 hari		14 hari		21 hari		28 hari	
	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP
1	0,036		0,035		0,220	370,375	0,403	827,875
2	0,025		0,041		0,212	350,375	0,387	787,875
3	0,035		0,027		0,029		0,031	
4	0,042		0,021		0,025		0,033	
5	0,036		0,036		0,208	340,375	0,328	640,375
6	0,021		0,128	140,375	0,223	377,875	0,385	782,875
7	0,027		0,131	147,875	0,227	387,875	0,393	798,750
8	0,055		0,127	137,875	0,232	400,375	0,392	800,375
9	0,045		0,120	120,375	0,221	372,875	0,386	770,375
10	0,027		0,025		0,057		0,036	
11	0,031		0,045		0,029		0,036	
12	0,033		0,031		0,025		0,027	
13	0,036		0,036		0,251	447,875	0,324	630,375
14	0,032		0,036		0,263	477,875	0,352	700,375
15	0,036		0,032		0,056		0,042	
16	0,041		0,036		0,021		0,037	
17	0,032		0,119	117,875	0,200	320,375	0,305	582,875
18	0,025		0,123	127,875	0,226	385,375	0,375	757,875
19	0,037		0,127	137,875	0,275	507,875	0,381	772,875
20	0,033		0,025		0,240	420,375	0,343	677,875
21	0,036		0,055		0,042		0,029	
22	0,029		0,042		0,036		0,040	
23	0,029		0,029		0,036		0,032	
24	0,025		0,036		0,036		0,041	
25	0,042		0,111	97,875	0,203	327,875	0,365	732,875
26	0,036		0,110	95,375	0,208	340,375	0,328	640,375
27	0,055		0,113	102,875	0,236	410,375	0,382	775,375
28	0,021		0,115	107,875	0,295	557,875	0,427	887,875
29	0,025		0,025		0,037		0,042	
30	0,027		0,031		0,037		0,033	
31	0,042		0,042		0,033		0,051	
32	0,041		0,033		0,032		0,045	
33	0,036		0,121	122,875	0,207	337,875	0,365	732,875
34	0,035		0,029		0,203	327,875	0,331	647,875
35	0,036		0,025		0,201	322,875	0,373	752,875
36	0,029		0,033		0,034		0,045	
37	0,040		0,025		0,218	365,375	0,390	795,375
38	0,037		0,041		0,250	445,375	0,353	702,875
39	0,051		0,045		0,210	345,375	0,367	737,875
40	0,032		0,032		0,201	322,875	0,352	700,375
41	0,036		0,033		0,027		0,033	

42	0,033		0,027		0,204	330,375	0,331	647,875
43	0,027		0,029		0,200	320,375	0,342	675,375
44	0,033		0,042		0,216	360,375	0,325	632,875
45	0,037		0,032		0,227	387,875	0,333	652,875
46	0,036		0,051		0,218	365,375	0,381	772,875
47	0,045		0,036		0,223	377,875	0,377	762,875
48	0,036		0,037		0,029		0,036	
49	0,031		0,114	105,375	0,217	362,875	0,367	737,875
50	0,033		0,112	100,375	0,205	332,875	0,398	815,375
<b>JUMLAH</b>		0		14		32		32

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

**Lampiran 4. Kadar progesteron serum darah sapi perah hari ke 21 pasca inseminasi**

No	Kadar Progesteron (ng/ml)	Keterangan
1	4,02	Kadar Progesteron Kambing Bunting : > 1 ng/ml
2	3,69	
3	3,62	
4	4,24	
5	3,58	
6	3,80	
7	4,09	
8	5,91	
9	5,16	
10	0,91	
11	0,51	
12	0,24	
13	5,53	
14	5,49	
15	0,60	
16	0,62	
17	5,29	
18	5,73	
19	5,73	
20	5,40	
21	0,80	
22	0,82	
23	3,51	
24	0,71	
25	5,71	
26	5,24	
27	5,38	
28	4,38	
29	0,93	
30	1,18	
31	0,78	
32	0,07	
33	5,53	
34	5,58	
35	5,62	
36	0,82	
37	5,96	
38	5,40	
39	5,76	
40	5,13	
41	0,82	
42	5,71	

43	5,13	
44	5,93	
45	5,04	
46	5,78	
47	5,67	
48	0,93	
49	5,91	
50	5,87	

**Lampiran 5. Hubungan Kadar Protein PSPB, Progesteron dan Pemeriksaan Palpasi  
Rektal Sapi Perah**

Kambing	Uji Kebuntingan			
	Protein PSPB ( $\mu\text{g/ml}$ )		Progesteron ( $\text{ng/ml}$ )	Palpasi Abdominal
	14 hari Pasca IB	21 hari Pasca IB	21 hari Pasca IB	90 hari Pasca IB
1	-	370,375	4,02	+
2	-	350,375	3,69	+
3	-	-	3,62	+
4	-	-	4,24	+
5	-	-	3,58	-
6	140,375	377,875	3,80	+
7	147,875	387,875	4,09	+
8	137,875	400,375	5,91	+
9	120,375	372,875	5,16	+
10	-	-	0,91	-
11	-	-	0,51	-
12	-	-	0,24	-
13	-	447,875	5,53	+
14	-	477,875	5,49	+
15	-	-	0,60	-
16	-	-	0,62	-
17	-	-	5,29	-
18	127,875	385,375	5,73	+
19	137,875	507,875	5,73	+
20	-	420,375	5,40	+
21	-	-	0,80	-
22	-	-	0,82	-
23	-	-	3,51	-
24	117,875	-	0,71	-
25	97,875	327,875	5,71	+
26	95,375	340,375	5,24	+
27	102,875	410,375	5,38	+
28	107,875	557,875	4,38	+
29	-	-	0,93	-
30	-	-	1,18	-
31	-	-	0,78	-
32	-	375,375	0,07	-
33	-	337,875	5,53	+
34	-	327,875	5,58	+
35	-	322,875	5,62	+
36	-	-	0,82	-
37	122,875	325,375	5,96	+
38	-	445,375	5,40	+
39	-	345,375	5,76	+
40	-	322,875	5,13	+
41	-	-	0,82	-