

SKRIPSI

IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK *EARLY PREGNANCY FACTOR* (EPF) DARI KOTILEDON SAPI BUNTING



Oleh :

DIANTI SULISTYANING KUSUMA DEWI

NIM. 060413262

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK *EARLY PREGNANCY FACTOR* (EPF)
DARI KOTILEDON SAPI BUNTING**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh:

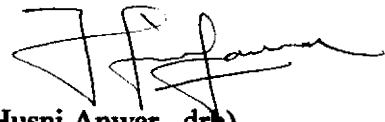
DIANTI SULISTYANING KUSUMA DEWI

NIM. 060413262

Menyetujui

Komisi Pembimbing,


(Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh)
Pembimbing Pertama


(Husni Anwar., drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Identifikasi Protein Spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari Kotiledon Sapi Bunting

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

Surabaya, 15 November 2010



Dianti Sulistyaning Kusuma Dewi
NIM. 060413262

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 5 November 2010

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

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

Sekretaris : Epy M. Luqman, drh., M. Si

Anggota : Dr. Suherni Susilowati, drh., M. Kes

Pembimbing I : Prof. Dr. Bambang Sektiari L, drh., DEA

Pembimbing II : Husni Anwar, drh

Telah diuji pada

Tanggal : 11 November 2010

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Epy M. Luqman, drh., M. Si

Anggota : Dr. Suherni Susilowati, drh., M. Kes

Prof. Dr. Bambang Sektiari L, drh., DEA

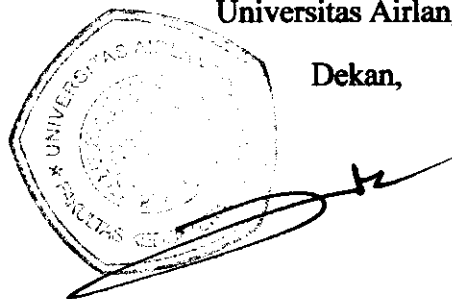
Husni Anwar, drh

Surabaya, 15 November 2010

Fakultas Kedokteran hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah sidik, drh., Ph.D.
NIP. 130 687 305

Identification of Specific Protein Early Pregnancy Factor (EPF) from Pregnant Cow's Cotyledon

Dianti Sulistiyaning Kusuma Dewi

ABSTRACT

The development of animal protein from cow cattle is high in Indonesia, but there are obstacle thing on reproduction such as oestrus detected, the right time for pregnant, and the right pregnancy diagnostic. One of the solution to fix the problem is having a good and quick of pregnancy diagnostic, one of the candidate to diagnose by using Early Pregnancy Factor (EPF). In this research using cotyledon of three months pregnant cow with SDS PAGE method and Western blotting method, it is found that EPF of this pregnancy cow cotyledon can be identified as knowing Molecular Mass, while being identified using anti-EPF which is 59,88 KDa. With the found of this EPF Molecular Mass hopefully there will be a more research to make the diagnostic kit of pregnancy as paper strip or dipstick.

Keyword : *EPF, SDS PAGE, Western blotting*

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan berkah, rahmat dan hidayah-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **Identifikasi Protein Spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) Dari Kotiledon Sapi Bunting.**

Pada kesempatan ini tidak lupa dengan penuh rasa hormat penulis ucapkan terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Hj. Romziah Sidik, Ph. D., drh. Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Husni Anwar, drh. selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan membimbing dengan penuh kesabaran, penuh perhatian dan senantiasa mendorong semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya diucapkan kepada Dr Abdul Samik, M.Si. drh. selaku dosen dalam penelitian ini, yang selalu bersedia memberikan bimbingan, arahan, saran, petunjuk dan nasehat yang sangat berguna dalam penyusunan naskah skripsi ini.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof.Dr. Aullanni'am, drh., DES. Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Brawijaya, atas ijin dan fasilitas serta bimbingan selama pengerjaan di laboratorium. Kepala laboratorium Invitro FKH-Unair atas ijin dan fasilitas laboratorium dan peralatannya. H Ja'Faril dan keluarga selaku pemilik peternakan di Wonosalam-Jombang yang telah

berkenan mengizinkan dan memberikan fasilitas yang digunakan sebagai hewan percobaan. Kepada seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga penulis sampaikan terima kasih yang tak terhingga atas bekal ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat.

Ungkapan rasa terima kasih dan penghargaan yang tiada tara tingginya dihaturkan kepada Ibu, Bapak dan kakak karena telah membesarkan, mengayomi, mendidik dengan kasih sayang, pengorbanan materi yang tak terhingga dan tak henti-hentinya mendoakan untuk penyelesaian pendidikan sarjana ini. Keluarga besar RRI Surabaya, PT. Surabaya Media Televisi yang sangat aku sayangi atas dorongan semangat, iringan doa, dan bantuan yang tulus ikhlas yang tak ternilai.

Rekan-rekan penelitian (ayu,alvi,soni) atas semua bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung. Kepada semua pihak, teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu penulisan skripsi ini disampaikan terima kasih setinggi-tingginya.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, meskipun sudah diusahakan semaksimal mungkin, oleh sebab itu penulis mengharap kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di Indonesia.

Surabaya, November 2010

Penulis

DAFTAR ISI

		Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	Xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	Xiii
BAB I	PENDAHULUAN	1
	1.1 Latar Belakang Masalah	1
	1.2 Rumusan Masalah	2
	1.3 Landasan Teori	3
	1.4 Tujuan Penelitian	5
	1.4.1 Tujuan jangka pendek	5
	1.4.2 Tujuan jangka panjang	5
	1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	7
	2.1 Siklus Reproduksi Birahi	7
	2.2 Fertilisasi dan Kebuntingan	8
	2.3 Selaput Ekstra Embriotik atau Selaput Fetus	9
	2.4 <i>Early Pregnancy Factor</i>	13
	2.4.1 Tinjauan tentang EPF	13
	2.4.2 Bioassay EPF	18
	2.4.3 Isolasi dan Identifikasi EPF	20
BAB III	MATERI DAN METODE PENELITIAN	21
	3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
	3.2 Materi Penelitian	21
	3.2.1 Hewan penelitian	21
	3.2.2 Bahan penelitian	21
	3.3 Metode Penelitian	23
	3.3.1 Tahap koleksi dan isolasi EPF Kotiledon Sapi FH Bunting	23
	3.3.2 Tahap identifikasi protein EPF dengan Teknik SDS-PAGE	24

	3.3.3 Tahap uji spesifitas protein EPF dengan teknik Western Blot	25
BAB IV	HASIL PENELITIAN	27
	4.1 Hasil SDS-PAGE	27
	4.2 Hasil Western Blotting	28
BAB V	PEMBAHASAN	29
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	33
	6.1 Kesimpulan	33
	6.2 Saran	33
RINGKASAN	34
DAFTAR PUSTAKA	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 5. 1 Berat Molekul pita-pita protein kotiledon sapi bunting.....	26

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
Gambar 4. 1 Hasil metode SDS PAGE dari kotiledon sapi bunting.....	23
Gambar 4. 2 Hasil <i>Western Blotting</i> untuk menentukan BM protein EPF Kotiledon sapi.....	24
Gambar 5.1 Kurva Hubungan antara Rf dengan log BM protein standart...	25

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

EPF	: Early Pregnancy Factor
Na₂CO₃	: Sodium Carbonate
TBST-20	: Tris-Buffered Saline Tween-20
PBS	: Phosphate Buffered Saline
BSA	: Bovine Serum Albumin
Pnpp	: Para-Nitro-Phenylphosphat
PGF₂α	: Prostaglandin F₂α
Elisa Indirect	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay Indirect
RIA	: Radio Imuno Assy
Abpo	: Antibodi Poliklonal
PSP-B	: Pregnancy Spesific Protein – B
PAG-1	: Pregnancy Associated Glycoprotein – 1
bPAG1	: Bovine Pregnancy Associated Glycoprotein

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG PENELITIAN

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing, dan domba di Indonesia belum cukup berarti bahkan cenderung mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh banyaknya permintaan akan protein hewani yang berasal dari daging ternak sapi, kambing, dan domba namun kurang diimbangi dengan peningkatan populasi ternak tersebut.

Pengembangan usaha ternak sapi perah masih mengalami hambatan terutama dibidang reproduksi. Panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan merupakan penyebab sulitnya mencapai tingkat reproduktivitas yang optimal. Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang tepat. Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilisasi dapat dikurangi.

Penerapan terhadap peningkatan kadar progesteron serum dengan *radioimmunoassay* (RIA) dari betina bunting, dapat dikatakan merupakan metode deteksi kebuntingan yang paling cepat yang pernah ada selama ini. Diagnosa ini dapat dilakukan pada umur kebuntingan 21 atau 22 hari. Namun akurasi dari metode ini masih dianggap rendah, mengingat bahwa peningkatan progesteron juga terjadi pada hewan yang tidak bunting, yaitu selama fase luteal dalam siklus birahi (Hafez, 2000). Deteksi antigen khusus kebuntingan, mendeteksi adanya antigen khusus kebuntingan dalam plasma darah induk dapat dilakukan dengan reaksi hemaglutinasi (Hunter, 1995).

Saat ini telah ditemukan substansi yang lebih spesifik yang terbentuk selama masa kebuntingan, yang dikenal sebagai *early pregnancy factor* (EPF) (Hafez, 2000). EPF merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan dalam darah induk mamalia sejak umur 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Substansi EPF ditemukan dalam darah induk setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000).

1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan diatas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut :

1. Apakah protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari kotiledon sapi bunting dapat diidentifikasi dengan metode SDS PAGE?
2. Apakah EPF kotiledon sapi bunting dapat diuji spesifitasnya dengan metode Western Blotting?

1.3 LANDASAN TEORI

Early Pregnancy Factor (EPF) merupakan substansi sebagai penanda adanya proses kebuntingan dalam tubuh manusia atau hewan seperti mencit, babi, dan domba (Cavanaugh, 1996; DuPlants, 2000). EPF dapat ditemukan dalam serum darah maternal setelah proses implantasi kurang lebih pada masa kebuntingan 3 minggu yang selanjutnya menetap hingga akhir kebuntingan.

Xie *et al.* (1996) mendeteksi EPF pada induk sapi sejak umur kebuntingan 3 minggu. Konsentrasi EPF dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Sementara itu, Karen *et al.* (2001) berhasil mendeteksi substansi ini pada umur kebuntingan 3 sampai 4 minggu, dengan menyebutkan banyaknya konsentrasi substansi EPF ini berbanding lurus dengan jumlah fetus, sedangkan jenis kelamin fetus jantan menyebabkan konsentrasi EPF dalam darah menjadi lebih tinggi. Dilaporkan pula banyaknya konsentrasi EPF tampak menurun drastis setelah 4 minggu post partum.

Early Pregnancy Factor (EPF) dikelompokkan sebagai antigen khusus yang telah diisolasi sebagai *Pregnancy Specific Protein B* (PSP-B) pada tahun 1982 oleh Butler *et al.* (Garbayo *et al.*, 1998). Substansi antigen yang serupa antara lain *Pregnancy Associated Glycoprotein 1* (PAG 1). PAG, serta oPSPB juga telah diisolasi oleh El Amiri *et al.* tahun 2004 dari plasenta hewan pemamah biak. Menurut Green *et al.* (2000), Karen *et al.* (2001) dan Karen *et al.* (2003) oPAG disintesa oleh sel binukleat tropoblastik dari plasenta fetus. Pada tahun 1982 Butler *et al.* berhasil memisahkan protein spesifik kebuntingan berupa PSP-A dan PSP-B dari membran plasenta sapi. Selanjutnya PSP-B ditetapkan sebagai protein kebuntingan spesifik plasenta (Garbayo *et al.*, 1998).

Early Pregnancy Factor (EPF) merupakan substansi yang memiliki struktur glikoprotein dengan berat molekul berkisar antara 43-90 KDa. Dari hasil karakterisasi ternyata banyak oPAG memiliki berat molekul 43-67 KDa (Xie *et al.*, 1997 ; Karen *et al.*, 2001) dan PAG-1, 67 KDa dengan rangkaian asam amino tak lebih dari 330 (Xie *et al.*, 1996).

Early Pregnancy Factor (EPF) berupa PAG atau PSP-B, dapat dimanfaatkan untuk deteksi kebuntingan sejak awal masa embrional hingga menjelang akhir kebuntingan (Karen *et al.*, 2001). Keberadaan substansi PAG atau PSP-B dalam serum darah sangat berguna untuk : deteksi fertilisasi dan implantasi ataupun untuk memonitor

kelangsungan perkembangan embrio, fetus oleh karena secara biologis EPF mempengaruhi implantasi embrional (Cavanaugh, 1996 ; DuPlant, 2000 ; Karen *et al.*, 2001).

1.4 TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini dirancang dengan dua tujuan yaitu tujuan jangka pendek dan tujuan jangka panjang sebagai berikut :

1.4.1 Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah :

- Mengidentifikasi protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari kotiledon sapi bunting dengan metode SDS PAGE.
- Mengetahui spesifitas EPF dengan metode *Western Blotting*.

1.4.2 Tujuan jangka panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah :

Memberikan informasi tentang berat molekul protein *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari kotiledon sapi bunting. Sebagai usaha untuk pembuatan antibodi *Early Pregnancy Factor* (EPF).

1.5 MANFAAT PENELITIAN

Hasil dari penelitian diharapkan :

Pada masa yang akan datang reaksi antigen dan antibodi EPF dari kotiledon hewan bunting dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 SIKLUS REPRODUKSI BIRAH

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

Satu siklus reproduksi dibagi menjadi 3 fase yaitu fase pregradivitas, meliputi proses birahi, ovulasi, kopulasi, dan fertilisasi. Fase graviditas, meliputi proses-proses implantasi plasentasi, dan kebuntingan. Fase postgradivitas, meliputi proses-proses pengeluaran foetus, pengeluaran sekundinae dan laktasi (Hardjopranto, 1987). Siklus birahi diatur oleh mekanisme endokrin dan neuroendokrin meliputi hormon-hormon dari hipotalamus, gonadotropin dan steroid yang disekresikan oleh ovarium dan testis. Pengaturan sekresi hormon gonadotropin selama siklus birahi diperlukan untuk keseimbangan antara reaksi hormon-hormon yang kompleks (Hafez, 1993 ; Ismudiono, 1999).

Selama siklus birahi terjadi perubahan-perubahan fisiologis dari alat kelamin hewan betina. Perubahan ini berkesinambungan satu sama lain

hingga kemudian terulang kembali sama seperti perubahan awal. Lama siklus birahi pada sapi berkisar antara 20-21 hari. Siklus birahi dibagi menjadi 4 fase, antara lain proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Hafez,1993).

2.2 FERTILISASI DAN KEBUNTINGAN

Apabila sel telur telah diovulasikan dari ovarium dan bertemu dengan sel spermatozoa didalam ampula tubafalopii maka pada saat itu sudah dinyatakan terjadi kebuntingan. Secara klinis kebuntingan baru dapat dihitung mulai saat sapi betina tidak lagi menunjukkan gejala birahi kembali pada siklus birahi berikutnya. Lama periode kebuntingan pada sapi berlangsung selama 285 hari atau berkisar antara 273-296 hari (Mahaputra, 2001).

Fertilisasi akan menghasilkan individu yang diploid yaitu yang memiliki $2n$ kromosom, $1n$ kromosom berasal dari sel jantan dan $1n$ kromosom berasal dari betina. Fertilisasi adalah proses timbal balik dan bersifat spesies spesifik yang dapat menstimulir sel telur untuk mengadakan pembelahan dan perkembangan lebih lanjut (Hunter, 1995). Perkembangan selanjutnya disebut morula yang mencapai uterus kemudian berkembang menjadi blastula (blastosis) yang terdiri dari banyak sel yang masing-masing sel disebut blastomer. Blastula adalah suatu bentuk bola yang berongga yang terdiri dari lapisan sel-sel yaitu tropoblas yang menyelimuti blastosel (blastocoel). Masa sel tropoblas

yang terletak diposisi dalam menjulur kedalam blastosel dan akhirnya membentuk badan embrio, dalam proses ini terbentuk 3 lapisan kecambah. Ketiga lapisan kecambah tersebut adalah ectoderm (kulit bagian luar), endoderm (kulit bagian dalam), dan mesoderm (kulit bagian tengah) (Ismudiono, 1999).

2.3 SELAPUT EKSTRA EMBRIONIK ATAU SELAPUT FETUS

Selaput ekstra embrionik atau selaput fetus berkembang dan berfungsi pada kehidupan pra lahir. Selaput itu tidak menjadi bagian dari tubuh embrio dan dikeluarkan dari tubuh pada waktu partus atau beberapa saat setelah partus. selaput tersebut terdiri dari kantung kuning telur, kantung amnion, allantois, dan chorion (Poernomo dkk., 2004). Selaput ini berfungsi melindungi, memberi makan dan membungkus embrio agar tidak mudah rusak akibat pengaruh dari luar (Mahaputra, 2001).

Kantung kuning telur berupa sebuah kantung berisi kuning telur. Kantung kuning telur dihubungkan dengan tubuh embrio oleh tangkai kuning telur (Poernomo dkk., 2004). Pembuluh darah segera terbentuk didalam kantung kuning telur dan berfungsi sebagai penyalur bahan nutrisi yang diserap dari dinding uterus kedalam embrio sendiri. Kantung kuning telur ini sendiri berfungsi hanya singkat saja dari terbentuknya, dan kemudian fungsinya digantikan oleh allantois. Dari satu sisi embrio yaitu lapisan mesoderm dan lapisan ectoderm tumbuh

dan berkembang menuju bagian luar embrio menjadi selaput amnion. Lapisan ini bertemu dibagian atas embrio dan membungkus embrio dalam 2 dinding kantong yang dikenal sebagai amnion, kurang lebih timbul pada hari ke 18 dan juga sering dikenal dengan sebutan *water bag* (Mahaputra, 2001). Jumlah cairan amnion pada hewan besar berkisar sampai 7 liter. Ada kalanya cairan amnion bercampur urin atau mekonium (Poernomo dkk., 2004).

Pada saat permulaan blastocyst selaput luarnya berkembang menjadi tropoblast. Tropoblast ini mempunyai kelanjutan germ disk dari lapisan sebelah luar yang dibentuk dari ectoderm. Pada saat dibentuknya germ layers, lapisan bagian luar ini memisahkan diri dari germ disk, kemudian disebut dengan trophoctoderm. Pada permulaannya tugas dari serosa adalah mengabsorpsi nutrisi, selanjutnya serosa dan allantois bersama-sama membentuk chorion dan juga sebagai penyalur nutrisi kedalam embrio (Mahaputra 2001).

Chorion dan amnion berkembang bersamaan sebagai lipatan dari selaput ekstra embrionik somatopleura. Dinding chorion terdiri dari 2 lapis, lapis dalam berasal dari mesoderm somatic dan lapisan luar dari tropoblast. Pada mamalia, chorion berasal dari jaringan tropoblast. Pada proses pembentukan plasenta, chorion merupakan bagian plasenta dari fetus. Chorion kaya dengan pembuluh darah, sehingga bahan-bahan dari gas dapat melewati chorion masuk kedalam peredaran darah induk dan fetus. Tetapi, bakteri tidak dapat melewati selaput tersebut. Dinding

allantois kaya dengan pembuluh darah. Dengan meluasnya allantois, dindingnya bersatu dengan chorion membentuk selaput chorio-allantois (Poernomo dkk., 2004).

Allantois ini secara sempurna telah terbentuk pada umur kebuntingan 23 hari, dan dalam umur kebuntingan 26 hari membrane allantois ini telah membesar dan berada pada titik disekitar sebelah bawah embrio, dan selanjutnya mengisi ruangan diantara serosa dan amnion. Embrio ini dihubungkan oleh uracus kedalam kantong allantois melewati chorda umbilicalis (Mahaputra, 2001).

Adapun fungsi allantois antara lain : sebagai kantong urin ekstra embrional, dimana cairan urin berasal dari sisa metabolisme embrio yang berbentuk asam urat, sebagai paru-paru ekstra embrional yang disebabkan dibagian luar dinding allantois ada area vasculosa, yaitu daerah chorio-allantois, untuk mencerna abumen pada sel telur kleidoik, seperti reptilian, burung dan mamalia bertelur dan merupakan bagian plasenta fetus pada mamalia berplasenta (Mahaputra, 2001 ; Poernomo dkk., 2004).

Semakin meningkatnya ukuran embrio maka proses pemberian makanan zigot menjadi tidak mencukupi untuk mempertahankan hidup dan meneruskan pertumbuhannya. Membran ekstra embrional atau plasenta selanjutnya berkembang sebagai sarana untuk mencukupi

kebutuhan nutrisi embrio selanjutnya yang lebih banyak (Frandsen, 1991).

Plasenta adalah suatu sistem yang terdiri dari dua komponen, yaitu selaput ekstra embrionik dan selaput lender rahim yang berintegrasi menjadi satu kesatuan untuk keperluan pertukaran timbal balik faal antara induk dan fetus serta dapat menghasilkan hormon. Plasenta induk adalah indometrium rahim dan plasenta fetus adalah chorio-allantois (Poernomo dkk., 2004).

Bentuk plasenta cotyledonaria, terdapat pada ruminansia. Villinya berkelompok-kelompok dengan penembusan keselaput lendir rahim lebih dalam (Poernomo dkk., 2004). Hanya villi khorion yang tumbuh subur pada permukaan khorion disebut dengan kotiledon dan mukosa indometrium yang berhadapan langsung dengan kotiledon yang juga tumbuh subur disebut dengan karunkula. Persatuan masing-masing karunkula dan kotiledon disebut dengan placentom (Mahaputra, 2001). Villi-villi chorionic pada domba mulai tumbuh pada hari ke 27 (Restiadi, 2002).

Pengaliran bahan-bahan metabolic dari induk ke fetus melewati membran plasenta melalui beberapa mekanisme. Dahulu diperkirakan pemindahan ini berlangsung secara difusi sederhana, molekul berpindah dari daerah berkonsentrasi tinggi ke daerah berkonsentrasi rendah. Kini disinyalir hampir semua molekul fisiologik penting dipindahkan

melalui mekanisme transport aktif, molekul-molekul dipompakan dengan konsentrasi tinggi sehingga memungkinkan embrio untuk menumpuk zat-zat makanan yang berasal dari darah induk. Phagocytosis (penelanan makanan) dan pinocytosis (penelanan air) juga merupakan mekanisme penting dalam pertukaran zat secara fisiologik dalam makanan yang dibutuhkan oleh embrio yang dapat mengalir masuk melalui plasenta. Zat-zat yang diangkut melalui plasenta dari induk ke fetus adalah : (1) gas : O₂ masuk kedalam, CO₂ dikeluarkan ; (2) air (3) zat anorganik : natrium, ferrum, cuprum, mangan, calcium, dan phosphor ; (4) zat organik : fruktosa, asam lemak, glycerol ; (5) vitamin : A, D, dan E ; (6) hormon : insulin, steroid, gonadotropin (Restiadi, 2002).

2.4 EARLY PREGNANCY FACTOR (EPF)

2.4.1 Tinjauan tentang EPF

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

Tahun 1982, Butler *et al.* memisahkan 2 protein spesifik kebuntingan (PSP A dan B) dari membran plasenta sapi. PSP A

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dilaboratorium invitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Kandang Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pelaksanaan penelitian ini dimulai Mei 2008 sampai Juni 2008.

3.2 MATERI PENELITIAN

3.2.1 Hewan Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan untuk isolasi EPF adalah kotiledon dari satu ekor sapi dari RPH (Rumah Potong Hewan) Pegirikan Surabaya yang sudah tanggal gigi 2 kali dan sedang bunting 3 bulan.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan berupa isolat protein EPF dari kotiledon sapi FH bunting, antibodi poliklonal EPF (Abpo-EPF) dari kambing.

Beberapa reagen kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah : Tween-20 (Biorad, cat. 170-6531) ; Phosphat Buffer Salin-Tween (BPS-Y, pH 7,4) ; Amonium Persulfat (APS, Biorad, cat 161-0700) ; Bovin Serum Albumin (BSA, B 4287) ; Buffer Tris-Glisin ; Buffer Fosfat ; Bis Acrilamid (plus one, cat. 17-13041) ; Poliakrilamid (Promega, V311A) ; Sodium Dodecyl Sulfonat (SDS, Biorad, cat. 161-0301) ; TEMED (Sigma) ; Mercaptoeethanol (Biorad, cat. 161-0710) ; Commasie Brilliant Blue R250 (Sigma C-7920) ; Bromophenol blue (Merck, 8122-0025) ; Marker Protein (Biorad) ; Glisin (Sigma G7403) ; Ampholite (Sigma, A10043) ; Ethanol (Merck) ; Methanol (Merck, 822158) ; Complete Freund's Adjuvant (CFA, Sigma F585) dan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma F5506). Anti-Goat-IgG AP (Biorad, S3831) ; Diethanolamine (Sigma, D0683) ; pNPP (para-Nitro-Phenylphosphat, Sigma N9389) ; Membran Nitroselulosa (Sigma, M0250). Hormon PGF₂ α (Lutalyse TM Dinoprost Tromethamin 5 mg/ml Pharmacia N. VI S.A Puurs-Belgium), Antibodi Monoklonal EPF (Knoxville, TN), Semen beku, Alkohol 70% serum darah sapi, eritrosit domba 0,5% dan kapas.

Sejumlah peralatan yang digunakan berupa disposable syringe 1 ml, 5 ml dan 20 ml (Terumo Co., Europe), tabung reaksi venoject 5 ml, 10 ml dan 20 ml, rak tabung venoject, peralatan

untuk laboratorium seperti SDS-PAGE, Elusi, Western Botting, serta uji ELISA ; meliputi mikropelat bentuk datar “U”, pipet eppendroof 20-200 μ l dan 1-10 μ l, water bath, freezer -40°C , refrigerated centrifuge, centrifuge vortexer, pH meter merk Schoot-Gerate tipe CG 820, Autoclave, Biorad electrophoresis (Vertikal dan Horisontal), mikropipet, up-mikropipet, kantong dialysis/selofan (Sigma, D9652), dot blotter (Biorad), transfer blotter (Biorad), ELISA plate dan reader (biorad), Gun inseminasi, pipa fiber, kamera. Sedangkan untuk uji Hi terdiri dari ; mikropelat bentuk V, pipet dropper 0,025 ml dan 0,05 ml, diluter 0,025 ml.

3.3 METODE PENELITIAN

3.3.1 Tahap Koleksi dan Purifikasi EPF Kotiledon Sapi FH Bunting

Kotiledon diambil dari satu ekor sapi yang bunting 3 bulan. Kemudian kotiledon ditimbang dan didapatkan sebanyak 1 gram. Kotiledon dipotong dan dicuci dengan PBS azida. Selanjutnya kotiledon digerus dan ditambah PBST 10 kali. Gerusan kotiledon dimasukkan ke vial 10 ml lalu disonikasi selama 10 menit. Kemudian dilakukan sentrifuge pada 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dengan endapan, endapan dibuang, selanjutnya supernatan disonikasi selama 10 menit dan

disentrifuge pada 1000 rpm, 4°C, selama 20 menit. Kemudian supernatan dipisahkan dengan endapannya. Endapan ditampung di vial 10 ml dan ditambah Tris-Cl 50 ml, diberi kode E, selanjutnya dimasukkan ke freezer -40°C. Supernatan yang diduga mengandung EPF ditambahkan etanol absolute dengan perbandingan 1:1, diamkan sampai terbentuk endapan, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terbentuk ditambah Tris-Cl dan disimpan dalam freezer -40°C. Bahan ini merupakan sediaan untuk analisis pada SDS-PAGE maupun Western Blotting.

3.3.2 Tahap Identifikasi Protein EPF Dengan Teknik SDS-PAGE

Identifikasi dengan teknik SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran protein EPF yang ditunjukkan melalui area (pita-pita dari protein). Tahapan-tahapan yang harus dilakukan adalah mencetak running gel dan membuat separating gel. Bahan-bahan untuk pembuatan running gel dimasukkan ke dalam glass plate sampai bawah batas atas. Selanjutnya permukaan bagian atas running gel diratakan dengan menambahkan aquades. Langkah ini dilanjutkan dengan menambahkan stacking gel dalam cetakan running gel sampai penuh. Comb dimasukkan dalam stacking gel, dan inkubasikan selama 25 menit pada suhu kamar sampai memadat. Lalu comb dilepas dan dibersihkan dari sisa-sisa gel. Cetakan gel yang telah siap dimasukkan ke dalam

Chamber (bak Elektroforesis) kemudian direndam dengan running buffer. Suspensi serum yang mengandung EPF sebanyak 35 μ l dimasukkan ke lubang sumuran cetakan, selanjutnya Elektroforesis dialiri arus listrik 130 V, 30 mA, selama 1,5 jam hingga reaksi gel mencapai dasar chamber. Alat dimatikan, plate dibuka dan dipisahkan. Lembaran gel hasil running diwarnai dengan commasite blue, digoyang 30 menit, lalu diangkat, lalu ditambahkan cairan destaining, lalu digoyang 30 menit, jika cairan sudah terlihat berwarna birudiganti dengan cairan destaining yang baru, begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasil yang berupa band-band (pita-pita). Berat molekul akan dapt terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003).

3.3.3 Tahap Uji Spesifitas Protein EPF Dengan Teknik Western Blotting

Serum sapi bunting yang diduga mengandung protein *Early Pregnancy Factor* (EPF) dirunning dalam SDS-PAGE 12% dalam kondisi tereduksi bersama “marker EPF” dan ditransferkan pada membran Nitrosellulosa. Membran di blok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-Cl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama 1 jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung BSA 1% dengan *antibody monoclonal* EPF (Knoxville, TN). Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder

(Anti Rabbit-IgG-AP) pengenceran 1:2500 dan anti EPF, pengenceran 1:2500 dan ditambahkan substrat Western Blue. Pita yang muncul adalah pita protein Early Pregnancy Factor (EPF) sehingga bisa diketahui BM protein EPF dari serum (Upstate, 2002).

BAB IV

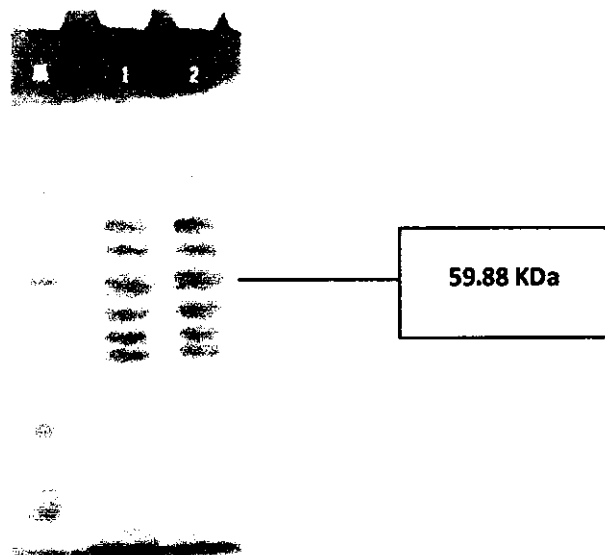
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil dari metode SDS-PAGE

Metode SDS-Page ini bertujuan untuk mengetahui gambaran protein EPF yang di tunjukkan melalui area (pita-pita protein)



Gambar 4.1 Hasil Metode SDS PAGE kotiledon sapi bunting

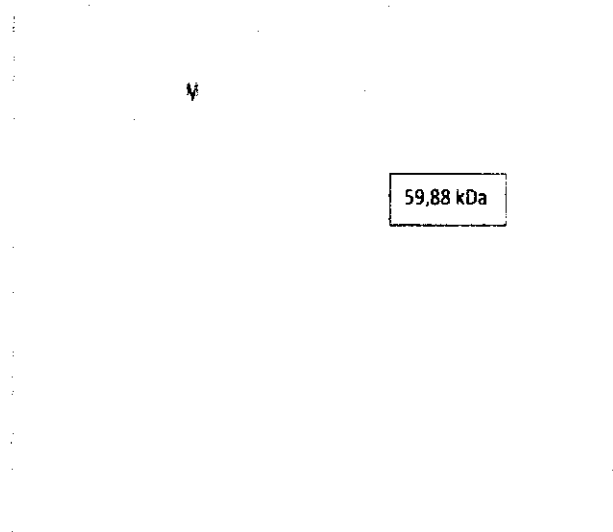
Keterangan :

- M : Marker
- 1 : Sampel protein kotiledon
- 2 : Sampel protein kotiledon

Hasil dari SDS-PAGE kotiledon sapi bunting ini masih berupa berat molekul dari pita-pita protein kasar, belum spesifik pada berat molekul EPF.

Metode berikutnya yaitu dilakukannya uji spesifitas agar dapat diketahui BM EPF secara spesifik.

4.2 Hasil Western Blotting pita-pita protein



Gambar 4. 2 Hasil *Western Blotting* untuk menentukan BM protein EPF kotiledon sapi

Keterangan

- M : Marker
- 1. 1 : Ulangan ke 1
- 1. 2 : Ulangan ke 2
- 1. 3 : Ulangan ke 3

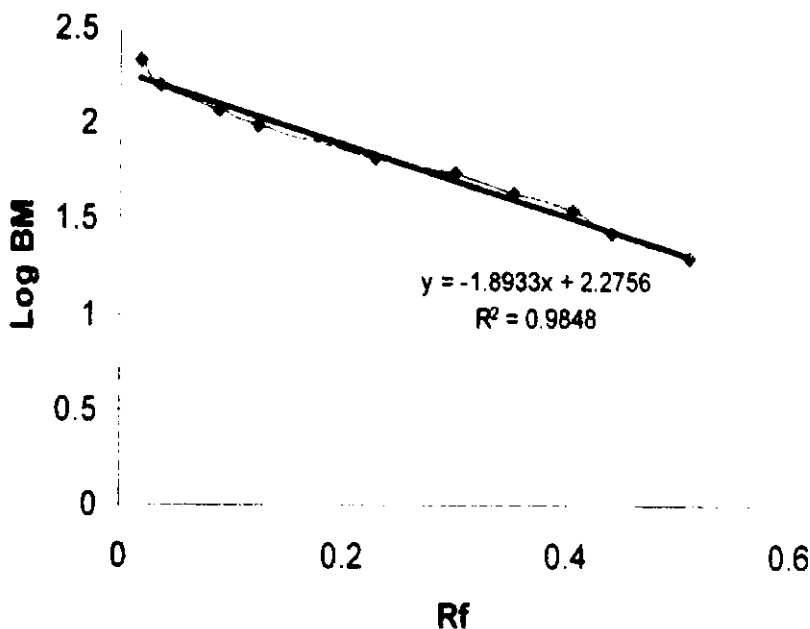
Setelah di lakukannya metode Western Blotting di hasilkan identifikasi protein yang spesifik EPF karna telah di beri marker dari anti-EPF itu sendiri, dan warna yang di munculkan dalam hasil ini adalah karena menggunakan indikator pewarnaan western blue. Di dapatkanlah hasil yang tampak yaitu Berat Molekul 59.88 kDa.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V**PEMBAHASAN**

Hasil dari metode awal dengan menggunakan SDS PAGE merupakan pita-pita protein yang menggambarkan protein yang masih kasar dari kotiledon sapi bunting, menunjukkan hasil pada angka 20 hingga 212 Kda pada marker. Kemudian Penentuan Berat Molekul dilakukan dengan bantuan protein standar, Berat Molekul isolat EPF di tentukan dengan mengplotkan harga Rf yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -1.8933X + 2.2756$ kurva hubungan antara Rf (X) dengan Log BM protein standar (Y) (gambar 5.1).



Gambar 5.1 Kurva hubungan antara Rf dengan log BM protein standar

Pita protein yang diidentifikasi dari protein kotiledon dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Rf(X)	Log BM (Y)	BM kDa
0.0526	2.176012	149.97
0.0702	2.142690	138.89
0.0877	2.109558	128.69
0.1404	2.009781	102.28
0.2632	1.777283	59.88
0.2982	1.711018	51.41
0.3684	1.578108	37.85
0.5439	1.245834	17.61
0.5789	1.179569	15.12

Tabel 5.1 Berat molekul pita-pita protein kotiledon sapi bunting

Setelah diketahui Berat Molekul dari pita-pita protein yang diambil dari kotiledon sapi betina bunting. Untuk selanjutnya pita-pita protein ini dipotong dan dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan metode *Western Blotting* untuk mendapatkan Berat Molekul EPF secara spesifik. Karena pita-pita yang dihasilkan dari metode SDS-PAGE ini masih tercampur dengan protein-protein yang lain. Karena kisaran besar Berat Molekul yang terdapat pada lembaran SDS-PAGE yaitu antara 15.12 kDa (BM yang paling kecil) hingga 149.97 kDa (BM yang paling besar) jadi ada kemungkinan protein EPF spesifik ada dalam substansi ini. Early Pregnancy Factor (EPF) merupakan substansi yang memiliki struktur glikoprotein dengan berat molekul berkisar antara 43-90 KDa (Xie *et al.*, 1997; Karen *et al.*, 2001)

Setelah diisolasi melalui SDS PAGE selanjutnya dilakukan uji spesifitas terhadap EPF dengan metode *Western Blotting* dengan tujuan memastikan bagian

EPF adalah benar-benar terkandung dalam sampel yang di uji. Kecepatan dalam pemeriksaan kebuntingan ini juga harus di perhitungkan dalam melaksanakan pemeriksaan kebuntingan. *Early Pregnancy Factor* (EPF) merupakan antigen khusus yang dapat di temukan dalam darah induk mamalia sejak umur 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Selama ini umur kebuntingan dapat di tentukan sejak hari ke 21 dan 22, namun akurasi dari metode ini masih di anggap rendah, mengingat bahwa peningkatan progesterone juga terjadi pada hewan yang tidak bunting, yaitu selama fase luteal dalam siklus birahi (Hafez, 2000). Tes kebuntingan dini dengan metode EPF di harapkan dapat menjadi alternatif karena dapat dilakukan dengan cepat, mudah dan murah.

Setelah dilakukannya metode *Western Blotting* dihasilkan identifikasi protein yang spesifik EPF karena telah diberi marker dari anti-EPF itu sendiri, dan warna yang di munculkan dalam hasil ini adalah karena menggunakan indikator pewarnaan western blue. Sehingga dapatkanlah hasil yang tampak yaitu Berat Molekul 59.88 kDa.

Dengan di dapatkannya hasil akhir dari isolasi dan identifikasi EPF dari kotiledon sapi bunting ini diharapkan menjadi salah satu kandidat dalam membuat diagnosa kebuntingan dengan mudah dan akurat. Diagnosa kebuntingan dini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah induk seperti *Early Pregnancy Factor* (EPF) dan (b) dengan mendeteksi substansi non spesifik yang ada dalam darah, urine, atau air susu selama kebuntingan seperti progesterone, esterone sulphate (Hafez, 2000)

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

Selain berguna sebagai kandidat diagnosis kebuntingan, EPF juga dapat digunakan untuk membedakan antara kegagalan pembuahan dan kegagalan implantasi, seperti dalam pemantauan beresiko (Cavanaugh, 1996) sehingga dalam proses reproduksi hewan ternak EPF ini sangat bermanfaat. Dalam pengembangan pembuatan *dipstick* atau *paper strip* di Indonesia, ada beberapa kendala yang dihadapi salah satunya adalah produksi anti-EPF yang diperlukan untuk identifikasi ikatan EPF dengan anti-EPF nya. Selain harus memproduksi dalam jumlah yang banyak anti-EPF juga memerlukan waktu yang cukup lama dalam produksinya. Sehingga penelitian lebih lanjut sangat dianjurkan untuk meminimalisir kendala-kendala yang dihadapi.

Indonesia yang merupakan Negara berkembang berlainan dengan negara maju, disamping kendala suatu tes kebuntingan, kepraktisan dan biaya pemeriksaan yang murah merupakan suatu faktor yang sangat perlu di pertimbangkan dalam pemilihan suatu tes kebuntingan untuk hewan ternak.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.2 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

- Protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) dari kotiledon sapi bunting dapat diidentifikasi melalui metode SDS PAGE.
- Melalui uji *Western blotting* dapat diketahui spesifitasnya dengan berat molekul 59.88 KDa, sehingga dapat digunakan untuk kandidat diagnosis kebuntingan pada sapi.

6.1 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diajukan saran sebagai berikut:

Perlu penelitian lebih lanjut tentang EPF yang terdapat dalam kotiledon, dengan cara di produksi lebih banyak, diharapkan dengan penelitian tersebut dapat meminimalisir kendala-kendala yang akan terjadi dalam proses pembuatan KIT diagnosis kebuntingan pada sapi dan di aplikasikan di lapangan. Setelah terbukti dapat mendiagnosis kebuntingan barulah di buat dalam bentuk *paper strip* atau *dipstick*.

RINGKASAN

RINGKASAN

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum cukup berarti bahkan cenderung mengalami penurunan menjadi latar belakang masalah penelitian ini. Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas tinggi dapat tercapai dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi, perkawinan dan diagnosa kebuntingan yang tepat.

EPF merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan dalam darah induk sapi sejak umur kebuntingan 7 hari. Dengan mendeteksi adanya EPF dalam darah sapi bunting dapat dipastikan kebuntingannya.

Metode yang digunakan untuk mengetahui identitas EPF dari kotiledon sapi bunting dalam penelitian ini menggunakan metode SDS-PAGE dan metode Western blotting untuk mengetahui spesifitasnya.

Optical Density dari EPF yaitu nilai absorbansinya dikonversikan dengan kurva standar EPF sehingga dapat diketahui rumus regresi liniernya. Berdasarkan rumus tersebut maka dapat diketahui nilai titer antibodi EPF.

Sampel yang digunakan adalah kotiledon sapi bunting dari RPH (Rumah Potong Hewan) Pegirikan Surabaya yang sudah tanggal gigi 2 kali dan bunting 3 bulan. Hasil penelitian menunjukkan saat dilakukan metode SDS-PAGE dapat diketahui identitas pita-pita protein dengan kisaran berat molekulnya antara 15.12 kDa hingga 149.97 kDa, karena belum spesifik maka dilakukan uji spesifitas yang selanjutnya yaitu metode *Western Blotting*. Pada saat dilakukan metode ini di

dapatkan hasil yang diinginkan yaitu muncullah pita dengan berat molekul 59.88 kDa. Dengan hal ini dapat dibuktikan bahwa dalam kotiledon sapi betina bunting dapat diidentifikasi sebagai EPF spesifik.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: *Early Pregnancy Factor* (EPF) dengan berat molekul sebesar 59,88 KDa dapat digunakan untuk kandidat diagnosis kebuntingan. Saran yang diberikan yaitu perlu penelitian lebih lanjut untuk pembuatan kit diagnosis kebuntingan *paper strip* atau *dipstick*.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2001. Jawa Timur Dalam Angka. Badan Statistik Propinsi Jawa Timur. Hal. 163.
- Artama, W.T. 1992. Antibodi Monoklonal, Theori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. Hal. 8-9, 28-31.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Cetakan Pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal. 28-45.
- Bach JF, Antonie B. In vitro Detection of Immunosuppressive Activity of Anti-Lymphocyte Sera. *Nature*. 1968 ; 217 (5129) : 658-659.
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosa Penelitian. Gajah Mada University Press. 163-167.
- Butler, J.M., Hamilton W.C, Sasser R.G, Ruder C.A, Hass G.M, Williams R.J. 1982. Detection and Partial Characterization of Two Bovine Pregnancy Specific Protein. *Biology Reproduction* 26 : 925-933.
- Cavanaugh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10 : Implication for Understanding Its Role. *Journal of The Society for Reproduction and Fertility-Reviews of Reproduction* Volume I pp.28-32.
- Chard, T. 1982. An Introduction to RIA and Related Techniques. 2nd Ed. Amsterdam : Elsevier Biomedical Press.
- 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.
- Diane, E.S. 1995. Examination and Board Review Medical Biostatistics and Epidemiology. 1st ed. a Lange medical book. Norwalk, Connecticut.
- DuPlants, L.J. 2000. Early Pregnancy Factor. *Lifeissues. Net.* Kochi, Japan. All Right Reserved. Pp 1-2.
- El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-MBoko and J.F. Beckers. 2000. Pregnancy-associated Glycoprotein in Bos Taurus and Bos Taurus Indicus. *Theriogenology* 53 : 283.
- El Amiri, B., B. Remy, N.M. Sousa, J.F. Beckers. 2004. Isolation and Characterizations of Eight Pregnancy-Associated Glycoproteins Present

- at high level in The Ovine Placenta Between Day 60 and Day 100 of Gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 169-181.
- Engvall E, Perlman P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8 (9) : 871-4.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi Keempat. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Garbayo, J.M., B. Remy, J.L Alabart., J.Folch, R. Wattiez, P. Falmange, and J.F Beckers. 1998. Isolation and Partial Characterization of Pregnancy Associated Glycoprotein Family From The Goat Placenta. *Biol. Reprod.* 58: 109-115.
- Green, J.A., S. Xie, X. Quan, B. Bao, X. Gan, N. Mathialagan, J.F Beckers, and R.M Robert. 2000. Pregnancy Associated Glycoproteins Exhibit Spatially and Temporal Distinct Expressions Pattern During Pregnancy. *Biol Reprod.* 62 : 1624-1631.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia. 172-181.
- Hardjopranjoto, S. 1982. *Physiology Reproduksi*. Edisi kedua. Cetakan ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjopranjoto, S. 1987. *Pembuahan In Vitro dan Transfer Embrio*. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Harlow, E and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB. Bandung. 13-26, 41-45, 74-104.
- Karen, A., P. Kovacs, J.F Beckers, and O. Szenci. 2001. Pregnancy Diagnosis in Sheep : Review of The Most Practical Methods. *Acta Vet. Brno* 70 : 115-126.
- Karen, A., J.F Beckers, J. Sulon, N.M Sousa, K. Szabados, reczigel, and O. Szenci. 2003. Early Pregnancy Diagnosis in Sheep By Progesteron and Pregnancy Associated Glycoproteins Test. *Theriogenology* 59 (9) : 1941-1948. (Abstract).
- 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.
- Kresno, SB. 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 407-414.
- Kusriningrum. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya. 18, 98-100.
- Likes, R.L. 2002. *Pregnancy Diagnosis*. Departement of Emergency Medicine. Darnall Army Community Hospital. Pp 1-9.
- 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*. Cetakan 1. Airlangga University Press. Surabaya.
- Salisbury, G.W, and N.L. Van de Mark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 157-163.
- Samik, A. 1989. *Hubungan Umur Sapi, Bulan Laktasi dan Produksi Susu dengan Kadar Total Protein, Albumin, Total Globulin dan Gama Globulin Serum Darah Sapi Frisan Holstein*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 25-32.
- Setiadi, B. 2001. *Standardisasi Mutu Bibit Kambing dan Domba : Suatu Tinjauan Karakteristik Biologik dan Alternatif Pertimbangannya*. Balai Penelitian Ternak Surakarta. 2, 8-10, 13.
- Smith, J.R. 1995. *Produksi Serum Hiperimun. Dalam Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian*. James Cook University of North Queensland. G.W. Burgess Ed.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1995. *Principles and Procedures of Statistics A Biometrical Approach*. International Student Edition. Mc Graw-Hill Koga Kusha, LTD. P. 137-167.
- Suwarno, R. Ernawati, A.P Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani, dan F.A Rantam. 2003. *Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA*. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 1-10.
- Toelihere, M.R. 1981. *Ilmu Kemajiran Ternak*. Edisi pertama. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Xie, S., R.J Nagel, J. Green, J.F Beckers, and R.M Robert. 1996. *Trophoblast Spesific Processing and Phophorylation of Pregnancy*

Associated Glycoprotein-1 In Day 15 to 25 Sheep Placenta. *Biol Reprod.* 54 : 122-129.

Xie, S., J.A Green, B. Bao, J.B Bixby, B. Szafranska, J.C DeMartini, S. Hecht, and R.M Robert. 1997. The Diversity and Evolutionary Relationship of The Pregnancy Associated Glycoproteins An Aspartic Proteinase subfamily Consisting of Many Trophoblast Expressed Genes. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 94 : 12809-12816.

Xie, S., J.A Green, B. Bao, J.F Beckers, K.E Veldez, L. Hakami, and R.M Robert. 1997. Multiple Pregnancy Associated Glycoproteins Are Secreted By Day 100 Ovine Placental Tissue. *Biol Reprod.* 57 : 1384-1393 (Abstract).