

SKRIPSI

DIAGNOSA KEBUNTINGAN PADA KAMBING MENGUNAKAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-EARLY PREGNANCY FACTOR SAPI



Oleh :

ALVI AQUARIYANTI
060413323

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**DIAGNOSA KEBUNTINGAN PADA KAMBING
MENGUNAKAN ANTIBODI POLIKLONAL
ANTI-EARLY PREGNANCY FACTOR SAPI**

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

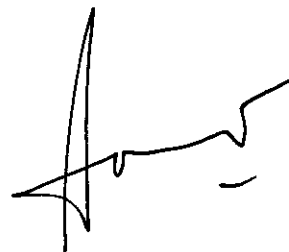
Oleh :

ALVI AQUARIYANTI
NIM 060413323

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



Herman Setyono, MS., drh.
Pembimbing pertama



Indah Norma Triana, M.Si., drh.
Pembimbing kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**DIAGNOSA KEBUNTINGAN PADA KAMBING
MENGUNAKAN ANTIBODI POLIKLONAL
ANTI-EARLY PREGNANCY FACTOR SAPI**

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 Desember 2008



ALVI AQUARIYANTI
NIM. 060413323

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 11 November 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Widjiati, M.Si., drh.
Sekretaris : Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.
Anggota : Tatik Hernawati, M.Si., drh.
Pembimbing I : Herman Setyono, M.S., drh.
Pembimbing II : Indah Norma Triana M.Si., drh.

Telah diuji pada

Tanggal : 27 November 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Widjiati, M.Si., drh.

Anggota : Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.

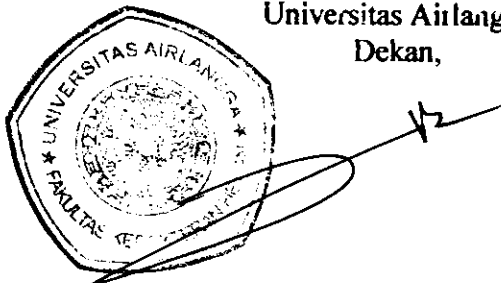
Tatik Hernawati, M.Si., drh.

Herman Setyono, M.S., drh.

Indah Norma Triana M.Si., drh.

Surabaya, 27 November 2008

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh
NIP. 130687305

PREGNANCY DIAGNOSING IN GOAT USING BOVINE ANTI-EARLY PREGNANCY FACTOR POLYCLONAL ANTIBODY

Alvi Aquariyanti

ABSTRACT

The objective of this experiment was to determine goat pregnancy using bovine anti-early pregnancy factor polyclonal antibody. Experiments were carried out on thirty Ettawah crossbred female goats aged between 1.5-2 years old. Each goat was having oestrus synchronized with 1 g progestogen and artificial inseminated with fresh semen diluted in fresh milk. Then, for assessment of pregnancy using bovine early pregnancy factor polyclonal antibody 5 ml blood was taken on 7, 14, 21, 28 days after mating. ELISA direct test was performing the appearance of early pregnancy factor antibody as well as the highest OD result. Sensitivity, specificity, negative predictive value, positive predictive value test were applied in order to identify how much the accuracy of bovine early pregnancy factor polyclonal antibody in goat pregnancy diagnosing. Bovine early pregnancy factor polyclonal antibody detects pregnancy with an accuracy 94,44% and a high specificity (91,67%) from day 21 of gestation. In conclusion EPF that is from bovine cotyledon was reliable for detecting pregnancy in goat.

Key words: Early Pregnancy Factor, Pregnancy diagnosing, Goat, Bovine, ELISA direct.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul

UJI SENSITIVITAS EARLY PREGNANCY FACTOR YANG BERASAL DARI SAPI TERHADAP KEBUNTINGAN KAMBING

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., Drh. Atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Herman Setyono, M.S., drh. selaku pembimbing pertama, Ibu Indah Norma Triana M.Si., drh. selaku pembimbing kedua dan Ibu Ira Sari Yudaniayanti, MP., drh. selaku dosen wali atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Ibu Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku ketua penguji, Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku sekretaris penguji, dan Ibu Tatik Hernawati, M.Si., drh. selaku anggota penguji.

Bapak Abdul Samik, M.Si., drh. selaku dosen penelitian yang telah banyak memberikan nasehat dan bimbingan kepada penulis dan Dr. Aullanni'am, DES., drh serta seluruh staf laboratorium Biologi Molekuler fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Ayah, Ibu dan Mbah Sumasri yang telah mendidik, memberikan segalanya dan doa restunya – I wouldn't be the person I am today without you. My everything, my heroes.

Adik Radika, Dafa dan Mbak Fatima tercinta dan tersayang yang telah memberikan semangat dan dorongan kepada penulis.

Keluarga besar Mbah Mislan dan Mbah Karman yang telah menghantarkan penulis pada banyak keberhasilan.

Sahabat tersayang Amit Sharma – The special person who I find is so often the inspiration for so many things in my life. A best friend of mine that has always been there. And continues to be there, even when I can't see him. When an occasion arose to celebrate their love and friendship yet again, I found mere words were simply not enough.

Kakakku tercinta Osaf Ahmed Khan - It's for me that you push away your own rain so that I may find comfort in calling your name. You have wings that I know not only I can see because only an angel could find strength to carry me. To that angel out there, I love you so much. May Allah always protect you.

Teman-teman penelitian Melati, Sonny dan Dianti dan teman-teman tercinta Khalid Al-Sawad – My little heart breaker brother, Rina, Rinda, Nunuk, Ito', Mbak Ita, Meme, Mas Mario, Hari, Mbak Indah, Ahmed Habsyi – Abangku, Mas Eddy – My motivator, AA, Sekhran, Aang Habsyi, Mas Kido dan teman-teman di British Coucil, Era, Peni, Endhah, Galuh, Reni, Yulia, Mbak Fatma, Mbak Yunina, Susi, Airlangga atas bantuan dan doanya. Terima kasih kepada teman-teman 2004 yang

tidak bisa saya ucapkan satu persatu yang telah banyak membantu dan memberi hari – hari yang indah.

Arfi, Sasha dan Ratna – thank you for listening, supporting me, cheering me up, and basically, just being there for me during a very trying time in my life. Your names hang right beside your smiling faces.

Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu.

Akhirnya penulis masih menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, hasil – hasil yang dituangkan dalam skripsi ini diharapkan dapat bermanfaat bagi pengembangan peternakan di Indonesia.

Surabaya, Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iii
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN.....	 1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Landasan Teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	7
1.5. Manfaat Penelitian.....	7
1.6. Hipotesis Penelitian.....	7
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 8
2.1. Siklus Reproduksi dan Birahi.....	8
2.2. Fertilisasi dan Kebuntingan.....	9
2.3. Selaput Ekstra Embrionik atau Selaput Fetus.....	10
2.4. <i>Early Pregnancy Factor</i> (EPF).....	13
2.4.1. Tinjauan tentang EPF.....	13
2.4.2. Bioassay EPF.....	17
2.5. Sistem Imun.....	18
2.5.1. Antibodi.....	19
2.6. Imunoassay Untuk Identifikasi Ikatan Antigen-Antibodi EPF...	21
 BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	 22
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.2. Materi Penelitian.....	22
3.2.1. Bahan Penelitian.....	22
3.2.2. Alat Penelitian.....	22
3.3. Metode Penelitian.....	23
3.3.1. Tahap Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan pada Kambing.....	23

3.3.2. Imunoasai dengan Metode <i>ELISA Direct</i>	24
3.4. Peubah yang Diamati.....	25
3.5. <i>Diagnosability</i> Bahan EPF.....	25
3.6. Analisa Data.....	26
BAB 4 HASIL PENELITIAN	27
4.1. Pengukuran <i>Optical Density</i> Protein <i>Early Pregnancy Factor</i> pada Kambing.....	27
4.2. <i>Diagnosability Early Pregnancy Factor</i> Sapi Terhadap Kebuntingan Kambing.....	28
BAB 5 PEMBAHASAN	30
5.1. <i>Diagnosability</i> Bahan EPF Sapi pada Kambing.....	30
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	35
6.1. Kesimpulan.....	35
6.2. Saran.....	35
RINGKASAN	36
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Kadar Protein <i>Early Pregnancy Factor</i> pada 21 hari pasca IB.....	28
4.2. Jumlah Perbandingan Diagnosa Kebuntingan Kambing Menggunakan Protein Spesifik <i>Early Pregnancy Factor</i> yang Berasal dari Kotiledon Sapi dengan Palpasi Abdominal.....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. <i>Direct</i> ELISA.....	21
3.1. Inseminasi Buatan pada vagina kambing.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan Pengenceran Semen dengan Air Susu.....	44
2. Prosedur <i>ELISA Direct</i>	45
3. Nilai Absorbansi (OD) Protein EPF pada Pengenceran 1:20.....	47
4. Hasil Penelitian Dibandingkan dengan Palpasi Abdominal (90 hari pasca IB).....	48
5. Perhitungan Konsentrasi EPF Lewat Kurva Standar.....	49
6. Hasil Diagnosability Bahan EPF.....	55
7. Alur Skema Penelitian.....	57
8. Pengambilan Darah pada Kambing Melalui Vena Jugularis.....	58
9. Proses Pengerjaan <i>ELISA Direct</i>	58
10. Hasil identifikasi protein EPF dengan metode <i>ELISA Direct</i>	59
11. Hasil Pembacaan <i>Optical Density</i> dengan <i>ELISA Reader</i>	59
12. <i>Plate Layout ELISA Direct</i>	60

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
PGF_{2α}	= Prostaglandin F_{2α}
ELISA direct	= Enzyme Linked Immunosorbant Assay direct
IB	= Inseminasi Buatan

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1. 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.

Peningkatan produktivitas ternak dewasa ini menjadi tuntutan utama seiring dengan pencanangan swasembada daging. Karena itu, deteksi kebuntingan merupakan faktor yang penting di dalam usaha peningkatan produktivitas ternak. Namun sampai saat ini deteksi kebuntingan yang dilakukan memiliki beberapa kelemahan. Antara lain akurasi yang rendah, bahaya kegagalan kebuntingan yang tinggi, kurang aplikatif bagi masyarakat, dan harga yang mahal. Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Salah satu cara diagnosa kebuntingan dengan pemeriksaan hormon seperti progesteron, dilakukan dengan mengukur sampel serum darah menggunakan *Radioimmunoassay* (RIA). Diagnosa ini dilakukan pada umur kebuntingan 17-18 hari dengan angka keberhasilan 85 %. Teknik RIA ini belum dapat dilaksanakan secara cepat di lapangan karena pelaksanaan yang sulit, harga kit yang mahal dan bahan-bahan untuk keperluan RIA sulit diperoleh. Metode lain untuk diagnosa

kebuntingan adalah dengan mendeteksi antigen khusus kebuntingan. Antigen khusus yang dimaksud adalah suatu protein yang dihasilkan oleh embrio dalam darah induk (Hunter, 1995).

Xie *et al.* (1996) mendeteksi *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada induk sapi sejak umur kebuntingan tiga minggu. Konsentrasi EPF dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Karen *et al.* (2001) berhasil mendeteksi substansi ini pada umur kebuntingan tiga sampai empat 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. Dlaporkan pula banyaknya konsentrasi EPF tampak menurun drastis setelah empat minggu post partum.

Produksi serum hiperimun (antiserum) yang mengandung antibodi dapat dilakukan melalui imunisasi terhadap hewan dengan suatu imunogen spesifik. Antibodi didapat dengan jalan mengumpulkan sampel darah dari hewan yang diimunisasi (Smith, 1995; Karnen, 2001). Hampir semua molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, hormon, asam nukleat dan protein dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik yang mampu merangsang aktivasi limfosit yang diperlukan untuk mengawali respon imun (Kresno, 1996). Substansi dapat dikatakan bersifat imunogen jika berat molekul lebih dari 10.000 Dalton (Goodman, 1991; Abbas *et al.*, 2000).

Berat molekul *Early Pregnancy Factor* pada kambing berkisar 20-200 KD dan digolongkan menjadi dua yaitu EPF-A dan EPF-B. Aktivitas EPF akan hilang bila terpisah (Clarke *et al.*, 1980; Clarke and Wilson, 1982; Wilson *et al.*, 1983).

EPF-A dihasilkan oleh saluran sel telur dan EPF-B dihasilkan oleh ovarium (Morton *et al.*, 1982; Cruz *et al.*, 2001). EPF pertama kali ditemukan sebagai pregnancy-associated substance dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000). EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Sedangkan El Amiri *et al.* (2000) mengemukakan bahwa pada lapisan superfisial dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAGs). Menurut Chard (1982) preparat hormon dengan berat molekul yang besar mempunyai sifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antigen untuk dapat menginduksi timbulnya antibodi spesifik terhadap antigen tersebut.

Antisera terhadap EPF yang dibuat pada kambing dapat digunakan untuk tes diagnostik kebuntingan. Diagnosis kebuntingan ini dilakukan dengan cara mendeteksi antigen khusus yang dihasilkan oleh embrio dalam darah induk kambing bunting (Hunter, 1995).

Perenyi *et al.* (2002) menyarankan bahwa lebih baik menggunakan antisera *caprine* PAG untuk mendeteksi PAG pada sapi bunting dan anggota serumpun.

Xie *et al.* (1996) mengidentifikasi cDNA untuk bo.PAG-1 dan ovPAG-1 dan mampu menarik rangkaian asam amino dari kedua protein tersebut. Seperti diprediksikan dari cDNanya ovPAG-1 dan bo.PAG-1 adalah asam amino 382 dan 380 dengan bobot molekular 42985 dan 42852. Struktur-struktur tersebut meliputi rangkaian sinyal residu 15 dan 38-residue-pro-peptide, sehingga bobot molekular

dari polipeptida matang tersebut secara teoritis sekitar 36805 dan 36731 untuk ovPAG-1 dan boPAG1.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut: Apakah antibodi poliklonal anti-*Early pregnancy factor* yang berasal dari kotiledon sapi betina bunting dapat digunakan untuk mendeteksi kebuntingan umur 21 hari pada kambing?

1.3. Landasan Teori

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

Xie *et al.* (1996) mendeteksi *Early Pregnancy Factor* (EPF) pada induk sapi sejak umur kebuntingan tiga minggu. Konsentrasi EPF dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Karen *et al.* (2001) berhasil mendeteksi substansi ini pada umur kebuntingan tiga sampai empat 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 empat minggu post partum.

Early Pregnancy Factor (EPF) dikelompokkan sebagai antigen khusus yang telah di isolasi sebagai *Pregnancy Specific Protein-B* (PSP-B) oleh (Garbayo *et al.*, 1998). Substansi antigen yang serupa antara lain *Pregnancy Associated Glycoprotein-1* (PAG-1), *Ovine Pregnancy Associated Glycoprotein* (ov.PAG), serta *Ovine Pregnancy Specific Protein-B* (ov.PSP-B) juga telah di isolasi oleh El Amiri *et al.* (2004) dari plasenta hewan pemamah biak. Menurut Green *et al.* (2000), Karen *et al.* (2001) dan Karen *et al.* (2003) ov.PAG di sintesa 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 perkiraan berat molekul relatifnya sangat beragam berkisar dari 47 hingga 90 kDa. Dari hasil karakterisasi ternyata banyak ov.PAG yang memiliki berat molekul 43-67 kDa (Xie *et al.*, 1997^b; 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 di manfaatkan 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: mendeteksi fertilisasi dan

implantasi ataupun untuk memonitor kelangsungan perkembangan embrio dan feiuis, karena secara fisiologis EPF mempengaruhi implantasi embrional (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000; Karen *et al.*, 2001).

Atkinson *et al.* (1993) menggunakan pendekatan berbeda untuk memurnikan antigen-antigen plasenta domba. Prosedur tersebut meliputi langkah purifikasi immunoafinitas dengan antibodi monoklonal yang mengenali epitop karbohidrat spesifik plasenta sehingga dapat diketahui tiga glikoprotein spesifik sel binukleat dengan massa 69, 62, dan 57 kDa. Protein-protein tersebut memiliki homologi atau kesamaan rangkaian parsial terhadap oPAG-1, bPAG-1, dan pepsinogen F kelinci, dan bereaksi silang dengan antisera poliklonal yang didapatkan setelah imunisasi kelinci dengan oPAG-1, bPSP-B.

Penggunaan *bovine* PSP-B dengan metode RIA *test* secara akurat dapat mendeteksi kebuntingan (100%) dan tidak bunting (83%) pada kambing dan domba pada hari ke-26 sampai hari ke-106 kebuntingan dikarenakan adanya reaksi silang antara antigen domba dengan antibodi *bovine* PSP-B, begitu juga dengan antigen kambing (Karen *et al.*, 2001).

Konsentras: PAG pada domba merino betina yang telah diinseminasi buatan pada hari ke-22 dideeteksi dengan *double antibody radioimmunoassay* heterolog dengan menggunakan *bovine* PAG 67 kDa sebagai pelacak dan standar, dan antiserum kelinci pelawan *caprine* PAG 55 dan 59 kDa sebagai antibodi pertama (Karen *et al.*, 2001).

Immunoreaktivitas fraksi total protein domba diperoleh melalui prosedur purifikasi yang dimonitor dengan *radioimmunoassay* heterolog menggunakan

boPAG-1 murni sebagai standar dan *tracer* dan dikombinasi dengan tiga antisera berbeda ovine PAG atau caprine PAG (caPAG₅₅₊₅₉ dan caPAG₅₅₊₆₂) (El Amiri *et al.*, 2004).

1.4. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui apakah antibodi poliklonal anti-*Early pregnancy factor* yang berasal dari kotiledon sapi betina bunting dapat digunakan sebagai bahan deteksi kebuntingan dini pada kambing.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* (EPF) dari sapi bunting yang diproduksi pada kambing sebagai salah satu alternatif bahan deteksi kebuntingan dini pada kambing.

1.6. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, landasan teori maka hipotesis penelitian:

Antibodi poliklonal anti-*Early pregnancy factor* yang berasal dari kotiledon sapi betina bunting dapat digunakan sebagai bahan untuk deteksi kebuntingan umur 21 hari pada kambing.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Siklus Reproduksi dan Birahi

Siklus reproduksi adalah siklus perkembangbiakan hewan betina setelah mencapai masa pubertas. Siklus ini akan berulang tiap satu jangka waktu tertentu, sehingga merupakan kurun waktu antara beranak sampai beranak berikutnya. Satu siklus reproduksi dibagi menjadi tiga fase yaitu fase pregraviditas, meliputi proses birahi, ovulasi, kopulasi dan fertilisasi. Fase graviditas, meliputi proses-proses implantasi, plasentasi dan kebuntingan. Fase postgraviditas, meliputi proses-proses pengeluaran foetus, pengeluaran sekundinae dan laktasi (Hardjopranjoto, 1987).

Siklus birahi diatur oleh mekanisme endokrin dan neuroendokrin meliputi hormon-hormon dari hipotalamus, gonadotropin dan hormon 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 kambing dan sapi berkisar antara 20-21 hari. Siklus birahi dibagi menjadi empat 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 dalam ampula tuba falopii maka pada saat itu sudah dinyatakan terjadi kebuntingan. Secara klinis, kebuntingan tersebut baru dihitung mulai saat kambing betina tidak lagi menunjukkan gejala birahi kembali pada siklus birahi berikutnya. Lama periode kebuntingan pada kambing berlangsung selama 149 hari atau berkisar antara 143-151 hari (Mahaputra, 2001).

Fertilisasi akan menghasilkan individu yang diploid yaitu yang memiliki $2n$ kromosom, satu n kromosom berasal dari sel jantan dan satu n kromosom berasal dari betina. Fertilisasi adalah proses timbal balik dan bersifat spesies spesifik yang dapat menstimulir sel telur untuk mengadakan pembelahan dan perkembangan lebih lanjut (Hunter, 1995). Perkembangan selanjutnya disebut morula yang mencapai uterus kemudian berkembang menjadi blastula (blastosis) yang terdiri dari banyak sel yang masing-masing sel disebut blastomer. Blastula adalah suatu bentuk bola yang berongga yang terdiri dari lapisan sel-sel yaitu tropoblast yang menyelimuti blastosel (*blastocoel*). Massa sel tropoblast yang terletak di posisi dalam menjulur kedalam blastosel dan akhirnya membentuk badan embrio, dalam proses ini terbentuk tiga lapisan kecambah. Ketiga lapisan kecambah tersebut adalah *ectoderm* (kulit bagian luar), *endoderm* (kulit bagian dalam), dan *mesoderm* (kulit bagian tengah) (Ismudiono, 1999).

2.3. 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 pakan dan membungkus embrio agar tidak mudah rusak akibat pengaruh dari luar (Mahaputra, 2001).

Kantung kuning telur berupa sebuah kantung berisi kuning telur. Kantong kuning telur dihubungkan dengan tubuh embrio oleh tangkai kuning telur (Poernomo dkk., 2004). Pembuluh darah segera terbentuk di dalam dinding kantong kuning telur dan berfungsi sebagai penyalur bahan nutrisi yang diserap dari dinding uterus kedalam embrio sendiri. Kantong kuning telur ini sendiri berfungsi hanya singkat saja dari saat 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 dua dinding kantong yang dikenal sebagai amnion, kurang lebih timbul pada hari ke-18 dan juga sering dikenal dengan sebutan "*water bag*" (Mahaputra, 2001).

Pada saat-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 *trophectoderm*. Pada permulaannya tugas dari serosa adalah mengabsorpsi nutrisi, selanjutnya serosa dan allantois bersama-sama membentuk *chorion* dan juga sebagai penyalur nutrisi ke dalam embrio (Mahaputra, 2001).

Chorion dan *amnion* berkembang bersamaan sebagai lipatan dari selaput ekstra embrionik somatopleura. Dinding *Chorion* terdiri dari dua lapis, lapis dalam berasal dari mesoderm somatis dan lapis 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 berupa gas bisa melewati *chorion* masuk ke dalam peredaran darah induk dan fetus. Tetapi, bakteri tidak dapat melewati selaput tersebut. Dinding luar 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 membran allantois ini telah membesar dan berada pada titik di sekitar sebelah bawah embrio, dan selanjutnya mengisi ruangan di antara serosa dan amnion. Embrio ini dihubungkan oleh uachus ke dalam kantong allantois melewati chorda umbilicalis (Mahaputra, 2001).

Adapun fungsi allantois antara lain: (1) sebagai kantung urine ekstra embrional, dimana cairan urine berasal dari sisa metabolisme embrio yang berbentuk asam urat, (2) sebagai paru-paru ekstra embrional yang disebabkan dibagian luar dinding allantois ada area vasculosa, yaitu daerah *chorio-allantois*,

(3) untuk mencerna abumin pada sel telur kleidoik, seperti reptilian, burung dan mamalia bertelur dan (4) 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 ialah suatu sistem yang terdiri dari dua komponen, yaitu selaput ekstra embrional dan selaput lendir rahim yang berintegrasi menjadi satu kesatuan untuk keperluan pertukaran timbal balik faal antara induk dan fetus serta dapat menghasilkan hormon. Plasenta induk adalah endometrium rahim dan plasenta fetus adalah *chorio-allantois* (Poernomo dkk., 2004).

Bentuk plasenta *cotyledonaria*, terdapat pada ruminansia. Villinya berkelompok-kelompok dengan penembusan ke selaput lendir rahim lebih dalam (Poernomo dkk., 2004). Hanya villi *chorion* yang tumbuh subur pada permukaan *chorion* disebut dengan kotiledon dan mukosa endometrium 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 metabolik dari induk ke fetus melewati membran plasenta dengan beberapa proses 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: O_2 masuk ke dalam, CO_2 dikeluarkan; (2) Air; (3) Zat anorganik: *Natrium, Ferrum, Cuprum, Mangan, Calsium dan Phospor*; (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 kambing sejak umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Menurut Cavanagh (1996) EPF pertama kali ditemukan sebagai *pregnancy associated substance* dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies.

Tahun 1982, Butler *et al.* memisahkan dua protein spesifik kebuntingan (PSP A dan B) dari membran plasenta sapi. PSP-A diidentifikasi sebagai α -

fetoprotein, yang tidak hanya terbatas pada kebuntingan, sementara PSP-B ditetapkan sebagai protein spesifik plasenta (Garbayo *et al.*, 1998).

Subtansi EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Menurut 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.

Pregnancy Associated Glycoproteins-1 (PAG-1) dikenal sebagai *Pregnancy-Specific Protein B* (PSP-B). Glikoprotein tersebut (PSP-B atau PAG) bisa terdeteksi dalam sirkulasi maternal pada minggu ke tiga setelah kebuntingan (Xie *et al.*, 1996). Protein spesifik tersebut bisa dideteksi pada serum darah maternal saat sel-sel binukleat tropoblast plasenta fetus mulai bermigrasi dan berfusi dengan sel-sel endometrium membentuk feto-maternal *syncytium* (Karen *et al.*, 2003). PAG dimurnikan dari plasenta sapi perah dan juga ditemukan dalam serum darah maternal segera setelah implantasi embrio. *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAGs) yang diduga berkaitan erat dengan *bovine Pregnancy-Specific Protein B* (bo.PSP-B), diisolasi pada 1982 oleh Butler *et al.* pada domba, PAG disebut ov.PAG atau ov.PSP-B teridentifikasi melalui tiga pendekatan berbeda (El Amiri *et al.*, 2004). Glikoprotein ov.PAG yang secara imunologis berhubungan dengan *bovine Pregnancy Associated Glycoproteins* (bo.PAG1-) dan bo.PSP-B, telah diisolasi dari kotiledon fetus domba kemudian disebut ov.PAG-1 dan ov.PSP-B (Garbayo *et al.*, 1998).

Pregnancy Associated Glycoproteins-1 (PAG-1) bisa digunakan sebagai penanda biokimia untuk kebuntingan dan bisa dideteksi dalam darah maternal pada tiga minggu setelah konsepsi (Xie *et al.*, 1996). EPF tersisa dalam sirkulasi maternal hingga sekitar minggu terakhir kebuntingan tetapi selalu menghilang dari serum sebelum proses kelahiran (Duplants, 2000). ov.PAG disintesa oleh sel binukleat tropoblas (Green *et al.*, 2000; Karen *et al.*, 2001). PSP-B disekresi oleh sel-sel binukleat *trophoctoderm* fetus (Karen *et al.*, 2001). Pada sapi perah dan domba, PAG-1 merupakan produk sel-sel tropoblas binukleat yang merupakan komponen-komponen invasif dari plasenta (Xie *et al.*, 1996).

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

Pregnancy Associated Glycoproteins-1 (PAG-1) bovine adalah asam glikoprotein dengan berat molekul 67 kDa. Perkiraan massa molekular relatifnya sangat beragam, dari 47 hingga 90 kDa, meski polipeptida dewasa diperkirakan

panjangnya tidak lebih dari 330 asam amino (Xie *et al.*, 1996). PAG pertama kali disebutkan sebagai glikoprotein 67 kDa asam dengan titik-titik isoelektrik berbeda (El Amiri *et al.*, 2004). oPAG memiliki berat molekular antara 43 hingga 67 kDa (Xie *et al.*, 1997^b).

Cavanagh (1996) berpendapat bahwa EPF dapat merangsang sel-sel sistem kekebalan maternal. Ini mungkin merupakan bagian dari mekanisme penolakan fetus yang dianggap benda asing oleh tubuh induk. Antigen-antigen yang mirip secara serologis telah ditemukan pada domba, dan beberapa lainnya pada *ungulate* pemamah biak (Xie *et al.*, 1996). Antigen-antigen yang secara serologis mirip dengan PSP-B dan PAG-1 telah ditemukan pada pemamah biak lain, termasuk bagal dan rusa ekor putih, kambing gunung, rusa merah, kambing Alpine Perancis, bison, rusa besar, sejenis rusa besar (*elk*), rusa dataran gersang, dan rusa sika. Secara imunologis antigen yang berhubungan dengan PAG sebelumnya telah terdeteksi dalam serum kambing bunting. Protein yang disekresi oleh plasenta, saat terdeteksi dalam sirkulasi perifer al induk, bisa menjadi indikator berguna bagi kebuntingan dan kesehatan fetus. Studi komparatif menunjukkan bahwa PAG memiliki kemampuan mengikat peptida, bahkan ketika tidak terjadi aktifitas katalitik. Fungsinya bisa meliputi pengikatan dan transpor peptida bioaktif. Reaksi antigen tersebut tampak melalui teknik RIA dengan antiserum terhadap ov.PAG1 (Garbayo *et al.*, 1998).

Early Pregnancy Factor (EPF) dalam serum maternal sebelum implantasi bukanlah sebagai produk zigot tetapi merupakan respon maternal akibat adanya zigot sebagai faktor ovum. Hanya sedikit yang diketahui tentang faktor ovum

kecuali bahwa faktor ovum memiliki massa molekular yang relatif kecil dan disekresi oleh ovum atas penetrasi sperma. Produksinya terus berlangsung hingga tahap *blastocys* dari perkembangan embrio (DuPlants, 2000).

2.4.2. Bioassay EPF

Bioassay untuk EPF didasarkan pada demonstrasi oleh Bach dan Antoine pada tahun 1968, bahwa anti limfosit serum (ALS) immunosupresif bisa menghambat secara *in vitro* formasi *Rosette* spontan antara limfosit dan sel-sel darah merah heterogen. *Early Pregnancy Factor* (EPF) diekspresikan sebagai titer inhibisi *Rosette* dengan nilai lebih dari 16 yang mengindikasikan kebuntingan positif. Rangkaian Uji hambatan *Rosette* ini cukup kompleks dan mahal, disamping hasilnya sulit untuk segera diinterpretasikan (DuPlant, 2000).

Modifikasi untuk deteksi *Early Pregnancy Factor* (EPF) diperkenalkan setelah terbukti bahwa limfosit, yang di inkubasi dalam EPF, memberi hambatan *Rosette* yang lebih besar dibanding daripada limfosit dari donor yang sama tanpa di inkubasikan pada EPF. EPF terdeteksi dalam serum semua mamalia yang diuji, dalam 24-48 jam setelah fertilisasi bila dihubungkan dengan kesehatan embrionik, EPF dapat dideteksi pada serum 12 jam setelah transfer embrio dan menghilang 24-48 jam setelah kematian atau pengeluaran embrio. Selain digunakan untuk diagnosis awal kebuntingan, deteksi EPF bisa sangat berguna untuk membedakan antara kegagalan pembuahan dan kegagalan implantasi, seperti dalam pemantauan kebuntingan beresiko (Cavanagh, 1996).

Cavanagh (1996) berpendapat bahwa *Early Pregnancy Factor* (EPF) diperlukan pada pembelahan pertama embrio, sementara efeknya lebih nampak

sebagai respon maternal daripada pada embrio itu sendiri. Di samping itu, EPF diperlukan untuk keberhasilan implantasi embrio.

2.5. Sistem Imun

Imunitas (kekebalan) merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler (Rantam, 2003). Pada proses ini terjadi serangkaian mekanisme yang meliputi pengenalan, penempatan, netralisasi dan eliminasi bahan-bahan dari dalam tubuh. Secara garis besar mekanisme kekebalan terbagi menjadi 2 yaitu: *Innate immunity* (sistem imun tidak spesifik) dan *Adaptive immunity* (sistem imun spesifik)

Innate immunity adalah pertahanan tubuh yang didapat karena adanya respon yang tidak spesifik dan merupakan bagian dari sistem imun yang berfungsi sebagai barrier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit. Perangkat imun yang berperan pada sistem imun tidak spesifik ini adalah makrofag, sel darah merah, sel asesoris, monosit, NK (*Natural Killer cell*), sel sitotoksik dan sekresi lisosim.

Adaptive immunity merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, apabila *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi akibat fagosit tidak mengenali agen infeksius. Penanggulangannya diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi, sehingga dapat menstimulir proses fagositosis (Rantam, 2003). Pada sistem imun spesifik, kekebalan dapat ditingkatkan baik kualitas maupun kuantitas dengan stimulasi berulang dari molekul asing yang

sama (Artama, 1992). Sel yang berperan sebagai mediator pada proses ini adalah sel limfosit yang terdapat sel reseptor sesuai dengan antigen determinan yang masuk.

2.5.1. Antibodi

Antibodi merupakan molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat adanya interaksi antara limfosit B peka antigen dan antigen khusus. Antibodi memiliki kemampuan berikatan khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan penyingkirannya. Antibodi terdapat dalam berbagai cairan tubuh tetapi terdapat dalam konsentrasi tertinggi dan termudah diperoleh dalam jumlah yang banyak untuk dianalisis berasal dari serum darah (Tizard, 1988).

Menurut Jawetz *et al.* (1991), antibodi adalah protein yang dikenal sebagai imunoglobulin. Antibodi terbentuk sebagai respon terhadap suatu antigen yang bereaksi secara spesifik dengan antigen itu atau sesuatu yang mempunyai hubungan erat dengannya. Antibodi adalah protein khusus, yaitu imunoglobulin-imunoglobulin. Sifat antibodi ini antara lain tergantung pada kelas dari imunoglobulin.

Antibodi atau imunoglobulin adalah struktur yang berhubungan dengan glikoprotein diproduksi oleh limfosit B yang berfungsi sebagai moderator spesifik imunitas humoral. Semua antibodi umumnya mempunyai dua struktur rantai ringan (*Light chain*) dan dua struktur rantai berat (*Heavy chain*) yang identik serta dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan disulfida (Noris and Varma, 1992). Struktur imunoglobulin terdiri dari fragmen ab (*Fab*) dan fragmen c (*Fc*) kedua

fragmen ini dirangkai oleh untaian dua sulfida (s-s). Bagian yang terdiri dari asam amino yang bertugas untuk mengikat antigen dikenal dengan *side binding* antigen, sedang Fc terdiri dari karbohidrat yang sering berikatan dengan komplemen (Rantam, 2003).

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh yang berfungsi untuk melindungi bagian tubuh hewan terhadap masuknya organisme, produk beracun maupun benda asing. Adanya benda asing yang masuk nantinya akan berikatan dengan reseptor yang diperantarai oleh limfosit dan dihasilkan produk khusus yang berupa protein spesifik yang disebut antibodi (Baratawidjaya, 2000).

Langkah awal dalam pembentukan antibodi adalah terjadinya fagositosis antigen oleh makrofag. Makrofag ini memberikan antigen kepada sel-sel B dan sel-sel T pembantu. Sel-sel B yang membawa imunoglobulin pada permukaannya yang cocok dengan antigen dirangsang untuk berproliferasi membentuk klon dan berdiferensiasi menjadi sel-sel plasma. Sel plasma mensintesis protein antibodi (Jawetz *et al.*, 1991; Vilk, 1992).

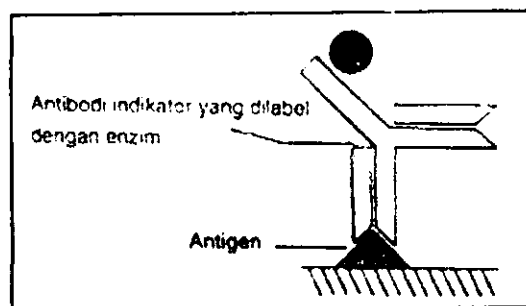
Sifat-sifat umum imunogen adalah: (1). Keasingan, yaitu: dalam lingkungan normal sistem imun membedakan antar self dan non self. (2). Ukuran, antigen harus mempunyai ukuran minimum yang efektif dengan berat molekul lebih kurang 10.000 Dalton. (3). Kompleksitas, faktor yang menentukan kompleksitas imunogen yaitu sifat fisik dan kimia molekuler (Wahab dan Noerjati, 1993).

Imunogenitas suatu substansi ditentukan oleh beberapa faktor penting, diantaranya yaitu: molekul substansi tersebut harus berukuran cukup besar,

walaupun belum diketahui batas ukuran molekul yang menentukan imunogenitas. Substansi dapat dikatakan bersifat imunogen jika berat molekul lebih dari 10.000 Dalton (Goodman, 1991; Abbas *et al.*, 2000).

2.6. Immunoassay Untuk Identifikasi Ikatan Antigen-Antibodi EPF

ELISA direct merupakan konfigurasi paling sederhana. Antigen secara langsung diadsorbsikan ke suatu substrat padat. Permukaan substrat dicuci dan antibodi yang dilabel dengan enzim digunakan untuk menunjukkan adanya antigen. Hasilnya akan terlihat bila ditambah substrat. Konfigurasi ini memerlukan antiserum yang spesifik untuk antigen yang dimaksud. Antiserum ini harus dikonjugasikan pada enzim. Keterbatasan konfigurasi ini berkaitan dengan sifat pengikatan substrat padat dan kualitas antibodi indikator. Keuntungan utamanya adalah kesederhanaan sistem. Konfigurasi ini biasanya digunakan dalam assay untuk mengenali suatu antigen (Burgess, 1995). Kelemahan model ini adalah diperlukan keahlian dalam melakukan konjugasi atau melabel antibodi dengan enzim, sehingga tahap ini memerlukan tahapan purifikasi antibodi dan setelah itu dilanjutkan dengan pelabelan (Rantam, 2003).



Gambar 2.1 Direct ELISA
(Sumber: Burgess, 1995)

BAB 3

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Invitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Tulangan, Sidoarjo. Pelaksanaan penelitian ini dimulai 2 Februari 2008 sampai 21 Mei 2008.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah tiga puluh ekor kambing Peranakan Ettawah betina berumur 2 tahun dan sudah pernah beranak untuk diagnosa kebuntingan.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan berupa antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor*, hormon Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (*Lutalyse*™ *Dinoprost Tromethamin* 5mg/ml Pharmacia N. VI S.A Puurs - Belgium), Progesteron, semen segar, susu skim, serum darah kambing bunting.

Beberapa reagen kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah: *Sodium Carbonate* (Na_2CO_3) *buffer*, 50 mM, pH 9.6 dengan 0.02% NaN_3 ; *Tris-Buffered Saline Tween-20* (TBST-20, pH 7,4); *Phosphate Buffered saline* (PBS); *Bovine Serum Albumin* (BSA, B 4287); *Buffer Tris-Glisin*; *Buffer Fosfat*; *Diethanolamine*

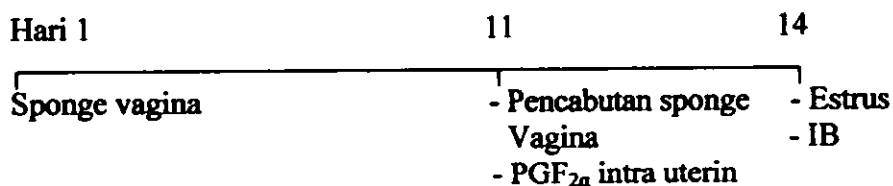
(Sigma, D0683); pNPP (*para-Nitro-Phenylphosphat*, Sigma N9389); Alkohol 70%.

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 uji *ELISA*; meliputi *microtiter plate ELISA*, pipet *ependroof* 20-200 μ l dan 1-10 μ l, *pipette tips*, *water bath*, *refrigerated centrifuge*, *centrifuge vortexer*, pH meter merk *Schoot-Gerate* tipe CG 820, *Autoclave*, aluminium foil, *tissue*, mikropipet, *ELISA reader* (biorad), *gun* inseminasi, pipa fiber, termometer.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Tahap Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan pada Kambing

Sebanyak 30 ekor kambing Peranakan Ettawah berumur 2 tahun digunakan dalam penelitian ini. Sinkronisasi birahi dilakukan dengan menggunakan hormon Progesteron dosis 1 g (*sponge vagina*). *Sponge vagina* dibiarkan dalam vagina selama 11 hari. Pada hari ke-11 bersamaan dengan mancabut *sponge vagina*, kambing diberi Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (*Iutalyze*) 2,5 mg secara intra uterin.





Gambar 3.1. Inseminasi Buatan pada vagina kambing

Pengamatan birahi dilakukan dengan melihat gejala birahi yang timbul yaitu vulva merah, bengkak, basah dan lender serviks. Sebelum di Inseminasi Buatan, pada saat estrus (hari ke-0), dilakukan pengambilan darah terlebih dahulu yang akan digunakan sebagai kontrol negatif. Inseminasi buatan dilakukan setelah 12-18 jam tanda birahi tampak dengan menggunakan semen segar yang diencerkan dengan susu sapi segar dosis IB 1 ml dengan konsentrasi 50-60 juta spermatozoa/ml, pH 5,9 – 7, lihat Lampiran 1 untuk prosedur pengenceran semen.

Kemudian dilakukan pengambilan darah pada minggu ke-3 setelah Inseminasi Buatan.

3.3.2. Immunoassay dengan Metode *ELISA Direct*

Sampel darah yang telah diambil dari kambing bunting tersebut didiamkan untuk kemudian diambil serumnya dan diidentifikasi protein spesifik *Early Pregnancy Factor* dengan teknik *Enzyme Linked Immunosorbant Assay direct / ELISA direct*, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari *ELISA reader*. Untuk prosedur *ELISA direct* dapat dilihat pada Lampiran 2.

Nilai *Optical Density* (OD) dapat dibaca dengan metode positif atau negatif. Nilai *optical density* antigen yang dibaca melalui *reader* dari *ELISA*

dinyatakan positif untuk sampel kecil (<10) bila sampel memberikan nilai *absorban* 2 kali di atas nilai rata-rata kontrol negatif ($2 \times \text{COV/ Cut Off Value}$). Nilai COV untuk besar sampel antara 10-100, ditentukan dengan rata-rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($X + 2-3 \text{ SD}$) (Suwarno dkk., 2008).

3.4. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah adanya protein EPF dalam serum kambing yang diduga bunting dengan metode *ELISA direct* yang antibodi indikatornya berasal dari serum kambing yang diimunisasi dengan protein EPF sapi, hasil penelitian sebelumnya. Kemudian nilai absorbansi protein EPF dikonversikan dengan kurva baku standar EPF yang sudah diketahui rumus regresi liniernya, seperti pada Lampiran 5. Berdasarkan rumus tersebut maka dapat diketahui kadar protein EPF dalam serum tersebut.

3.5. *Diagnosability* Bahan EPF

Hasil penelitian yaitu bahan diagnosa EPF menggunakan metode *ELISA direct* dibandingkan dengan metode diagnosa kebuntingan yang lain yaitu palpasi abdominal pada hari ke-90 setelah Inseminasi Buatan sebagai *gold standard*. Diagnosa yang diamati dalam penelitian ini adalah sensitivitas, spesifisitas, prediktif nilai negatif, prediktif nilai positif bahan diagnosa penelitian terhadap serum kambing diduga bunting pada minggu ke-3 setelah Inseminasi Buatan dibandingkan dengan *gold standard*.

Sensitivitas (*true positive*) adalah pengukuran statistik bahan diagnosa EPF yang menunjukkan hasil positif bunting dan kambing benar-benar bunting setelah diujikan dengan *gold standard*, kebalikannya adalah *false negative* yaitu bahan diagnostik menunjukkan hasil tidak bunting padahal bunting.

Spesifisitas (*true negative*) adalah pengukuran statistik bahan diagnosa EPF yang menunjukkan hasil negatif bunting dan kambing benar-benar tidak bunting setelah diujikan dengan *gold standard*, kebalikannya adalah *false positive* yaitu bahan diagnosa menunjukkan hasil bunting padahal kambing tidak bunting.

Prediktif nilai negatif adalah pengukuran statistik dimana bahan diagnosa menunjukkan hasil negatif bunting dan kambing benar-benar tidak bunting setelah diujikan dengan *gold standard*. Prediktif nilai positif adalah probabilitas dimana bahan diagnosa menunjukkan hasil positif bunting dan benar-benar bunting setelah diujikan dengan *gold standard* (Altman dan Bland, 1994).

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, presentase, dan gambar.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4. HASIL PENELITIAN

4.1 Pengukuran *Optical Density* Protein *Early Pregnancy Factor* pada Kambing

Pengukuran titer protein *Early Pregnancy Factor* dari serum kambing dilakukan dengan metode *ELISA direct* yang antibodi indikatornya berasal dari serum kambing yang diimunisasi dengan protein EPF sapi, hasil penelitian sebelumnya. Nilai *Optical Density* protein EPF yang dibaca melalui *ELISA reader* dinyatakan positif bila memberikan nilai diatas COV yaitu rata-rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($X + 2-3 SD$) (Suwarno dkk., 2008). Jika kontrol rata-rata adalah 0,0355 dengan SD 0,0143, maka nilai *Optical Density* EPF yang dihasilkan harus lebih besar dari 0,1282. Pada penelitian ini kambing dengan nilai *Optical Density* EPF positif tidak ditunjukkan pada kambing nomor 5, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 29 dan 30. Kisaran nilai *Optical Density* EPF positif dari 0,201 hingga 0,295 dan nilai *Optical Density* tertinggi terdapat pada kambing 28, dapat dilihat pada Lampiran 3.

Berdasarkan hasil pemeriksaan *Optical Density*, selanjutnya kadar protein EPF diperoleh dengan cara mengkonversi nilai *Optical Density* dengan rumus persamaan kurva baku standar EPF yang diperoleh dari SPSS version 13.0 seperti di bawah ini:

$$Y = 0,0719 + 0,0004X$$

Keterangan: Y = Nilai absorbansi

X = Kadar protein

Data tersebut dapat dilihat pada tabel 4.1. di bawah ini :

Tabel 4.1. Kadar Protein *Early Pregnancy Factor* pada 21 hari pasca IB

Kambing	Absorbansi	Kadar Protein ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,220	370,375
2	0,212	350,375
3	0,213	352,875
4	0,220	370,375
5	-	
6	0,223	377,875
7	0,227	387,875
8	0,232	400,375
9	0,221	372,875
10	-	
11	-	
12	-	
13	0,251	447,875
14	0,263	477,875
15	-	
16	-	
17	-	
18	0,226	385,375
19	0,275	507,875
20	0,240	420,375
21	-	
22	-	
23	-	
24	0,211	347,875
25	0,203	327,875
26	0,208	340,375
27	0,236	410,375
28	0,295	557,875
29	-	
30	-	

Keterangan: - = Tidak ada perubahan warna

4.2 *Diagnosability Early Pregnancy Factor* Sapi Terhadap Kebuntingan Kambing

Hasil identifikasi EPF dengan menggunakan metode *ELISA direct* yang menunjukkan bunting atau tidaknya ke-30 kambing tersebut, kemudian dibandingkan dengan palpasi abdominal pada hari ke-90 pasca IB. Untuk data lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4. Seperti yang ditunjukkan pada tabel 4.2. di bawah ini:

Tabel 4.2. Jumlah Perbandingan Diagnosa Kebuntingan Kambing Menggunakan Protein Spesifik *Early Pregnancy Factor* yang Berasal dari Kotiledon Sapi dengan Palpasi Abdominal

PA EPF	+	-	
+	TP = 17	FP = 1	PPV = 94,44%
-	FN = 1	TN = 11	NPV = 91,67%
	SN = 94,44%	SP = 91,67%	

Keterangan

+	:	Bunting
-	:	Tidak Bunting
EPF	:	Diagnosa Kebuntingan pada Kambing Berdasarkan EPF
PA	:	Palpasi Abdominal
TP	:	<i>True Positive</i>
FP	:	<i>False Positive</i>
FN	:	<i>False Negative</i>
TN	:	<i>True Negative</i>
PPV	:	<i>Positive Predictive Value</i>
NPV	:	<i>Negative Predictive Value</i>
SN	:	<i>Sensitivity</i>
SP	:	<i>Specificity</i>

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5. PEMBAHASAN

5.1 *Diagnosability* Bahan EPF Sapi pada Kambing

Hasil pengamatan penelitian terhadap 30 ekor kambing menunjukkan hasil yang sangat signifikan. Berdasarkan pengamatan tampak bahwa 18 sampel serum darah dari kambing yang diduga bunting setelah diuji dengan antibodi poliklonal anti-EPF yang berasal dari kotiledon sapi menggunakan metode *ELISA direct* menunjukkan hasil positif dan 12 sampel lainnya menunjukkan hasil negatif.

Deteksi kebuntingan kambing pada hari ke-21 gestasi menggunakan antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* yang berasal dari kotiledon sapi mempunyai sensitivitas yang tinggi yaitu 94,44% dengan spesifisitas yang tinggi pula yaitu 91,67%. Hasil positif bunting atau *true positive* yang ditunjukkan oleh EPF dan palpasi abdominal adalah sebanyak 17 kambing, sedangkan hasil tidak bunting atau *true negative* yang ditunjukkan oleh EPF dan palpasi abdominal sebanyak 11 kambing. Hasilnya didapatkan adanya nilai *false positive* dan *false negative* masing-masing adalah 1 (satu) dengan presentase 3,33%. Kematian embrio dini mungkin merupakan penyebab adanya nilai *false positive*. Adanya nilai *false negative* disebabkan karena permasalahan yang terjadi saat proses *ELISA direct*, salah satunya seperti efek mata kail sehingga hasil deteksi tidak konsisten dengan keadaan klinis kambing tersebut. Efek mata kail dapat disebabkan karena pengenceran sampel yang rendah memberi hasil yang sedang, tetapi pada pengenceran yang lebih besar, kadar analit melampaui batas atas daya baca *ELISA reader* (Suwarno dkk., 2008).

Nilai prediksi positif adalah 94,44% dan untuk nilai prediksi negatif adalah 91,67%. Hasil deteksi kebuntingan pada kambing menunjukkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi mungkin bisa terjadi karena sampel darah yang digunakan adalah sampel pada hari ke-21 setelah dilakukan Inseminasi Buatan. Hal ini sesuai yang dikatakan oleh Xie *et al.* (1996) bahwa *Pregnancy Associated Glycoproteins-1* (PAG-1) yang juga dikenal sebagai *pregnancy-specific protein B* (PSP-B) bisa terdeteksi dalam sirkulasi maternal pada minggu ke tiga setelah kebuntingan. Keduanya bisa dideteksi pada darah maternal saat sel-sel binukleat tropoblast plasenta fetus mulai bermigrasi dan berfusi dengan sel-sel endometrium membentuk feto-maternal *syncytium* (Karen *et al.*, 2003).

Pregnancy Associated Glycoproteins-1 (PAG-1) bisa digunakan sebagai penanda biokimia untuk kebuntingan dan bisa dideteksi dalam darah maternal pada tiga minggu setelah konsepsi (Xie *et al.*, 1996). EPF tersisa dalam sirkulasi maternal hingga sekitar minggu terakhir kebuntingan tetapi selalu menghilang dari serum sebelum proses kelahiran. Substansi EPF ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus, sehingga EPF dalam jaringan plasenta kurang lebih timbul pada hari ke-18 (Duplants, 2000).

ELISA Direct digunakan untuk mendeteksi titer protein EPF secara semi kuantitatif atau kuantitatif melalui *ELISA reader* berdasarkan pada nilai absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/ OD*) (Suwarno dkk., 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. Protein EPF dapat dideteksi dengan mengadsorbikan antigen secara langsung ke suatu substrat padat. Permukaan substrat dicuci dan antibodi yang ditemplei enzim digunakan untuk menunjukkan adanya antigen, dalam hal ini protein EPF pada kambing yang diduga bunting. Hasilnya akan terlihat bila ditambah substrat. Konfigurasi ini memerlukan antiserum yang spesifik untuk antigen yang dimaksud. Antiserum ini harus dikonjugasikan pada enzim. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikatkan dan sesuai pula dengan kadar protein yang dicari. Berdasarkan hasil pemeriksaan 30 sampel serum darah dari kambing yang diduga bunting dengan uji *ELISA direct* diperoleh bahwa 18 kambing terlihat adanya perubahan warna dan menunjukkan titer positif terhadap anti EPF dan 12 kambing tidak menunjukkan perubahan warna sehingga nilai titer tidak terbaca oleh spektrofotometer. Titer protein EPF yang menunjukkan positif dengan angka tertinggi dihasilkan pada kambing ke-28.

Penggunaan antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* yang berasal dari kotiledon sapi terbukti dapat digunakan untuk mendeteksi kebuntingan pada kambing. Hal ini dikarenakan protein-protein tersebut memiliki kesamaan rangkaian parsial terhadap bPAG-1, dan bereaksi silang dengan antiserum poliklonal yang didapatkan setelah imunisasi kambing dengan bPSP-B (Atkinson *et al.*, 1993).

Bahan bioaktif pada penelitian ini bila dibandingkan dengan diagnosa kebuntingan yang lain pada kambing misalnya teknik RIA, memiliki banyak keunggulan. Salah satu cara diagnosa kebuntingan dengan pemeriksaan hormon

seperti progesteron, dilakukan dengan mengukur sampel serum darah menggunakan RIA. Diagnosa ini dilakukan pada umur kebuntingan 17-18 hari dengan angka keberhasilan 85 % (Hunter, 1995). Pada *Ovine Pregnancy Specific Protein B* (PSP-B) memiliki keakuratan 100% dalam mendeteksi kebuntingan pada hari ke-26 setelah kebuntingan (Karen *et al.*, 2003).

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah sensitivitas, spesifitas, prediktif nilai negatif, dan prediktif nilai positif bahan bioaktif penelitian, untuk mendapatkan hal tersebut, EPF yang merupakan bahan diagnosa penelitian, dibandingkan dengan *gold standard*, dalam hal ini adalah palpasi abdominal. *Gold standard* yang digunakan sesuai pendapat Diane (1995) yaitu tes yang sederhana dan relatif tidak mahal.

Jika dibandingkan dengan diagnosa kebuntingan menggunakan progesteron dengan nilai sensitivitas 88% - 100%, maka sensitivitas bahan diagnosa EPF menggunakan metode *ELISA direct* menunjukkan hasil 94,44%, ini tergolong tinggi. Tes yang mempunyai sensitivitas tinggi berguna untuk *screening* (Diane, 1995) dalam hal ini kebuntingan kambing. Kegunaan bahan diagnosa EPF adalah selain digunakan untuk diagnosis awal kebuntingan, deteksi EPF bisa sangat berguna untuk membedakan antara kegagalan pembuahan dan kegagalan implantasi, seperti dalam pemantauan kebuntingan beresiko (Cavanagh, 1996). Tes yang mempunyai sensitivitas tinggi sedikit terjadi *false negative*, ketika hasil tes menyatakan kambing tidak bunting maka praktisi dapat memastikan kambing memang tidak bunting, sehingga yang mempunyai sensitivitas yang tinggi sangat membantu ketika hasilnya negatif atau tidak bunting (Diane, 1995).

Spesifisitas bahan diagnosa EPF dengan metode *ELISA direct* menunjukkan presentase 91,67% dan tergolong tinggi. Tes yang mempunyai spesifisitas yang tinggi hasil *false positive* kecil. Konsekuensinya tes yang spesifik sangat membantu ketika hasilnya positif atau bunting (Diane, 1995).

Indonesia yang merupakan negara berkembang maju, di samping keandalan suatu tes, kepraktisan dan biaya pemeriksaan merupakan suatu faktor yang perlu diperhitungkan dalam pemilihan suatu tes. Suatu uji laboratoris yang amat handal tetapi tidak praktis dan membutuhkan biaya pemeriksaan yang mahal hanya mempunyai arti akademis dan hanya dapat dipakai untuk penelitian saja tetapi tidak dapat dipakai untuk keperluan pelayanan di lapangan (Handojo, 1996). Mendeteksi kabuntingan secara dini dengan menggunakan protein spesifik *Early Pregnancy Factor*, diharapkan menjadi salah satu alternatif bahan diagnostik untuk tes kebuntingan pada kambing yang relatif lebih mudah untuk digunakan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian sampel serum kambing setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-EPF (*Early Pregnancy Factor*) yang berasal dari kotiledon sapi dengan teknik *ELISA direct*, maka dapat diambil kesimpulan sbb:

1. Protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang berasal dari kotiledon sapi dapat digunakan untuk mendiagnosa kebuntingan umur 21 hari pada kambing dengan sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 94,44% dan 91,67%.
2. Protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) lebih efektif untuk diagnosis kebuntingan dini dibandingkan dengan palpasi abdominal.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diajukan saran sebagai berikut :

1. EPF dapat digunakan untuk diagnosa kebuntingan kambing secara dini yang dilakukan di lapangan.
2. Keberhasilan protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang berasal dari kotiledon sapi dalam mendiagnosa kebuntingan pada kambing memungkinkan peternak kambing menggunakan tes ini sehingga dapat mengukur tingkat reproduktivitasnya.

RINGKASAN

RINGKASAN

ALVI AQUARIYANTI. Diagnosa Kebuntingan pada Kambing Menggunakan Protein Spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang Berasal dari Kotiledon Sapi, dibawah bimbingan Herman Setyono, MS., drh. sebagai dosen pembimbing I dan Indah Norma Triana, M.Si., drh. sebagai dosen pembimbing II.

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.

Xie *et al.* (1996) mendeteksi *Early Pregnancy Factor* (EPF) dalam sirkulasi maternal pada minggu ketiga kebuntingan. Konsentrasi EPF dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Protein spesifik tersebut bisa terdeteksi pada serum darah maternal saat sel-sel binukleat tropoblast plasenta fetus mulai bermigrasi dan berfusi dengan sel-sel endometrium membentuk *feto-maternal syncytium* (Karen *et al.*, 2003).

Cara yang digunakan untuk mendeteksi EPF dalam darah dalam penelitian ini menggunakan metode *ELISA direct* dengan mereaksikan antara serum darah kambing yang diduga bunting dengan antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* yang berasal dari kotiledon sapi yang kemudian dibaca nilai absorbansinya dengan panjang gelombang 405 nm dari *ELISA reader*.

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

Sampel yang digunakan adalah serum darah dari 30 ekor kambing yang diduga bunting. Sampel kemudian diuji dengan antibodi poliklonal anti-EPF menggunakan metode *ELISA direct*. Hasil pengujian dibandingkan dengan *gold standard* yaitu palpasi abdominal.

Hasil penelitian menunjukkan adanya protein EPF dalam serum darah kambing pada minggu ke-3 setelah Inseminasi Buatan, yang direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-EPF yang berasal dari kotiledon sapi dengan metode *ELISA direct* menunjukkan 18 ekor kambing yang diduga bunting, positif bunting, yang ditunjukkan dengan nilai absorban di atas nilai rata-rata kontrol negatif dan setelah dibandingkan dengan palpasi abdominal menunjukkan hasil *true positive* atau benar-benar bunting hanya 17 ekor kambing dengan *false positive* sebanyak satu ekor kambing. Sedangkan 12 ekor kambing lainnya tidak menunjukkan adanya perubahan warna sehingga nilai absorbannya tidak dapat terbaca dan setelah dibandingkan dengan palpasi abdominal menunjukkan hasil *true negative* atau benar-benar tidak bunting adalah 11 ekor kambing dengan *false negative* satu ekor kambing. Sehingga didapatkan bahwa protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang berasal dari kotiledon sapi mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam mendiagnosa kebuntingan pada kambing, yaitu masing-masing 94,44% dan 91,67%.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa protein spesifik *Early Pregnancy Factor* (EPF) yang berasal dari kotiledon sapi dapat digunakan untuk mendiagnosa kebuntingan kambing umur 21 hari. Saran yang diberikan yaitu peternak kambing dapat menggunakan tes ini sehingga dapat mengukur tingkat reproduktivitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Altman, D.G. Bland JM. 1994. Diagnostic Tests. 1: Sensitivity and Specificity. *BMJ* 308 (6943): 1552. PMID 8019315.
- Artama, W.T. 1992. Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. Hal 8-9, 28-31.
- Atkinson, Y.H., Gogolin-Ewens, K.J., Hounsell, E.F., Davies, M.J., Brandon, M.R., Seamark, R.F. 1993. Characterization of Placentation-Spesific Binucleate Cell Glycoproteins Possessing A Novel Carbohydrate. Evidence For A New Family Pregnancy-Ascociated Molecules. *J. Biol Chem.* 268: 26679-26685.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Cetakan Pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal 28-45.
- Badan Statistik Propinsi Jawa Timur. 2001. Jawa Timur Dalam Angka. Hal. 163.
- Baratawidjaja, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Ed. 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Burgess, G.W. 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosa Penelitian. Gadjah Mada University Press. Hal 163-167.
- Butler, J.E., Hamilton, W.C., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M., Williams, R.J. 1982. Detection and Partial Characterization of Two Bovine Pregnancy-Spesific Protein. *Biol Reprod.* 26: 925-933.
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperorin 10: Implication for Understanding Iis 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 Releated Techniques. 2rd Ed. Amsterdam: Elsilver 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. Noorwalk. Connecticut.

- DuPlants, L.J. 2000. Early Pregnancy Factor. Lifeissues.net. kechi, 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.
- Fitzgerald, I.I. 2004. Purified Polyclonal Antibodies. Fitzgerald Industries International, Inc. <http://www.fitzgerald-fii.com/p-p-prolactin-1.shtml>.
- Frandsen, R.D. 1991. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi Pertama. Gadjahmada University Press. Yogyakarta.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi Keempat. Gadjahmada 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.
- Goodman. J.W. 1996. Immunology Structure and Function. *In: Basic and Clinical Immunology 7nd Ed.* A Lange Lange Medical Book. Prentice Hall Internasional, inc. (UK) Limited. London. P 19-54.
- Gorman, N.T. and REW Halliwell. 1989. The Immunoglobulin: Structure, Genetics and Function. *In: Veterinary Clinical Immunology.* WB. Saunders Company. Philadelphia. P 19-54.
- Green, J.A., S. Xie, X. Quan, B. Bao, X. Gan, N. Mathialagan, J.F Beckers, and R.M Robert. 2000. Pregnancy Associated Glycoproteins Exhibit Spatially and Temporally Distinct Expressions Pattern During Pregnancy. *Biol Reprod.* 62: 1624-1631.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th.Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp.461-465.
- Hardijanto., Sardjito, T., Hernawati, T., Susilowati, S., Suprayogi, T.W. 2006. Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi. Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 17 -18

- Hardjopranjoto, S. 1982. *Physiologi Reproduksi*. Edisi kedua. Cetakan ketiga. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Herscowitz, M.B. 1993. *Immunologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi*. Dalam: *Immunologi III*. J.A Belanti. Gadjahmada University Perss. Yogyakarta. Hal 126-172.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB. Bandung. 13 – 26, 41 – 45, 74 – 104.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Edisi Kedua. Diklat Kuliah Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jawezt, J.L. Melnick and E.A. Adeberg. 1991. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology)*. Edisi 16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 198-205.
- 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 Progesterone and Pregnancy Associated Glycoproteins Test*. *Theriogenology* 59 (9): 1941-1948. (Abstract).
- Mahaputra, L. 2001. *Ilmu Kebidanan Veteriner*. Edisi II. Cet ke – 2. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Norris, J.R. and A.K. Varma. 1992 *Method In Microbiology Vol 24*. Academic Press Inc. San Diego. P 101-105.
- Oklahoma State University Board of Regents. 2000. <http://www.ansi.okstatc.edu/breeds/>
- Poernomo, B., Widjiati, M. Mafruchati, E.M. Luqman, E.D. Masithah, A.T Mukti. 2004. *Penuntun Embriologi*. Penerbit Pustaka Melati. Surabaya.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode imunologi*. Cetakan 1. Airlanggz University Press. Surabaya.
- Restiadi, T.I. 2002. *Selaput Fetus dalam Buku Ajar Ilmu Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga*. Surabaya.
- Subowo. 1993. *Imunologi*. Penerbit Angkasa Bandung. Hal 75-89.

- Suwarno, R. Ernawati, A.P Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani, dan F.A Rantam. 2008. ELISA, Teori dan Protokol. Departemen Mikrobiologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 26-36.
- Tizard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Edisi Ke-2. Airlangga University Press.
- Vilk, W.A. 1992. Basic Microbiology 7Ed. Harper Collins Publisher Inc. USA. P 276-277.
- Wanab, A.S. dan S. Noerjati. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal 45-49.
- Xie, S., R.J Nagel, J. Green, J.F Beckers, and R.M Robert. 1996. Trophoblast Specific Processing and Phophorylation of Pregnancy Associated Glycoprotein-1 In Day 15 to 25 Sheep Placenta. Biol Reprod. 54: 122-129.
- Xie, S., J.A Green, B. Bao, J.B Bixby, B. Szafranska, J.C DeMartini, S. Hecht, and R.M Robert. 1997^a. The Diversity and Evolutionary Relationships of The Pregnancy Associated Glycoproteins an Asparatic 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 Valdez, L. Hakami, and R.M Robert. 1997^b. Multiple Pregnancy Associated Glycoproteins Are Secreted By Day 100 Ovine Placental Tissue. Biol Reprod. 57: 1384-1393 (Abstract).

LAMPIRAN

**Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Pengenceran Semen dengan Air Susu
(Hardijanto dkk, 2006)**

1. Masukkan 300 – 500 ml air susu sapi segar ke dalam tabung *Erlenmeyer* dan pasanglah sedemikian rupa *thermometer* yang berkapasitas 100°C atau lebih sehingga mudah dibaca.
2. Masukkan tabung *Erlenmeyer* ke dalam sebuah bejana yang berisi air secukupnya dan dipanaskan air susu tersebut secara tidak langsung.
3. Setelah *thermometer* menunjukkan 92°C, aturlah nyala api pemanas dan dipertahankan suhu tersebut antara 92 – 95°C selama 10 menit.
4. Dinginkan air susu tersebut perlahan-lahan hingga mencapai sampai 32°C sesuai suhu semen yang diencerkan.
5. Buang kepala susu atau disaring memakai kain kasa steril bila kepala susu pecah.
6. Ditambahkan antibiotik *Penicillin* 1000 IU dan *Streptomycin* 1 mg ke dalam setiap *millimeter* air susu yang telah didinginkan, kemudian diaduk hingga rata.
7. Campurkan semen dengan air susu di atas dengan perbandingan 1 : 10.

Lampiran 2. Prosedur *ELISA direct* (Suwarno dkk, 2003)

Sampel darah yang telah diambil dari kambing bunting tersebut didiamkan untuk kemudian diambil serumnya dan diidentifikasi protein spesifik *Early Pregnancy Factor* dengan teknik *Enzyme Linked Immunosorbant Assay direct / ELISA direct*, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari *ELISA reader*. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut:

Coating Antigen pada Microplate

1. Serum kambing bunting yang mengandung protein *Early Pregnancy Factor*, dilarutkan dalam *Sodium Carbonate* (Na_2CO_3) *buffer* (*Coating buffer*) dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μl per-well.
2. Kemudian *plate* ditutup dengan plastik *adhesive* dan diinkubasi pada 4 °C selama semalam atau pada suhu ruang selama dua jam.
3. Kemudian dilakukan pencucian dengan menambahkan 200 μl 0,05 % *Phosphate Buffered saline Tween-20* per-well sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit.

Blocking

1. Setelah pelapisan lempeng dengan antigen kemudian diblok dengan 200 μl *Bovine Serum Albumin* 1% dalam *Phosphate Buffered saline* (PBS) dan dimasukkan kedalam *microtiter plate* masing-masing 50 μl per-well.
2. Kemudian *plate* ditutup dengan plastik *adhesive* dan diinkubasi pada suhu ruang selama dua jam.

3. Kemudian dicuci dengan menambahkan 200 μ l 0,05 % *Phosphate Buffered saline Tween-20* per-well sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit.

Inkubasi dengan Antibodi

1. Tambahkan 100 μ l antibodi poliklonal anti-*Early Pregnancy Factor* yang berasal dari kotiledon sapi yang sudah dilabel dengan *Alkaline Phosphatase*, dan dilarutkan dengan *Bovine Serum Albumin* 1% dalam *Phosphate Buffered saline* (PBS).
2. Kemudian *plate* ditutup dengan plastik *adhesive* dan diinkubasi pada suhu ruang selama dua jam.
3. Kemudian dicuci dengan menambahkan 200 μ l 0,05 % *Phosphate Buffered saline Tween-20* per-well sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit.

Deteksi

1. Selanjutnya ditambahkan substrat *para-Nitro-Phenylphosphat* (pNPP) dalam *diethanolamine* 10 %, dimasukkan dalam *microtiter plate*, 100 μ l per-well.
2. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan gelap dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan dengan penambahan NaOH 3 M (*Stop Reaction*) 100 μ l per-well.
3. Kemudian dibaca absorbansinya dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

Lampiran 3. Nilai Absorbansi (OD) Protein EPF pada Pengenceran 1:20

<i>Kambing</i>	<i>Rataan</i>
1	0,220*
2	0,212*
3	0,213*
4	0,220*
5	0,057
6	0,223*
7	0,227*
8	0,232*
9	0,221*
10	0,056
11	0,050
12	0,058
13	0,251*
14	0,263*
15	0,058
16	0,050
17	0,084
18	0,226*
19	0,275*
20	0,240*
21	0,050
22	0,058
23	0,064
24	0,211*
25	0,203*
26	0,208*
27	0,236*
28	0,295*
29	0,066
30	0,072

Keterangan : * = positif bunting

COV = 0,0903622

Lampiran 4. Hasil Penelitian Dibandingkan dengan Palpasi Abdominal (90 hari pasca IB)

Kambing	EPF	Palpasi Abdominal
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	-	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	+	+
14	+	+
15	-	-
16	-	-
17	-	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	+	-
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	-	-
30	-	-

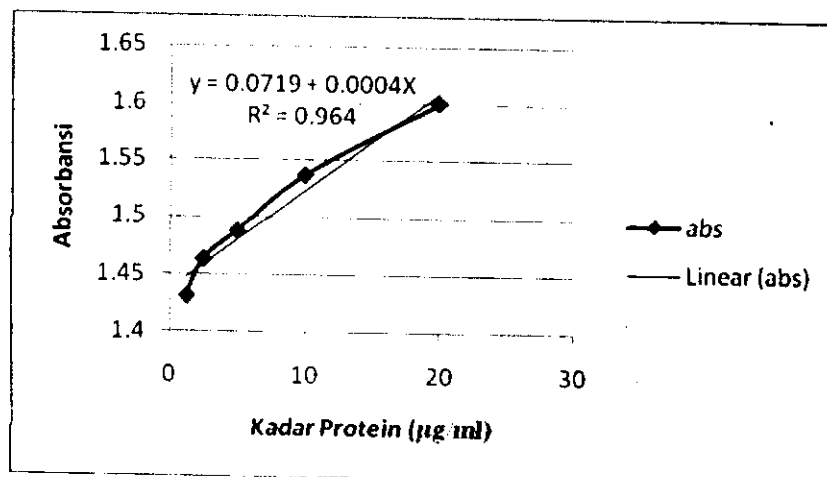
Keterangan: + = Bunting
- = Tidak bunting

Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi EPF Lewat Persamaan Kurva Standar

Konsentrasi dan nilai absorbansi dari EPF standar

kons ug/ml	Abs
20	1,601
10	1,537
5	1,488
2,5	1,463
1,25	1,431

Berdasarkan konsentrasi protein EPF standar dan nilai absorbansinya, maka diperoleh gambaran kurva standar protein EPF dan persamaan regresi liniernya sebagai berikut



Kadar protein EPF serum darah diperoleh dengan cara mengkonversi nilai *optical density* dengan rumus $Y = 0,0719 + 0,0004X$

Y = NILAI ABSORBANSI

X = KADAR PROTEIN EPF

Perhitungan :

$$Y = 0,0719 + 0,0004X \longrightarrow X = \frac{(Y - 0,0719)}{0,0004}$$

X = KADAR PROTEIN EPF

Y = NILAI ABSORBANSI

$$\text{Kambing 1 : } X = \frac{(0,220 - 0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 370,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 2 : } X = \frac{(0,212 - 0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 350,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 3 : } X = \frac{(0,213 - 0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 352,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 4 : } X = \frac{(0,220 - 0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 370,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 5 : } X = \frac{(0,057 - 0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -37,25 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 6 :

$$X = \frac{(0,223-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 377,875 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 7 :

$$X = \frac{(0,227-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 387,875 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 8 :

$$X = \frac{(0,232-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 400,375 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 9 :

$$X = \frac{(0,221-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 372,875 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 10 :

$$X = \frac{(0,056-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -39,75 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 11 :

$$X = \frac{(0,050-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -54,75 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 12 :

$$X = \frac{(0,058-0,0719)}{0,0004}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 13 : } & X = -34,75 \mu\text{g/ml} \\ & X = \frac{(0,251-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = 447,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 14 : } & X = \frac{(0,263-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = 477,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 15 : } & X = \frac{(0,058-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = -34,75 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 16 : } & X = \frac{(0,050-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = -54,75 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 17 : } & X = \frac{(0,084-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = 30,25 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 18 : } & X = \frac{(0,226-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = 385,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kambing 19 : } & X = \frac{(0,275-0,0719)}{0,0004} \end{aligned}$$

$$X = 507,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 20 : } X = \frac{(0,240-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 420,375 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 21 : } X = \frac{(0,050-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -54,75 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 22 : } X = \frac{(0,058-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -34,75 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 23 : } X = \frac{(0,064-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -19,75 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 24 : } X = \frac{(0,211-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 347,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 25 : } X = \frac{(0,203-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 327,875 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Kambing 26 : } X = \frac{(0,208-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 340,375 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 27 :
$$X = \frac{(0,236-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 410,375 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 28 :
$$X = \frac{(0,295-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 557,875 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 29 :
$$X = \frac{(0,066-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = -14,75 \mu\text{g/ml}$$

Kambing 30 :
$$X = \frac{(0,072-0,0719)}{0,0004}$$

$$X = 0,25 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran 6. Hasil Diagnosability Bahan EPF

PA EPF	+	-	
+	TP = 17	FP = 1	PPV = 94,44%
-	FN = 1	TN = 11	NPV = 91,67%
	SN = 94,44%	SP = 91,67%	

Keterangan

+	:	Bunting
-	:	Tidak Bunting
EPF	:	Diagnosa Kebuntingan pada Kambing Berdasarkan EPF
PA	:	Palpasi Abdominal
TP	:	<i>True Positive</i>
FP	:	<i>False Positive</i>
FN	:	<i>False Negative</i>
TN	:	<i>True Negative</i>
PPV	:	<i>Positive Predictive Value</i>
NPV	:	<i>Negative Predictive Value</i>
SN	:	<i>Sensitivity</i>
SP	:	<i>Specificity</i>

Sensitifitas :

$$\frac{\text{true positive}}{\text{true positive} + \text{false negative}} \times 100\% = \frac{17}{17+1} \times 100\% = 94,44\%$$

Spesifisitas :

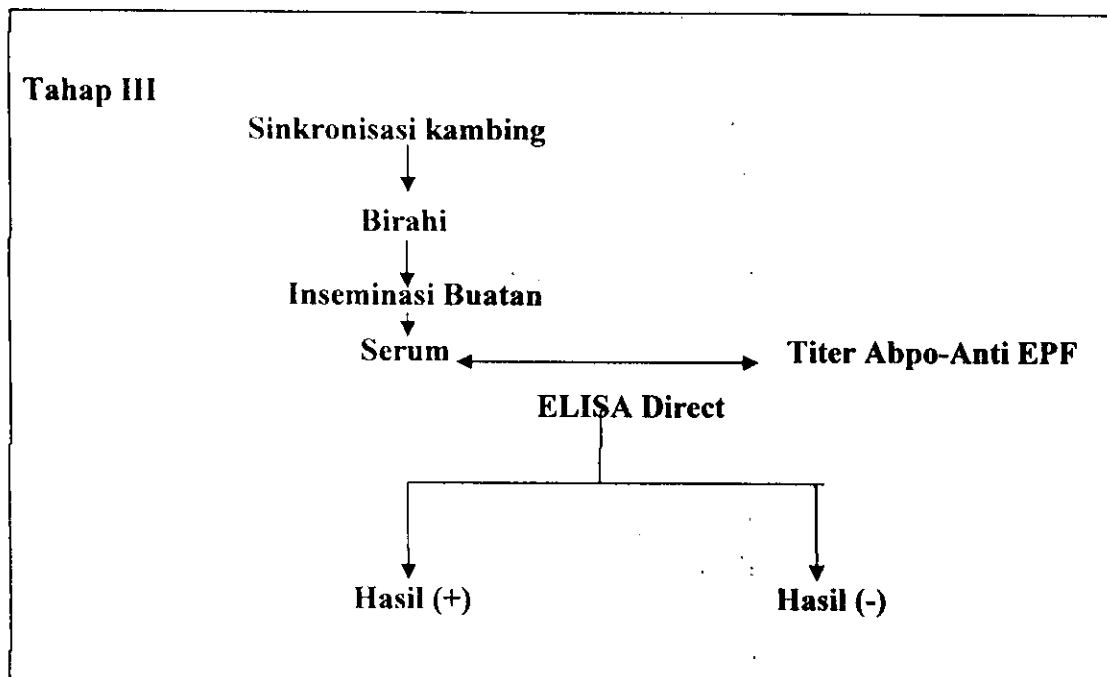
$$\frac{\text{true negative}}{\text{false positive} + \text{true negative}} \times 100\% = \frac{11}{11+1} \times 100\% = 91,67\%$$

Nilai prediksi negatif :

$$\frac{\text{true positive}}{\text{true positive} + \text{false positive}} \times 100\% = \frac{17}{17+1} \times 100\% = 94,44\%$$

Nilai prediksi positif :

$$\frac{\text{true negative}}{\text{true negative} + \text{false negative}} \times 100\% = \frac{11}{11+1} \times 100\% = 91,67\%$$

Lampiran 7. Alur Skema Penelitian

Lampiran 8. Dokumentasi



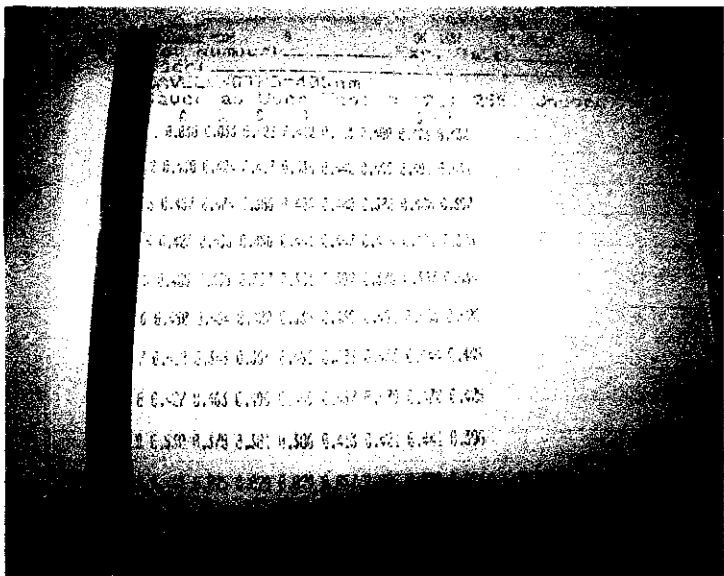
Gambar pengambilan darah pada kambing melalui vena jugularis



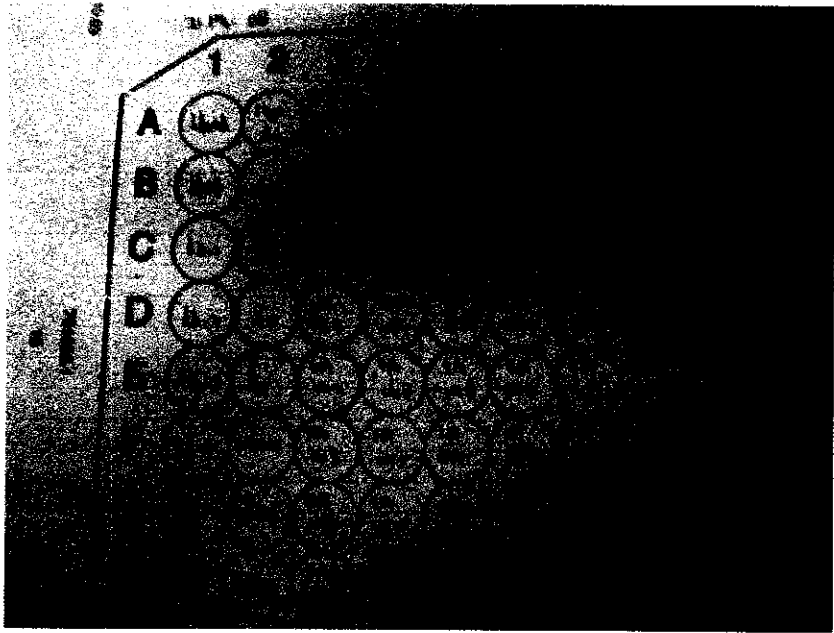
Gambar proses pengerjaan *ELISA direct*



Gambar hasil identifikasi protein EPF dengan metode *ELISA Direct*



Gambar hasil pembacaan *Optical Density* dengan *ELISA reader*



Gambar *plate layout ELISA direct*