

DISERTASI

PERUNUTAN ALUR LUTEOLITIK HORMON PROSTAGLANDIN F_{2α} YANG DIBERIKAN SECARA SUBMUKOSA VULVA UNTUK GERTAK BIRAH PADA SAPI PERAH



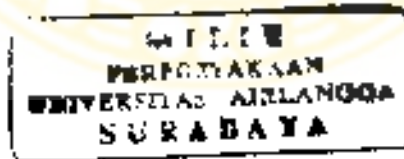
PUDJI SRIANTO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**PERUNUTAN ALUR LUTEOLITIK HORMON
PROSTAGLANDIN F_{2α} YANG DIBERIKAN SECARA
SUBMUKOSA VULVA UNTUK GERTAK BIRAH
PADA SAPI PERAH**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 05 Oktober 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB



Oleh :

PUDJI SRIANTO
NIM. 090013741 D

LEMBAR PERSETUJUAN

**Naskah Disertasi ini Telah Disetujui
Tanggal, 25 Oktober 2004**

Olah
Promotor



**Prof Dr H Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc
NIP. 130 189 851**

Ko-Promotor



**Prof Dr Ismudiono, drh MS
NIP. 130 687 297**

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 7 September 2004

Panitia Penguji Disertasi

Ketua Prof Dr DNK Laba Maharputra, drh MSc

Anggota 1. Prof Dr H Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc
 2. Prof Dr Ismudiono, drh MS
 3. Prof Dr H Setiawan Koedarto, drh MSc
 4. Dr H Nuryadi, Ir MS
 5. Dr Fedik A Rantam, drh
 6. Drs Win Darmanto, MS PhD



Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor 6816/J03/PP/2004
Tanggal : 17 September 2004

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga penulisan disertasi ini dapat terselesaikan dengan baik dan lancar.

Terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada Prof Dr H Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc sebagai promotor beliau tidak henti-hentinya memberikan dorongan semangat untuk cepat segera menyelesaikan jenjang pendidikan tertinggi. Kesabaran, perhatian dan dedikasi yang tinggi untuk senantiasa menyediakan waktu, merupakan kekaguman saya kepada beliau. Dari beliau pula saya mempunyai ketertarikan pada bidang reproduksi yang dimulai sejak tingkat sarjana, magister sampai dengan penyelesaian penulisan disertasi ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi - tingginya saya ucapkan kepada Prof Dr Ismudiono, drh MS selaku ko-promotor yang tidak pernah bosan untuk memberikan semangat, bimbingan dan dari beliaulah ketrampilan lapangan tentang teknik reproduksi khususnya pada sapi perah saya peroleh. Semoga Allah SWT selalu melipat gandakan pahalaNya kepada beliau.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial sehingga sangat meringankan beban saya untuk segera dapat menyelesaikan disertasi ini.

Dengan selesainya penulisan disertasi ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof Dr Med.Puruhilo, dr SpB TKV serta mantan Rektor Prof H Soedarto, dr DTM&H PhD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammad Amin, dr SpP(K) yang telah memberikan fasilitas kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga

Prof Dr Mandojo Rukmo, drg MSc SpKG ketua Program Studi Ilmu Kedokteran dan Prof Dr Hj Juliati Hood A, dr MS SpPA FIAC mantan ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, atas nasehat dan perhatian yang telah diberikan kepada saya.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof Dr Ismudiono, drh MS yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Staf Pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga: Prof H Eddy Pranowo Soedibjo, dr MPH (alm), Prof H Bambang Rahino Selokoesoamo, dr, Prof Soetandyo Wignyosubroto, MPA, Prof Dr J

Glinka, SVD, Prof Dr Koento Wibisono S, Prof Purnomo Suryohudoyo, dr, Prof Dr Kuntoro, dr MPH, Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr MS, Prof Dr M Zainudin, Drs Apt, Siti Pariani, dr MS MPH PhD, Dr L Dyson, Fuad Amsyan, dr MPH PhD, Widodo J Pudjirahardjo, dr MS MPH Dr, Prof Dr H Sarmanu, drh MS, H Mas'ud Haradi, drh MPhil PhD, Dr Fedik A Rantam, drh Dr RTS Adikara drh.,MS, Prof Dr H Mustahdi Soerjoamodjo, drh MSc, Prof Dr H Setiawan Koesdarto, drh MSc, Dr Ir H Nuryadi, MS dan Drs Win Darmanto, MS PhD yang dengan lulus membenkan bekal ilmu pengetahuan dan bimbingan yang sangat berguna untuk penelitian dan penulisan disertasi ini

Prof Dr Ismudiono, drh MS sebagai ketua peneliti *Research Grant* Program DUE-Like Batch II Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuan dana penelitian untuk penyelesaian penelitian tahap II disertasi ini.

Ungkapan rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr Aulianni'am, drh DES staf laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya, Wibi Riawan, SSI staf laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah banyak memberikan bantuan khususnya dalam pemeriksaan imunologis. Prof Dr DNK, Laba Mahaputra, drh MSc di Bagian Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan dan kesempatan kepada saya untuk melakukan pemeriksaan hormonal. Sejawat Husni Anwar, Sri Pantja Madyawati, Abdul Samik dan sejawat Erma Safitri juga di Bagian Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dalam penelitian lapangan maupun laboratorium

Kepada teman-teman angkatan 2000/2001 Program Doktor, Program Studi Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, saya sampaikan terima kasih atas kebersamaannya untuk saling memberikan semangat dan dorongan, semoga persahabatan ini dapat terus terbina

Kepada semua pihak, mitra peternak, teman sejawat, mahasiswa dan teman-teman di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan yang namanya tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu selama penelitian berlangsung, saya sampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan karuniaNya.

Akhimya kepada istriku Hardiati, anak-anaku Ardyan Vita, Wirastya Ariestianto dan Widhiswastya Anantaboga, rasa cinta dan sayang serta terima kasih atas pengertian, pengorbanan, dorongan semangat dan doa yang selalu dibenkan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Semoga Allah SWT selalu memberikan petunjuk keselamatan dan rahmat kepada kita semua. Amien.

RINGKASAN

**PERUNUTAN ALUR LUTEOLITIK HORMON PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$
YANG DIBERIKAN SECARA SUBUKOSA VULVA UNTUK
GERTAK BIRAHİ PADA SAPI PERAH**

Pudji Srianto

Serangkaian penelitian yang terdiri dari penelitian pertama (eksperimental) dan kedua (eksperimental laboratoris) telah dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan timbulnya birahi yang fertil pada sapi perah yang disebabkan oleh pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dan perunutan alur luteolitik yang dialiri oleh $PGF_{2\alpha}$ dalam saluran alat kelamin betina sapi perah untuk menimbulkan birahi.

Penelitian pertama merupakan penelitian lapangan yang menggunakan 30 ekor sapi perah *Frisch Holland* (FH) sebagai sampel, yang dibagi menjadi 10 ekor perlakuan I sebagai kelompok kontrol (penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara im dosis 25 mg), 10 ekor kelompok perlakuan II (penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara sbmv dosis 7,5 mg) dan 10 ekor kelompok perlakuan III (penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara sbmv dosis 5 mg). Perubahan yang diamati dalam penelitian pertama ini adalah jumlah sapi yang birahi, waktu timbulnya birahi, kejadian ovulasi, serta angka kebuntingan. Hasil penelitian pertama menunjukkan bahwa penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ pada kelompok I, II dan III dapat menimbulkan birahi sebanyak 100%; waktu timbulnya birahi berturut-turut adalah $77,00 \pm 7,20$ jam, $73,30 \pm 2,36$ jam dan $73,30 \pm 2,36$ ($P > 0,05$); Kadar hormon progesteron dalam serum darah saat penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ berturut-turut adalah sebesar $3,2590 \pm 2,4447$ ng/ml; $3,5530 \pm 2,4783$ ng/ml dan $3,8700 \pm 2,0592$ ng/ml ($P > 0,05$), kadar hormon progesteron saat birahi didapatkan berturut-turut sebesar $0,0780 \pm 0,1724$ ng/ml, $0,0950 \pm 0,1630$ ng/ml dan $0,1820 \pm 0,1703$ ng/ml ($P > 0,05$). Sedangkan kadar hormon progesteron hari ke-7 setelah birahi didapatkan berturut-turut sebesar $2,7190 \pm 1,2933$ ng/ml, $2,7350 \pm 1,6790$ ng/ml dan $2,3750 \pm 1,0092$ ng/ml ($P > 0,05$). Analisis faktorial (3×3) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara dosis hormon $PGF_{2\alpha}$ yang diberikan dan waktu pengambilan darah terhadap kadar hormon progesteron dalam serum darah ($P > 0,05$), akan tetapi terdapat perbedaan yang sangat nyata antara pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga dengan kadar hormon progesteron dalam serum darah ($P < 0,01$). Persentase kebuntingan pada sapi perah didapatkan berurut-turut sebesar 70%; 70% dan 60% ($P > 0,05$).

Penelitian kedua yang merupakan penelitian eksperimen laboratorik terdiri atas rangkaian penelitian yang meliputi biosintesis anti- $PGF_{2\alpha}$ dengan cara memberikan imunisasi sebanyak empat kali pada delapan ekor kelinci lokal jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 2 ekor. Kelompok kontrol disuntik dengan PBS + CFA dan IFA, kelompok PI

disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ 250 μg (50 μl dalam 50 μl CFA) kelompok PII disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ 500 μg (100 μl dalam 100 μl CFA) dan kelompok PIII disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ 750 μg (150 μl dalam 150 μl CFA). Kemudian dilakukan penyuntikan ulang (*booster*) pada minggu ke 3, 4 dan 5 dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam IFA dengan dosis yang sama. Immunoglobulin G (IgG) yang diperoleh dari serum hasil pengambilan darah dikarakterisasi dengan menggunakan metoda *dot blot* dan ELISA Tidak Langsung. Anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diperoleh digunakan sebagai antibodi primer untuk pemeriksaan imunohistokimia tidak langsung pada saluran alat kelamin betina sapi perah (metoda *Avidin Biotin Complex*).

Pembuktian perunutan alur luteolitik digunakan 5 ekor sapi perah betina sebagai sampel. Satu ekor sebagai kontrol disuntik dengan PBS secara Sbmv dosis 1,5 cc, 2 ekor sebagai kelompok perlakuan I disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara Sbmv dosis 7,5 mg (1,5 cc) dan 2 ekor sebagai kelompok perlakuan II disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara Sbmv dosis 5 mg (1 cc) kemudian selang satu dan dua jam setelah penyuntikan sapi dipotong. Selanjutnya saluran alat kelamin sapi betina diambil dan dipotong-potong (ukuran 2X2X2) untuk dibuat preparat imunohistokimia.

Hasil penelitian kedua menunjukkan bahwa penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebagai imunogen pada kelinci jantan dapat menimbulkan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang dikarakterisir melalui uji spesifisitas dengan menggunakan teknik *dot blot* dan ELISA Tidak Langsung. Selanjutnya ikatan antigen dan antibodi yang divisualisasikan dengan warna kecoklatan terdapat pada semua saluran reproduksi pada perlakuan satu dan dua jam setelah penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$, akumulasi warna kecoklatan banyak terdapat pada preparat korpus uteri.

Dari rangkaian tahapan penelitian yang telah dilakukan dapat dibuktikan bahwa pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan respon birahi yang fertil dan memberikan angka kebuntingan sebesar 60-70%. Pemeriksaan imunohistokimia dengan metoda *Avidin Biotin Complex* dapat digunakan untuk merunut alur luteolitik hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang dibenkan secara submukosa vulva.

SUMMARY

Luteolytic pathway of prostaglandin $F_{2\alpha}$ hormone by vulvar submucosal injection as estrous synchronization on dairy cows

Pudji Srianto

A research, consisted of the first, an experimental study, second, a laboratory experimental study has been conducted in order to prove the incidence of estrous at dairy cows due to the administration of $PGF_{2\alpha}$ hormone through vulvar submucosal and luteolytic groove passed by hormone $PGF_{2\alpha}$ hormone in female genitals tract of dairy cow.

First study was a field research involving thirty dairy cows (FH) as a sample, which were divided into three groups. The first group served as a control (ten cows) injected with $PGF_{2\alpha}$ hormone (25 mg, i.m.). The second and third were given with $PGF_{2\alpha}$ to vulvar submucous injection with the dose of respectively 7,5 mg and 5 mg.

Variables observed in this first study were the amount of cows with estrous, the length of estrus, ovulation evidence, and also pregnancy number. The results suggested that the first research indicated that all of the cows could generate estrous 100%; the length of estrous were successively 77.00 ± 7.20 ; 73.30 ± 2.36 ; and 73.30 ± 2.36 (hours after given with $PGF_{2\alpha}$) ($P > 0.05$); The concentrations of serum progesterone hormone of moment injection of $PGF_{2\alpha}$ hormone were successively equal to 3.2590 ± 2.4447 ng/ml; 3.5530 ± 2.4783 ng/ml and 3.8700 ± 2.0592 ng/ml ($P > 0.05$); The concentrations of serum progesterone hormone at the moment of estrous successively equal to 0.0780 ± 0.1724 ng/ml, 0.0950 ± 0.1830 ng/ml and 0.1820 ± 0.1703 ng/ml ($P > 0.05$). While the concentrations of serum progesterone hormone on day seventh after estrous were successively equal to 2.7190 ± 1.2933 ng/ml, 2.7350 ± 1.6790 ng/ml and 2.3750 ± 1.0092 ng/ml ($P > 0.05$). Factorial analysis (3x3) indicated that there were no interactions between dose of $PGF_{2\alpha}$ hormone given and time of bleed with the concentration of serum progesterone hormone ($P > 0.05$). However there were significant difference between first, second and third bleed with the concentrations of serum progesterone hormone ($P < 0.01$). Pregnancy rate at dairy cows was equal to 70%; 70% and 60% respectively ($P > 0.05$).

The second research comprised biosynthesis of anti- $PGF_{2\alpha}$ which was given to immunized four times at eleven local rabbit male (*Oryctolagus cuniculus*) which were divided into four groups, each group consisted of two rabbit. Group control injected by PBS + CFA and IFA, group PI was injected by $PGF_{2\alpha}$ dose 250 μ g (50 μ L in 50 μ L CFA), group PII was injected by $PGF_{2\alpha}$ 500 μ g (100 μ L in 100 μ L CFA) and group PIII was injected by 750 $PGF_{2\alpha}$ μ g (150 μ L in 150 μ L CFA), then conducted by booster at week third, fourth and fifth with $PGF_{2\alpha}$ in IFA with the same dose.

ImmunoglobulinG (IgG) was taken from blood serum obtained from blood collection and was characterized by using method of dot blot and indirect ELISA. Anti-PGF_{2α} obtained was used as a primary antibody for the inspection of indirect immunohistochemistry (method of Avidin Biotin Complex). The verification of luteolytic groove used five cows as sample. One cow as control was injected by PBS to vulvar submucosal at the dose 7.5 ml. two cows as P1 was injected with PGF_{2α} to vulvar submucosal with dose 7.5 mg (1.5 ml), two cows as PII was injected with PGF_{2α} to vulvar submucosal at the dose of 5 mg (1 ml). After certain period one and two hours cows were sacrificed. There after the female genital tract was taken and cut to pieces to make immunohistochemistry preparation.

The result of the second research indicated that qualitative and quantitative anti-PGF_{2α} could detect using dot blot and indirect ELISA techniques. Antigen and antibody binding visualized with the brown color and located at all of genital reproductive tract at treatment one, and two hours after the injection of PGF_{2α} hormone, the accumulation of antigen and antibody binding was found many more at uterine corpus.

From this research it was proved that the administration of step PGF_{2α} to vulvar submucosal could generate fertile estrous response and provided a good pregnancy number. Immunohistochemical examination with the method of Avidin Biotin Complex is applicable to find the path of luteolysis of PGF_{2α} hormone given to vulvar submucosal injection.



ABSTRACT**Luteolytic pathway of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by vulvar submucosal injection as estrous synchronization on dairy cows****Pudji Srianto**

This research was conducted to study the incidence of estrous after $PGF_{2\alpha}$ administration through vulvar submucosal injection, and the pathway of injected $PGF_{2\alpha}$ as luteolysis in the females genital tract of dairy cows.

Result of first research indicated that the incidence of estrous of all treatment group was 100%, while the length of estrous after injection of 25 mgram (IM); 7,5 mgram and 5,0 mgram (vulvar submucosal injection) were $77,0 \pm 7,2$ hours $73,0 \pm 2,36$ hours and $73,30 \pm 2,36$ hours respectively ($P > 0,05$)

Serum progesterone concentration of first bleeding, were $3,2390 \pm 2,4447$ ng/ml; $3,5530 \pm 2,783$ ng/ml and $3,8700 \pm 2,0592$ ng/ml respectively ($P > 0,05$). At second bleeding were $0,0780 \pm 0,1724$ ng/ml; $0,0950 \pm 0,1630$ ng/ml and $0,1820 \pm 0,1703$ ng/ml respectively and the third bleeding were $2,7190 \pm 1,2933$ ng/ml; $2,7350 \pm 1,6790$ ng/ml and $2,3750 \pm 1,0092$ ng/ml respectively ($P > 0,05$). No interaction between dose of $PGF_{2\alpha}$ and time of bleeding for serum progesterone concentration. However there were significant differences between first, second and third bleeding for serum progesterone concentration. No significant difference on pregnancy rate among treatments ($P > 0,05$). Indirect immunohistochemical technique showed the site of antigen – antibody binding complex within the female genital tract, that indicated the pathway of $PGF_{2\alpha}$ as luteolysis if given by vulvar submucosal injection.

Conclusions of this research are : 1. administration of $PGF_{2\alpha}$ by vulvar submucosal injection to fertile cows are able to stimulate estrous, ovulation and high pregnancy rate. 2 immunohistochemical technique is applicable for identification of pathway of $PGF_{2\alpha}$ in the female genital tract of dairy cows.

Key words:

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), Anti-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Anti- $PGF_{2\alpha}$), and Vulvar submucosal (Sbmv) injection

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Penitia	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	X
Abstract	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tinjauan Tentang Alat Kelamin dan Siklus Reproduksi	8
2.1.1 Alat kelamin betina sapi perah	8
2.1.2 Siklus Birahi Sapi Perah	11
2.2 Hormon Prostaglandin	12
2.2.1 Sejarah	12
2.2.2 Struktur kimiawi hormon prostaglandin	13
2.2.3 Biosintesis hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$	15
2.2.4 Mekanisme luteolitik hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$	16
2.2.5 Kegunaan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$	19
2.3 Anti-prostaglandin	20
2.4. <i>Radio Immunoassay, Immunoblotting</i> ELISA Tidak Langsung dan Immunohistokimia	22
2.4.1 <i>Radio Immunoassay</i>	22
2.4.2 <i>Immunoblotting</i>	24
2.4.3 ELISA Tidak Langsung	25
2.4.4. Immunohistokimia	26

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.1 Kerangka Konseptual	28
3.2 Hipotesis Penelitian	31
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	32
4.1 Rancangan Penelitian	32
4.2 Populasi, Sampel dan Besar sampel	32
4.3 Variabel Penelitian	34
4.3.1 Penelitian I	34
4.3.2 Penelitian II	34
4.4 Definisi Operasional Variabel	35
4.5 Hewan Percobaan	36
4.6 Bahan dan Peralatan Penelitian	37
4.7 Prosedur Penelitian	38
4.7.1 Tahapan penelitian lapangan	38
4.7.1.1 Perlakuan dan pengumpulan serum darah	39
4.7.1.2 Analisis kadar hormon progesteron dengan RIA fase padat	39
4.7.1.3 Cara penghitungan kadar hormon	41
4.7.2 Tahapan penelitian laboratorium	42
4.7.2.1 Biosintesis anti- prostaglandin $PGF_{2\alpha}$	43
Penyiapan hewan coba	43
Imunisasi hewan coba	43
Preparasi serum	44
Purifikasi Anti - $PGF_{2\alpha}$ dari serum	44
Uji spesifisitas Antib - $PGF_{2\alpha}$ hasil induksi $PGF_{2\alpha}$ Melalui Metode <i>dot blot</i>	46
Pengukuran titer antibodi	47
4.7.2.2 Uji imunohistokimia	47
<i>Embedding</i>	48
<i>Coating</i> obyek gelas	49
Pembuatan preparat jaringan	49
Imunohistokimia	49
4.8 Analisis Data	53
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	54
5.1 Data Penelitian	54
5.1.1 Penelitian pertama	54
5.1.1.1 Jumlah sapi yang birahi	54
5.1.1.2 Waktu timbulnya birahi	55
5.1.1.3 Kadar progesteron serum darah	56
5.1.1.4 Persentase kebuntingan	57
5.1.2 Penelitian Kedua	58
5.1.2.1 Biosintesis anti- $PGF_{2\alpha}$	58
5.1.2.2 Karakterisasi anti- $PGF_{2\alpha}$	59
5.1.2.2.1 Hasil <i>Dot blot</i>	59
5.1.2.2.2 Hasil ELISA Tidak Langsung	60

5.1.2.3 Uji imunohistokimia	62
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian.....	67
5.2.1 Penelitian pertama	67
5.2.1.1 Jumlah sapi yang birahi	67
5.2.1.2 Waktu timbulnya birahi	68
5.2.1.3 Kadar progesteron serum darah	69
5.2.1.4 Persentase kebuntingan	71
5.2.2 Penelitian kedua	72
5.2.2.1 Karakterisasi anti- PGF _{21α}	72
5.2.2.1.1 Analisis hasil <i>dot blot</i>	72
5.2.2.1.2 Uji ELISA Tidak Langsung	73
5.2.2.2 Uji imunohistokimia	74
BAB 6 PEMBAHASAN	76
6.1 Penelitian pertama	76
6.1.1 Jumlah sapi perah yang birahi.....	76
6.1.2 Waktu timbulnya birahi	77
6.1.3 Kadar progesteron serum darah	79
6.1.4 Persentase kebuntingan.....	81
6.2 Penelitian kedua	83
6.2.1 Biosintesis anti-prostaglandin dan karakterisasi	83
6.2.2 Uji imunohistokimia	87
BAB 7 PENUTUP	92
7.1 Kesimpulan	92
7.2 Saran	93
DAFTAR PUSTAKA.....	94
LAMPIRAN	100

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
5.1 Persentase jumlah sapi perah yang birahi setelah pemberian hormon PGF_{2x} secara intra muskuler dan submukosa vulva. . .	54
5.2 Rataan waktu timbulnya birahi sapi perah setelah pemberian hormon PGF_{2x} secara intra muskuler dan submukosa vulva . . .	55
5.3 Rataan kadar hormon progesteron pada pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga	56
5.4 Persentase kebuntingan pada sapi perah pada perlakuan I (PGF_{2x} 25 mg im), perlakuan II (PGF_{2x} 7,5 mg sbmv) dan perlakuan III (PGF_{2x} 5 mg sbmv)	57
5.5 Hasil skoring <i>dot blot</i> pada membran nitroselulose.	60
5.6 Rataan titer antibodi kelompok kontrol dengan perlakuan III pada pengambilan darah yang berbeda	61
5.7 Rangkuman analisis <i>Chi-square</i> jumlah sapi perah yang birahi setelah penyuntikan PGF_{2x} secara intramuskuler dan submukosa vulva	67
5.8 Rangkuman analisis varians rataan waktu timbulnya birahi sapi perah setelah penyuntikan PGF_{2x} secara intramuskuler dan submukosa vulva.	68
5.9 Sidik ragam waktu timbulnya birahi pada sapi perah	68
5.10 Sidik Ragam pengambilan darah ke-1,2 dan ke-3 terhadap kadar hormon progesteron pada ketiga perlakuan	69
5.11. Hasil uji beda nyata terkecil waktu pengambilan darah dengan kadar hormon progesteron serum darah pada berbagai dosis PGF_{2x}	70
5.12 Rangkuman analisis <i>Chi-square</i> angka kebuntingan pada sapi perah.	71
5.13 Rangkuman analisis <i>Chi-square</i> rataan skor dan rangking gradasi warna <i>dot blot</i> terhadap dosis PGF_{2x} sebagai imunogen	73
5.14 Rangkuman analisis Mann Whitney rataan skor dan rangking perlakuan pengambilan darah ke-lima.	73
5.15 Rangkuman analisis varians titer antibodi pengambilan darah ke-lima pada perlakuan III.	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Alat kelamin betina sapi.....	9
2.2 Struktur hormon prostaglandin.....	14
2.3 Biosintesis hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam sel luteal.....	16
2.4 Vaskularisasi ovarium - uterus.....	18
2.5 Mekanisme luteolitik hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$	19
2.6 Prinsip dasar teknik RIA fase padat.....	23
2.7 Immunodeteksi pada membran dengan antigen terperangkap.....	24
2.8 Skema ELISA Tidak Langsung.....	26
2.9 Metoda imunohistokimia tidak langsung (metode avidin-biotin complex).....	27
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	30
4.1 Operasionalisasi penelitian tahap I.....	51
4.2 Operasionalisasi penelitian tahap II.....	52
5.1 Histogram jumlah sapi perah yang birahi setelah pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva.....	55
5.2 Histogram kadar hormon progesteron serum darah pada pengambilan darah pertama, ke-dua dan ke-tiga.....	56
5.3 Grafik kadar hormon progesteron dalam serum darah sapi perah setelah menerima tiga macam perlakuan.....	57
5.4 Histogram persentase kebuntingan sapi perah pada pertakuan I, II dan III.....	58
5.5 Hasil <i>Blotting</i> dari 64 buah sera kelompok kontrol dan perlakuan.....	59
5.6 Nilai Titer Antibodi pada kelompok kontrol dan kelompok imunogen $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebesar 750 μg yang dibaca pada panjang gelombang 405 nm.....	61
5.7 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada vulva dengan <i>counterstain</i> Hematoxyllin.....	63
5.8 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada vagina dengan <i>counterstain</i> Hematoxyllin.....	64
5.9 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada serviks dengan <i>counterstain</i> Hematoxyllin.....	64
5.10 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada uterus dengan <i>counterstain</i> Hematoxyllin.....	65
5.11 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada uterus dengan <i>counterstain</i> Hematoxyllin.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1. Isolasi Serum Darah Sapi dan Pemeriksaan dengan Metode <i>Radioimmunoassay</i>	100
2. Imunisasi pada Kelinci Lokal Jantan	101
3. Isolasi serum kelinci lokal jantan	102
4. Purifikasi serum kelinci lokal jantan	103
5. Cara kerja metoda <i>dot blotting</i>	105
6. Prosedur pelaksanaan metoda ELISA Tidak Langsung	107
7. Pembuatan preparat histologis dan histokimia	109
8. Hasil pengamatan birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF _{2α} dengan dosis 25 mg (perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (perlakuan II) serta dosis 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva.....	112
8.1 Analisis pengamatan birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF _{2α} dengan dosis 25 mg (perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (perlakuan II) serta dosis 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva.....	113
9. Waktu timbulnya birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF _{2α} dengan dosis 25 mg (perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (perlakuan II) serta dosis 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva.....	114
9.1 Analisis statistik waktu timbulnya birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF _{2α} dengan dosis 25 mg (perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (perlakuan II) serta dosis 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva.....	115
10. Kadar hormon progesteron serum darah sapi perah yang disuntik dengan hormon PGF _{2α} secara intramuskuler dan submukosa vulva	116
10.1 Analisis statistik <i>univariate</i> waktu pengambilan darah dan dosis terhadap kadar hormon progesteron.....	117
10.2 Penghitungan kepekaan kadar hormon progesteron.....	120
11. Jumlah sapi perah yang bunting setelah penyuntikan PGF _{2α} dengan dosis 25 mg (perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (perlakuan II) serta dosis 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva	121
11.1 Analisis statistik persentase kebuntingan pada sapi perah ..	122
12. Jumlah sera hasil imunisasi pada kelinci lokal jantan	123
13. Analisis Chi-Square untuk rataan rangking <i>dot blot</i>	124
13.1 Analisis uji Z (Mann Whitney test) pengambilandarah ke-5	125
14. Analisis statistik ELISA Tidak Langsung	129

DAFTAR SINGKATAN

Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
AP	: Alkaline phosphatase
BNT	: Beda Nyata Terkecil
Bo	: Binding absolute
BSA	: Bovine Serum Albumin
CFA	: Complete Freund's Adjuvant
CPB	: Competitive Protein Binding
CPM	: Count per minute
Da	: Dalton
DAB	: 3-3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DPC	: Diagnostic Products Corporation
DAG	: Diasil gliserol
E8	: Estradiol benzoate
EIA	: Enzyme Immuno Assay
ET	: Endothelin
ET-1	: Endothelin-1
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assays
FH	: Friesian Holstein (Friesch Holland)
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
G	: Gauge
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
IgG	: Immunoglobulin G
IFA	: Incomplete Freund's Adjuvant
IL-2	: Interleukin-2
IL-1 β	: Interleukin-1 β
Im	: Intra muskuler
M	: Molar
MB	: Maximum Binding
MHC II	: Major Histocompatibility Complex II
n	: besar sampel tiap ulangan
ng	: Nano gram
Na Cl	: Natrium Chloride
NaN ₃	: Sodium Azide
NSB	: Non Specific Binding
OD	: Optical Density
PBS	: Phospat Buffer Saline
PFA	: Paraformaldehyde
PGA	: Prostaglandin A
PGB	: Prostaglandin B
PGC	: Prostaglandin C
PGD ₂	: Prostaglandin D ₂
PGE	: Prostaglandin E
PGF	: Prostaglandin F
PGG ₂	: Prostaglandin G ₂
PGFM	: Prostaglandin F metabolite
PGE ₁	: Prostaglandin E ₁
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂

PGF- α	: Prostaglandin F _{1α}
PGF- γ	: Prostaglandin F _{2γ}
PGH ₂	: Prostaglandin H ₂
PGI ₂	: Prostaglandin I ₂
PGHS	: Prostaglandin H synthase
PIP2	: Fosfatidilinositol difosfat
IP3	: Inositol trifosfat
PKC	: Protein Kinase C
PLC	: Phospholipase C
pNPP	: Para Nitro Phenol Phosphate
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
PRID	: Progesteron Released Intravaginal Device
RIA	: Radioimmunoassay
RPM	: Rotation per minute
Sbmv	: Submukosa vulva
SA-HRP	: Strep Avidin- Horseradish Peroxidase
SAS	: Saturated Ammonium Sulphate
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphonate PolyAcryamide Gel Electrophoresis
TBS	: Tris buffer saline
T _H	: T helper
μ L	: Mikro liter
\bar{x}	: Simpangan baku
σ	: Galat/ragam beda



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peran bioteknologi sebagai alat dalam bidang peternakan, khususnya pada sapi perah sudah merupakan bagian yang tak terpisahkan. Teknologi gertak birahi (penyerentakan birahi), superovulasi, inseminasi buatan dan transfer embrio merupakan beberapa upaya untuk meningkatkan daya reproduktivitas sapi perah. Aplikasi teknologi gertak birahi dengan cara hormonal di Indonesia masih merupakan teknologi yang dianggap mahal dengan keberhasilan yang masih belum menggembirakan. Inskeep *et al* (1998) melaporkan bahwa penggunaan *Progesterone Release Intravaginal Device* (PRID) dikombinasikan dengan *estradiol benzoate* (EB). PRID dikombinasikan dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ dan prostaglandin $F_{2\alpha}$ sendiri dengan pola satu kali pemberian menghasilkan angka kebuntingan sebesar 60%, 50% dan 51%, sedangkan De Jamette (2001) dengan menggunakan metoda *Select Synch* dan *Co-Synch System* memberikan angka kebuntingan 67% dan 43%.

Kendala penggunaan hormon-hormon untuk gertak birahi yang dihadapi saat ini adalah mahalnya harga hormon serta angka kebuntingan yang dihasilkan masih rendah, sementara itu informasi tentang variasi aplikasi penggunaan beberapa hormon untuk keperluan tersebut dirasakan masih sangat kurang



Teknologi penyerentakan birahi pada sapi perah biasanya dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan sekelompok ternak yang mengalami birahi dalam waktu yang bersamaan sehingga memudahkan dalam proses perkawinan yang dilakukan dengan teknik inseminasi buatan, dan jika terjadi kebuntingan sampai dengan kelahiran, maka akan didapatkan pedet dengan umur yang sama, sehingga akan memudahkan perawatan. Disamping itu teknologi ini juga berguna untuk mengatur kesinambungan produksi susu dengan cara mengatur komposisi ternak yang bunting dan laktasi dalam satu periode laktasi.

Hormon yang biasanya digunakan dalam gertak birahi adalah progesteron atau prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Gertak birahi dengan menggunakan hormon progesteron membutuhkan waktu yang lama (sekitar 9-13 hari) dan birahi baru muncul 2-3 hari setelah pengambilan spon atau implan progesteron, di samping itu pemberian hormon ini memberikan rasa tidak nyaman pada sapi, oleh karena harus diberikan secara intravaginal, atau dengan cara implan subkutan yang memerlukan alat khusus. Hormon $PGF_{2\alpha}$ jika diberikan secara intramuskuler atau subkutan dengan dosis 20-25 mg akan mengakibatkan birahi pada sapi pada jam ke 48-72 setelah pemberian (Hafez, 1993).

Terobosan teknologi telah dilakukan untuk menciptakan teknologi gertak birahi dengan menggunakan hormon $PGF_{2\alpha}$ yang murah, yaitu dengan memberikan hormon ini secara intrauterin. Keuntungan yang diperoleh dengan cara ini adalah mengurangi dosis hormon yang

diberikan menjadi sepertiga dari dosis intramuskuler, sehingga pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intrauterin lebih ekonomis dibandingkan dengan pemberian secara intramuskuler. Walaupun demikian pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intrauterin bukannya tanpa kendala, manipulasi serviks dengan menggunakan laras inseminasi untuk mencapai uterus pada fase luteal memungkinkan terjadinya perlukaan dan infeksi pada saluran alat kelamin pada sapi perah akseptor dan angka kebuntingan yang dihasilkan akan menurun menjadi sekitar 45-60% (Hafez, 1993 dan Ismudiono *et al.* 2000). Narasimha dan Suryaprakasam (1990) dalam upaya peningkatan fertilitas sapi silang antara Bos Zebu dengan Bos Taurus menggunakan PRID dikombinasikan dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara *intravulvosubmucous* menghasilkan angka kebuntingan 46,6%. Demikian juga dengan Malik (2001), memberikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intraovari pada sapi perah ternyata hanya memberikan angka kebuntingan sekitar 33,3%.

Hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ merupakan derivat asam lemak yang mempunyai mekanisme luteolitik terhadap korpus luteum selama siklus birahi (Skarzynski dan Okuda, 1999), hormon ini terbentuk secara cepat dari prekursornya kemudian mengalami degradasi secara cepat menjadi metabolit dengan aktivitas prostaglandin yang lemah. $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam aliran darah mempunyai waktu paruh kurang dari satu menit, di dalam paru hampir 99% $\text{PGF}_{2\alpha}$ dimetabolisasikan menjadi 13,14-dehydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ suatu metabolit $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang stabil. Okuda dan Skarzynski (2000) menyebutkan bahwa, pada sapi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam paru mengalami degradasi

sebesar 65% dan 16% tetap bertahan dalam sirkulasi darah sebagai $\text{PGF}_{2\alpha}$ aktif, sehingga hormon ini bisa juga berperan secara sistemik.

Dunbar (1994) menyatakan keberadaan hormon yang diberikan secara eksogen umumnya dapat dideteksi dengan metode *enzyme linked immunosorbence assay* (ELISA) dengan menggunakan anti hormon sebagai antibodi primer. Luck et al. (1995) menyebutkan bahwa dengan memanfaatkan anti-hormon yang telah terlabel dapat diketahui secara kualitatif hormon yang diberikan secara eksogen. Sedangkan keberadaan bahan aktif yang terdapat dalam jaringan atau sel dapat dikenali dengan suatu metoda pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip dasar imunologi yang dikenal dengan metoda Imunohistokimia (Beesley, 1995).

Berdasarkan berbagai aplikasi pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang telah ada serta adanya peran lokal hormon ini melalui "*counter current transfer mechanism*" (Skarzynski & Okuda, 1999), pemberian tunggal hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat dipakai sebagai alternatif dalam upaya melakukan gertak birahi pada sapi perah yang diharapkan dapat mengatasi kendala yang ditimbulkan oleh pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler, subkutan, intrauterin dan intraovari.

Aplikasi pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ untuk keperluan gertak birahi secara submukosa vulva pada sapi perah tidak memerlukan keahlian khusus, caranya mudah dan dosis yang diberikan rendah, sehingga menjadi murah dan efisien. Aplikasi secara submukosa vulva ini diharapkan akan

sangat berguna di dalam menunjang peningkatan populasi sapi perah yang pada gilirannya akan meningkatkan produksi susu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut .

1. Apakah pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi pada sapi perah?
2. Apakah terdapat perbedaan waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler?
3. Apakah birahi yang timbul akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva diikuti oleh kejadian ovulasi?
4. Apakah terdapat perbedaan persentase kebuntingan sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler?
5. Apakah imunisasi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelinci lokal jantan dapat menimbulkan antibodi terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$?
6. Apakah terdapat ikatan antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dan antibodi (anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$) dalam saluran alat kelamin betina sapi perah yang dipapar dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengkaji efektivitas pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam menimbulkan birahi yang fertil untuk meningkatkan persentase kebuntingan serta merunut alur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada saluran alat kelamin betina sapi perah yang diberikan secara submukosa vulva.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi pada sapi perah
2. Mengetahui perbedaan waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler
3. Membuktikan bahwa pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi yang diikuti oleh ovulasi
4. Mengetahui adanya perbedaan persentase kebuntingan sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler
5. Membuktikan bahwa imunisasi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelinci lokal jantan dapat menimbulkan antibodi terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$
6. Mengetahui adanya ikatan antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dan antibodi (anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$) dalam saluran alat kelamin betina sapi perah yang dipapar dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat keilmuan

Memberikan penjelasan tentang kejadian biologis kelamin pada sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva mulai dari timbulnya birahi sampai dengan terjadinya kebuntingan serta membenarkan dasar ilmiah perunutan alur luteolitik yang dilalui oleh $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada saluran alat kelamin betina dalam menimbulkan respon birahi.

1.4.2 Manfaat praktis

Bila penelitian ini dapat mengungkap alur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva untuk gerak birahi, maka teknologi ini diharapkan dapat dijadikan acuan upaya peningkatan efisiensi reproduksi pada sapi perah.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Alat Kelamin dan Siklus Reproduksi Sapi Perah

2.1.1 Alat Kelamin Betina Sapi Perah

Susunan anatomi alat kelamin betina pada umumnya terdiri dari alat kelamin utama yaitu gonad atau ovarium; saluran reproduksi yang terdiri dari tuba fallopii, uterus, servik, vagina dan alat kelamin luar yang terdiri dari vulva dan klitoris. Di dalam rongga pelvis alat kelamin betina sapi perah digantung oleh beberapa alat penggantung. Ovarium digantung oleh alat penggantung mesovarium dan ligamentum utero-ovarika, tuba fallopii digantung oleh mesosalping, sedangkan uterus, servik dan sebagian vagina digantung oleh mesometrium atau ligamentum lata (Hafez,2000).

Ovarium merupakan suatu kelenjar reproduksi yang dapat menghasilkan ovum dan hormon kelamin. Tuba fallopii merupakan saluran sempit berujung lebar, sebagai tempat fertitisasi dan selanjutnya meneruskannya ke uterus. Pada bagian yang melebar terdapat rambut getar. Uterus terdiri dari kornua uteri, korpus uteri dan servik uteri. Pada kornua dan korpus uteri memungkinkan telur yang sudah dibuahi tumbuh dan berkembang sampai saat dilahirkan. Sedangkan servik uteri merupakan tempat pengunci uterus sewaktu ada kebuntingan (Hardjopranjoto, 1995)



Keterangan gambar .

- | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1. Ovarium | 9. Duktus epoophon | 17. Mesosalpinx |
| 2. Korpus luteum | 10. Onficum urethrae | 18. Bursa ovarica |
| 3. Infundibulum | 11. Onficum vestibulans | 19. Lig. ovarii |
| 4. Tuba fallopii | 12. Emientia vestibulans | 20. Lig. lata uteri |
| 5. Cornua uteri | 13. Klitoris | 21. a et v ovarica |
| 6. Korpus uteri | 14. Labia vulva | 22. a uterina media |
| 7. Portio vaginalis | 15. Vestibulum vagina | 23. Ureter |
| 8. Vagina | 16. Mesovarum | 24. Lig. intercomulae |

Gambar 2.1 Alat Kelamin Betina Sapi
(Sumber Popesko, 1954)

Vagina merupakan alat kopulasi hewan betina dan sebagai tempat untuk mendeposisi air mani pada waktu kopulasi. Pada vagina terdapat fornix vagina yang merupakan sudut yang dibentuk oleh proyeksi pelvis kedalam kranial vagina. Vulva sebagai jalan keluar dari urin dan sebagai pintu gerbang alat kelamin dengan dunia luar (Salisbury and van Demark 1985 , Frandson, 1992).

Vaskularisasi ovarium berasal dari *ramus ovaricus* dari arteri *ovarica* yaitu cabang dari arteri *spermatice interna*. *Ramus ovaricus* ini juga mengalirkan darah ke *tuba fallopii*. Vaskularisasi uterus dilakukan oleh arteri *uterina cranialis* yang merupakan cabang arteri *spermatice interna* dan arteri *uterina media* yang berasal dari arteri *umbilicalis* yang merupakan cabang dari arteri *hypogastrica*. Arteri *uterina caudalis* memberikan darah pada servik dan sebagian vagina (Popesko, 1954).

Vulva (*Pudendum femininum*) merupakan ujung paling belakang dari alat kelamin betina yang meliputi *klitoris*, *labium minora* dan *labium mayora*. *Labium minora* berupa lipatan mukosa yang membentuk dinding lateral vestibulum. Epitelnya berupa epitel berlapis pipih dan bagian tengahnya terdiri atas jaringan ikat yang banyak mengandung pembuluh darah, terdapat juga papila tinggi yang menjorok jauh ke dalam epitel. Kelenjar sebacea terdapat pada kedua permukaannya dan tidak dilengkapi dengan folikel rambut. *Labium mayora* berwujud lipatan kulit yang menutupi *labium minora*. Permukaan dalamnya halus, tidak berambut. Permukaan luarnya diliputi epidermis dengan lapisan tanduk dan mempunyai rambut, kelenjar keringat dan sebacea. Bagian tengah setiap bibir mengandung cukup banyak jaringan lemak dan sedikit serat otot polos (Leeson *et al.*, 1991). Pada sisi luar terlihat kedua labia vulva yang bersatu membentuk komisura dorsalis yang

membulat dan komisura ventralis yang runcing. Labia vulva berambut halus dapat berpigmen atau tidak tergantung pada spesiesnya. Di dalam subkutisnya terdapat lapisan lemak disamping beberapa urat daging sirkuler dan spingter yang menutup seluran vulva dari dunia luar. Bidang dalam labia vulva berubah menjadi selaput lendir kutan yang dilanjutkan dengan vestibulum vagina. Labia vulva biasanya tertutup rapat karena adanya otot spingter. Vaskularisasi vulva dan vestibulum berasal dari arteri urogenitalia, pudenda eksterna dan interna (Salisbury and van Demark, 1985; Frandson, 1992).

2.1.2 Siklus Birahi Sapi Perah Betina

Siklus birahi merupakan ritme fungsi faal tertentu sistem kelamin yang terdapat pada lemak setelah masa pubertas tercapai. Dapat juga diartikan sebagai jarak antara timbulnya satu periode birahi ke permulaan periode birahi berikutnya. Setiap spesies hewan mempunyai ciri khas pola siklus birahinya, sapi sebagai hewan poliestrus memperlihatkan gejala birahi secara periodik sepanjang tahun (Ismudiono, 1999).

Mc Donald (1980) menyebutkan bahwa siklus birahi diatur oleh hormon-hormon dari kelenjar hipotalamus, kelenjar hipofisis, ovarium dan uterus. Panjang siklus berkisar antara 17-25 hari dengan rata-rata panjang siklus $20,2 \pm 2,3$ hari pada sapi dara dan $21,3 \pm 3,7$ hari pada sapi dewasa. Selanjutnya disebutkan pula

bahwa berdasarkan fungsi ovarium, maka siklus birahi terbagi menjadi dua fase, yaitu fase folikuler dan fase luteal. Fase folikuler meliputi suatu seri kegiatan yang dimulai sejak luteolisis dan berakhir saat folikel dominan pada ovarium mengalami ovulasi. Karakteristik fase luteal adalah terdapatnya korpus luteum pada ovarium yang mensekresi hormon progesteron sampai terjadinya regresi korpus luteum. Sedangkan berdasarkan perilaku atau perubahan yang nampak secara klinis pada saluran alat kelamin, maka dalam satu siklus birahi terbagi menjadi empat fase yaitu, proestrus, estrus, melestus dan diestrus.

Hanadi *et al* (2000) menyebutkan bahwa akurasi deteksi birahi merupakan hal yang sangat fundamental dalam mengevaluasi keberhasilan sinkronisasi birahi pada ternak sapi. Kebanyakan sapi secara alami menunjukkan perubahan tingkah laku saat birahi antara jam enam pagi sampai jam enam sore. Selanjutnya disebutkan pula bahwa ketepatan deteksi birahi ditentukan oleh faktor frekuensi, lama dan waktu pengamatan perubahan tingkah laku selama birahi.

2.2 Hormon Prostaglandin

2.2.1 Sejarah

Von Euler pada tahun 1935 pertama kali menemukan suatu zat yang dihasilkan oleh kelenjar prostat manusia yang selanjutnya



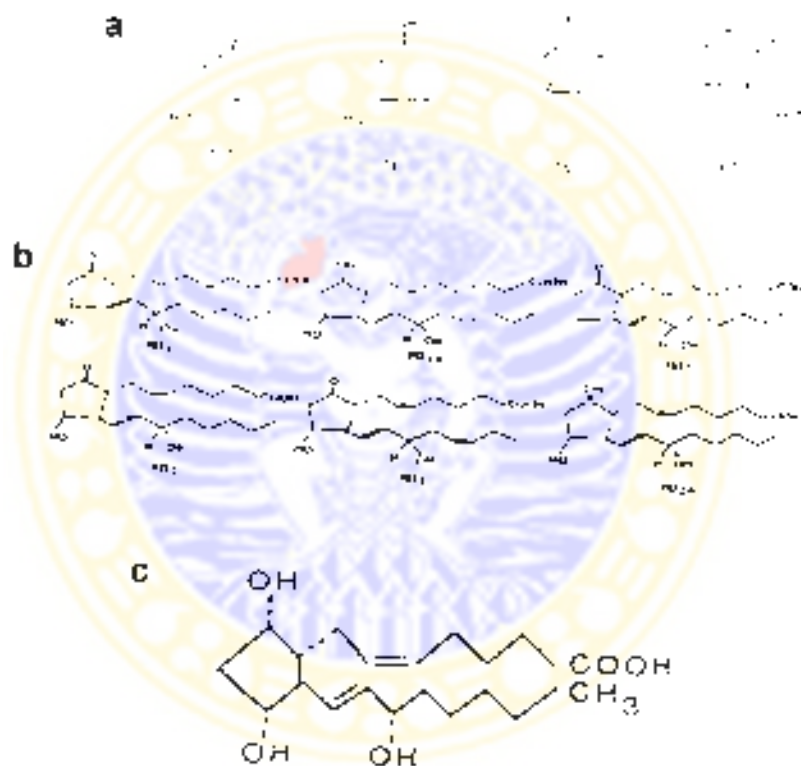
diberi nama prostaglandin. Prostaglandin merupakan suatu zat yang dapat menurunkan tekanan darah serta dapat memacu kontraksi usus dan uterus. (Djojosoebagio, 1996)

Ford *et al* (1995) menyebutkan bahwa prostaglandin dapat disintesis oleh berbagai organ seperti paru, hati, ginjal dan limpa serta efeknya sangat beraneka ragam. Pembentukannya dapat dirangsang oleh berbagai stimuli. Dalam jumlah sangat kecil sudah cukup untuk menimbulkan berbagai efek seperti vasodilatasi, kontraksi uterus, usus maupun bronchus. Selanjutnya disebutkan pula bahwa di antara ke lima kelompok utama prostaglandin, yang berhubungan erat dengan proses reproduksi adalah $PGF_{2\alpha}$ dan PGE_2 . $PGF_{2\alpha}$ mempunyai efek lebih baik daripada PGE_2 dalam proses meregresikan korpus luteum. Selain itu $PGF_{2\alpha}$ juga mempengaruhi peningkatan kontraksi tuba fallopii dalam transport sel telur dan spermatozoa pada waktu birahi dan perkawinan.

2.2.2 Struktur Kimiawi Hormon Prostaglandin

Senyawa prostaglandin merupakan derivat asam lemak esensial yang mempunyai 20 atom karbon yang mengandung 3,4 atau 5 ikatan tidak jenuh disebut asam lemak prostanoat. Penamaan prostaglandin menurut huruf alfabet (A, B, E dan F) didasarkan pada struktur cincin siklopentan. Selanjutnya disebutkan pula bahwa kelompok PGF kemudian dibedakan lagi bergantung pada gugusan hidroksil yang terdapat

pada atom karbon ke-9 apakah berada pada kedudukan trans (α) atau cis (β), dan kelompok PGF yang trans terbagi lagi berdasarkan ikatan ganda yang terdapat dalam struktur hormon tersebut menjadi $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, dan $\text{PGF}_{3\alpha}$. $\text{PGF}_{2\alpha}$ mempunyai rumus kimia $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$ dengan berat molekul 476,6 (Sigma, *Chemical Company* 1991).



- Keterangan gambar.
 a. Cincin siklopentan prostaglandin E, F, A dan prostaglandin G
 b. Struktur hormon prostaglandin E₁, E₂, E₃, F₂, F₃
 c. Hormon prostaglandin F₂

Gambar 2.2 Struktur Hormon Prostaglandin
 (Sumber : Hafez, 1993 dan Djojosoebagio, 1996)

Berdasarkan struktur kimianya, prostaglandin dikelompokkan dalam lima kelompok besar yaitu PGA, PGB, PGC, PGE dan PGF.

Perbedaan antara satu dengan lainnya terletak pada gugus fungsional yang terletak pada cincin segi lima (*cyclo pentane*) Setiap jenis prostaglandin mempunyai fungsi yang berbeda-beda antara lain berpengaruh terhadap saluran pencernaan, saluran pernafasan, sistem saraf pusat serta saluran reproduksi (Hafez. 1993)

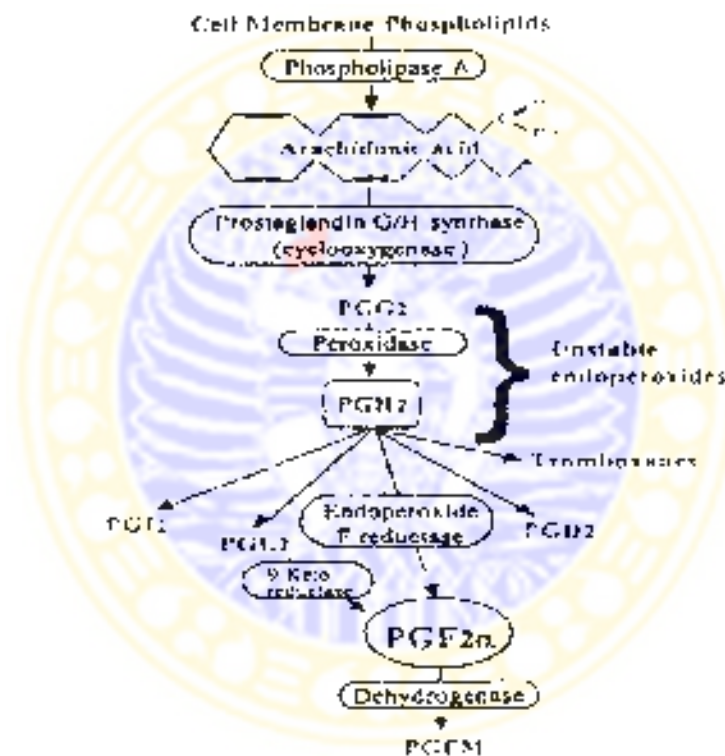
2.2.3 Biosintesis Hormon Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Hafez (2000) menyatakan bahwa prostaglandin pertama kali berhasil diisolasi dari cairan kelenjar seks aksesoris dan ternyata hampir semua jaringan tubuh mensekresi hormon ini. Selanjutnya disebutkan pula bahwa asam arachidonat merupakan prekursor hormon ini.

Kindahl (1980) menyebutkan bahwa biosintesis prostaglandin pada awalnya dimulai dari asam arachidonat yang berasal dari fosfolipid dan trigliserida. Asam arachidonat selanjutnya akan mengalami oksigenasi melalui dua jalur, yaitu jalur lipo-oksigenase dan melalui jalur siklo-oksigenase

Djoroşoebagio (1996) juga menyebutkan bahwa biosintesis prostaglandin berlangsung secara enzimatis dengan menggunakan asam lemak tidak jenuh yang mempunyai atom karbon sebanyak 20 buah yaitu asam arachidonat yang mempunyai empat ikatan ganda 5,8,11 dan 14 (5,8,11,14 – *tetraene arachidonic acid*) untuk PGE_2 dan $PGF_{2\alpha}$, sedang PGE_1 dan $PGF_{1\alpha}$ disintesis dari asam

arachidonat yang mempunyai ikatan ganda tiga buah yaitu pada atom karbon 8, 11 dan 14 (*8,11,14-triene arachidonic acid*). Sedangkan menurut Okuda & Skarzynski (2000) biosintesis prostaglandin dalam korpus luteum ditunjukkan oleh adanya ikatan enzim *cyclooxygenase* dan *endoperoxide isomerase* pada membran sel seperti di tunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Biosintesis hormon $PGF_{2\alpha}$ dalam sel luteal (Sumber:Okuda & Skarzynski.2000)

2.2.4 Mekanisme Luteolitik Hormon Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Regresi korpus luteum secara fisiologis menurut Godding (1974) dapat disebabkan oleh tiga hal: 1) korpus luteum mengalami regresi karena telah cukup umumnya; 2) korpus luteum

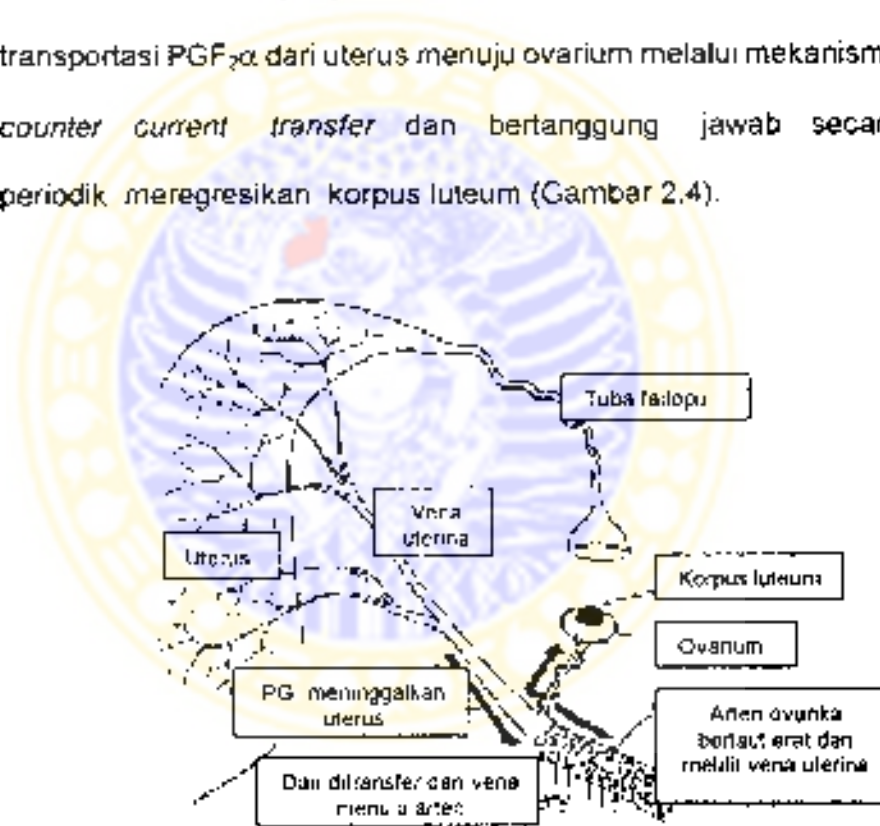
beregresi karena hilang atau tidak adanya hormon yang diperlukan untuk kelangsungan hidup dan fungsinya, 3) korpus luteum beregresi disebabkan oleh adanya zat luteolitik.

Pharris, Tillson dan Erickson yang dikutip oleh Setiawan dan Hamidjojo (1982) menyatakan bahwa ada lima hipotesis tentang mekanisme kerja $PGF_{2\alpha}$ dalam meregresi korpus luteum yaitu: 1) $PGF_{2\alpha}$ langsung mempengaruhi hipofisis, karena hipofisis sangat penting dalam mempertahankan aktivitas korpus luteum, 2) $PGF_{2\alpha}$ dapat menginduksi luteolisis melalui uterus dengan jalan $PGF_{2\alpha}$ menstimulasi kontraksi uterus, sehingga uterus mengeluarkan luteolisin endogen, 3) $PGF_{2\alpha}$ langsung bereaksi sebagai racun terhadap sel-sel luteal, 4) $PGF_{2\alpha}$ bersifat anti-gonadotropin, interaksi antara $PGF_{2\alpha}$ dan gonadotropin terjadi dalam sirkulasi darah atau pada reseptor di korpus luteum, 5) $PGF_{2\alpha}$ mempengaruhi aliran darah ke ovarium.

Hipotesis yang mengatakan bahwa bagaimana $PGF_{2\alpha}$ menginduksi regresi korpus luteum diperkenalkan oleh Niswander *et al.* (1980), yang mengatakan bahwa efek vasokonstriksi $PGF_{2\alpha}$ mungkin yang menyebabkan terjadinya hipoksia yang selanjutnya menyebabkan luteolisis.

Transportasi $PGF_{2\alpha}$ dari uterus untuk meregresikan korpus luteum diduga tidak melalui peredaran darah umum karena $PGF_{2\alpha}$ akan mengalami degradasi di paru-paru. Berdasarkan penelitian

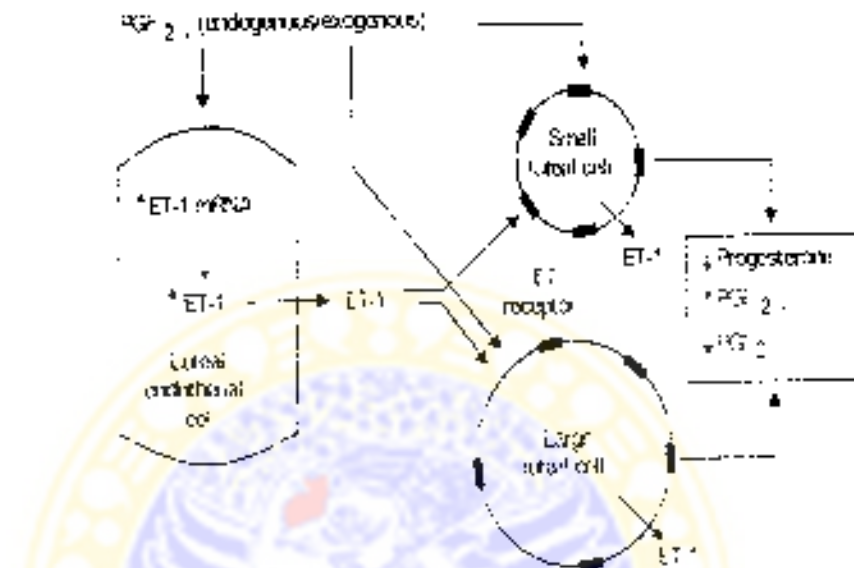
Cumming dan Lawson (1973) yang dikutip oleh Ismudiono (1982), bila arteri ovarika dipisahkan dari vena yang menuju uterus maka kehidupan korpus luteum dapat diperpanjang. Hal ini membuktikan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ dialirkan dan vena uterina ke arteri ovarika berdasarkan prinsip keseimbangan konsentrasi. Konsentrasi $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang terdapat dalam vena lebih tinggi dibandingkan di dalam arteri. Selanjutnya menurut Mc Cracken *et al.* (1972) transportasi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dari uterus menuju ovarium melalui mekanisme *counter current transfer* dan bertanggung jawab secara periodik meregresikan korpus luteum (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Vaskularisasi ovarium–uterus
(Sumber: Hafez, 1987)

Milvae (2000) menyebutkan bahwa proses luteolitik pada ruminansia dimulai dengan membanjirnya $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan uterus, yang selanjutnya akan mempengaruhi sel endotel untuk menghasilkan

endotelin1 yang akan menghambat proses steroidogenesis pada fase luteal seperti diperlihatkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Mekanisme luteolitik hormon $PGF_2\alpha$
(Sumber : Milvae, 2000)

2.2.5 Kegunaan Hormon Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Menurut Hardjopranto (1995), dalam siklus reproduksi normal, korpus luteum dapat mempengaruhi uterus untuk menghasilkan zat luteolitik yang dapat menghancurkan korpus luteum kembali. Zat luteolitik yang disebut dengan $PGF_2\alpha$ ini dihasilkan oleh endometrium uterus yang masuk ke dalam vena uterina menuju ke ovarium. Demikian juga hormon $PGF_2\alpha$ yang dihasilkan oleh sekresi kelenjar asesoris hewan jantan memegang peranan dalam proses kapasitasi sel spermatozoa dalam saluran

alat kelamin betina. Selanjutnya disebutkan pula bahwa mekanisme terjadinya anestrus yang diakibatkan oleh piometra, mumifikasi atau maserasi fetus disebabkan oleh karena ketidakmampuan endometrium untuk menghasilkan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ untuk melisis jaringan luteal.

Untuk keperluan klinis hormon $\text{PGF}_2 \alpha$ sering digunakan untuk sinkronisasi birahi; pengobatan piometra; penanganan anestrus karena korpus luteum persisten serta untuk induksi kelahiran (Hafez, 1993; Hutchinson, 2000 dan Luckas & Bricker, 2001).

2.3 Anti-prostaglandin

Artama (1992) menyebutkan bahwa bersamaan dengan masuknya antigen ke dalam tubuh, maka perangkat imun akan membenarkan respon berupa suatu kaskade reaksi yang terkenal dengan sentral imunologi dogma. Selanjutnya disebutkan pula bahwa sesuai dengan banyaknya antigen determinan, maka suatu antigen akan menstimulasi sejumlah limfosit-B yang mempunyai reseptor sesuai dengan epitop yang akan berproliferasi menghasilkan antibodi yang spesifik.

Prostaglandin mempunyai fungsi sangat beragam dan terdapat perbedaan antara prostaglandin tipe satu dengan tipe lainnya. Beberapa macam obat atau zat mempunyai efek sebagai penghambat atau merangsang sintesis prostaglandin melalui berbagai mekanisme.

Mekanisme kerja zat-zat penghambat atau antagonis prostaglandin ada tiga macam yaitu antagonis farmakologik, antagonis kimiawi dan antagonis fungsional (Djojosoebagio,1996). Dikatakan pula bahwa antagonis farmakologik mempunyai kemampuan untuk mengacaukan pembentukan atau ikatan antara agonis dengan reseptor (*antagonist receptor complex*). Selanjutnya dikatakan bila suatu zat yang dapat berikatan dengan reseptor di mana seharusnya merupakan tempat ikatan agonis disebut antagonis bersaing (*competitive antagonist*), ikatan antara antagonis – reseptor dapat bersifat tidak mantap (*reversible*) dan mantap (*irreversible*). Cara kerja antagonis kimiawi adalah menurunkan atau menghilangkan sama sekali aktivitas biologik agonis dengan jalan melakukan interaksi kimia dengan molekul agonisnya. Kelompok antagonis fungsional bekerja dengan jalan mengurangi agonis tanpa melibalkan reseptor. Beberapa zat yang secara alamiah mempunyai fungsi menghambat sintesis prostaglandin adalah asetilkolin, katekolamin, histamin, dan 5-hydroxythryptamin. Selanjutnya beberapa peneliti melakukan sintesis beberapa zat yang mempunyai kesamaan dengan prostaglandin dengan jalan mengikatkan atom oksigen pada atom karbon nomer 7 pada struktur prostaglandin, zat ini mempunyai fungsi sebagai antagonis prostaglandin.

Skarzynski *et al.* (2000) menyebutkan bahwa beberapa cara telah dikembangkan untuk mengetahui mekanisme kerja hormon, salah satunya dengan menggunakan metoda *direct enzyme immunoassay* (EIA)

melalui preparasi antagonis atau anti-hormon yang dikehendaki, selanjutnya disebutkan pula bahwa antisera $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan antisera PGE_2 telah banyak digunakan untuk keperluan tersebut

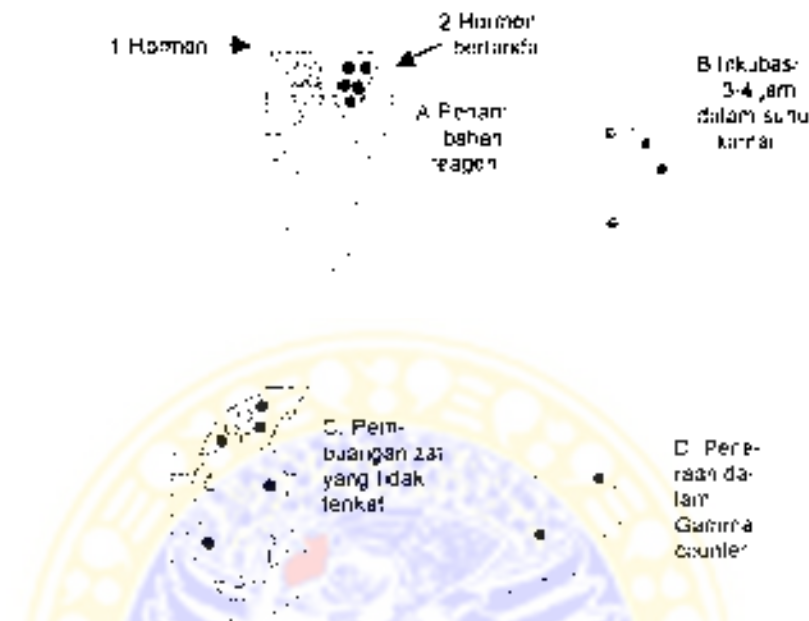
2.4 Radio Immunoassay, Immunoblotting, Elisa Tidak Langsung dan Immunohistokimia.

2.4.1 Radio Immunoassay

Teknik *Radio Immunoassay* (RIA) dimulai dengan penemuan Berson dan Yellow (1969) tentang kadar insulin secara kuantitatif dan hingga kini hampir seluruh hormon protein maupun steroid telah dapat ditentukan secara kuantitatif dengan teknik RIA.

Mahaputra (1990) menyebutkan bahwa prosedur RIA fase padat yang menggunakan prinsip adanya persaingan reaksi antara *radioligand* dengan *ligand* terhadap antibodi spesifik yang disebut *competitive protein binding* (CPB) atau *ligand binding assay*. Persaingan antara hormon yang akan diperiksa (*ligand*) dengan hormon bertanda (*radioligand*) menduduki *receptor site* antibodi yang spesifik terjadi berbanding terbalik dengan jumlah atau kadar hormon yang diperiksa. Selanjutnya disebutkan pula bahwa semakin banyak kadar hormon yang diperiksa akan berakibat sedikit kesempatan *radioligand* menempatkan diri pada *receptor site antibody*, sehingga peneraan di dalam *gamma counter* makin sedikit. Pengukuran kadar progesteron dilakukan dengan *manual gamma counter* selama satu

menit, kepekaan (*sensitivity*) pada *assay* ini adalah 0,03 ng/ml (International Atomic Energy Agency, 1984 dan Mahaputra 1990).



Gambar 2.6 Prinsip Dasar Teknik RIA Fase Padat (Sumber : Mahaputra, 1990)

Batasan yang digunakan dalam penentuan kadar progesteron dalam serum darah sapi perah meliputi : kadar progesteron pada fase folikuler (saat birahi) 0,0 – 0,70 ng/ml, fase luteal (7 hari pasca inseminasi) 0,93 – 1,30 ng / ml dan bunting dini (22 hari pasca inseminasi) 1,50 – 2,62 ng/ml dan kematian embrio dini (hari ke-0, hari ke-22 – 29 dan hari ke-30 – 60) mempunyai kadar progesteron masing-masing 0,33 – 0,93; 2,48 – 3,38 dan 0,28 – 3,1 ng/ml sedangkan kadar progesteron pada hewan tidak bunting pada hari ke-0, hari ke-22 – 29 dan hari ke 30 – 60 adalah sebesar 0,94; 0,27 dan 0,38 ng/ml (Mahaputra, 1990).

2.4.2 Immunoblotting

Salah satu metode *immunoblotting* yang dapat digunakan adalah *dot blotting* yaitu suatu metode untuk mendeteksi keberadaan antigen (Goer,1993). Prosedurnya adalah antigen ditetaskan pada membran *nitrocellulose* atau *polyvinylidene difluoride* (PVDF) dan diinkubasikan dalam antibodi, tanpa adanya pemisahan melalui SDS-PAGE sehingga *dot blotting* hanya mengetahui keberadaan antigen dan tidak memberikan informasi berat molekul



Gambar 2.7 Imunodeteksi pada membran dengan antigen terperangkap
(Sumber : Promega, 1996)

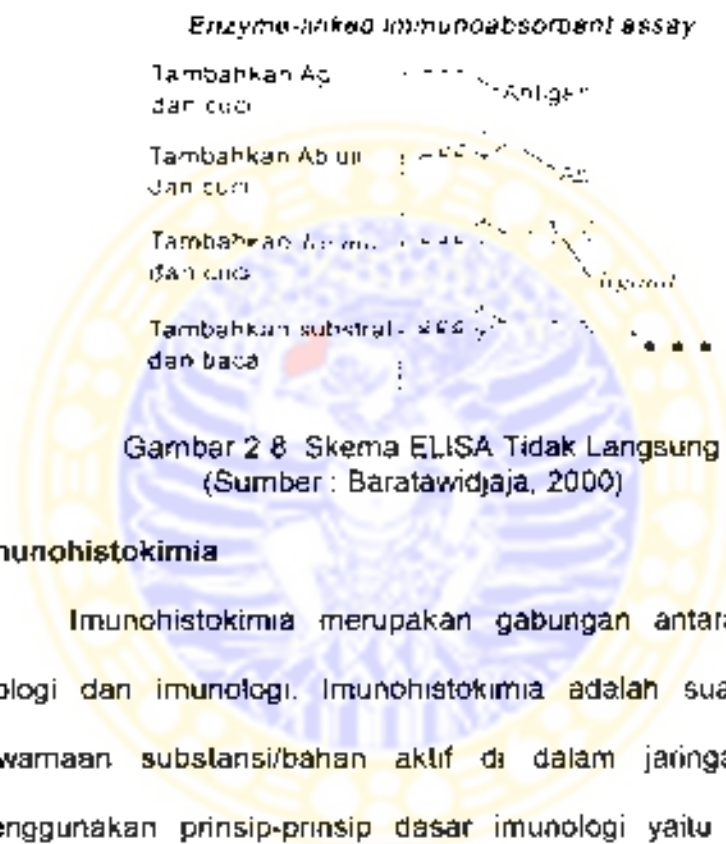
Reaksi spesifik antara antigen dan antibodi dikonfirmasi dengan antibodi *conjugate alkaline fosfatase* sebagai antibodi sekunder dan direaksikan dengan substrat. *Dot blotting* dapat digunakan untuk menetapkan secara kualitatif konsentrasi antigen dengan intensitas warna yang ada pada membran (Goer, 1993)

2.4.3 Elisa Tidak Langsung

Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlmann pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam immunoassay. Aplikasi dari metode ini salah satunya adalah dipergunakan untuk mendeteksi antibodi dengan cara menilai absorbennya melalui *Optic Density (OD)* (Burgess, 1995). ELISA terbagi menjadi dua sistem, yaitu sistem homogen dan heterogen. Sistem heterogen terdapat dua model, yaitu kompetitif dan non kompetitif ELISA.

Non kompetitif ELISA adalah sistem yang paling banyak digunakan dan dikembangkan karena lebih sensitif dibandingkan model sistem yang lain. Salah satu contoh dari sistem ini adalah metode *indirect* ELISA (Rantam, 2003). Model ini banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini mudah diperoleh. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus. Antibodi dapat dideteksi dengan cara antigen diikatkan pada benda padat kemudian ditambah antibodi pertama yang akan dicari, setelah itu ditambahkan antibodi

kedua (*conjugated*) yang telah dilabel dengan enzim (peroksidase). Langkah terakhir adalah dengan menambahkan substrat kromogenik yang menimbulkan warna akibat bereaksi dengan enzim. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang dicari.

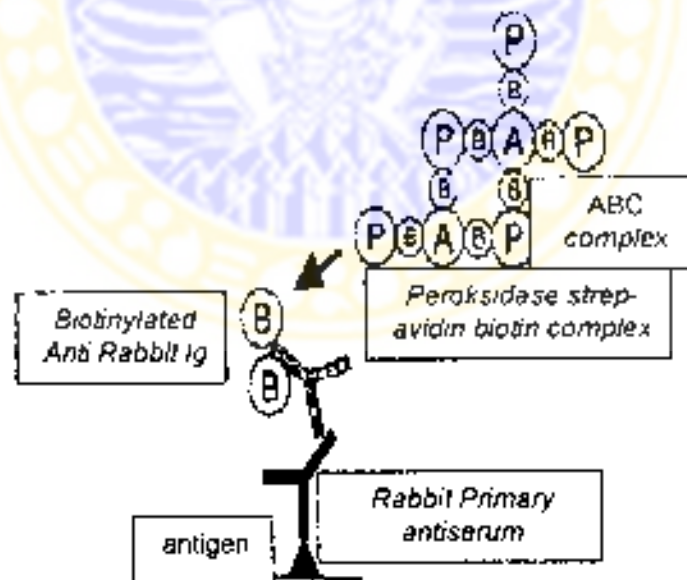


2.4.4 Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan gabungan antara histologi/ sitologi dan imunologi. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunkan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti-bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen-antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi diikat oleh suatu penanda (*marker*) berupa fluoresin, enzim, bahan partikel atau isotop yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa

protein, karbohidrat asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat, 2002, Setijanto,2002).

Beberapa syarat yang harus dipenuhi dari metode ini adalah bahan aktif tersebut harus dapat membentuk antibodi yang spesifik terhadap bahan aktif tersebut bila disuntikkan ke hospes kedua yang berbeda dengan hospes tempat asal bahan aktif tersebut. Bahan aktif tersebut juga harus terakumulasi dalam jumlah cukup di dalam sel atau jaringan sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik serta dapat divisualisasikan. Stabilitas dan deteminan antigen yang akan diidentifikasi dalam jaringan serta sifat alamiah dari antigen dan proses penanganan jaringan (Setijanto,2002).



Gambar 2.9 Metode Imunohistokimia Tidak Langsung Metode Avidin Biotin Complex.
(Sumber Beesley 1995)

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

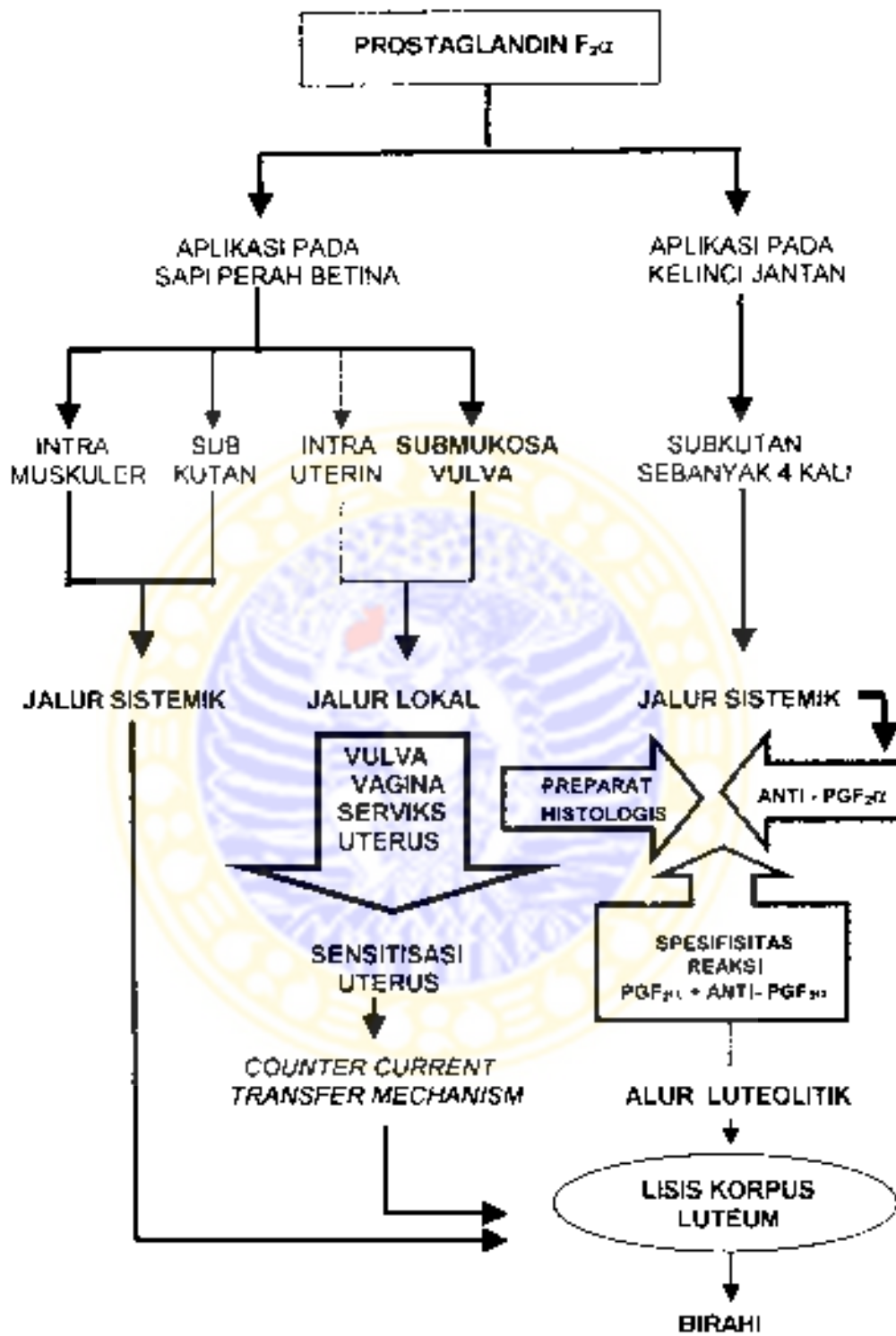
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) merupakan hormon asam lemak dengan fungsi luteolitik. Berdasarkan sifat luteolitiknya, prostaglandin kemudian digunakan untuk kegiatan teknik gertak birahi pada ternak (Hafez, 1993). Oleh karena waktu paruh hormon ini sangat pendek, maka pemberian hormon ini secara intramuskuler membutuhkan dosis yang besar, fungsi lokal hormon ini dimanfaatkan untuk teknik gertak birahi secara intrauterin walaupun dengan berbagai kendala. Proses luteolitik dengan $PGF_{2\alpha}$, membutuhkan sensitisasi oleh beberapa hormon lain seperti hormon oksitosin dan hormon progesteron (Kobayashi *et al.* 2001).

Berdasarkan mekanisme fungsi luteolitik prostaglandin yang dapat berlangsung secara sistemik maupun secara lokal maka teknik sinkronisasi birahi pada sapi perah dengan menggunakan hormon $PGF_{2\alpha}$ diharapkan dapat dilakukan secara submukosa vulva. Mekanisme sistemik $PGF_{2\alpha}$ ini akan menyebabkan lisis korpus luteum, sedang mekanisme lokal menyebabkan perubahan pada endometrium uterus, yang diikuti dengan terjadinya *counter current transfer mechanism* (Milvae, 2000). Akibatnya akan menyebabkan penurunan kadar hormon progesteron dalam darah yang akan merangsang hipofisis anterior untuk menghasilkan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Selanjutnya akan terjadi perkembangan folikel (folikulogenesis) dan terjadi kenaikan

sintesis hormon estrogen (steroidogenesis) dalam folikel, yang berakibat dengan timbulnya gejala birahi (Walker *et al.*, 1994).

Hafez (2000) menyatakan bahwa kebanyakan hormon prostaglandin berfungsi secara lokal dan akan menyebabkan kontraksi pada otot polos melalui jalur interaksi antar sel dan tidak terakumulasi dalam jaringan, sedangkan Darnell *et al.* (1990) menyebutkan bahwa sinyal endokrin dari kelenjar endokrin pada sel target ada dua macam, yaitu sinyal autokrin dan parakrin, selanjutnya disebutkan pula bahwa hormon prostaglandin yang merupakan hormon asam lemak akan berikatan dengan reseptor permukaan sel (*Cell-surface receptor*) dan akan berperan sebagai *signaling substance* dan akan berikatan dengan reseptor permukaan sel yang disebut dengan *complex receptor ligand* dan akan berikatan ke sel-sel berikutnya untuk mencapai target organ.

Pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva diharapkan dapat menimbulkan birahi dan keberadaan hormon ini dalam mencapai target organ dapat ditelusuri dengan menggunakan metoda imunohistokimia dengan penyiapan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Skarzynski&Okuda,2000 dan Nurhidayat,2002)



Gambar 3 1 Bagan Kerangka Konseptual

HIPOTESIS PENELITIAN

1. Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi pada sapi perah
2. Terdapat perbedaan waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler
3. Pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi yang diikuti oleh ovulasi
4. Terdapat perbedaan persentase kebuntingan sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan intramuskuler
5. Imunisasi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelinci lokal jantan dapat menimbulkan antibodi terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari dua tahap. Penelitian tahap pertama merupakan penelitian lapangan dan penelitian tahap kedua merupakan penelitian laboratorik.

Penelitian tahap pertama digunakan untuk menguji hipotesis apakah pemberian hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi sampai dengan terjadinya kebuntingan. Penelitian tahap kedua untuk menguji hipotesis bahwa imunisasi dengan menggunakan $PGF_{2\alpha}$ dapat menimbulkan antibodi terhadap $PGF_{2\alpha}$, selanjutnya anti- $PGF_{2\alpha}$ yang diperoleh dapat digunakan untuk merunut alur luteolitik $PGF_{2\alpha}$ hormon yang diberikan secara submukosa vulva pada saluran alat kelamin betina sapi perah.

4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

Populasi penelitian I adalah sekelompok sapi perah betina bangsa *Fries Holland* (FH) yang berada di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk menguji pemberian hormon $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva sebagai hormon gertak birahi. Sapi-sapi tersebut ditempatkan dalam kandang tunggal berderet dan kandang ganda (*tail to tail*).

Sampel penelitian yang digunakan adalah sapi perah betina yang sudah pernah melahirkan, dalam kondisi laktasi dengan produksi susu rata-rata 10 liter/hari, mendapatkan pakan konsentrat sebanyak 4 kg/hari dan rumput sebanyak 30 kg/hari dan berada dalam fase luteal (hari ke-11 setelah birahi, yang diketahui dengan memberikan PGF_{2α} secara intramuskuler pola dua kali penyuntikan).

Besar sampel dalam penelitian ini diperoleh dengan cara $\delta/d = 1$, sehingga $(\alpha_D^2) \delta^2 = 1$. Diperlukan $Z_{\alpha/2} = Z_{0,025} = 1,96$ dan $Z_{\beta} = Z_{0,20} = 0,85$ $n (1,96 + 0,85)^2 = 7,9$ di bulatkan menjadi 8. besar sampel dalam penelitian ini sepuluh (Steel dan Torrie, 1989).

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma_D^2}{\delta^2}$$

Keterangan :

- n = besar sampel tiap ulangan
- δ = simpangan baku
- σ_D = galat /ragam beda
- $Z_{\alpha/2}$ = harga standar normal untuk 0,025 = 1,96
- Z_{β} = harga standar normal untuk 0,20 = 0,85

Populasi penelitian II terdiri dari a). Sekelompok kelinci lokal jantan untuk biosintesis anti-prostaglandin F_{2α} (untuk mencari titer antibodi tertinggi dalam serum) b). Sekelompok sapi perah betina untuk mempelajari jalur luteolitik hormon PGF_{2α} (untuk mengetahui spesifisitas dan respon PGF_{2α} terhadap saluran alat kelamin) . Sampel penelitian II adalah serum kelinci jantan yang telah diinduksi dengan PGF_{2α} untuk mendapatkan anti-PGF_{2α} dan saluran alat kelamin betina sapi perah

yang telah disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva untuk mempelajari alur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ eksogen melalui teknik imunohistokimia.

Operasionalisasi kegiatan penelitian tahap I dan II dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Penelitian I

Variabel Bebas (*Independent variable*)

Berbagai dosis pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dan intramuskuler sebagai kontrol.

Variabel terikat (*dependent variable*)

1. Jumlah sapi yang birahi
2. Waktu timbulnya birahi
3. Kadar hormon progesteron saat penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$, saat birahi, hari ke-7 pasca birahi
4. Angka kebuntingan melalui palpasi rektal pada hari ke-75 pasca inseminasi

Variabel kendali

1. umur sapi perah betina
2. Siklus birahi sapi perah betina

4.3.2 Penelitian II

Variabel Bebas (*Independent variable*)

1. Berbagai dosis pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara subkutan pada

kelinci jantan

Variabel terikat (*dependent variable*)

1. Antibodi anti-PGF_{2α} dalam serum darah kelinci jantan
2. Ikatan PGF_{2α} dengan anti PGF_{2α} yang terjadi pada saluran alat kelamin sapi perah betina

Variabel kendali

1. Umur kelinci jantan
2. Siklus birahi sapi perah betina
3. Waktu pemberian PGF_{2α}
4. Waktu pengambilan darah

4.4 Definisi Operasional Variabel

1. PGF_{2α} adalah hormon derivat asam lemak yang secara fisiologis diproduksi oleh jaringan endometrium uterus dan digunakan untuk menginduksi birahi pada sekelompok ternak sapi perah.
2. Anti-PGF_{2α} adalah antibodi hasil respon pemberian PGF_{2α} pada kelinci jantan yang diketahui dengan metoda *immunoblotting*.
3. Waktu timbulnya birahi adalah saat antara dimulai pemberian PGF_{2α} secara submukosa vulva sampai terjadinya tanda-tanda birahi pada sekelompok induk sapi perah sebelum dilakukan inseminasi bualan

4. Pelaksanaan inseminasi buatan adalah saat melakukan inseminasi pada sekelompok induk sapi perah yang telah memperlihatkan tanda-tanda birahi yang jelas.
5. Pemeriksaan hormon progesteron dalam penelitian ini adalah pengukuran kadar hormon progesteron pada fase luteal (saat penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$); pada saat birahi (kadar progesteron saat birahi) dan tujuh hari setelah birahi dengan memakai teknik RIA fase padat (*Radioimmunoassay*).
6. Angka kebuntingan adalah jumlah induk sapi perah yang bunting setelah inseminasi dengan semen beku melalui pemeriksaan rektal pada hari ke 75 pasca inseminasi.
7. Ikatan antigen antibodi pada saluran alat kelamin sapi betina untuk membuktikan jalur $\text{PGF}_{2\alpha}$ di dalam saluran alat kelamin setelah penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan menggunakan teknik imunohistokimia.

4.5 Hewan Percobaan

Pada penelitian pertama hewan percobaan yang digunakan adalah sapi perah betina FH yang sehat, dinyatakan dengan bulu yang mengkilat, tidak terdapat telur cacing dalam tinja, telah pernah beranak, berat badan sekitar 300-350 kg, bersiklus normal, tidak bunting dan sedang dalam fase luteal (hari ke-11). Hewan percobaan pada penelitian ke dua adalah ketinci lokal jantan dewasa yang sehat, umur sekitar 6-9 bulan, berat

badan 1 – 1,5 kg untuk biosintesis anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ dan jaringan saluran alat kelamin betina yang diperlukan untuk mengetahui keberadaan hormon $PGF_{2\alpha}$ eksogen dari sapi perah betina yang akan di potong di Rumah Potong Hewan untuk uji imunohistokimia.

4.6 Bahan dan Peralatan Penelitian

Bahan dan larutan yang dipakai dalam penelitian lapangan adalah hormon $PGF_{2\alpha}$ (Glandin N, Lohmann Animal Health GmbH & Co.KG.Jerman) , kit hormon progesteron (COAT-A-COUNT Progesterone DPC, Amerika) alkohol 70%, kapas, sarung tangan, nitrogen cair, semen baku sapi perah. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah kontainer nitrogen cair, laras inseminasi, *plastic sheath*, pinset, gunting, vial steril, *venoject plain*, alat suntik dan peralatan untuk pemeriksaan RIA.

Bahan dan larutan yang digunakan dalam penelitian laboratorium terdiri dari : hormon $PGF_{2\alpha}$, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) (Sigma Aldrich GmbH, Jerman) , SAS 50 % (*Saturated Ammonium Sulphate*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7 , Tween 20 , PMSF (*Poly Methyl Sulfonyl Floride*), Casein, NaN_3 (*Sodium Azide*), Buffer Tris-glisin, glisin, asam sitrat, bisakrilamid, poliakrilamid, mercaptoethanol, amonium persulfat , Commasie Brilliant Blue R250, etanol , BSA (*Bovine Serum Albumin*), asam asetat, glutaraldehid, $NaBH_4$, $MgCl_2$, methanol, $BaCl_2$, NaCl , NaOH, Alkalin

fosfatase, substrat western blue, membran Nitroselulosa (Hybond C pure Amersham Life Science, England), dan ddH₂O

Alat penelitian yang dipakai terdiri dari . *refrigerated centrifuge*, *freezer* , *autoclaf*, peralatan gelas, peralatan seksi, vaccutainer, oven, mikroskop optik, *gamma counter* neraca analitik , pH meter, Biorad elektroforesis, Dot-blotter , *vortex*, mikrotip, mikropipet, kolom kromatografi, tabung dialisis dan *cryostat*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Tahapan Penelitian lapangan

Penelitian ini menggunakan sapi perah induk sebagai hewan coba dengan tahapan pelaksanaan sebagai berikut

- a. Pemeriksaan sapi-sapi sampel dengan kriteria tidak bunting dan dalam kondisi fase luteal (hari ke-11 pasca birahi) yang diketahui setelah pemberian hormon PGF_{2α} secara intramuskuler pola dua kali penyuntikan.
- b. Penyuntikan hormon prostaglandin F_{2α} secara 1).intra muskuler dengan dosis 25 mg dan 2). secara submukosa vulva dengan dosis 5 mg dan 7.5 mg
- c. Pengamatan waktu timbulnya birahi sejak penyuntikan sampai munculnya gejala birahi
- d. inseminasi buatan dengan menggunakan semen beku sapi perah dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari , Malang

- e. Pemeriksaan kadar hormon progesteron darah dengan menggunakan metoda RIA fase padat pada saat penyuntikan PGF_{2α}, saat birahi dan hari ke-7 setelah birahi.
- f. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan dengan palpasi rektal pada hari ke -75 pasca inseminasi

4.7.1.1 **Perlakuan dan Pengumpulan Serum Darah**

Sampel darah sapi perah diambil melalui vena jugularis menggunakan jarum 21 G, ditampung dalam tabung gelas *vacutainer* 10 ml, kemudian ditetakkan miring untuk mendapatkan serum darah. Setelah 2 jam pengambilan darah selanjutnya di sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 RPM. Bagian yang bening (serum darah) dipisahkan dengan bagian padat, kemudian serum darah disimpan dalam *freezer* untuk pemeriksaan kadar progesteron dengan metode RIA fase padat

4.7.1.2 **Analisis Kadar Progesteron dengan RIA fase Padat**

Semua sampel serum darah yang akan diperiksa kadar progesteronnya dengan teknik RIA fase padat diadaptasikan kembali pada suhu kamar setelah disimpan pada lemari es. Pada semua sampel dilakukan homogenisasi dengan alat pengocok listrik selama 30 detik

Penentuan kuantitatif kadar progesteron dilakukan dengan menerapkan teknik RIA fase padat menggunakan tracer ^{125}I -P4 sebagai labelnya (DPC, USA). Tabung polypropylene berukuran 70 X 12 mm yang telah dilapisi antibodi anti-progesteron di dalamnya dipakai dalam assay menurut protokol yang dibuat. *Non specific binding* (NSB) masing-masing tanpa antibodi, *maximum binding* atau *binding* pada 0 ng/ml (MB/Bo), standar atau kalibrator 0 – 20 ng. Ke dalam tabung NSB dan tabung A dipipet 100 μl kalibrator A, selanjutnya masing-masing tabung assay yang telah dilapisi antibodi anti-progesteron diisi dengan kalibrator B-F sebanyak 100 μl . Kemudian 1000 μl larutan tracer ^{125}I -P4 dimasukkan ke dalam semua tabung assay dengan memakai pipet *ependorf* berskala 10 - 1000 μl . Setelah dilakukan pengocokan selama 5 – 10 detik diatas pengocok listrik semua tabung assay dibiarkan pada suhu kamar minimum selama 3 jam. Selanjutnya semua cairan dalam tabung assay dibuang dengan cara membalikkan permukaan tabung ke dalam penampung sampah radioaktif. Tabung-tabung assay dibiarkan terbalik di atas kertas hisap selama 5 menit untuk memberikan kesempatan tracer bebas keluar dari tabung assay. Peneraan kadar hormon

progesteron dilakukan dengan memasukkan masing-masing tabung *assay* selama 1 menit ke dalam *Gamma counter* (Mini-assay type 6-20, Mini-Instrument) (International Atomic Energy Agency, 1984).

4.7.1.3 Cara Penghitungan Kadar Hormon

Tampilan digital yang ditunjukkan *gamma counter* adalah hasil pancaran sinar gamma yang diemisikan oleh radionukleotida ^{125}I dalam *count per minute* (CPM). Pantauan CPM ini kemudian diolah pada masing-masing sampel yang belum diketahui menjadi persentase ikatan (% *binding*) yang dibagi dengan ikatan maksimum (MB=Bo)

$$\% \text{ Binding} = \frac{\text{rataaan CPM sampel} - \text{rataaan CPM NSB}}{\text{rataaan CPM Bo} - \text{rataaan CPM NSB}} \times 100\%$$

Keterangan :

CPM = *Count Per Minute*

NSB = *Non Specific Binding*

Bo = ikatan yang dianggap 100%

Transformasi kadar hormon progesteron dari persentase ikatan ke dalam bentuk ng/ml dilakukan dengan cara memasukkan terlebih dahulu angka persentase ikatan dari standar ke dalam kertas logit-log. Dengan menghubungkan masing-masing titik tersebut maka akan terbentuk garis lurus yang berkorelasi negatif antara persentase ikatan dengan kadar hormon. Selanjutnya

dengan cara memasukkan satu per-satu hasil persentase ikatan sampel serum sapi perah ke atas kertas logit-log yang sudah ada standarnya, maka diperoleh kadar hormon progesteron dalam serum darah tersebut dalam ng/ml (Diagnostic Products Corporation, 1993).

Diagram alir preparasi serum sampai dengan penghitungan kadar hormon progesteron dengan menggunakan metoda RIA fase padat dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.7.2 Tahapan Penelitian Laboratorium

Penelitian ini didahului dengan penelitian pendahuluan dengan tahapan-tahapan penelitian adalah :

- a. Pembuatan anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ melalui induksi beberapa variasi dosis $PGF_{2\alpha}$ pada kelompok hewan coba (Kelinci lokal jantan yang berasal dari Pusat Veterinaria Farma, Surabaya).
- b. Preparasi dan purifikasi anti- $PGF_{2\alpha}$ dan serum hewan coba yang telah di induksi dengan hormon $PGF_{2\alpha}$.
- c. Karakterisasi anti- $PGF_{2\alpha}$ hasil isolasi berdasarkan analisis titer antibodi dengan ELISA Tidak Langsung dan spesifisitas reaksi dengan $PGF_{2\alpha}$ menggunakan *dot-blotting*.
- d. Mempelajari alur luteolitik $PGF_{2\alpha}$ untuk gertak birahi pada kelompok hewan coba sapi perah betina yang telah disuntik

hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ submukosa vulva secara imunohistokimia dengan menggunakan jaringan saluran kelamin betina (vulva, vagina, servik dan uterus)

4.7.2.1 Biosintesis anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$

a Penyiapan Hewan Coba (Kelinci Lokal Jantan)

Hewan Coba yang dipakai untuk tujuan biosintesis anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ adalah kelinci lokal jantan yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. Untuk Produksi anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ digunakan hewan coba ini dikelompokkan berdasarkan dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan , yaitu sebagai berikut :

1. Kelompok Kontrol (Kelinci tanpa injeksi $\text{PGF}_{2\alpha}$, hanya PBS dan *complete Freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA).
2. Kelompok perlakuan yaitu kelinci yang diinduksi dengan dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ 250 μg ; 500 μg ; dan 750 μg (50 μL , 100 μL dan 150 μL) dalam 50 μL ; 100 μL dan 150 μL CFA dan IFA sebagai perlakuan I, II dan perlakuan III.

b Imunisasi Hewan Coba dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$

Penyuntikan dilakukan secara subkutan. Kelompok 1 hanya di imunisasi dengan *adjuvant*. Baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan hewan coba dilakukan penyuntikan ulang (*booster*) sebanyak 3 kali. Dosis sama dengan imunisasi pertama dengan interval 2 minggu .

Cara Penyiapan emulsi dari campuran $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan *adjuvant* dilakukan dengan meneteskan pelan-pelan *adjuvant* dalam $\text{PGF}_{2\alpha}$ sambil di *vortex*, sampai tercampur dan membentuk emulsi secara sempurna (Lampiran 2);

c Preparasi serum

Pengambilan darah untuk memperoleh anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dilakukan melalui *vena auricularis* pada kedua kelompok hewan coba yang telah di induksi dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan menggunakan jarum suntik *disposable* masing-masing pada minggu ke-3 sampai minggu ke-10 setelah imunisasi. kemudian dilakukan pemisahan serum dengan metoda sentrifugasi (1500 RPM selama 20 menit)

Presipitat dibuang, supernatannya dipindahkan ke dalam *microtube* dan disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya dilakukan purifikasi (Lampiran 3)

d Purifikasi Anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dari Serum

Serum ditambah dengan SAS 50% dengan perbandingan 1:1. kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama beberapa menit. Serum disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan dibuang, presipitat dicuci dengan SAS 50% (10x volume pelet), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*.

Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 RPM pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7 sampai volume 1 ml. Dilanjutkan dialisis dalam 0.01M buffer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4°C (Lampiran 4)

e Uji spesifisitas anti-PGF_{2α} hasil induksi PGF_{2α} melalui metode dot blot.

Karakterisasi anti-PGF_{2α} juga dilakukan berdasarkan spesifisitas reaksi dengan PGF_{2α}. Analisis melalui metode *dot blotting* dilakukan sebagai berikut. sampel PGF_{2α} sebagai antigen (Ag), diencerkan 50 kali dengan PBS pH 7,4 . 50 µL antigen ditetaskan pada membran *nitrocellulose* yang sudah diletakkan pada alat *dot blotter* untuk dikeringkan. Setelah kering, dilakukan *blocking* dalam PBS-susu skim 5% pada semua tetesan Ag selama 1 jam diatas alat penggoyang (*shaker*). Selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween 20 0.05% selama 3 menit sebanyak 3 kali. Membran diinkubasi dengan antibodi primer (anti-PGF_{2α}) yang telah diencerkan 50 kali dalam PBS-susu skim 1% pada suhu kamar sambil digoyang selama 2 jam. Membran dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Anti rabbit IgG AP Conjugate* (Promega Corporation, USA) yang

diencerkan dengan TBS 1:2500) selama 1 jam pada suhu kamar dan dicuci lagi dengan PBS-Tween 20 0,05%. Selanjutnya membran direndam dalam substrat *Western Blue* (Promega Corporation, USA) selama 30 menit dan reaksi dihentikan dengan penambahan aquadest ketika muncul warna biru/ ke-unguan dengan intensitas yang jelas (Lampiran 5)

f Pengukuran Titer Antibodi PGF_{2α}

Anti-PGF_{2α} yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) dengan metode ELISA Tidak Langsung, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari ELISA reader. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut : Antigen dengan kadar 10 µg/ml dilarutkan dalam *buffer* Carbonat-Bicarbonat (*Coating buffer*) dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 100 µl tiap *well*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4° C selama satu malam. Kemudian *microplate* dicuci dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali, setelah itu *blocking buffer* dimasukkan pada *microplate* sebanyak 100 µl tiap *well*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali. Anti-PGF_{2α} (Antibodi primer) dilarutkan ke dalam *blocking buffer* BSA

1% dengan seri pengenceran yaitu, 1/4000, kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 100 μ l tiap well, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali, Selanjutnya *Anti-Rabbit IgG* berlabel *Alkalin fosfatase* dilarutkan dalam TBS Tween-20 dengan pengenceran 1/ 2500, dimasukkan pada *microplate* sebanyak 100 μ l tiap well, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam. *Microplate* dicuci dengan PBS-Tween-20 sebanyak empat kali, kemudian substrat *p-NPP* dalam *diethanolamine* 10% dimasukkan pada *microplate* masing - masing sebanyak 100 μ l tiap well. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap, kemudian ditambahkan NaOH 3M (*Stop reaction*) sebanyak 50 μ l tiap well. Setelah itu diukur titer dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm (Lampiran 6)

4.7.2.2 Uji Immunohistokimia.

Pemeriksaan immunohistokimia dilakukan pada hewan coba sapi perah betina yang disuntik dengan hormon $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg kemudian berdasarkan selang waktu (satu jam dan dua jam) saluran alat kelamin, vulva, vagina, servik dan uterus hewan coba diambil dan dipotong-potong dengan ukuran 2 x 2 x2 cm

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui alur luteolitik $PGF_{2\alpha}$ eksogen dalam saluran alat kelamin berdasarkan ikatan $PGF_{2\alpha}$ dan anti- $PGF_{2\alpha}$, terlabel yang dicirikan dengan adanya gambaran warna kebiruan dalam jaringan. Adapun langkah-langkah metode imunohistokimia adalah sebagai berikut :

1 *Embedding*

Saluran alat kelamin dipisahkan antara vulva, vagina, servik dan uterus dan direndam dalam larutan fiksatif berupa Formalin/PFA (1-7 hari). Kemudian direndam dalam etanol 70% selama minimal 24 jam, dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam. Direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Dilanjutkan perendaman sebanyak 3 kali dalam etanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda. Direndam dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Direndam dalam xylol parafin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan *embedding* dengan mencelupkan ovarium dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, parafin akan memadat dan ovarium berada dalam blok parafin.

2 Coating Obyek Gelas

Obyek gelas ditandai dengan kikir dan direndam dalam alkohol 70% selama semalam. Dikeringkan dan dihindarkan dari debu. Dicelupkan selama 30 detik dalam 0,05 % gelatin hangat yang dilarutkan dalam aquabides. Gelatin 0,5% sebanyak 100 ml digunakan untuk 100 obyek gelas. Dikeringkan dalam ruang tertutup. Obyek gelas dapat digunakan dalam 2 hari.

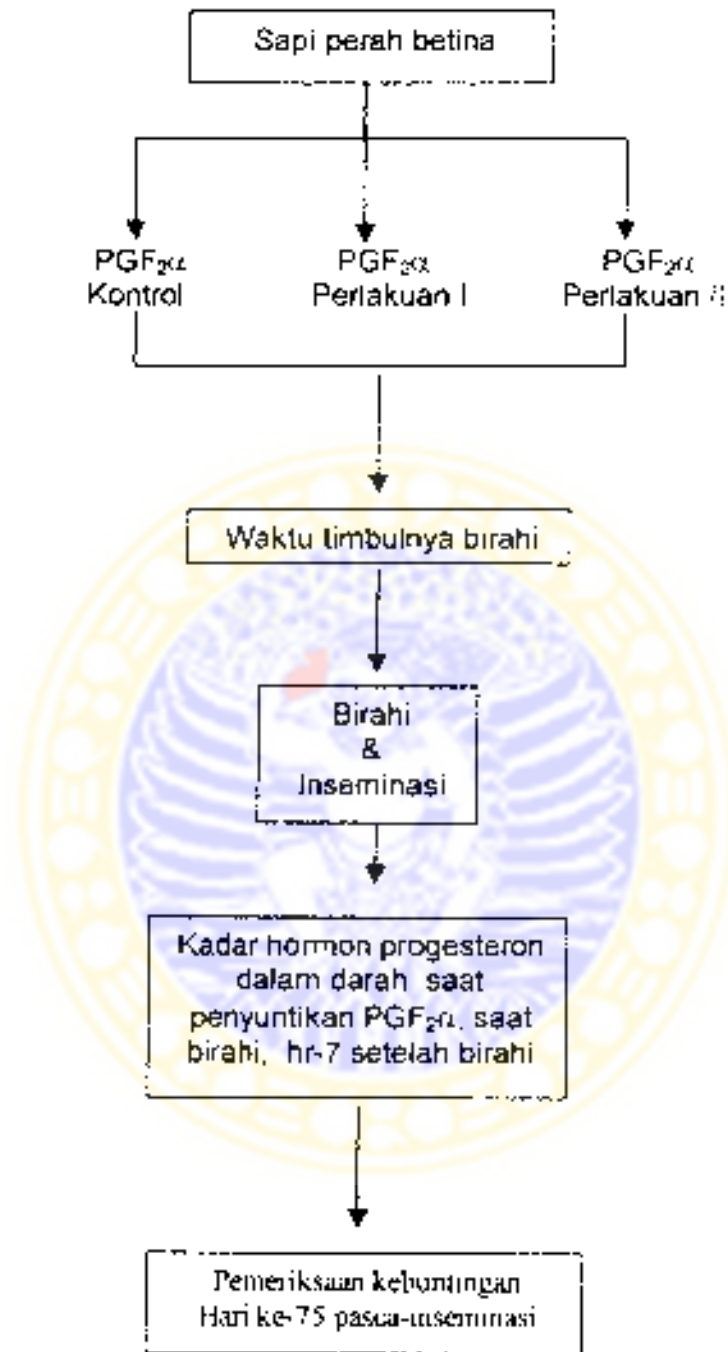
3 Pembuatan Preparat Jaringan

Jaringan saluran alat kelamin betina sapi perah yang terdiri dari vulva, vagina, servik dan uterus pada blok parafin hasil *embedding* dilakukan pemotongan dengan menggunakan mikrotom. Pemotongan diawali dengan mengatur ketebalan irisan, untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan dan akhirnya dihasilkan irisan dengan ukuran 4 μ m

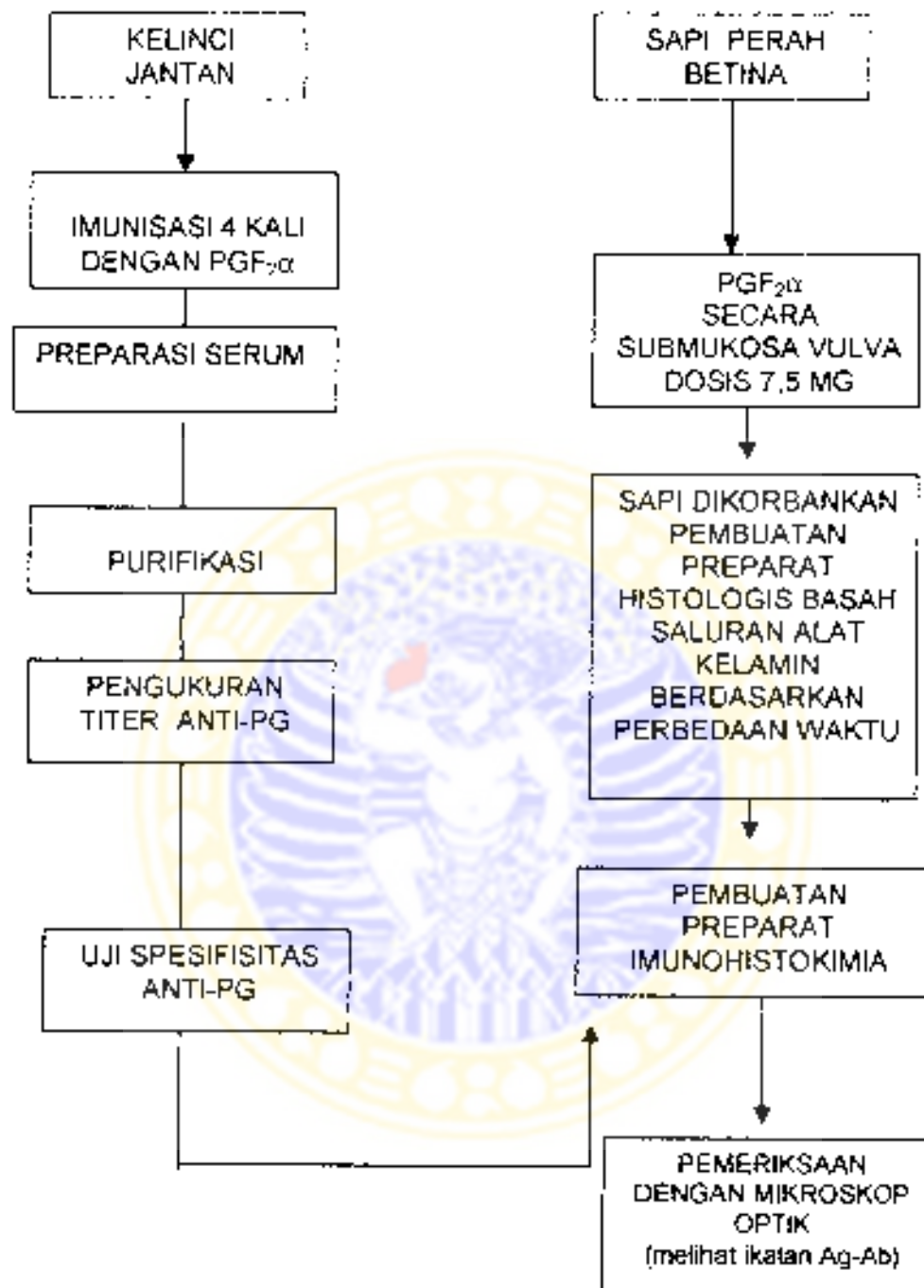
4 Imunohistokimia

Preparat dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan aquades secara berurutan. Dicuci dalam PBS pH 7,4 tiga kali masing-masing selama 5 menit. Direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *dionized water*) selama 5-10 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Direndam dalam 1 %

BSA dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan antibodi primer *Rabbit Anti-PGF2 α* selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan antibodi sekunder *Anti-Rabbit- IgG Biotin Labelled* selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (*Strept Avidin Horseradish Peroxidase*) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan Kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan hematoksilin (*Mayer Hematoxyllin Solution*, Sigma Jerman) selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit. Dilakukan *mounting* dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 40, 100 dan 400 kali. Diagram alir pembuatan preparat histologis dan imunohistokimia secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 7.



Gambar 4.1 Operasionalisasi Penelitian Tahap I



Gambar 4.2 Operasionalisasi Peneelitian Tahap II

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian pertama dan kedua dibuat tabulasi dan disajikan secara deskriptif. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Peta Faktorial. Jumlah sapi perah yang birahi, persentase kebuntingan, pemeriksaan kualitatif anti-PGF_{2α} serta nilai OD anti-PGF_{2α} dianalisis dengan uji statistik non parametrik. Sedangkan waktu timbulnya birahi diuji dengan analisis varians, untuk mengetahui interaksi antara waktu pengambilan darah dan dosis PGF_{2α} yang diberikan terhadap kadar hormon progesteron digunakan uji faktorial (3x3) Apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji BNT. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Steel & Torrie, 1989).

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

5.1.1 Penelitian pertama

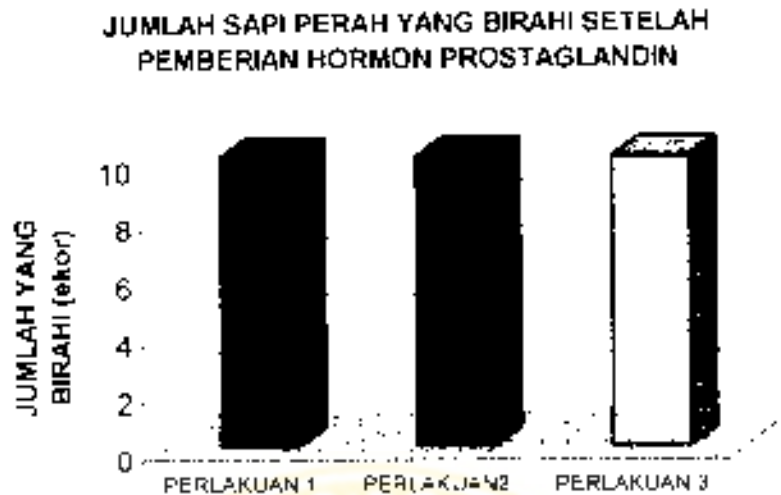
Penelitian pertama dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi, perbedaan waktu timbulnya birahi, birahi yang diikuti dengan ovulasi serta perbedaan persentase kebuntingan pada sapi perah.

5.1.1.1 Jumlah sapi yang birahi

Dua atau tiga hari setelah pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva dilakukan pengamatan secara klinis terhadap sapi-sapi yang menunjukkan gejala birahi. Jumlah sapi yang birahi setelah pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara intramuskuler (perlakuan I) dan pemberian secara submukosa vulva (perlakuan II, dan perlakuan III) dapat dilihat pada Lampiran 8, sedangkan persentase jumlah sapi yang birahi disajikan pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.1.

Tabel 5.1 Persentase jumlah sapi perah yang birahi setelah Pemberian hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva

	Perlakuan I (25 mg, im)	Perlakuan II (7,5 mg, sbmv)	Perlakuan III (5 mg, sbmv)
Birahi	100%	100%	100%
Tidak Birahi	0 %	0 %	0 %
Jumlah	100%	100%	100%



Gambar 5.1 Histogram jumlah sapi perah yang birahi setelah pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva

5.1.1.2 Waktu timbulnya birahi

Waktu timbulnya birahi yang dihitung dalam jam dilakukan sejak penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara intramuskuler (perlakuan I) dan secara submukosa vulva (perlakuan II dan III) sampai terlihat munculnya gejala birahi dapat dilihat pada Lampiran 9, sedangkan rata-rata waktu timbulnya birahi dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Rataan waktu timbulnya birahi sapi perah setelah pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva

Perlakuan	Waktu Timbulnya Birahi (dalam jam)
Ke-1	$77,00 \pm 7,1957$
Ke-2	$73,30 \pm 2,3594$
Ke-3	$75,20 \pm 5,0343$

5.1.1.3 Kadar hormon progesteron serum darah

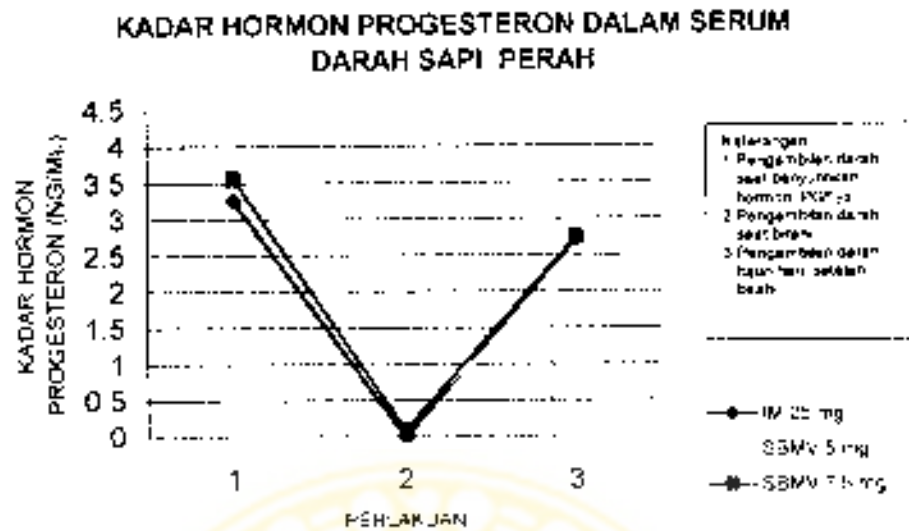
Kadar progesteron serum darah diambil pada saat penyuntikan PGF_{2α} untuk mengetahui bahwa penyuntikan PGF_{2α} benar dilakukan pada fase luteal (pengambilan darah ke-1) kemudian serum darah diambil pada saat birahi (pengambilan darah ke-2) dan tujuh hari setelah birahi (pengambilan darah ke-3). Kadar hormon progesteron pada ketiga pengambilan darah dapat dilihat pada Lampiran 10, sedangkan rataannya dapat dilihat pada Tabel 5.3, Gambar 5.2 dan Gambar 5.3.

Tabel 5.3 Rataan kadar hormon progesteron pada pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga

Waktu Pengambilan	Kadar Hormon Progesteron (ng/ml) pada dosis		
	Im, 25 mg	SbmV, 7,5 mg	SbmV, 5 mg
Ke - 1	3,2580 ± 2,4447	3,5530 ± 2,4783	3,8700 ± 2,0592
Ke - 2	0,0780 ± 0,1724	0,0950 ± 0,1630	0,1820 ± 0,1703
Ke - 3	2,7190 ± 1,2933	2,7350 ± 1,6790	2,3750 ± 1,0092



Gambar 5.2 Histogram kadar hormon progesteron serum darah pada pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga.



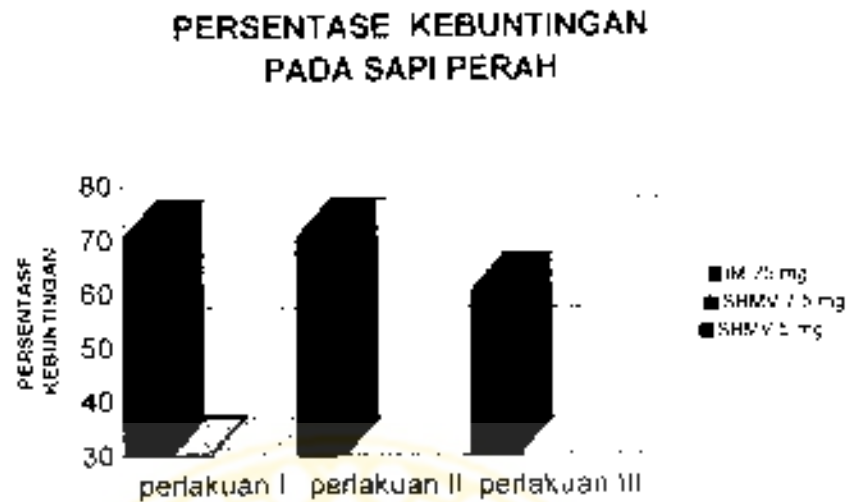
Gambar 5.3 Grafik kadar hormon progesterone dalam serum darah sapi perah setelah menerima tiga macam perlakuan.

5.1.1.4 Persentase kebuntingan

Persentase kebuntingan yang dilakukan dengan cara melaksanakan pemeriksaan dengan palpasi rektal pada semua sapi perah percobaan pada hari ke - 75 pascainseminasi dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.4 (Lampiran 11) dan Gambar 5.4.

Tabel 5.4 Persentase kebuntingan pada sapi perah pada perlakuan I (PGF_{2α} 25 mg im), perlakuan II (PGF_{2α} 7,5 mg sbmv) dan perlakuan III (PGF_{2α} 5 mg sbmv)

	Perlakuan I		Perlakuan II		Perlakuan III	
	Jumlah	%	Jumlah	%	Jumlah	%
Bunting	7	70	7	70	6	60
Tidak bunting	3	30	3	30	4	40
Jumlah	10	100	10	100	10	100



Gambar 5.4 Histogram persentase kebuntingan sapi perah pada perlakuan I, II dan III.

5.1.2 Penelitian kedua

Penelitian kedua dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa imunisasi dengan menggunakan $PGF_{2\alpha}$ sebagai imunogen dapat menimbulkan anti- $PGF_{2\alpha}$ yang selanjutnya anti- $PGF_{2\alpha}$ ini digunakan untuk menjawab permasalahan adanya ikatan antigen dan antibodi pada saluran alat kelamin betina sapi perah dalam merunut alur luteolitik $PGF_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva

5.1.2.1 Biosintesis anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$

Biosintesis anti- $PGF_{2\alpha}$ dilakukan dengan cara imunisasi sebanyak empat kali pada hewan coba kelinci lokal jantan dengan berbagai dosis $PGF_{2\alpha}$ dalam

complete dan incomplete Freund's adjuvant (Lampiran 12).

Sera hasil imunisasi didapatkan sebanyak 64 buah (empat perlakuan, dua ulangan dan delapan kali pengambilan) kemudian dilakukan purifikasi.

5.1.2.2 Karakterisasi anti-PGF_{2α}

Karakterisasi anti-PGF_{2α} dilakukan berdasarkan spesifisitas reaksi dengan PGF_{2α} yang dilakukan dengan metode *dot blotting* dan berdasarkan nilai titer antibodi dengan menggunakan teknik ELISA Tidak Langsung

5.1.2.2.1 Hasil *Dot blot*

Hasil dari metode *dot blot* yang dilakukan pada 64 sera yang terdiri dari 16 sera kelompok kontrol dan 38 sera kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.5

Perlakuan / Dosis imunogen (µg)	Bleeding ke-							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol								
1 (250 µg)				+	•	•		
2 (500 µg)		•		•	•	•		
3 (750 µg)				•	•	•		

Gambar 5.5 Hasil *blotting* dari 64 sera kelompok kontrol dan perlakuan

Pembacaan pada membran nitroselulose dilakukan berdasarkan skor penilaian dari gradasi kegelapan warna dot pada membran nitroselulose dari ke-64 sera yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Hasil skoring *Dot Blot* pada membran Nitroselulose

Perlakuan / Dosis Imunogen		Skor Pengambilan darah ke							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	Ka	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kb	0	0	0	0	0	0	0	0
I (250 μ g)	1a	2	3	2	4	5	5	1	1
	1b	1	3	3	5	6	5	1	1
II (500 μ g)	2a	2	4	4	5	6	5	2	2
	2b	2	4	3	5	6	4	3	1
III (750 μ g)	3a	2	3	1	6	7	5	3	2
	3b	2	4	1	6	7	5	2	2

Keterangan : Ka = kelinci kontrol ulangan pertama; Kb = kelinci kontrol ulangan kedua; 1a, 1b; 2a, 2b dan 3a, 3b : kelinci perlakuan I, II dan III ulangan pertama dan kedua.

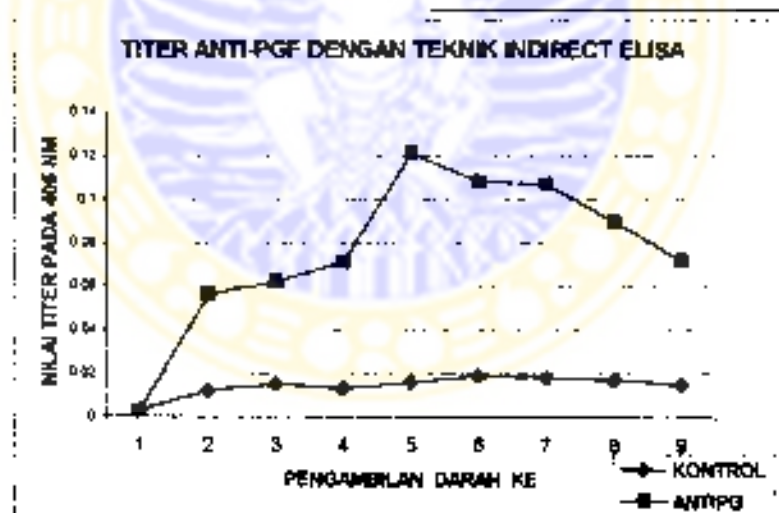
5.1.2.2 Hasil ELISA Tidak Langsung

Uji ELISA Tidak Langsung digunakan untuk menghitung titer antibodi yang terkandung dalam serum darah dari masing-masing pengambilan dan perlakuan. Serum darah yang diperiksa terdiri dari serum kontrol (PBS + CFA/ IFA), dan serum hasil sembilan kali pengambilan setelah imunisasi pertama dan booster (pengambilan darah pertama merupakan serum pre-imun) dari kelompok perlakuan dengan dosis PGF_{2 α} sebagai imunogen sebesar 750 μ g (diperoleh dari hasil *dot blot*). Rataan titer antibodi i

pada pengambilan darah pre-imun (kontrol) dan pengambilan darah ke-1 sampai dengan ke-8 dapat dilihat pada Tabel 5.6, sedangkan grafik garisnya dapat dilihat pada Gambar 5.6.

Tabel 5.6 Rataan titer antibodi kelompok kontrol dengan perlakuan III pada pengambilan darah yang berbeda

Pengambilan darah ke-	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol	0,00300 \pm 0,000730
1	0,03681 \pm 0,025885
2	0,04288 \pm 0,029141
3	0,03413 \pm 0,022093
4	0,04430 \pm 0,028920
5	0,10519 \pm 0,214953
6	0,06937 \pm 0,052895
7	0,06213 \pm 0,046911
8	0,06069 \pm 0,047770



Gambar 5.6 Nilai titer antibodi pada kelompok kontrol dan kelompok imunogen $PGF_{2\alpha}$ sebesar $750\mu g$ yang dibaca pada panjang gelombang 405 nm.

5.1.2.3 Uji imunohistokimia

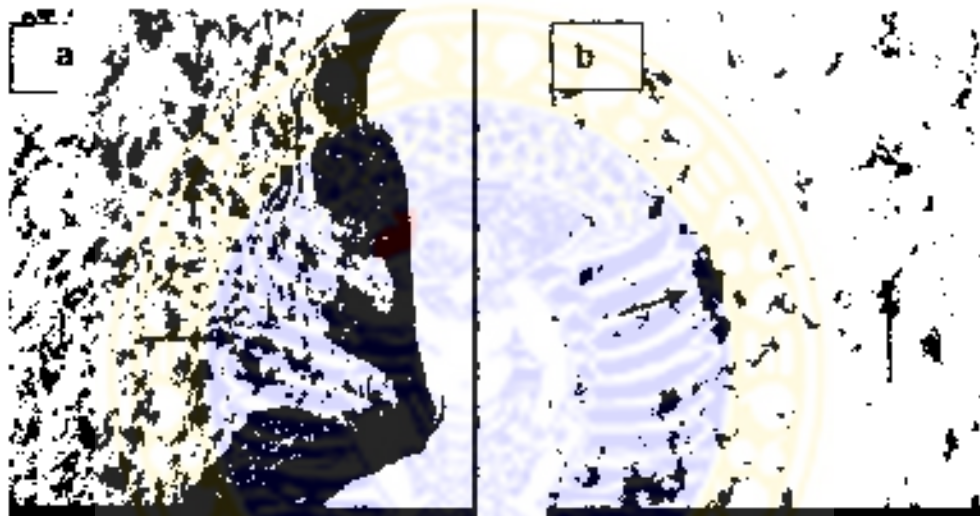
Pemeriksaan ini didahului dengan penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva pada sapi perah betina 1,5 cc yang mengandung $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7,5 mg (perlakuan) dan 1,5 cc larutan NaCl fisiologis secara submukosa vulva (kontrol), kemudian satu jam dan dua jam setelah penyuntikan dilakukan pemotongan sapi perah, saluran alat kelamin dipisahkan, dilakukan pemotongan dengan ukuran 2 x 2 x 2 cm terhadap vulva, vagina, servik dan korpus uteri.

Metode yang digunakan pada uji imunohistokimia ini menggunakan kespesifikan ikatan antara molekul avidin dan biotin SA-HRP yang terdapat pada antibodi sekunder yang membentuk kompleks avidin-biotin melalui molekul avidin.

Kromogen yang digunakan pada penelitian ini adalah DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Dalam larutan kromogen ini telah mengandung peroksida (H_2O_2) sebagai substansi penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP. Komplek yang terbentuk dari kromogen DAB akan menghasilkan warna coklat gelap. Kromogen ini mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami

perubahan warna. Visualisasi detil jaringan menggunakan *counterstain* dengan Hematoksilin.

Uji imunohistokimia pada saluran alat kelamin betina sapi perah yang dipotong satu dan dua jam setelah penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat dilihat pada Gambar 5.7, Gambar 5.8, Gambar 5.9 dan Gambar 5.10.



Keterangan gambar:

- a. Pemotongan satu jam
- b. Pemotongan dua jam
- Menunjukkan adanya ikatan ag-ab

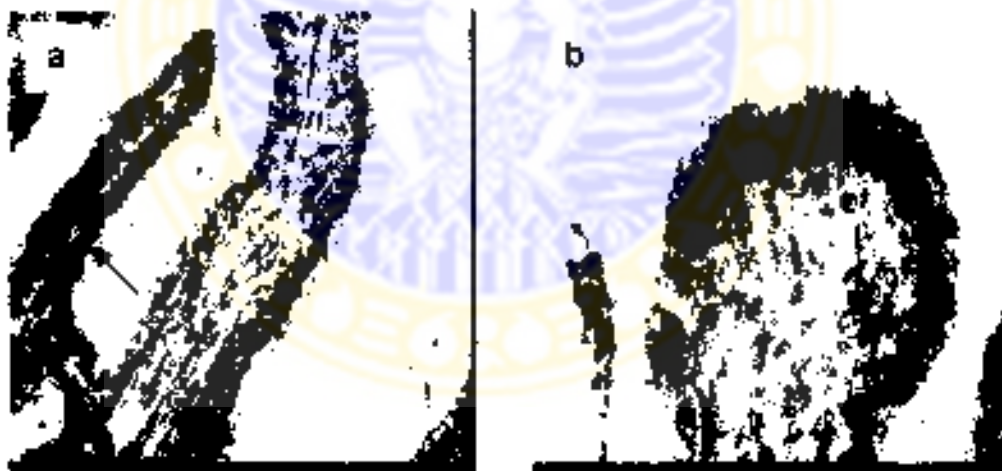
Gambar 5.7 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada vulva dengan *counterstain* Hematoxylin (pembesaran 40 x)



Keterangan gambar.

- a Pemotongan satu jam
- b Pemotongan dua jam
- Menunjukkan adanya ikatan ag-ab

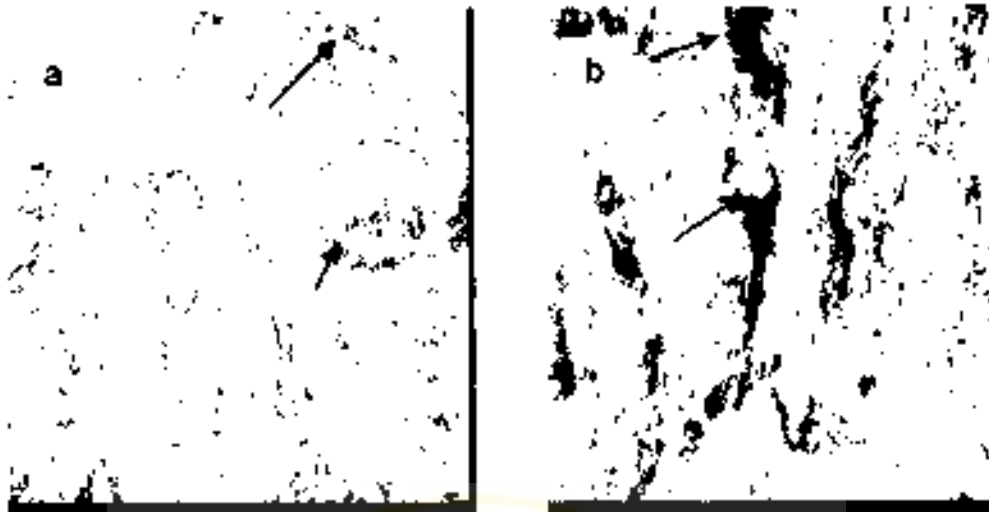
Gambar 5.8 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada vagina dengan *counterstain* Hematoxylin (pembesaran 40 x)



Keterangan gambar.

- a Pemotongan satu jam
- b Pemotongan dua jam
- Menunjukkan adanya ikatan ag-ab

Gambar 5.9 Sediaan imunohistokimia terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada servik dengan *counterstain* Hematoxylin (pembesaran 40 x)

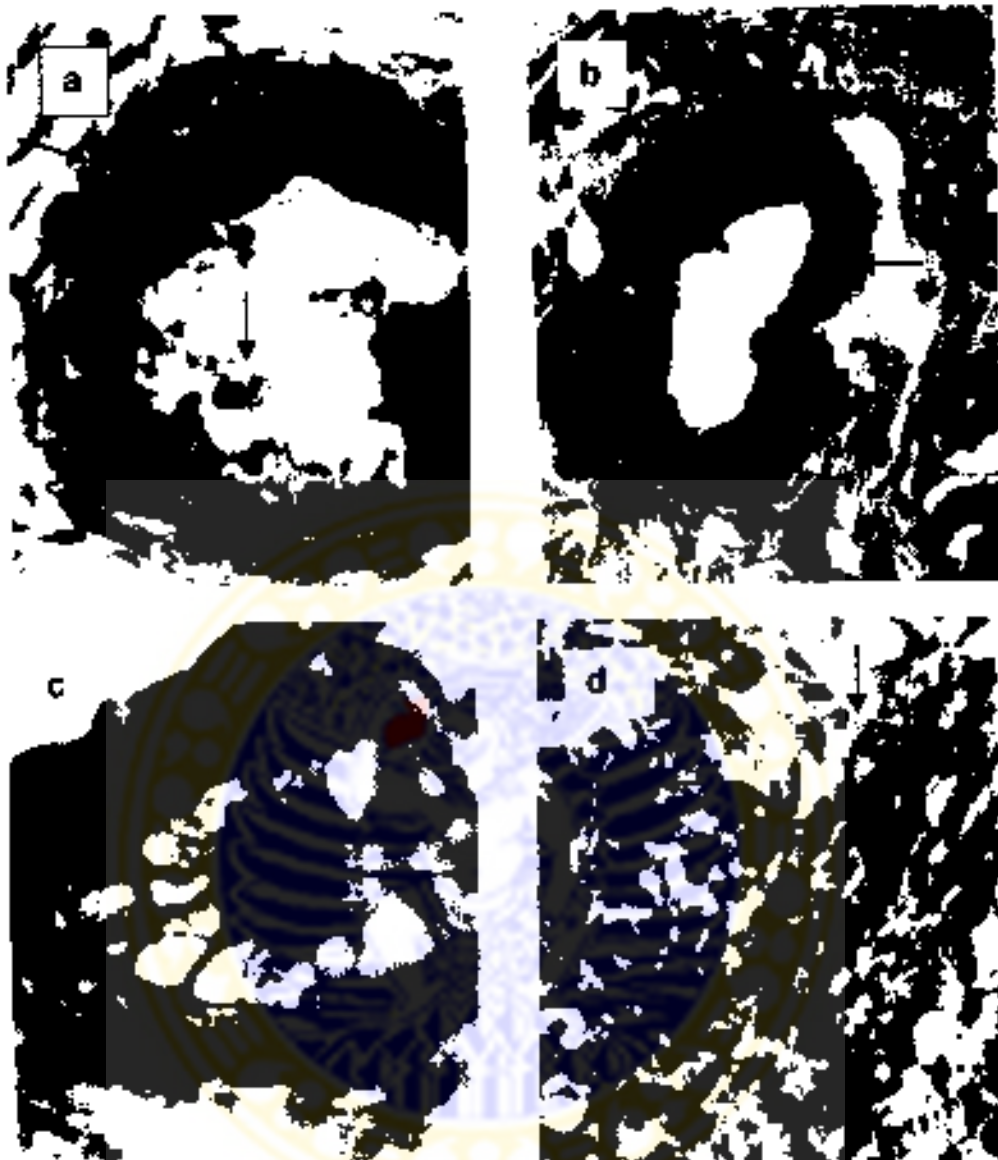


Keterangan gambar:

- a Pemotongan satu jam
- b Pemotongan dua jam
- Menunjukkan adanya ikatan ag-ab

Gambar 5.10 Sediaan imunohistokimia terhadap PGF_{α} pada uterus dengan *counterstain* Hematoxylin (pembesaran 40 x)

Pembesaran 400 x pada sediaan imunohistokimia terhadap PGF_{α} pada uterus, ikatan antigen dan antibodi banyak didapatkan pada pembuluh darah arteri, vena, kelenjar endometrium dan jaringan endometrium yang dapat dilihat pada Gambar 5.11.



Keterangan gambar:

- a. arteri di uterus pada pemotongan dua jam
 - b. vena di uterus pada pemotongan dua jam
 - c. kelenjar endometrium pada pemotongan dua jam
 - d. jaringan endometrium pada pemotongan dua jam
- Menunjukkan adanya ikatan ag-ab

Gambar 5.11 Sediaan imunohistokimia terhadap $PGF_{2\alpha}$ pada uterus dengan *counterstain* Hematoxyllin (pembesaran 400 x)

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

5.2.1 Penelitian pertama

5.2.1.1 Jumlah sapi yang birahi

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa semua sapi perah menjadi birahi setelah disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler (perlakuan I) dan secara submukosa vulva (perlakuan II dan III), analisis dengan menggunakan uji *Chi-square* ternyata tidak didapatkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) jumlah sapi yang birahi pada perlakuan I, II dan perlakuan III (Lampiran B.1), dengan demikian dapat diartikan bahwa pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg dan dosis 5 mg dapat menimbulkan birahi pada sapi perah sama seperti pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dosis 25 mg

Rangkuman analisis *Chi-square* jumlah sapi perah yang birahi pada perlakuan I, II dan perlakuan III dapat dilihat pada Tabel 5.7

Tabel 5.7 Rangkuman analisis *Chi-square* jumlah sapi perah yang birahi setelah penyuntikan $\text{PF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva

	Perlakuan I (25 mg, im)	Perlakuan II (7,5 mg, sbmv)	Perlakuan III (5 mg, sbmv)
Birahi	100%	100%	100%
Tidak Birahi	0 %	0 %	0 %
Jumlah	100%	100%	100%
	df = 2	P = 1,000	

6.2.1.2 Waktu timbulnya birahi

Hasil analisis varians terhadap waktu timbulnya birahi pada sapi perah akibat pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ ternyata tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$) (Lampiran 9.1). Dengan demikian dapat diartikan bahwa waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang disuntik dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg dan dosis 5 mg sama dengan sapi perah yang disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dengan dosis 25 mg. Rangkuman analisis varians rata-rata waktu timbulnya birahi serta sidik ragamnya dapat dilihat pada Tabel 5.8 dan Tabel 5.9.

Tabel 5.8 Rangkuman analisis varians rata-rata waktu timbulnya birahi sapi perah setelah pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dan submukosa vulva

Perlakuan	Waktu Timbulnya Birahi (dalam jam)
Ke-1	$77,00 \pm 7,1957^a$
Ke-2	$73,30 \pm 2,3594^a$
Ke-3	$75,20 \pm 5,0343^a$

Nilai rata-rata pada kolom yang sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

Tabel 5.9 Sidik ragam waktu timbulnya birahi pada sapi perah

Sumber	JK	db	KT	F	P
Kel	48,600	2	24,300	0,882	0,428
Galat	744,200	27	27,563		
Total	792,800	29			

5.2.1.3 Kadar progesteron serum darah

Analisis faktorial untuk mengetahui adanya interaksi antara dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan dengan waktu pengambilan darah terhadap kadar hormon progesteron dalam serum dapat dilihat pada Lampiran 10.1 dan sidik ragamnya dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10 Sidik ragam pengambilan darah ke-1, 2 dan ke-3 terhadap kadar hormon progesteron pada ketiga perlakuan.

Sumber	JK	db	KT	F	P
Faktor A	189,608	2	94,804	38,865	0,000
Faktor B	0,274	2	0,137	0,56	0,945
Faktor AB	2,483	4	0,621	0,254	0,906
Galat	197,584	81	2,439		
Total	389,949	89			

Keterangan :

- A. Waktu pengambilan darah (3 x)
- B. Dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3 macam, yaitu 25 mg, 7,5 mg dan 5 mg)

Tabel 5.10 menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara waktu pengambilan darah dengan dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan terhadap kadar hormon progesteron ($P>0,05$), akan tetapi terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P<0,01$) antara pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga terhadap kadar hormon progesteron dalam serum, hal ini dapat diartikan bahwa kadar hormon progesteron tidak tergantung pada dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan akan tetapi tergantung pada waktu pengambilan darah. Hasil uji

statistik menggunakan Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara waktu pengambilan dengan kadar hormon progesteron dalam serum darah sapi perah (Tabel 5.11).

Tabel 5.11 Hasil uji beda nyata terkecil waktu pengambilan darah dengan kadar hormon progesteron serum darah pada berbagai dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Waktu Pengambilan	Kadar Hormon Progesteron (ng/ml) pada dosis		
	Im, 25 mg	Sbm, 7,5 mg	Sbm, 5 mg
Ke - 1	3,2590 ± 2,4447 ^a	3,5530 ± 2,4783 ^a	3,8700 ± 2,0592 ^a
Ke - 2	0,0780 ± 0,1724 ^b	0,0950 ± 0,1630 ^b	0,1820 ± 0,1703 ^b
Ke - 3	2,7190 ± 1,2933 ^c	2,7350 ± 1,6790 ^c	2,3750 ± 1,0092 ^c

Nilai rata-rata pada baris yang sama yang diikuti dengan superskrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) nilai rata-rata pada kolom yang sama yang diikuti dengan superskrip yang berbeda berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 5.11 menunjukkan bahwa pengambilan darah pertama yang dilakukan saat penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ benar-benar dilakukan pada fase luteal. Sedangkan pada pengambilan darah yang dilakukan saat birahi, kadar progesteron berada pada tingkat yang rendah (basis), hal ini berarti bahwa semua kelompok perlakuan berada dalam fase birahi, demikian juga pada pengambilan darah yang ke-3, kadar progesteron darah juga meningkat, hal ini membuktikan bahwa pada saat hewan birahi juga diikuti oleh kejadian ovulasi.

Kepekaan atau *sensitivity* adalah jumlah terkecil dari hormon yang masih dapat terdeteksi oleh teknik RIA

fase padat, dengan menggunakan rumus $B_0 + 2 \text{ SD}$ maka assay hormon progesterone dalam penelitian ini didapatkan nilai kepekaan sebesar 93% atau 0,02 ng/ml, 20% *intercept* sebesar 44 ng/ml, 50% *intercept* sebesar 6,2 ng/ml dan 80% *intercept* sebesar 0,94 ng/ml (Lampiran 10.2)

5.2.1.4 Persentase Kebuntingan

Data Tabel 5.4 dilakukan analisis statistik melalui uji *Chi-square* untuk membuktikan adanya perbedaan persentase kebuntingan dan rangkuman analisis statistik yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5.11 (Lampiran 11.1) Tabel 5.12 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan ($P > 0,05$), ini berarti bahwa pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dengan dosis 25 mg (perlakuan I) dan pemberian hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan dosis 7.5 mg dan 3 mg submukosa vulva (Perlakuan II dan III) memberikan angka kebuntingan yang sama.

Tabel 5.12 Rangkuman analisis *Chi-square* angka kebuntingan pada sapi perah

PERLAKUAN	BUNTING	TIDAK BUNTING	TOTAL
I	7	3	10
II	7	3	10
III	6	4	10
Total	20	10	30
	df = 2	P = 1,000	

5.2.2 Penelitian kedua

5.2.2.1 Karakterisasi anti-PGF_{2α}

6.2.2.1.1 Analisis Hasil *Dot blot*

Hasil skoring *dot blot* pada Tabel 5.5 dirangking dengan uji *Kruskal Wallis* terhadap kontrol dan perlakuan pada delapan kali pengambilan darah., kemudian dilakukan uji non parametrik dengan *Chi-square* terhadap perlakuan pada masing-masing pengambilan darah dan hasilnya menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) (Lampiran 13). Hasil ini dapat diartikan bahwa imunisasi berulang dengan menggunakan hormon PGF_{2α} berbagai variasi dosis dapat menimbulkan antibodi. Rangkuman analisis *Chi-square* rata-rata skor dan rangking gradasi warna *dot blot* dapat dilihat pada Tabel 5.13. Dari Tabel tersebut dapat dilihat bahwa rata-rata skor dan rangking tertinggi diperoleh pada pengambilan darah ke-lima pada masing-masing perlakuan (variasi dosis PGF_{2α}). Hal ini dapat diartikan bahwa pada pengambilan darah ke-lima pada semua perlakuan (variasi dosis PGF_{2α} sebagai imunogen) dapat menimbulkan antibodi dengan kadar yang paling tinggi.

Tabel 5.13 Rangkuman analisis *Chi-square* skor dan rangking gradasi warna *dot blot* terhadap dosis PGF_{2α} sebagai imunogen

Perlakuan & Pengambilan darah	250µg		500µg		750µg	
	Skor	Rangking	Skor	Rangking	Skor	Rangking
1	1,5	9	2	6,5	2	9,5
2	3	17,5	4	18,5	3,5	18
3	2,5	15	3,5	15,5	1	2,5
4	4,5	24	5	25,5	6	26,5
5	5,5	29	6	30,5	7	30,5
6	5	26,5	4,5	22	5	22,5
7	1	5,5	2,5	9,5	2,5	13
8	1	5,5	1,5	4	2	9,5
P	0,000		0,000		0,000	

Analisis statistik dengan menggunakan uji *Mann Whitney* pada pengambilan darah ke-lima dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 13.1 dan rangkuman analisisnya dapat dilihat pada Tabel 5.14.

Tabel 5.14 Rangkuman analisis *Mann Whitney* rata-rata skor dan rangking perlakuan pengambilan darah ke-lima.

Perlakuan	Rata-rata	
	Skor	Rangking
Kontrol	0	2,5 ^c
250µg	5,5	7,5 ^b
500µg	6	9,5 ^b
750µg	7	14,5 ^a

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

6.2.2.1.2 Uji ELISA Tidak Langsung

Data pada Tabel 5.6 diuji dengan analisis varians dan rangkuman analisisnya dapat dilihat pada Tabel 5.15 (Lampiran 14).

Tabel 5.15 Rangkuman analisis varians titer antibodi pengambilan darah ke-5 pada perlakuan lil.

Pengambilan Darah Ke-	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol	0,00300 ^a \pm 0,000730
1	0,03681 ^{bc} \pm 0,025885
2	0,04288 ^{bc} \pm 0,029141
3	0,03413 ^{bc} \pm 0,022093
4	0,04431 ^{bc} \pm 0,028920
5	0,10519 ^b \pm 0,214953
6	0,08937 ^{ab} \pm 0,052885
7	0,08213 ^{ab} \pm 0,048911
8	0,06068 ^{ab} \pm 0,047770

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 5.15 dan Lampiran 14.1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada titer antibodi dari tiap-tiap pengambilan darah pada perlakuan lil (dosis imunogen 750 μ g). Disamping itu dapat dikatakan pula bahwa antibodi yang timbul diakibatkan karena pemberian imunogen (PGF_{2 α}) dan bukan oleh karena adanya pemberian ajuvansia (CFA/IFA).

5.2.2.2 Uji imunohistokimia

Pembesaran 40 x pada sediaan vulva, vagina, servik dan uterus ikatan antigen dan antibodi nampak berwarna coklat tua dan terdapat pada hampir semua sediaan baik pada pemotongan satu jam dan dua jam. Ikatan antigen antibodi nampak jelas pada pembesaran 400 x pada sediaan uterus pada pemotongan dua jam terutama pada

arteri, vena, kelenjar endometrium dan jaringan (stroma) endometrium uterus.



BAB 6 PEMBAHASAN

Penelitian pertama tentang penyuntikan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secara submukosa vulva terhadap fertilitas sapi perah telah dilakukan yang hasil dan analisisnya terdapat pada Bab 5. Demikian juga penelitian kedua untuk mengetahui alur luteolitik $PGF_{2\alpha}$ yang dilakukan dengan pembuatan anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ sampai dengan uji imunohistokimia untuk mengetahui adanya ikatan antigen dan antibodi dalam saluran alat kelamin betina sapi perah.

Pembahasan dilakukan secara berurutan berdasarkan tahapan hasil penelitian, mulai dari jumlah sapi perah yang birahi, waktu timbulnya birahi, kadar hormon progesteron dalam serum darah sapi perah dan angka kebuntingan yang dihasilkan. Penelitian II juga dibahas berurutan mulai dari biosintesis $PGF_{2\alpha}$, karakterisasi dengan menggunakan *dot blotting* dan ELISA Tidak Langsung, serta uji imunohistokimia.

6.1 Penelitian Pertama

6.1.1 Jumlah sapi perah yang birahi

Dalam penelitian ini semua kelompok sapi perah perlakuan menunjukkan gejala birahi setelah penyuntikan $PGF_{2\alpha}$, hal ini menunjukkan bahwa $PGF_{2\alpha}$ merupakan agen luteolitik. Hafez (2000) menyebutkan bahwa $PGF_{2\alpha}$ secara fisiologis akan menyebabkan inisiasi siklus birahi yang baru, selanjutnya

disebutkan pula bahwa kemampuan induksi luteolitik ini banyak digunakan untuk memanipulasi siklus birahi.

Knobil dan Neill (1968) menyebutkan bahwa periode dimana terjadi aktivitas dari korpus luteum disebut dengan fase luteal yang pada sapi lamanya berkisar antara 16-17 hari, sedangkan fase yang lain adalah fase folikuler yang berkisar antara 3-6 hari. Oleh karena $PGF_{2\alpha}$ merupakan agen luteolitik maka jika diberikan pada fase luteal akan mengakibatkan birahi pada semua sapi perah pertakuan, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan dimana pemberian hormon $PGF_{2\alpha}$ dilakukan saat fase luteal (hari ke-11 setelah birahi) semua sapi perah kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan menunjukkan gejala birahi.

Gejala birahi pada sapi perah yang nampak secara klinis meliputi adanya kebengkakan vulva warna kemerahan pada mukosa vulva, leleran lendir pada vulva yang berasal dari serviks, sapi menjadi gelisah sering menguak, pangkal ekor terangkat keatas jika sapi dikeluarkan dari kandang akan saling menaiki.

6.1.2 Waktu timbulnya birahi

Waktu timbulnya birahi yang dihitung sejak penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ sampai timbulnya gejala birahi. dalam penelitian ini adalah pada kelompok kontrol (25 mg/im), P1 (7.5 mg/Sbmv) dan P2 (5 mg/Sbmv) berturut-turut adalah $77,00 \pm 7,1957$ jam $73,30 \pm 2,3594$ jam dan $73,30 \pm 2,3594$ jam

Analisis statistik dengan menggunakan analisis varians menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$) antara waktu penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ berbagai dosis dan aplikasi dengan waktu timbulnya birahi. Ini berarti waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang disuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg dan dosis 5 mg sama hasilnya dengan sapi perah yang disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dengan dosis 25 mg.

Hafez (1993) menyatakan bahwa penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler akan menyebabkan birahi, 48 – 72 jam setelah pemberian, demikian pula dengan Hunter (1995) yang menyebutkan bahwa birahi akan timbul dua sampai empat hari setelah penyuntikan.

Srianto *et al.* (1996) menyebutkan bahwa waktu timbulnya birahi setelah penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler dikombinasikan dengan hormon PMSG adalah sekitar 43 – 59 jam, Ismudiono *et al.* (1997) menyebutkan bahwa waktu timbulnya birahi pada sapi perah yang diberi hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intrauterin berkisar antara 36 jam sampai 65 jam, Tanaka *et al.* (2001) dalam penelitiannya telah yang memberikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara intramuskuler pola dua kali penyuntikan pada sapi perah dapat menimbulkan birahi sekitar 4 – 5 hari setelah penyuntikan.

Variasi timbulnya birahi pada penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ ini menurut Speroff (1990) disebabkan oleh karena kadar hormon estradiol dalam lingkungan mikro folikel yang sedang mengalami diferensiasi mempunyai pengaruh yang besar untuk terjadinya folikel dominan. Demikian pula Rajamahendran *et al.* (2002) menyebutkan bahwa sapi dengan tiga gelombang pertumbuhan folikel akan menunjukkan respon birahi yang lebih cepat dibandingkan dengan sapi yang mempunyai dua gelombang pertumbuhan folikel, hal ini disebabkan oleh karena folikel dominan yang sudah ada akan segera tumbuh ketika kadar progesteron dalam darah menurun, dan kadar FSH mulai meningkat.

6.1.3 Kadar hormon progesteron serum darah

Rataan kadar hormon progesteron dalam serum darah pada pengambilan darah pertama yaitu saat penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelompok kontrol (25 mg/im), kelompok PI (7,5 mg/Sbmv) dan kelompok PII (5 mg/Sbmv) berturut-turut adalah sebesar $3,2590 \pm 2,4447$ ng/ml; $3,5530 \pm 2,4783$ ng/ml dan $3,8700 \pm 2,0592$ ng/ml. Pada pengambilan darah kedua yaitu pada saat birahi, kadar hormon progesteron pada kelompok kontrol (25 mg/im), kelompok PI (7,5 mg/Sbmv) dan kelompok PII (5 mg/Sbmv) berturut-turut adalah $0,0780 \pm 0,1724$ ng/ml, $0,0950 \pm 0,1630$ ng/ml dan $0,1820 \pm 0,1703$ ng/ml sedangkan pada pengambilan darah ketiga yaitu tujuh hari setelah birahi pada kelompok kontrol (25 mg/im),

kelompok PI (7,5 mg/Sbmv) dan kelompok PII (5 mg/Sbmv) berturut-turut adalah $2,7190 \pm 1,2933$ ng/ml; $2,7350 \pm 1,6790$ dan $2,3750 \pm 1,0092$ ng/ml.

Dari hasil diatas dapat dilihat bahwa pada pengambilan darah pertama dan ketiga kadar hormon progesteron dalam darah cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada kedua pengambilan darah tersebut dilakukan pada fase luteal, sedangkan pengambilan darah kedua kadar hormon progesteron sangat rendah sehingga benar dilakukan saat sapi berada dalam fase folikuler. Knobill dan Neill (1988) menyebutkan bahwa pada fase luteal kadar hormon progesteron dalam darah berada dalam kisaran 2 – 20 ng/ml dan pada fase folikuler berada dalam kisaran 0,00 – 0,30 ng/ml. Demikian juga dengan hasil penelitian Mahaputra (1990) yang melaporkan bahwa sapi yang birahi kadar hormon progesteronnya mendekati basal (0 ng/ml) sedangkan pada fase luteal kadar hormon progesteronnya lebih tinggi 0,75 ng/ml dan fase folikuler kadarnya lebih rendah dari 0,75 ng/ml. Hunter (1995) menyebutkan juga bahwa pada fase folikuler kadar hormon progesteron dalam serum darah kurang dari 1,0 ng/ml.

Gambar 5.3 menunjukkan bahwa kadar hormon progesteron pada pengambilan darah pertama sapi-sapi perlakuan berada pada fase luteal, pada pengambilan darah kedua sapi-sapi tersebut berada pada fase folikuler (birahi) dan pada pengambilan ketiga

sapi-sapi tersebut kembali berada pada fase luteal ini berarti bahwa pada saat birahi yang biasanya diikuti oleh ovulasi korpus luteum pada pengambilan darah pertama telah teregresi, kemudian tingginya kadar hormon progesteron pada pengambilan darah ketiga berasal dari korpus luteum yang terbentuk akibat kerja hormon luteotropik setelah terjadinya ovulasi dari folikel de Graaf.

Mahaputra (1990) menyebutkan bahwa sapi perah yang mempunyai daur reproduksi normal, saat birahi kadar hormon progesteronnya berada pada kadar basal, dan bila diikuti oleh ovulasi, maka kadar hormon progesteron serum darah akan meningkat pada hari ke-2 sampai hari ke-5 dan mencapai puncaknya pada hari ke-16 dari siklus birahinya.

Kepakaan atau *sensitivity* assay hormon progesteron dengan menggunakan teknik RIA fase padat didefinisikan sebagai jumlah terkecil dari hormon progesteron yang masih dapat terdeteksi oleh teknik ini. Mahaputra (1990) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa kepekaan assay penentuan kadar hormon progesteron dengan menggunakan teknik RIA fase padat berkisar antara 0,01 ng/ml – 0,036 ng/ml. Dalam penelitian ini kepekaan kadar hormon progesterone didapatkan sebesar 0,02 ng/ml.

6.1.4 Persentase kebuntingan

Persentase kebuntingan yang didapat dalam penelitian ini untuk perlakuan pertama sebesar 70%, perlakuan kedua 70% dan

perlakuan ketiga 60%. Hasil ini ternyata lebih baik jika dibandingkan dengan laporan Deutscher (1991) yang melakukan program gertak birahi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ pola dua kali penyuntikan bila disertai dengan pengamatan birahi, memberikan persentase kebuntingan sebesar 50%, sedangkan pola dua kali penyuntikan tanpa disertai pengamatan birahi, memberikan persentase kebuntingan sebesar 45%. Samik (1994) melakukan penelitian gertak birahi dengan menggunakan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ pola satu kali dan dua kali penyuntikan memberikan persentase kebuntingan masing masing sebesar 36,66% dan 42,66%.

Hafez (1987) menyebutkan bahwa beberapa parameter yang digunakan untuk mengukur efisiensi reproduksi pada sapi perah seperti umur pertama kali beranak (*first calving*) yang kurang dari 24 bulan; han sejak mulai beranak sampai dengan terjadinya konsepsi (*days open*) kurang dari 100 han; persentase kebuntingan pada inseminasi pertama (*first service conception rate*) sekitar 70%; jarak antar beranak (*calving interval*) kurang dari 360 hari; jumlah straw dalam inseminasi untuk menghasilkan kebuntingan (*services per conception*) kurang dari dua; jumlah sapi perah yang bunting dalam satu kelompok ternak (*conception rate*) sekitar 95%; dan jumlah pedet yang lahir dalam satu kelompok ternak (*calving rate*) adalah sebesar 90%.

Pada penelitian ini parameter yang dapat diukur untuk mengetahui efisiensi reproduksi adalah persentase kebuntingan pada inseminasi pertama dan jumlah sapi yang bunting yang pada perlakuan I sebesar 70%, perlakuan II sebesar 70% dan perlakuan III sebesar 60%. Jumlah straw yang dipakai dalam inseminasi untuk menghasilkan kebuntingan pada perlakuan I sebesar 1,43, perlakuan II sebesar 1,43 dan perlakuan III sebesar 1,67. Jumlah pedet yang lahir pada perlakuan I sebesar 70%, perlakuan II 70% dan perlakuan III sebesar 60%.

Hasil yang didapat diatas menurut peneliti sudah cukup baik, oleh karena beberapa peneliti sebelumnya menunjukkan beberapa parameter efisiensi reproduksi yang lebih rendah, selanjutnya dapat dikatakan pula bahwa faktor dominan yang berpengaruh adalah faktor teknis seperti ketrampilan inseminator dan faktor non teknis seperti kelainan anatomis saluran reproduksi sapi perah betina terutama serviks.

6.2 Penelitian Kedua

6.2.1 Biosintesis anti-PGF_{2L} dan karakterisasinya

Biosintesis anti-PGF_{2L} dilakukan pada kelinci jantan yang diimunisasi dengan hormon PGF_{2L} dalam ajuvan CFA, kemudian dilakukan booster sebanyak tiga kali dengan hormon PGF_{2L} dalam ajuvan IFA dan pengambilan darah dilakukan sebanyak

delapan kali. Serum yang didapatkan kemudian dilakukan purifikasi untuk meningkatkan kuantitas antibodi yang diinginkan (Bollag dan Edelstein, 1991). Hasil *dot blot* dan ELISA Tidak Langsung menunjukkan bahwa didalam serum terdapat antibodi terhadap hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang telah dibuktikan mempunyai spesifisitas dengan antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) yang dipakai sebagai bahan induksi.

Hasil *dot blot* pada (Gambar 5.5) menunjukkan bahwa *rabbit* anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang dihasilkan pasca induksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dapat mengenali $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebagai antigennya. Hal ini menunjukkan bahwa dalam serum kelinci telah dihasilkan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebagai respon imun terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diinduksikan pada kelinci. Antigen $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang digunakan dalam *dot blotting* ini merupakan $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diinduksikan pada kelinci. Antigen $\text{PGF}_{2\alpha}$ sejumlah 50 μl dengan variasi perlakuan (250; 500 dan 750 μg) diteteskan ke membran nitroselulosa. Anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang digunakan sebagai antibodi primer akan berikatan dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebagai antigennya. *Anti Rabbit IgG AP-Conjugated* sebagai antibodi sekunder akan mengikat antibodi primer. *Western Blue substrate solution* akan berikatan dengan enzim AP (*Alkaline Phosphatase*) yang terdapat pada antibodi sekunder yang menghasilkan noda berwarna biru gelap pada membran (Autanni'am, 2003).

Spesifisitas dari anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diinduksikan pada kelinci dikonfirmasi secara semi kuantitatif

melalui metode *dot blotting*. Serum kelinci pasca induksi PGF_{2α} digunakan sebagai antibodi primer untuk mengenal PGF_{2α} sebagai antigennya. Hasil *dot blotting* menunjukkan kespesifikan ikatan antara serum kelinci yang mengandung anti-PGF_{2α} terhadap PGF_{2α} yang ditandai dengan terbentuknya noda berwarna ungu gelap pasca induksi PGF_{2α}, sedangkan pada serum pada kelompok kontrol tidak menunjukkan adanya reaksi positif dengan PGF_{2α}. Hal ini menunjukkan bahwa PGF_{2α} mampu menginduksi sintesis anti-PGF_{2α} pada kelompok kelinci.

Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi dari antigen yang diberikan. Selanjutnya disebutkan juga bahwa mekanisme terbentuknya antibodi dapat dijelaskan sebagai berikut: antigen non spesifik akan masuk ke dalam tubuh dan akan dikenali oleh *antigen presenting cell* yang berikatan dengan sistem *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) dalam hal ini adalah sel dendrit yang akan mengaktifasi sel T. Sel T kemudian menjadi aktif dan akan mengeluarkan sitokin (IL-2) yang berakibat pada aktifnya sel T. Sel ini kemudian akan menyebabkan sel B memproduksi IgG dalam plasma.

Demikian juga hasil ELISA Tidak Langsung yang bertujuan untuk menguji spesifisitas anti-PGF_{2α} yang dihasilkan pasca

induksi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam adjuvan dengan antigennya yaitu $\text{PGF}_{2\alpha}$. Pengujian dengan metode ELISA Tidak Langsung dapat menunjukkan titer anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang disintesis pada imunisasi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan beberapa kali waktu pemanenan serum. Berdasarkan hasil pembacaan dengan metode ELISA Tidak Langsung, terjadi peningkatan titer yang ditandai melalui pembacaan *optical density* (OD)₄₀₅.

Pengambilan darah ke-5 (4 minggu pasca imunisasi pertama) menghasilkan nilai OD₄₀₅ tertinggi (Gambar 5.6) dengan metode ELISA Tidak Langsung yang menandakan dalam serum kelinci mempunyai titer anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang tertinggi yaitu $0,10519 \pm 0,214953$. Sedangkan pada pengambilan darah ke-2,3,4 dan pengambilan darah ke 7,8,9 memiliki titer anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang lebih rendah. Penurunan titer ini disebabkan karena anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang terdapat dalam darah telah menuju ke sel target dimana sintesis $\text{PGF}_{2\alpha}$ terjadi atau keberadaan $\text{PGF}_{2\alpha}$ di dalam tubuh kelinci telah berkalat dengan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$. Hal ini sesuai dengan pendapat Darnell *et al* (1990) yang menyebutkan bahwa minggu pertama dan kedua setelah penyuntikan antigen, konsentrasi IgG dalam serum akan meningkat dan kemudian akan meningkat lebih tajam pada minggu kelima setelah pemberian booster pada minggu ketiga akibat telah terbentuknya sel memori yang cukup banyak untuk memproduksi IgG. Selanjutnya disebutkan pula bahwa bila

konsentrasi antibodi dalam tubuh masih tinggi dan dilakukan imunisasi maka antigen yang masuk segera diikat oleh antibodi yang beredar dalam darah.

6.2.2 Uji Imunohistokimia

Hasil imunohistokimia didapatkan bahwa keberadaan anti-PGF_{2α} pada saluran reproduksi sapi perah betina pasca paparan PGF_{2α} secara submukosa vulva dapat dideteksi dengan menggunakan metode imunohistokimia tidak langsung yang ditandai dengan warna coklat gelap pada vulva (Gambar 5.7), vagina (Gambar 5.8), serviks (Gambar 5.9) dan korpus uteri (Gambar 5.10). Warna coklat gelap menandakan visualisasi kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) pada kompleks ikatan SA-HRP - antibodi sekunder - antibodi primer - antigen. Kompleks avidin - biotin terbentuk antara SA-HRP dengan antibodi sekunder bertabel biotin. Substrat DAB membentuk kompleks dengan peroksidase pada SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*) membentuk warna yang tervisualisasi sebagai warna coklat dalam preparat yang mengandung PGF_{2α}. Garis-garis atau warna kecoklatan yang terdapat pada gambaran preparat merupakan posisi dari PGF_{2α}. Bagian preparat yang tidak terwarnai coklat tua merupakan bagian dimana tidak terjadi perembesan PGF_{2α} yang diberikan (Gambar 5.8). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Luck *et al* (1995) dan

Caldini *et al.*(1995) yang melakukan pemeriksaan histokimia dengan pembesaran 40x sudah dapat terlihat adanya ikatan antigen dan antibodi pada sediaan ovanum dengan menggunakan *counterstain* anti kolagen

Hasil imunohistokimia juga menunjukkan bahwa keberadaan anti-PGF_{2α} ada pada semua saluran alat kelamin betina yang disuntik dengan PGF_{2α} secara submukosa vulva satu dan dua jam sebelum hewan dipotong. Hal ini diyakini bahwa perambesan PGF_{2α} mengikuti jalur luteolitik dimana hal ini tidak ditemukan pada saluran alat kelamin betina dari hewan kontrol. Hasil imunohistokimia terlihat bahwa ikatan PGF_{2α} dengan anti-PGF_{2α} berwarna coklat tua, sedangkan bagian yang tidak ada PGF_{2α} tidak terwarnai oleh kromogen DAB. Hal ini berarti bahwa anti-PGF_{2α} dalam serum kelinci yang ditimbulkan secara *in vivo* melalui imunisasi dengan PGF_{2α} mampu dipakai untuk mendeteksi alur luteolitik paparan PGF_{2α} yang diberikan secara submukosa vulva.

Hafez (2000) menyatakan bahwa kebanyakan hormon prostaglandin berfungsi secara lokal ditempat ia diproduksi dengan melalui interaksi antar sel dan tidak terakumulasi pada jaringan. Namun Darnell *et al.* (1990) menyebutkan bahwa sinyal endokrin dari kelenjar endokrin pada sel target ada dua macam, yaitu sinyal parakrin dan sinyal autokrin selanjutnya disebutkan pula bahwa

prostaglandin yang merupakan hormon yang larut dalam lemak akan berikatan dengan reseptor permukaan sel (*Cell-surface receptor*). Hormon prostaglandin merupakan molekul hidrofilik dan berperan sebagai substansi sinyal (*signaling substance*) yang akan berikatan dengan reseptor permukaan sel yang disebut dengan kompleks reseptor-ligand dan akan berjalan ke sel-sel berikut sampai mencapai target organ. Okuda dan Skarzynski (2000) menyebutkan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ eksogen untuk menuju sel target akan menyebabkan homolog desensitisasi melalui protein G sebagai *second messenger intracellular* yang akan mengaktifkan fosfolipase C (PLC) yang akan menyebabkan hidrolisis fosfatidil inositol difosfat (PIP₂) menjadi inositol trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). Selanjutnya IP₃ akan menyebabkan dikeluarkannya ion Ca^{++} yang merupakan efektor intraseluler untuk membawa $\text{PGF}_{2\alpha}$ kembali keluar sel, sedangkan DAG akan mengaktifkan protein kinase C (PKC) yang juga merupakan intraseluler efektor. Sedangkan heterolog desensitisasi berkaitan erat dengan reseptor oksitosin dan progesteron pada permukaan sel.

Wathes dan Lamming (1995) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa stimulasi $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial difasilitasi oleh hormon oksitosin yang pada fase luteal pada endometrium banyak mengandung reseptor terhadap hormon ini. Selanjutnya disebutkan pula bahwa banyaknya reseptor hormon oksitosin akan

meningkatkan fosfolipase C (PLC) yang akan menyebabkan hidrolisis fosfatidilinositol difosfat (PIP₂) menjadi inositol trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). Tingginya konsentrasi DAG berakibat pada pengeluaran asam *arachidonat* dari membran fosfolipid.

Hasil penelitian imunohistokimia menunjukkan adanya ikatan antigen dan antibodi yang terakumulasi di korpus uteri (Gambar 5.11). Ini berarti bahwa terjadi akumulasi hormon PGF_{2α} yang diberikan secara submukosa vulva dalam waktu satu dan dua jam telah mencapai uterus (Gambar 5.10) dan selanjutnya akan melalui perembesan lintas vena-arteri ovarika menuju ke target organ yaitu ovarium (dalam hal ini menuju ke korpus luteum).

Gambar 5.11 menunjukkan adanya ikatan Ag-Ab yang terdapat pada uterus dalam jumlah lebih banyak dibandingkan ikatan Ag-Ab yang terdapat pada vulva, vagina dan serviks sedangkan jumlah hormon PGF_{2α} yang diberikan secara submukosa vulva hanya 7,5 mg (1,5 ml). Hal ini menimbulkan dugaan bahwa hormon PGF_{2α} yang diberikan dapat merangsang terbentuknya hormon PGF_{2α} endogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Pate (1995) yang menyebutkan bahwa respon target organ terhadap stimulasi hormon dimodifikasi oleh faktor lokal baik secara autokrin atau parakrin, selanjutnya disebutkan pula bahwa saluran reproduksi mempunyai komposisi sel yang heterogen

perannya dalam aktifitas reproduksi. Interleukin 1β (IL- 1β) tidak berespon terhadap sel endothelial atau fibroblast saat kadar hormon progesteron dalam keadaan basal, akan tetapi saat hormon progesteron meningkat (fase diestrus) IL- 1β akan menstimulasi sintesis hormon $PGF_{2\alpha}$ melalui jalur fosfolipase A dengan cara mengkonversi asam *arachidonat* menjadi hormon $PGF_{2\alpha}$.

Hormon $PGF_{2\alpha}$ endogen uterus inilah yang kemudian melalui perembesan lintas vena-arteri ovarika akan menuju ovarium untuk melisiskan korpus luteum (Hafez,2000).



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan seperti berikut

1. Pemberian prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg dan 5 mg dapat menimbulkan birahi pada sapi perah
2. Waktu timbulnya birahi sapi perah yang disuntik dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva sama dengan sapi perah yang disuntik dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara intramuskuler
3. Pemberian prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dapat menimbulkan birahi yang diikuti dengan ovulasi
4. Persentase kebuntingan pada sapi perah yang disuntik dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva sama dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang diberikan secara intramuskuler yaitu berkisar antara 60-70%
5. Immunisasi dengan menggunakan prostaglandin $F_{2\alpha}$ sebagai imunogen dapat menimbulkan anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang selanjutnya anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ ini dapat digunakan untuk merunut alur luteolitik prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang diberikan secara

submukosa vulva berdasarkan adanya ikatan antigen dan antibodi dalam saluran alat kelamin betina sapi perah.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pembakuan teknik pemberian prostaglandin $F_{2\alpha}$ secara submukosa vulva, oleh karena teknik ini terbukti lebih mudah, murah dan efisien
2. Meskipun telah dapat dibuktikan bahwa alur luteolitik prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva dapat diketahui berdasarkan adanya ikatan antigen dan antibodi dalam saluran alat kelamin betina sapi perah berdasarkan uji imunohistokimia, masih diperlukan pengkajian kemungkinan adanya uji lain yang lebih spesifik dalam merunut jalur luteolitik ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama WT, 1992, Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta, hlm 28-31.
- Aulianis'am, 2003, Analisis Antibodi Hasil Induksi Bovine Zona Pelusida 3 Terglikosilasi (bZP3dG) untuk Pengembangan Vaksin Kontrasepsi. Disertas.. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya
- Austyn J.M, Wood KJ, 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology, 1st Ed, Oxford University Press. p 695
- Baratawidjaja KG. 2000. Imunologi Dasar Edisi ke-4 Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Beesley JE. 1995. Immunocytochemistry, IRL Press, New York
- Berson SA, Yalow RS. 1969. Radioimmunoassay Techniques Science. 152-205
- Bollag DM, Edelstein SJ 1991, Protein Methods, Wiley-Liss. A John Wiley & Sons Inc. Publications, New York, pp 76-79
- Burgess, S S. 1995, Protein Analysis Laboratory Manual, Wiley-Liss A John Wiley & Sons Inc, Publications, New York, p 80.
- Caldani M, Antoine M, Batailler M, Diuttoz A, 1995, Ontogeny of GnRH Systems. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 49. 147-162
- Garrett J, Lodish H, Baltimore D. 1990, Molecular Cell Biology. 2nd Ed. Scientific American Books, W H, Freeman and Company, New York., pp 711-716
- De Jarnette M. 2001. Estroes Synchronization in Cattle Using GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) and PGF. Select Sires America's Best. <http://www.selectsires.com/estrosync.htm>
- Deutscher G H. 1991. Estrous Synchronization for Beef Cattle. University of Nebraska Cooperative Extension G85 - 74' -A <http://wayne.unl.edu>.
- Diagnostic Products Corporation 1993, Coat-A-Count Progesterone. Los Angeles, CA 90045

- Djojosebagio S. 1996, Fisiologi Kelenjar Endokrin Cetakan I, Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Dunbar B S. 1994, Protein Blotting. A Practical Approach. The Practical Approach Series. Oxford University Press, pp 8-9
- Ford M M, Young I R, Thorburn G D. 1995, Prostaglandin and the maintenance of pregnancy in goats, Journal of Reproduction and Fertility Supplement 49: 555-559
- Franson R D. 1992, Anatomy and Physiology of Farm Animals. 5th Ed, Lea & Febiger, Philadelphia, pp 87-98
- Godding J R. 1974, The Demonstration that Prostaglandin is The Uterine Luteolysin in The Ewe. J Reprod Fert, 38 261-271.
- Goer J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manual, Academic Press. Harcourt Brace Javanovich, Publisher San Diego. California.
- Goldsbey RA, Thomas JK, Osborne BA, 2000, Kuby Immunology Fourth Ed, New York. W H Freeman and Company, pp 374-380.
- Hardjopranto S. 1982, Fisiologi Reproduksi Cetakan III Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 14-45.
- Hardjopranto S. 1995. Ilmu Kemahiran Pada Ternak. Airlangga University Press, Surabaya. hlm 51.77, 124
- Hafez ESE, 1987, Reproduction in Farm Animals, 5th Ed Lea & Febiger, Philadelphia. pp 57-89
- Hafez ESE, 1993, Reproduction in Farm Animals, 6th Ed, Lea & Febiger, Philadelphia pp. 461-465.
- Hafez ESE, 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, A Walters Kluwer Company. Philadelphia
- Hanadi M, Mahaputra L, Srianto P, 2000. Upaya Meningkatkan Hasil Sinkronisasi Birahi / Ovulasi dengan Jalan Memadukan Gelombang Pertumbuhan Folikel dan Luteolisis. Riset Unggulan Terpadu. LIPI Jakarta.
- Hunter R H F. 1995 Fisiologi dan Teknologi Hewan Betina Domestik, Penerbit ITB Bandung, hlm 74-105

- Hutchinson R V, 2000, **The Use of Prostaglandin Therapy for Pyometritis.**
<http://www.workingdogs.com/doc0100.htm>.
- Inskoop EK, Dailey RA, Lewis PE, 1998, **Association of Fertility with Temporal Changes in Ovarian Function of Domestic Ruminants.**
<http://www.cochrane.org/Cochrane/revabstract002864.htm>.
- International Atomic Energy Agency, 1984, **Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction**, Viena Tech Series 233: 85 – 105.
- Ismudiono. 1982, **Pengaruh Waktu Inseminasi terhadap Persentase Kebuntingan dengan Estrumate (PGF₂ α) Sebagai Penggertak Birahi pada Sapi Perah di Grati.** Thesis. Fakultas Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Ismudiono, 1999, **Fisiologi Reproduksi Pada ternak.** Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ismudiono, Anwar H, Srianto P, 2000, **Upaya Meningkatkan Angka Kebuntingan melalui Inseminasi Ganda dalam Program Penye-rentakan Birahi pada Sapi Perah.** Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kindahl H 1980, **Prostaglandin Biosynthesis and Metabolism.** J. of The American Veterinary Medical Association, Vol. 176 No.10: 1173
- Knobil E, Jimmy D N, 1988, **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York, pp 1089-1280.
- Kobayashi S A, Miyamoto B, Berisha, Schams D, 2001. **Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F₂ alpha and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro.** Elsevier, Prostaglandin & other Lipid Mediators 63: 79-92
- Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA, 1991, **Buku Ajar Histologi**, Cetak-an II, Penerbit Buku Kedokteran, Terjemahan J Tambayong dkk, Jakarta, hlm 482-500.
- Luckas M, Bricker L, 2001, **Intravenous prostaglandin for induction of Labour** The Cochrane Library, Issue 3.

- Luck M R, Zhao Y, Silvester LM, 1995, Identification and localization of collagen types I and IV in the ruminant follicle and corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49: 517-521.
- Mahaputra L, 1990, Pengukuran Kadar Progesteron Air Susu dan LH Serum untuk Menentukan Status Reproduksi dan Upaya Penanggulangan Infertilitas pada Sapi perah Pasca Lahir. Disertasi. Universitas Airlangga Surabaya.
- Malik A, 2001, Efektivitas Prostaglandin F₂ alfa secara Intra Ovari Terhadap Penyerentakan Birahi Sapi Perah Frisian Holstein. Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mc Cracken JA, Baird DT, Carlson JC, Godding JR, Barchikorski B, 1972, The Role of Prostaglandin in Luteal Regression. *J. Reprod. Fert* 18:133-142.
- Mc. Donald LE, 1980, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea & Febiger. Philadelphia, pp: 230-233.
- Milvae RA, 2000, Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F₂α in corpus luteum function. *Journals of Reproduction and Fertility. Review of Reproduction*. Vol 5 No.1.
- Narasimha A V, Suryaprakasam TB, 1990, Induction of synchronized estrus and fertility in anestrus zebu >< Taurus crossbred cows. *Theriogenology*. July 1991. Vol 36 no.1.
- Niswander G D, Reiners T J, Dickman M J, Nett T M, 1980, Blood flow mediator of ovarian function. In: E.S.E. Hafez ed. *Reproduction in farm animals*. 4th Ed Lea & Febiger. Philadelphia.
- Nurhidayat, 2002, Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Imunohistokimia. *dalam Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis*. Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya manusia Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Okuda K, Skarzynski DJ, 2000, Luteal Prostaglandin F₂α. New Concepts of prostaglandin F₂α Secretion and Its Actions within the Bovine Corpus Luteum. *Asian-Aus.J Anim Sci*. Vol 13, No 3 :390-400

- Pate J L, 1995. Involvement of Immune Cells in Regulation of Ovarian Function. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49:365-377. Published by the Journal of Reproduction and Fertility Ltd. UK
- Popesko P, 1954, *Atlas of Topographical Anatomy of the Domestic Animal*. Vol. I. WB Saunders Company Philadelphia.
- Promega, 1996, *Protocols and Applications Guide*. 3rd Ed. Promega Corporation. All Rights Reserved. Printed in USA Cat # P 1610 ISBN - 1-882274-57-1. P.292.
- Rantam FA, 2003, *Metode Imunologi Cetakan Pertama*. Airlangga University Press Surabaya. Hal. 79 – 161 .
- Rajamahendran R , Aali M and Giritharan G. 2002, Ovarian follicular dynamic in farms animals and human. Current concept and clinical applications. Konggres I dan Seminar Nasional Bioteknologi Reproduksi 30-31 Maret 2002. Malang.
- Salisbury G W, van Demark NL, 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi* Terjemahan R.Djanuar. Gajah Mada University Press.35-81
- Samik A, Ismudono, Srianto P, Sardjito T, 1994. Pengaruh pemberian PGF_{2α} dosis tunggal dan dosis ganda pada sinkronisasi birahi terhadap reproduktivitas sapi perah Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Setiawan ED, Hamidjojo AN, 1982, Aplikasi dan Pengaruh Pemberian PGF_{2α} Terhadap Timbunya Birahi Pada Sapi Perah Inferti'. *Penyakit Hewan*. Vol. XIV No.35:5-7.
- Setiawan B.1983.Farmakologi Prostaglandin, Thromboxan dan Prostasiklin Dalam Prostaglandin dan Implikasinya. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Editor : A. Tjokronegoro dan B Setiawan
- Setijanto H.2002, Teknik Mempelajari Biologi Sel :identifikasi Beberapa Substansi/Senyawa yang Terlibat dalam Metabolisme Sel. Dalam: Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis. Kejasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya manusia Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

- Sigma, Chemical Company , 1991, Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, p 840.
- Skarzynski DJ, Okuda K, 1999. Sensitivity of Bovine Corpora Lutea to Prostaglandin F2 α in Dependent on Progesterone, Oxytocin and prostaglandins. *Biol.Reprod* 60(6), 1292-1298.
- Skarzynski DJ, Miyamoto Y, Okuda K, 2000, Production of Prosta – glandin F2 alfa by Cultured Bovine Endometrial Cells in Response to Tumor Necrosis Factor alpha :Cell Type Specificity and Intracel- lular mechamisms. *Biologi of Reproduction* 62:1116 – 11120
- Speroff L, 1990, Clinical Gyneecology Endocrinology Infertility 4th Ed. Williams and Wilkins. New York, pp 49.
- Srianto P, Ismudiono., Hermadi HA, Mustofa I, dan Samik A, 1996. Upaya peningkatan fertilitas sapi potong dengan pemberian kombinasi prostaglandin dan PMSG. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
- Steel RGD, Torrie JH, 1989, Prinsip dan prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi Kedua Alihbahasa Ir. Bambang Sumantri. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama : 145-146.
- Tanaka H , Herliantien, Zamanty D, 2001 Fisiologi dan Gangguan Reproduksi. The Aftercare Technical Cooperation for the Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. Indonesia
- Walker D, Ritchie H, Hawkins D, 1994, Estrus Synchronization of Beef Cattle Michigan Beef Production. Michigan State University Extension. MSU Extension Beef Bulletins - 23280001.
- Wathes DC, Lamming GE, 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the Maintenance of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49:53-67.

Lampiran 1 Isolasi Serum Darah Sapi dan Pemeriksaan dengan Metode RIA

Darah yang diperoleh dari pengambilan melalui Vena jugularis sapi
(saat penyuntikan, saat birahi dan hari ke-7 setelah birahi)



Sentrifugasi



Serum yang diperoleh dibekukan

Pemeriksaan RIA fase padat

1. Serum diadaptasikan pada suhu kamar
2. Kit progesteron disiapkan (terdiri dari tracer, larutan standar dan tabung polypropylene)
3. Semua tabung diisi dengan larutan tracer sebanyak 1000 μ l kemudian ditambah dengan serum yang akan diperiksa sebanyak 100 μ l



Dikocok dalam vortexer selama 10 detik



Inkubasi selama 3 jam

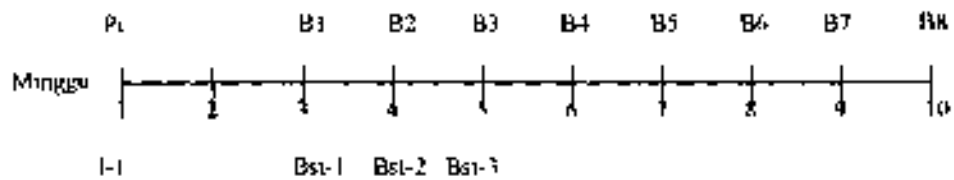


Tabung dibalik (sekitar 5 menit)



Pembacaan dalam *Gamma Counter*

Lampiran 2 Imunisasi pada kelinci jantan lokal



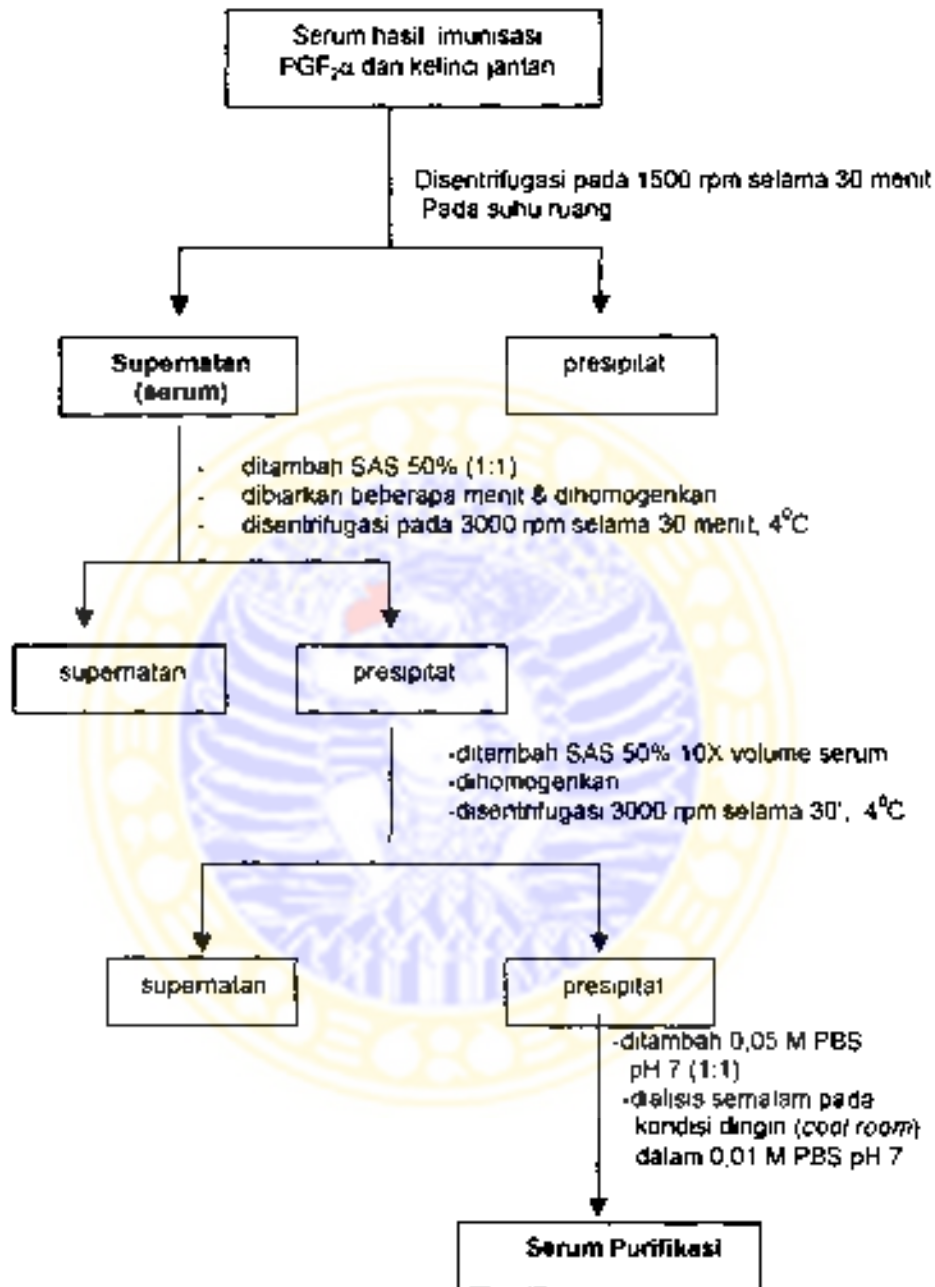
Keterangan:

- I-1 : imunisasi pertama
- Bst-1 : booster 1
- Bst-2 : booster 2
- Bst-3 : booster 3
- Pi : pengambilan darah pre-imun
- B1, B2, ..., B8 : pengambilan darah ke-

Lampiran 3 Isolasi Serum kelinci jantan lokal



Lampiran 4 Purifikasi Serum kelinci jantan lokal



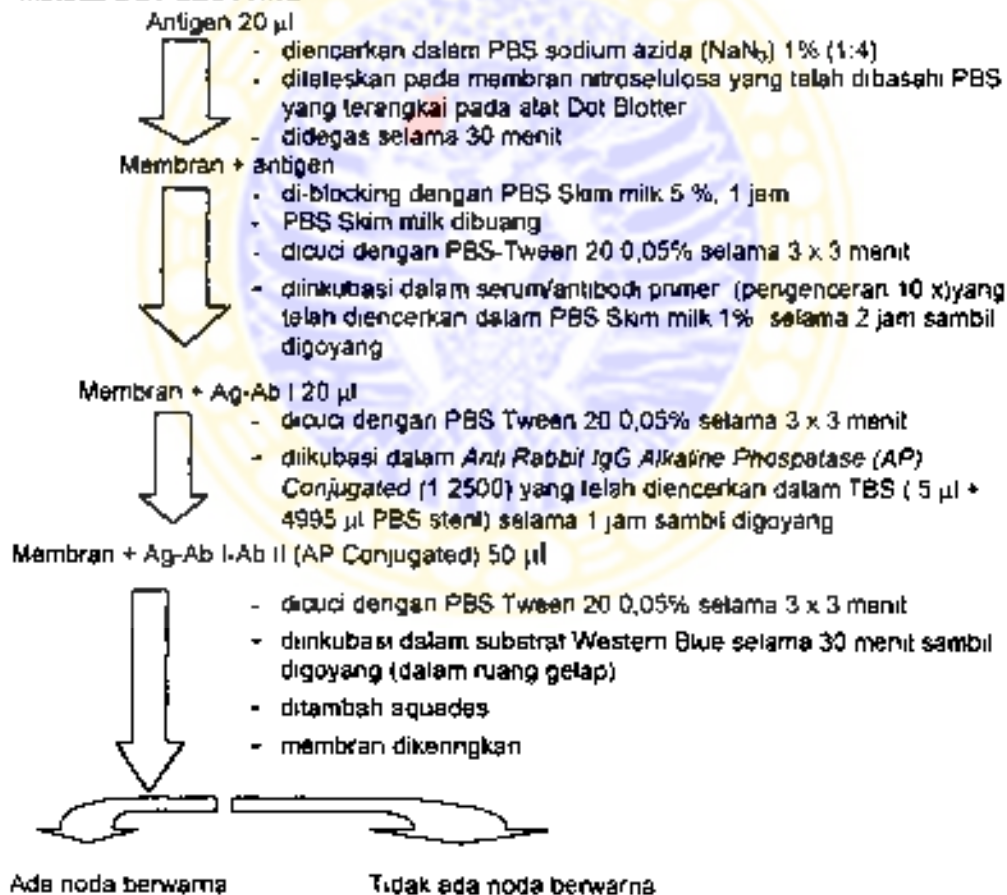
Komposisi Larutan untuk Purifikasi Serum

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
SAS 50%	Amonium sulfat ddH ₂ O	32 g 40 ml
Buffer Fosfat	Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O (0,2 M) NaH ₂ PO ₄ (0,2 M) ddH ₂ O dititrasi sampai pH7-8	1 L
PBS	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (berurutan sambil distrer) dH ₂ O	0,1 g 0,1 g 4 g 1,08 g hingga 500 ml

Lampiran 5 Cara Kerja untuk Metoda DOT BLOTTING

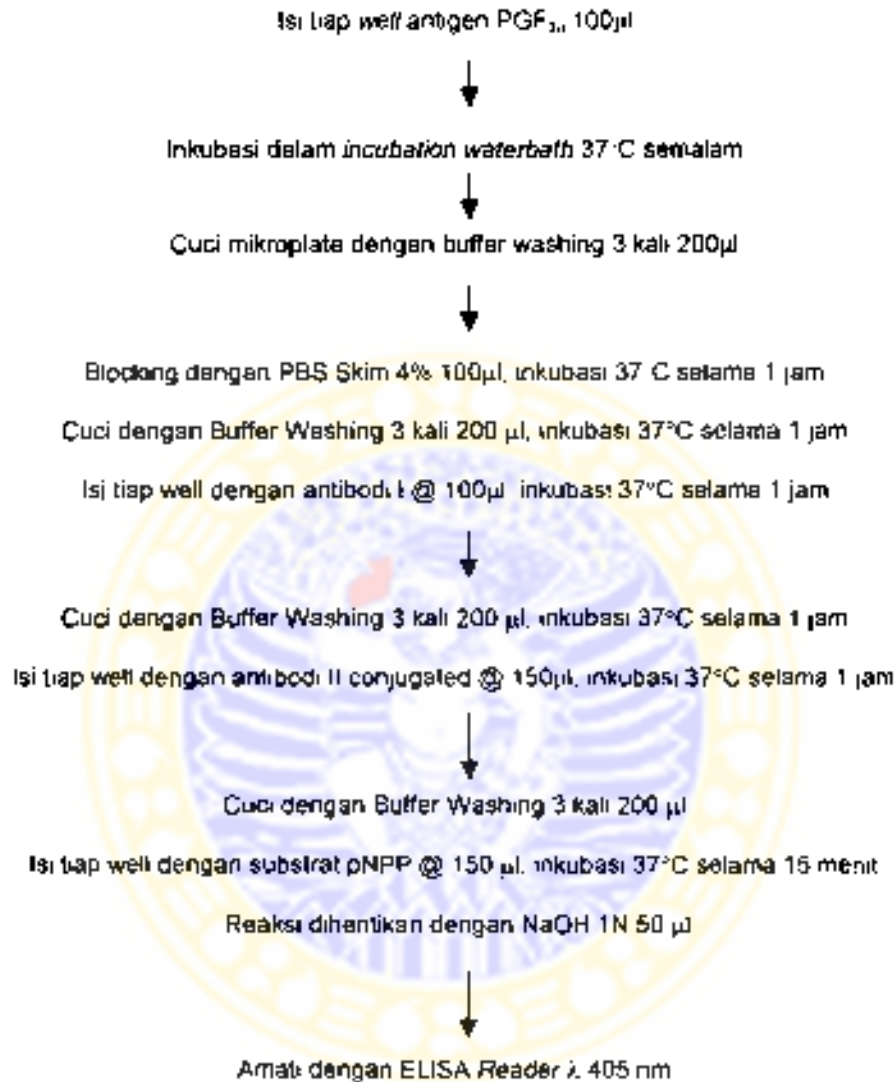
1. Antigen → Hormon Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Glandin N)
 - dalam 1 ml larutan mengandung 5 mg dinoprost
 - atau dalam 1 μ l mengandung 5 μ g dinoprost
 - ambil 20 μ l antigen (mengandung 100 μ g dinoprost) diencerkan dalam PBS sodium azida 1% (1:4) sehingga dalam 1 μ l larutan antigen + PBS sodium azida 1% mengandung 1 μ g dinoprost
 - 20 μ l antigen (mengandung 20 μ g dinoprost) digunakan untuk dot blot.
2. Antibodi primer → serum yang diduga mengandung anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang telah dipurifikasi
 - Ab primer diencerkan 10 kali dalam PBS skim milk 1%
 - Ambil 20 μ l digunakan untuk dot blot
3. Antibodi sekunder → *Anti Rabbit IgG Alkaline Phospatase (AP) Conjugated* (1.2500) yang telah diencerkan dalam TBS (5 μ l + 4995 μ l PBS steril)
 - diambil 20 μ l untuk dot blot

Metoda DOT BLOTTING



Komposisi Larutan pada Dot Blotting

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
PBS 500 ml	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O (berurutan sambil distirer) dH ₂ O	0,1 g 0,1 g 4 g 1,08 g hingga 500 ml
PBS-azida	PBS Natrium azida 1%	10 ml 5 µl
PBS skim 5%	PBS Non fat milk	100 ml 5 g
PBS-T 0,05 %	PBS Tween-20	100 ml 50 µl
TBS	NaCl Tris ddH ₂ O HCl pekat	8,7 g 1,21 g 1 L sampai pH 7,4
Antigen (1:50)	Antigen PBS azida	50 µl 2500 µl
Antibodi Primer (1:100)	Antibodi primer PBS-T skim	10 µl 990 µl
Antibodi Sekunder (1:2500)	Antibodi sekunder AP Conjugated TBS	0,4 µl 999,6 µl
Substrat Western Blue	Western Blue Substrat Solution	3 ml

Lampiran 6 Prosedur pelaksanaan metode ELISA Tidak Langsung

Komposisi Larutan pada ELISA Tidak Langsung

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
Coating buffer	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ NaN ₃ dd H ₂ O (cek pH 9.6)	0.159 g 0.293 g 0.02 g sampai 100 ml
PBS-1	PBS Tween-20	100 ml 50 µ
Blocking Buffer (BSA 1% dalam PBS)	BSA PBS	0.1 g 10 ml
Dietanolam 10% pH 9.6	Dietanolam dd H ₂ O NaN ₃ MgCl ₂ · 6 H ₂ O (cek pH 9.6)	2.425 ml 20 ml 0.005 g 0.0025 g
pNPP dalam Dietanolam	pNPP Dietanolam	1 tablet 5 ml

Lampiran 7 Pembuatan Preparat Histologis dan Histokimia

1. Embedding

1. potongan saluran alat kelamin disimpan dalam larutan fiksatif (10%)
2. rendam dalam etanol 70% 24 jam
3. rendam dalam etanol 80% 2 jam
4. rendam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama 30 menit
5. rendam dalam etanol absolut sebanyak tiga kali masing-masing selama 30 menit
6. rendam dalam xylol dua kali masing-masing selama 30 menit
7. rendam dalam paraffin

2 Coating obyek gelas

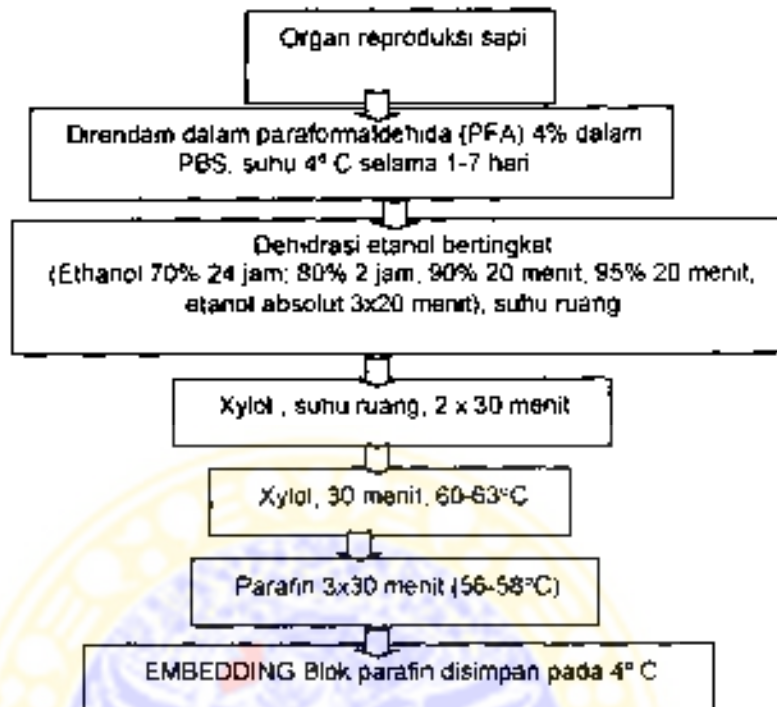
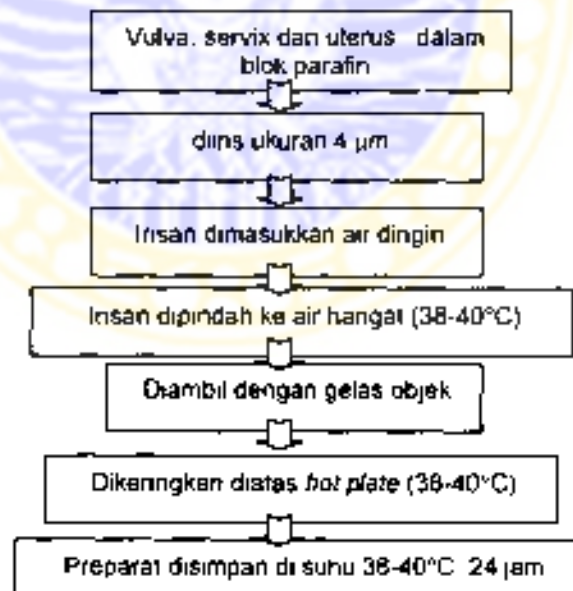
1. obyek gelas ditandai dengan di kikir
2. rendam dalam alcohol 70% semalam
3. keringkan, kemudian celupkan dalam gelatin 0,05%
4. keringkan

3. Pembuatan preparat histologis

1. paraffin blok yang sudah berisi potongan saluran alat kelamin dimasukkan dalam mikrotom
2. pemotongan dengan ketebalan 10 mikron
3. potongan dipindah dalam air hangat
4. pindahkan dengan jarum bertangkai dalam obyek gelas
5. keringkan

4. Pemeriksaan histokimia

1. preparat direndam dalam xylol sebanyak dua kali
2. kemudian rendam dalam alkohol secara bertingkat (100%, 90%, 80%, 70% dan 30%.
3. cuci dalam PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit
4. rendam dalam larutan hydrogen peroksida 3% selama 10 menit
5. cuci kembali dalam PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit
6. tambahkan antibodi primer (anti-prostaglandin F_{2α}) selama 1 jam dalam suhu ruang
7. cuci dengan PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit
8. tambahkan anti-goat IgG Biotin Labeled selama 1 jam
9. cuci dengan PBS pH7,4 selama 3 x 5 menit
10. tambahkan SA-HRP (Strep Avidin-Horseradish Peroksidase selama 1 jam pada suhu ruang
11. tambahkan khromogen DAB selama 10 - 20 menit
12. cuci dalam aquadest selama 3 x 5 menit
13. counterstain dengan Hematoksiniln selama 5 menit
14. cuci dalam aquadest selama 3 x 5 menit
15. Mounting dalam entelan
16. penksa dibawah mikroskop pembesaran 100 dan 400 kali

Diagram Alir Fiksasi dan Embedding**Diagram Alir Pembuatan Preparat**

Komposisi Larutan pada Imunohistokimia

Nama Larutan	Komposisi Bahan	Jumlah
PBS 500 ml	KCl	0,1 g
	KH ₂ PO ₄	0,1 g
	NaCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1,08 g
	(berurutan sambit distrer) dH ₂ O	hingga 500 ml
DAB (fresh)	DAB	2,5 g
	TBS pH 7,6	100 ml
AEC (fresh)	AEC	4 mg
	N,N-dimethyl formamide	1 ml
	0,1 M Buffer Asetat pH 5,2	14 ml
	3 % H ₂ O ₂	0,15 ml



Lampiran 8 Hasil pengamatan birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF_{2α} dengan dosis 25 mg (Perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (Perlakuan II) serta 5 mg (Perlakuan III) secara submukosa vulva

No. Sapi.	Perlakuan I (im 25 mg)		Perlakuan II (sbmv 7,5 mg)		Perlakuan III (sbmv 5 mg)	
	Birahi	Tidak	birahi	tidak	Birahi	tidak
1.	+	-	+	-	+	-
2.	+	-	+	-	+	-
3.	+	-	+	-	+	-
4.	+	-	+	-	+	-
5.	+	-	+	-	+	-
6.	+	-	+	-	+	-
7.	+	-	+	-	+	-
8.	+	-	+	-	+	-
9.	+	-	+	-	+	-
10.	+	-	+	-	+	-
J U M L A h	10	0	10	0	10	0
%	100%	0%	100%	0%	100%	0%

Lampiran 8.1 Analisis Statistik pengamatan birahi pada sapi perah setelah penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan dosis 25 mg (Perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (Perlakuan II) serta 5 mg (Perlakuan III) secara submukosa vulva.

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
dosis PGF	30	2,00	,83	1	3

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		dosis PGF
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,00
	Std. Deviation	,83
Most Extreme Differences	Absolute	,219
	Positive	,219
	Negative	-,219
Kolmogorov-Smirnov Z		1,200
Asymp. Sig. (2-tailed)		,112

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Chi-Square Test Frequencies

dosis PGF

	Observed N	Expected N	Residual
PGF 25 mg	10	10,0	,0
PGF 7,5 mg	10	10,0	,0
PGF 5 mg	10	10,0	,0
Total	30		

Test Statistics

	dosis PGF
Chi-Square ^a	,000
df	2
Asymp. Sig.	1,000

a. 0 cells (.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 10,0

Lampiran 9 Waktu timbulnya birahi pada sapi perah setelah Penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan dosis 25 mg (Perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (Perlakuan II) serta 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva

No. Sapi	Perlakuan I (im 25 mg)	Perlakuan II (sbmv 7,5 mg)	Perlakuan III (sbmv 5 mg)
1.	72	72	79
2.	72	72	79
3.	72	72	79
4.	72	74	79
5.	96	74	79
6.	77	77	69
7.	77	72	69
8.	77	77	69
9.	79	75	69
10.	76	78	72
rataan	77,00	74,30	75,20
sd	7,1957	2,3594	5,0343

Lampiran 9.1 Analisis statistik waktu timbulnya birahi pada sapi perah setelah penyuntikan PGF_{2α} dengan dosis 25 mg (Perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (Perlakuan II) serta 5 mg (perlakuan III) secara submukosa vulva

Descriptives

WAKTU TIMBULNYA BIRAH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
25 mg	10	77,0000	7,1957	2,2755	71,8525	82,1475	72,00	96,00
7,5 mg	10	74,3000	2,3594	,7461	72,6122	75,9878	72,00	78,00
5mg	10	74,3000	5,0343	1,5920	70,6987	77,9013	69,00	79,00
Total	30	75,2000	5,2286	,9546	73,2476	77,1524	69,00	96,00

Test of Homogeneity of Variances

BIRAH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,864	2	27	,175

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	N	dosis	BIRAH
Normal Parameters	30	2,00	75,2000
	Mean		
	Std. Deviation	,83	5,2286
Most Extreme Differences	Absolute	,219	,200
	Positive	,219	,200
	Negative	-,219	-,137
Kolmogorov-Smirnov Z		1,200	1,097
Asymp. Sig. (2-tailed)		,112	,180

a. Test distribution is Normal.

ANOVA

BIRAH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48,800	2	24,300	,882	,426
Within Groups	744,200	27	27,563		
Total	792,800	29			

Lampiran 10 Kadar hormon progesteron serum darah sapi perah yang disuntik dengan hormon Prostaglandin $F_2\alpha$ secara intramus kuler dan submukosa vulva

Waktu pengambilan Sampel darah	Nomor Sampel	Kadar hormon progesteron (ng/ml)		
		Intramus kuler $PGF_{2\alpha}$ 25 mg	Submukosa vulva $PGF_{2\alpha}$ 7,5 mg	Submukosa vulva $PGF_{2\alpha}$ 5 mg
I	P.1.1.	2,6	4,2	3,5
	P.1.2.	1,4	2,7	1,7
	P.1.3.	2,1	3,0	5,4
	P.1.4.	0,99	1,7	1,5
	P.1.5.	1,8	0,43	3,0
	P.1.6.	1,7	4,7	0,9
	P.1.7.	8,4	1,0	4,8
	P.1.8.	6,2	3	7,0
	P.1.9.	2,4	7,1	5,7
	P.1.10.	0,28	8,1	5,2
II	P.2.1.	0	0	0
	P.2.2.	0	0	0
	P.2.3.	0,28	1,1	0,35
	P.2.4.	0	0	0,2
	P.2.5.	0	0	0
	P.2.6.	0	0	0,43
	P.2.7.	0	0,99	0,28
	P.2.8.	0	0	0
	P.2.9.	0,5	0	0,35
	P.2.10.	0	0,45	0,21
III	P.3.1.	2,4	3,5	1,8
	P.3.2.	1,1	1,7	2,4
	P.3.3.	4,6	5,4	1,6
	P.3.4.	0,89	1,5	3,4
	P.3.5.	2,3	0,45	1,9
	P.3.6.	2,6	3,0	4,1
	P.3.7.	3,4	0,5	3,6
	P.3.8.	4,8	4,8	1,1
	P.3.9.	3,0	3,2	1,45
	P.3.10.	2,1	3,3	2,4

Keterangan . I. Pengambilan sample darah saat penyuntikan
 II. Pengambilan sample darah pada saat birahi
 III. Pengambilan sample darah pada tujuh hari setelah birahi

Lampiran 10.1. Analisis statistik Pengambilan darah, dosis dan kadar hormon progesteron serum darah sapi perah.

Univariate Analysis of Variance

Between – Subject Factors

	Value Label	N
Pengambilan	1 Pengambilan 1	30
	2 Pengambilan 2	30
	3 Pengambilan 3	30
Dosis	1 Dosis PGF 25 mg	30
	2 Dosis PGF 7.5 mg	30
	3 Dosis PGF 5 mg	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: KADAR

PENGAMBI	DOSIS	Mean	Std. Deviation	N
pengambilan I	dosis PGF 25 mg	3.2590	2.4447	10
	dosis PGF 7.5 mg	3.5530	2.4783	10
	dosis FGF 5 mg	3.8700	2.0592	10
	Total	3.5607	2.2874	30
pengambilan II	dosis PGF 25 mg	7.800E-02	.1724	10
	dosis PGF 7.5 mg	9.500E-02	.1630	10
	dosis FGF 5 mg	.1820	.1703	10
	Total	.1183	.1692	30
pengambilan III	dosis PGF 25 mg	2.7190	1.2933	10
	dosis PGF 7.5 mg	2.7350	1.6790	10
	dosis FGF 5 mg	2.3750	1.0092	10
	Total	2.6097	1.3185	30
Total	dosis PGF 25 mg	2.0187	2.0932	30
	dosis PGF 7.5 mg	2.1277	2.2454	30
	dosis FGF 5 mg	2.1423	2.0035	30
	Total	2.0962	2.0932	90

Test of Homogeneity of Variances

kadar progesteron

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.025	2	87	.138

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		pengambilan darah	kadar progesteron
N		90	90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.0000	27.7887
	Std. Deviation	.8211	26.0341
Most Extreme Differences	Absolute	.222	.143
	Positive	.222	.113
	Negative	-.222	-.143
Kolmogorov-Smirnov Z		2.103	1.357
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000	.050

a. Test distribution is Normal

b. Calculated from data

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Dependent Variable: KADAR

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
2,096	,165	1,769	2,424

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: KADAR

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	192,365 ^a	8	24,046	9,858	,000
Intercept	395,473	1	395,473	182,125	,000
PENGAMBI	188,608	2	94,304	38,885	,000
DOSIS	,274	2	,137	,056	,945
PENGAMBI * DOSIS	2,483	4	,621	,254	,906
Error	197,554	81	2,439		
Total	785,422	90			
Corrected Total	389,919	89			

a. R Squared = .493 (Adjusted R Squared = .443)

Post Hoc Tests PENGAMBI

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KADAR

(I) PENGAMBI	(J) PENGAMBI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	pengambilan pengambilan	3,4423*	,4033	,000	2,6400	4,2447
	pengambilan pengambilan	,9510*	,4033	,021	,1486	1,7534
	pengambilan pengambilan	-3,4423*	,4033	,000	-4,2447	-2,6400
	pengambilan pengambilan	-2,4913*	,4033	,000	-3,2937	-1,6890
	pengambilan pengambilan	-.9510*	,4033	,021	-1,7534	-.1486
	pengambilan pengambilan	2,4913*	,4033	,000	1,6890	3,2937

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level

Homogeneous Subsets

KADAR

PENGAMBI	N	Subset		
		1	2	3
Duncan ^{a,t} pengambilan II	30	1,183		
pengambilan III	30		2,6097	
pengambilan I	30			3,5607
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,439

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30,000.

b. Alpha = .05

Lampiran 10.2 Penghitungan kepekaan kadar hormon progesteron

1. TC = 32218/33011
2. NSB = 451/380
3. A(MB) = 11030/11077
4. B = 10959/10651
5. C = 9490/9562
6. D = 7557/8087
7. E = 4644/4838
8. F = 3644/3656
9. G = 2812/2755
10. BO = 1413/11079

Average CPM = Duplicate CPM / 2
 Net CPM = Average CPM - NSB
 % bound = Net CPM / Mean CPM Tc

Quality Control Parameter :

T = 32614,5

% NSB = $100 \times \frac{416}{32614,5}$
 = 1,28 = 1,3%

% MB = $100 \times \frac{10637,5}{32614,5}$
 = 32,6%

20% intercept = 44 ng/ml

50% intercept = 6,2 ng/ml

80% intercept = 0,94 ng/ml

Sensitivity 93% = 0,02 ng/ml

Sensitivity = Mean - 2 SD

$$\frac{10392,2}{1,38} \times 100\%$$

$$2 \text{ sd} = 1318,4$$

$$\text{Mean} = 11710,6$$

$$\text{Sd} = 657,2$$

$$n = 10$$

Lampiran 11 Jumlah sapi perah yang bunting setelah penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ dengan dosis 25 mg (Perlakuan I) secara intramuskuler dan dosis 7,5 mg (Perlakuan II) serta dosis 5 mg (Perlakuan III) secara submukosa vulva.

No. Sapi.	Perlakuan I (im 25 mg)		Perlakuan II (sbmv 7,5 mg)		Perlakuan III (sbmv 5 mg)	
	Biunting	Tidak	Biunting	tidak	Biunti	tidak
1.	+	-	+	-	+	-
2.	-	+	+	-	+	-
3.	+	-	+	-	-	+
4.	-	+	-	+	+	-
5.	+	-	-	+	+	-
6.	+	-	+	-	-	+
7.	+	-	-	+	+	-
8.	+	-	+	-	-	+
9.	-	+	+	-	+	-
10.	+	-	+	-	-	+
JMLH	7	3	7	3	6	4
%	70%	30%	70%	30%	60%	40%

Lampiran 11.1 Analisis statistik persentase kebuntingan pada sapi perah

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
DOSIS PGF	30	7,00	,83	1	3

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DOSIS PGF
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7,00
	Std. Deviation	,83
Most Extreme Differences	Absolute	,219
	Positive	,219
	Negative	-,219
Kolmogorov-Smirnov Z		1,200
Asymp. Sig. (2-tailed)		,117

- a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Chi-Square Test Frequencies

DOSIS PGF

	Observed N	Expected N	Residual
PGF 25 mg	10	7,0	3,0
PGF 7,5 mg	10	7,0	3,0
PGF 5 mg	10	6,0	4,0
Total	30		

Test Statistics

	DOSIS PGF
Chi-Square ^a	,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

- a. 0 cells (.0%) have expected frequencies less than 5.
b. The minimum expected cell frequency is 7,0.

**Lampiran 12 Jumlah serum hasil imunisasi pada proses biosintesis
Anti prostaglandin**

1. Kelompok kontrol 2 ekor dengan pengambilan darah sebanyak 8 kali sehingga didapatkan serum sebanyak 16 buah
2. Kelompok perlakuan I sebanyak 2 ekor dengan pengambilan darah sebanyak 8 kali sehingga didapatkan serum sebanyak 16 buah
3. Kelompok perlakuan II sebanyak 2 ekor dengan pengambilan darah sebanyak 8 kali sehingga didapatkan serum sebanyak 16 buah
4. Kelompok perlakuan III sebanyak 2 ekor dengan pengambilan darah sebanyak 8 kali sehingga didapatkan serum sebanyak 16 buah

Total serum yang diperoleh $2 \times 4 \times 8 = 64$ buah serum



Lampiran 13 Analisis *Chi-square* Untuk Rataan Rangkaian Dot Blot

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

Bleeding	N	Mean Rank
250 ug Bleeding-1	4	9.00
Bleeding-2	4	17.50
Bleeding-3	4	15.00
Bleeding-4	4	24.00
Bleeding-5	4	29.00
Bleeding-6	4	26.50
Bleeding-7	4	5.50
Bleeding-8	4	5.50
Total	32	

Test Statistics^{a,b}

	250 ug
Chi-Square	39.510
df	7
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal-Wallis Test

b. Grouping Variable: Bleeding

NPar Tests Kruskal-Wallis Test

Ranks

Bleeding	N	Mean Rank
500 ug Bleeding-1	4	6.50
Bleeding-2	4	18.50
Bleeding-3	4	15.50
Bleeding-4	4	25.50
Bleeding-5	4	30.50
Bleeding-6	4	22.00
Bleeding-7	4	9.50
Bleeding-8	4	4.00
Total	32	

Test Statistics^{a,b}

	500 ug
Chi-Square	29.270
df	7
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal-Wallis Test

b. Grouping Variable: Bleeding

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Bleeding	N	Mean Rank
750 ug	Bleeding-1	4	11.50
	Bleeding-2	4	18.00
	Bleeding-3	4	2.50
	Bleeding-4	4	26.50
	Bleeding-5	4	30.50
	Bleeding-6	4	22.50
	Bleeding-7	4	13.00
	Bleeding-8	4	9.50
	Total		32

Test Statistics^{a,b}

	750 ug
Chi-Square	30.314
df	7
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal-Wallis Test

b. Grouping Variable: Bleeding

Lampiran 13.1 Analisis Uji Z (Mann-Whitney Test) Pengambilan Darah Ke-5

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

Dosis Inamrogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 Kontrol	4	2,50	10,00
500 ug	4	6,50	26,00
Total	8		

Test Statistics^a

	Bleeding ke-5
Mann-Whitney U ^b	10,00
Wilcoxon W	26,000
Z	-2,401
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,014
Exact Sig. (2*1-tailed Sig.)	0,007

a. Not corrected for ties

b. Grouping Variable: Dosis Inamrogen

NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

Dosis Inamrogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 Kontrol	4	2,50	10,00
500 ug	4	6,50	26,00
Total	8		

Test Statistics^a

	Bleeding ke-5
Mann-Whitney U ^b	10,00
Wilcoxon W	26,000
Z	-2,401
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,014
Exact Sig. (2*1-tailed Sig.)	0,007

a. Not corrected for ties

b. Grouping Variable: Dosis Inamrogen

**NPar Tests
Mann-Whitney Test**

Ranks

Dosis Imanogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 Kontrol	4	7,50	10,00
750 ug	4	6,50	26,00
Total	8		

Test Statistics^b

	Bleeding ke-5
Mann-Whitney U	0,00
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,646
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^a

^a. Not corrected for ties

^b. Grouping Variable: Dosis Imanogen

**NPar Tests
Mann-Whitney Test**

Ranks

Dosis Imanogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 250 ug	4	3,50	14,00
500 ug	4	5,50	22,00
Total	8		

Test Statistics^b

	Bleeding ke-5
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	14,000
Z	-1,528
Asymp. Sig. (2-tailed)	,127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 ^a

^a. Not corrected for ties.

^b. Grouping Variable: Dosis Imanogen

NPar Tests
Mann-Whitney Test

Ranks

Dosis Imunogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 250 ug	4	2.50	10.00
750 ug	4	6.50	26.00
Total	8		

Test Statistics^a

	Bleeding ke-5
Mann-Whitney U	10.00
Wilcoxon W	13.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. (2*1-tailed Sig.)	.029 ^b

a. Not corrected for ties

b. Grouping Variable: Dosis Imunogen

NPar Tests
Mann-Whitney Test

Ranks

Dosis Imunogen	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Bleeding ke-5 500 ug	4	2.50	10.00
750 ug	4	6.50	26.00
Total	8		

Lampiran 14 Analisis statistik ELISA Tidak Langsung

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Titer dg indirect-ELISA

Blooding	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
P1	Kontrol	00300	000756	8
	anti-PGF	00300	000756	8
	Total	00300	000756	16
1	Kontrol	01188	000991	8
	anti-PGF	06175	003655	8
	Total	03681	025885	16
2	Kontrol	01475	001832	8
	anti-PGF	07100	002878	8
	Total	04288	029141	16
3	Kontrol	01275	000826	8
	anti-PGF	05550	000926	8
	Total	03413	022095	16
4	Kontrol	01638	002134	8
	anti-PGF	07225	001989	8
	Total	04431	028920	16
5	Kontrol	01875	001832	8
	anti-PGF	19163	286233	8
	Total	10519	214953	16
6	Kontrol	01825	002605	8
	anti-PGF	12050	003780	8
	Total	06937	052895	16
7	Kontrol	01675	003086	8
	anti-PGF	10750	002976	8
	Total	06213	046911	16
8	Kontrol	01463	001481	8
	anti-PGF	10675	000251	8
	Total	10969	047779	16
Total	Kontrol	01413	004262	72
	anti-PGF	08776	102805	72
	Total	03994	081187	144

Test of Homogeneity of Variances

pengambilan darah ke-

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.441	13	58	.000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		pengambilan darah ke-	ULANGAN
N		72	72
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	5.0000	1.412E-02
	Std. Deviation	2.6001	4.762E-03
Most Extreme Differences	Absolute	.112	.175
	Positive	.112	.094
	Negative	-.112	-.175
Kolmogorov-Smirnov Z		.954	1.484
Asymp. Sig. (2-tailed)		.322	.024

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ANOVA

Titer Indirect

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Corrected)		8,091E-02	7	1,156E-02	1140,450	.000
	Linear Term	Unweighted	3,482E-02	1	3,482E-02	3445,204	.000
		Weighted	3,987E-02	1	3,987E-02	3934,200	.000
		Deviation	4,104E-02	6	6,839E-03	674,925	.000
Within Groups			6,486E-04	54	1,013E-05		
Total			8,155E-02	71			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Independent Variable	Test Statistic	Mean Difference (I, J)	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
LSD	bleeding kor-1	bleeding kor-1	5,356E-07	1,94E-03	-5,5859E-02	4,87529E-02
		bleeding kor-2	-5,275E-07	1,94E-03	-8,1830E-02	5,5577E-02
		bleeding kor-3	6,800E-07	1,94E-03	-7,1189E-02	-4,4870E-02
		bleeding kor-4	-1,175000E-06	1,94E-03	-1,396799E-01	-1,143790E-01
		bleeding kor-5	-1,041250E-06	1,94E-03	-1,068700E-01	-1,013711E-01
		bleeding kor-6	-8,771E-07	1,94E-03	-8,6585E-02	-8,41964E-02
		bleeding kor-7	-6,925E-07	1,94E-03	-7,2470E-02	6,6070E-02
		bleeding kor-8	5,250E-07	1,94E-03	4,8870E-02	5,5680E-02
	bleeding kor-2	bleeding kor-1	-6,270E-07	1,94E-03	9,4289E-02	-9,0731E-02
		bleeding kor-3	-1,550E-07	1,94E-03	-1,8680E-02	1,2070E-02
		bleeding kor-4	-8,500E-07	1,94E-03	-8,8190E-02	-8,1820E-02
		bleeding kor-5	-5,187E-07	1,94E-03	-5,4976E-02	-4,7871E-02
		bleeding kor-6	-3,487E-07	1,94E-03	-3,8055E-02	-3,1995E-02
		bleeding kor-7	-1,875E-07	1,94E-03	-1,8690E-02	-1,9570E-02
		bleeding kor-8	5,875E-07	1,94E-03	5,5570E-02	6,1850E-02
		bleeding kor-9	8,250E-07	1,94E-03	5,0701E-02	9,4299E-02
bleeding kor-3	bleeding kor-1	-9,270E-07	1,94E-03	-1,7430E-02	-6,0791E-02	
	bleeding kor-2	-5,875E-07	1,94E-03	-8,1830E-02	-5,5570E-02	
	bleeding kor-4	-4,250E-07	1,94E-03	-4,5191E-02	-4,2021E-02	
	bleeding kor-5	2,862E-07	1,94E-03	-3,1820E-02	-7,6440E-02	
	bleeding kor-6	-1,260E-07	1,94E-03	-1,3680E-02	-1,3200E-02	
	bleeding kor-7	6,850E-07	1,94E-03	6,4820E-02	7,1180E-02	
	bleeding kor-8	1,500E-07	1,94E-03	1,2309E-02	1,8680E-02	
	bleeding kor-9	9,250E-07	1,94E-03	6,0701E-02	1,2430E-02	
	bleeding kor-10	-4,850E-07	1,94E-03	-5,1680E-02	-4,6320E-02	
	bleeding kor-11	-3,875E-07	1,94E-03	-3,8079E-02	-3,3371E-02	
	bleeding kor-12	-9,175E-07	1,94E-03	-2,2050E-02	-1,6166E-02	
	bleeding kor-13	-7,250E-07	1,94E-03	-4,4080E-02	-1,8289E-02	
	bleeding kor-14	1,175000E-06	1,94E-03	1,103711E-01	1,020760E-01	
	bleeding kor-15	5,187E-07	1,94E-03	6,1820E-02	6,8180E-02	
	bleeding kor-16	5,875E-07	1,94E-03	5,5570E-02	5,1900E-02	
	bleeding kor-4	bleeding kor-1	4,800E-07	1,94E-03	4,6320E-02	5,2680E-02
bleeding kor-2		3,010E-07	1,94E-03	1,8050E-02	1,0190E-02	
bleeding kor-3		1,337E-07	1,94E-03	-1,6129E-02	1,0621E-02	
bleeding kor-5		-6,750E-07	1,94E-03	-1,2888E-02	1,6549E-02	
bleeding kor-6		3,010E-07	1,94E-03	3,2121E-02	3,1079E-02	
bleeding kor-7		3,468E-07	1,94E-03	8,4166E-02	9,0536E-02	
bleeding kor-8		8,737E-07	1,94E-03	3,1689E-02	3,8255E-02	
bleeding kor-9		2,907E-07	1,94E-03	2,5495E-02	3,1805E-02	
bleeding kor-10		1,907E-07	1,94E-03	1,8196E-02	2,2555E-02	
bleeding kor-11		3,010E-07	1,94E-03	-3,1300E-02	-3,0848E-02	
bleeding kor-12		-1,675E-07	1,94E-03	-1,9204E-02	-1,7996E-02	
bleeding kor-13		1,817E-07	1,94E-03	1,4065E-02	2,1306E-02	
bleeding kor-14		6,925E-07	1,94E-03	6,0070E-02	7,7401E-02	
bleeding kor-15		1,675E-07	1,94E-03	1,3570E-02	1,9830E-02	
bleeding kor-16		1,060E-07	1,94E-03	1,3201E-02	1,3680E-02	
bleeding kor-5		bleeding kor-1	2,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02
	bleeding kor-2	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-3	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-4	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-6	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-7	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-8	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-9	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-10	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-11	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-12	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-13	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-14	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-15	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	
	bleeding kor-16	1,520E-07	1,94E-03	-1,9298E-02	4,7298E-02	

Table Caption
The mean difference is significant at the .05 level

Homogeneous Subsets

Titer Indirect

bleeding ke-	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
Duncan	8	.00E-03						
bleeding ke-	8		.55E-02					
bleeding ke-	8			.18E-02				
bleeding ke-	8				.10E-02			
bleeding ke-	8				.23E-02			
bleeding ke-	8					.04E-02		
bleeding ke-	16						.1712500	
bleeding ke-	8							.0500000
Sig.		1,000	1,000	1,000	.420	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

* Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,533.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error

