

ku
Tesis 5/05
Saf
k

TESIS

KARAKTERISASI DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PROLAKTIN (Abp α Pro) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES MOULTING

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

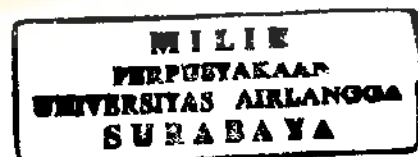


ERMA SAFITRI

PROGRAM STUDI ILMU BIOLOGI REPRODUKSI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2005



**KARAKTERISASI DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL
ANTI PROLAKTIN (Abpo- α Prol) SEBAGAI PENGHAMBAT
PROSES *MOULTING***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

ERMA SAFITRI

Nim: 090214770M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 18 Februari 2005

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DIUJI
TANGGAL, 18 FEBRUARI 2005

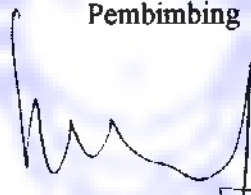
Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.
NIP. 130 687 297

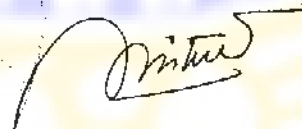
Pembimbing



Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.
NIP. 131 653 434

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Puji Sianto, M.Kes., Drh.
NIP. 131 570 349

Telah diuji pada

Tanggal 18 Februari 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, M.Sc., Drh.

Anggota : 1. Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.

2. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

3. H. Mas'ud Hariadi, M.Phil., PhD., Drh.

4. Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh.

5. Drs. Win Darmanto, MS., Ph.D.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama dipanjatkan puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karuniaNYA sehingga dapat terselesaikannya tesis ini.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya disampaikan kepada Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh. selaku pembimbing ketua yang telah menghantarkan melewati jenjang pendidikan Magister Pascasarjana, yang senantiasa menyediakan waktu untuk membimbing dengan penuh kesabaran mendorong untuk selalu berpandangan ke depan dalam mengikuti perkembangan ilmu pengetahuan di bidang reproduksi hewan, penuh perhatian dan senantiasa mendorong semangat untuk segera menyelesaikan tesis ini serta meningkatkan kemampuan dibidang penulisannya. Semoga ALLAH SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNYA serta melipat gandakan pahalanya.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya diucapkan kepada Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. selaku pembimbing yang selalu menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan dengan penuh kesabaran mendorong untuk selalu berpandangan ke depan dalam mengikuti perkembangan ilmu, mengajari dan membimbing dalam peningkatan kemampuan di bidang molekuler. Semoga ALLAH SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNYA serta melipat gandakan pahalanya.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui tim Manajemen Program Magister Pascasarjana yang telah memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban dalam penyelesaian tesis ini.

Dengan selesainya penulisan tesis ini, diucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpB.TKV, atas ijin, kesempatan dan fasilitas yang diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muh.Amin, dr., SpP(K), yang telah memberi kesempatan untuk mengikuti pendidikan Program Magister di Universitas Airlangga.

H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh., selaku ketua Program studi Ilmu Biologi Reproduksi Program Magister Pascasarjana Universitas Airlangga, atas segala nasehat, dorongan semangat dan perhatian yang diberikan selama mengikuti Program Magister.

Dekan Fakultas Kedokteran hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh. atas ijin dan kesempatan untuk mengikuti Program Magister Pascasarjana

Staf pengajar dan panitia penguji dari usulan penelitian sampai usulan naskah tesis di program Magister Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjoprano, M.Sc., Drh., Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh., Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh., Dr. Bambang Poernomo, MS., H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh., Dr. Pudji Sianto, M.Kes., Drh., Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D. yang telah menambah pengetahuan dan wawasan keilmuan selama mengikuti Program Magister Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dirjen DikTi dan ketua Lemlit Unair Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., Drh., yang telah memberi kepercayaan penulis sebagai ketua peneliti produksi bahan bioaktif *antimoulling*, melalui dana penelitian : Ilmu Penelitian Dasar anggaran tahun 2004.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Aullanni'am, DES., Drh. Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya, atas ijin dan fasilitas serta bimbingan selama pengerjaan di laboratorium yang dengan tulus ikhlas meluangkan waktu untuk membimbing, berkonsultasi serta meningkatkan kemampuan melakukan pekerjaan di laboratorium, komputer dan desain grafis, sehingga banyak membantu dalam penyelesaian tesis ini. Semoga ALLAH SWT senantiasa melimpahkan rahmad dan hidayahNYA serta melipat gandakan pahalaNYA.

Terima kasih yang tak terhingga disampaikan kepada kakak-kakak sejawat Eks. Laboratorium Fisiologi Reproduksi: Dr. Pudji Srinto, M. Kes., Drh. dan Sri Pantja M.Si., Drh. yang selalu menyediakan waktu untuk berkonsultasi, bantuan literatur dan dorongan untuk segera menyelesaikan tesis ini, Abdul Samik, M.Si., Drh. yang membantu pembuatan proposal usulan penelitian beserta metoda dan analisis statistiknya serta koreksi penulisan tesis. Semoga ALLAH SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNYA

Terima kasih kepada teman-teman sekelas, seangkatan dan kakak kelas program Magister: Indra Wirawan (Komting), Gracia Angelina H., Dwi Rini K., Wiwik Kesumawati, Wiwik Misaco-Rara, Emy Koestanti, Rosa Tri Hertamawati dan Eppy Muhammad Luqman, atas kebersamaan berbagi rasa suka dan duka, berbagi pengalaman dalam keilmuan dan kerjasamanya yang teramat baik.

Dengan kasih sayang yang tulus dan penuh rasa bangga disampaikan terima kasih kepada anak-anakku Kakak Isul (Sulaiman En) dan Adik Yo (Yusuf Ahmad En), yang telah memberikan pengertian, pengorbanan, dorongan semangat, iringan doa, dan bantuan yang tulus ikhlas yang tak ternilai sehingga dapat menyelesaikan pendidikan Magister ini. Semoga ALLAH SWT menjadikan anak-anak yang sholeh, berbakti pada orang tua dan berguna bagi nusa, bangsa dan agama.

Ungkapan rasa terima kasih dan penghargaan yang tiada tara tingginya dihaturkan kepada almarhumah mama Hj. Siti Halimah Barack yang tidak sempat melihat keberhasilan ini. Semoga ALLAH menerima segala amal disisiNYA.. Kepada ayahanda H. Marsodo diucapkan terima kasih karena telah membesarkan, mengayomi, mendidik dengan kasih sayang dan tak henti-hentinya mendoakan untuk penyelesaian pendidikan Program Magister ini.

Terima kasih yang tulus juga diucapkan kepada PakDe Sarbini, ibu Noeraini, kakak-kakak (Dra. Nurul Magdaniah & suami, Moch. Samson, SE. & istri), adik-adik (Ir. Rachmad Hidayat & istri serta Achmad Caesar) dan para keponakan untuk dorongan semangat dan bantuan Doanya.

Akhirnya kepada semua pihak, teman sejawat yang tidak bisa disebutkan satu-persatu yang telah membantu selama masa pendidikan ini, disampaikan terima kasih setinggi-tingginya, semoga ALLAH SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan karuniannya. Amin.

RINGKASAN

KARAKTERISASI DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL ANTI PROLAKTIN (Abpo- α Prol) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES *MOULTING*

Erma Safitri

Penelitian eksperimental laboratoris telah dilakukan melalui pemanfaatan isolat prolaktin dari serum ayam arab fase *moulting*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan berhentinya fase *moulting* dan ayam memulai produksi telur kembali yang disebabkan oleh peran antibodi hasil induksi molekul prolaktin. Antibodi tersebut diproduksi pada kambing dan disebut Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol).

Tahapan penelitian ini, meliputi : 1. *Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifitas* dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum ayam arab fase *moulting*; 2. Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol-1) pada Kelinci jantan strain New Zealand.; 3. Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol) pada Kambing kacang jantan; 4. Challenge test dari Abpo- α Prol pada ayam arab fase *moulting* awal.

Data karakter yang dihasilkan pada penelitian tahap 1 ini adalah molekul prolaktin dengan kisaran berat molekul 26,36 kDa., yang telah diuji spesifitasnya dengan metode *western blotting* sebelum dan setelah dilakukan *elektroelusi*. Berdasarkan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin dengan metoda *Biuret* ditentukan bahwa dosis yang digunakan untuk produksi Abpo- α Prol pada kambing adalah 350 μ g/ml.

Titer yang didapatkan dari metoda ELISA indirect diamati waktu mulai terbentuknya antibodi yaitu pada *bleeding* ke-1 setelah booster IFA yang pertama dan ditentukan titer tertinggi dan berbeda nyata $p < 0,01$ yang didapatkan pada *bleeding* ke-10 setelah *booster* IFA ketiga. Produksi Abpo- α Prol-1 ini dengan tujuan sebagai uji spesifitas protein metoda *western blotting* pada serum ayam fase *moulting* sebelum dan sesudah dilakukan *Elektroelusi*.

Abpo- α Prol dari kambing yang diproduksi dikarakterisasi dengan uji spesifitas metoda *dot blotting* dan dilakukan pengukuran titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* untuk menentukan waktu mulai terbentuknya dan titer tertinggi dari Abpo- α Prol. Reaksi positif dari uji spesifitas metoda *dot blotting* pada Abpo- α Prol baik dengan prolaktin (Sigma L-6520) ataupun dengan isolat prolaktin ditandai dengan noda spot warna biru keunguan dibandingkan dengan kontrol yang tidak menghasilkan warna spot. Waktu mulai terbentuknya Abpo- α Prol adalah pada *bleeding* ke-1 setelah *booster* IFA yang pertama dan titer tertinggi didapatkan pada *bleeding* ke-11 setelah *booster* IFA yang ketiga dan berbeda nyata ($p < 0,01$) diantara perlakuan (waktu *bleeding*). Produksi Abpo- α Prol ini dengan tujuan digunakann untuk uji *spesifitas* protein metoda *western blotting* pada isolat prolaktin yang telah dielektroelusi dan untuk challenge test pada ayam arab periode *moulting*. Sebelum challenge test dilakukan penghitungan kadar total protein dengan metoda *biuret* dari Abpo- α Prol dengan titer tertinggi. Hasil dari metoda *biuret* yaitu kadar total protein tertinggi sebesar 2930 μ g/ml pada kambing nomor 2 dari *bleding* ke-6 setelah IFA ke-2 yaitu sebanyak 11 ml dikonversikan untuk penentuan dosis 50 μ g/ml, 100 μ g/ml dan 200 μ g/ml.

nomor 2 dari *bleding* ke-6 setelah IFA ke-2 yaitu sebanyak 11 ml dikonversikan untuk penentuan dosis 50 µg/ml, 100 µg/ml dan 200 µg/ml.

Challenge test pada tahap ini digunakan Abpo-αProl dari hasil penelitian tahap 3 dengan dosis 50 µg/ml (P1), 100 µg/ml (P2) dan 200 µg/ml (P3) serta 0,5 ml PBS (sebagai kontrol). Pada tahap penelitian ini penghentian *moulting* terjadi berturut-turut pada hari ke $4,8 \pm 1,033$ (P1); $4,6 \pm 0,843$ (P2); $4,68 \pm 0,516$ (P3) dan $61,9 \pm 2,079$ (kontrol). Uji statistik dengan *anova* satu arah terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dari uji BNT 5% menyatakan bahwa penghentian *moulting* paling cepat adalah pada kelompok P3 (200 µg/ml) yang tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan P1 (50 µg/ml) dan P2 (100 µg/ml). Kecepatan mulai bertelur pada penelitian ini terjadi berturut-turut pada $9,3 \pm 0,675$ (P1); $7,4 \pm 0,843$ (P2); $3,3 \pm 0,823$ (P3) dan $18,4 \pm 1,174$ (kontrol). Uji statistik dengan *anova* satu arah terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dari uji BNT 5% menyatakan bahwa kecepatan mulai bertelur paling cepat adalah pada kelompok P3 (200 µg/ml) yang berbeda nyata ($p < 0,05$) baik dengan P1 (50 µg/ml); P2 (100 µg/ml); maupun dengan kontrol (PBS 0,5 ml).

Rangkaian tahapan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa molekul prolaktin dari isolat prolaktin serum ayam arab fase *moulting* berpotensi imunogenik untuk merangsang terbentuknya Abpo-αProl guna menghambat proses *moulting* dan juga mempengaruhi kecepatan mulai bertelur.

SUMMARY

CHARACTERIZATION AND PRODUCTION OF ANTI-PROLACTIN POLYCLONAL ANTIBODY (Abpo- α Prol) AS MOULTING PROCESS INHIBITOR

Erma Safitri

A laboratory experimental study had been done using prolactin isolate from moulting-phase arabic hens serum. The objective of this study was to prove that, due to the role of prolactin molecule-induced antibody, moulting phase ceased and hens started to recover egg laying. The antibody was produced in goat and entitled as anti-prolactin polyclonal antibody (Abpo- α Prol).

The stages of this study were as follows: 1. Isolation, characterization, purification, specificity test and total protein level measurement of prolactin isolate from moulting-phase arabic hens; 2. The production of anti-prolactin polyclonal antibody (Abpo- α Prol-1) in male New Zealand strain rabbit; 3. The production of anti-prolactin polyclonal antibody (Abpo- α Prol) in local goat; and 4. Challenge test for Abpo- α Prol to inhibit moulting process and to affect the time of egg laying recovery.

Characterization conducted at the first stage revealed prolactin molecule with molecular weight of 26.36 kDa, whose specificity had been tested using Western blotting method prior to and after electroelution. Based on the measurement of total protein level from prolactin isolate using Biuret method, it was determined that dose used for producing Abpo- α Prol in local goat was 350 μ g/ml.

Titer obtained from indirect ELISA method was observed starting from the formation of antibody, which was at the first bleeding after the first IFA booster. The highest titer with significant difference ($p < 0.01$) was obtained at tenth bleeding after the third IFA. The production of Abpo- α Prol-1 was aimed for testing protein specificity using Western blotting method in moulting-phase hens serum before and after electroelution.

The produced goat Abpo- α Prol was characterized using Dot blotting specificity test and the titer of Abpo- α Prol was measured using indirect ELISA to determine the first time of formation and the highest titer. Positive reaction from Dot blotting test in Abpo- α Prol, either using prolactin (Sigma L-6520) or prolactin isolate, was marked by purplish blue spot, which was not found in control. The first formation of Abpo- α Prol was at the first bleeding after the first IFA booster, while the highest titer was found at eleventh bleeding after the third IFA and significantly different ($p < 0.01$) between treatments (bleeding time). Abpo- α Prol production was aimed to use for protein specificity test using Western blotting method in electroeluted prolactin isolate and for challenge test in moulting-phase arabic hens. Prior to challenge test, total protein level was measured by means of biuret method from Abpo- α Prol with the highest titer, with the result that the highest total protein level, 2930 μ g/ml, obtained from goat no. 2 from the sixth bleeding after the second IFA, as much as 11 ml, was converted to determine the doses of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, and 200 μ g/ml.

For challenge test, we used Abpo- α Prol from the third stage of study with the dose of 50 μ g/ml (P1), 100 μ g/ml (P2), and 200 μ g/ml (P3) and 0.5 ml PBS (as control). In this stage, moulting was ceased respectively in day 4.8 ± 1.033 (P1); 4.6 ± 0.843 (P2); 4.68 ± 0.516 (P3) and 61.9 ± 2.079 (control). Statistical test using one way Anova revealed significant difference ($p < 0.01$) between control and treatment groups, and BNT 5% test showed that the fastest moulting inhibition was found in P3 group (200 μ g/ml), which was not significantly different ($p < 0.05$) with P1 (50 μ g/ml) and P2 (100 μ g/ml). The time of egg laying recovery was respectively at 9.3 ± 0.675 (P1); 7.4 ± 0.843 (P2); 3.3 ± 0.823 (P3) and 18.4 ± 1.174 (control). Statistical test using one way Anova test showed significant difference ($p < 0.01$) between control and treatment groups, and BNT 5% test indicated that the shortest time of egg laying recovery was at group P3 (200 μ g/ml), which was significantly different ($p < 0.05$) from P1 (50 μ g/ml); P2 (100 μ g/ml); and control (PBS 0.5 ml).

Conclusively, prolactin molecule from prolactin isolate of moulting-phase arabic henns serum has immunogenic potentials to stimulate the formation of Abpo- α Prol to inhibit moulting process and to affect the time of egg laying recovery.

ABSTRACT**CHARACTERIZATION AND PRODUCTION OF ANTI-PROLACTIN POLYCLONAL ANTIBODY (Abpo- α Prol) AS MOULTING PROCESS INHIBITOR****Erma Safitri**

Anti prolactin polyclonal antibody (Abpo- α Prol) has a specific activity against prolactin. It neutralizes prolactin action in circulation. The effect of such neutralization is the inhibition of moulting process, so that hens may be able to produce eggs again. Abpo- α Prol can be produced by injecting prolactin isolate from blood serum of arabic hens in moulting-phase into local goat.

The purpose of this study was to inhibit moulting process without reducing hens immune response. This study was commenced by protein characterization using SAS 50% method, prolactin identification from moulting-phase arabic hens serum by means of SDS-PAGE, and followed with isolation and purification using electroelution. Furthermore, prolactin isolate was immunized to local goat to produce Abpo- α Prol. Six local goats were divided into 2 groups. The first group comprised 1 goat immunized with PBS, and the second one was immunized with prolactin isolate in CFA and subjected to booster with prolactin isolate in IFA twice.

The formation of Abpo- α Prol and the highest titer was detected using indirect ELISA. Afterwards, the capability to inhibit moulting-phase and the time of the recovery of egg laying were assessed. This study involved 40 early moulting-phase arabic hens aged 14 - 16 months. These hens were divided into four group, the first group (P0), served as control, was immunized with PBS, the second (P1), third (P2), and fourth (P3) groups were given with intramuscular Abpo- α Prol of 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, and 200 μ g/ml, respectively.

The evaluation of capability in moulting inhibition was carried out every day, starting from the first loss of primary wing feather to the ceasing of feather loss and complete recovery of feather. Moulting process can be ceased at day 4 to day 6, while control group ceased moulting at day 60 to day 65. Results of ANOVA revealed that the difference between groups had $p < 0.05$.

The evaluation of capability in affecting the time of egg laying recovery was also carried out every day, starting from the first grow of wing feather to the recovery of egg laying. Result of evaluation showed that egg laying started at day 2 to day 10, while that in control group at day 17 to day 20. Result of ANOVA revealed difference between groups ($p < 0.05$).

The results of this study showed that (1) Abpo- α Prol could be produced in goat from the prolactin isolate of moulting-phase arabic hens blood serum; (2). The first emergence of Abpo- α Prol was at the first bleeding after immunization of prolactin isolate in CFA and first booster in IFA. The highest titer was found at eleventh bleeding after the third booster with prolactin isolate in IFA; and (3) Abpo- α Prol could inhibit moulting process and shorten the time of egg laying recovery.

Keywords: Abpo- α Prol, prolactin, arabic hens, moulting

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Penetapan Panitia	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	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Ayam Arab	7
2.2 Pubertas dan <i>Moulting</i>	10
2.3 Prolaktin	13
2.4 Mengatasi Fase <i>Moulting</i>	17
2.5 Antibodi Poliklonal	18
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konseptual	21
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	24
4.1 Rancangan Penelitian	24
4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel	24
4.3 Variabel Penelitian	25
4.3.1 Klasifikasi Variabel	25
4.3.2 Definisi Operasional Variabel	25
4.4 Bahan Penelitian	27
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	29
4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	29
4.6.1 Penelitian 1: <i>Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas</i>	

dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum darah ayam arab fase <i>moulting</i>	29
4.6.1.1 Isolasi Protein Serum	29
4.6.1.2 Identifikasi Prolaktin dengan SDS-PAGE	32
4.6.1.3 Uji Spesifisitas Protein Serum Metoda <i>Western Blotting</i>	33
4.6.1.4 Isolasi dan Purifikasi Prolaktin Metoda <i>Elusi</i>	33
4.6.1.5 Uji Spesifisitas Protein Isolat Prolaktin Metoda <i>Western Blotting</i>	34
4.6.1.6 Kadar Total Protein Isolat Prolaktin Metoda <i>Biuret</i>	35
4.6.2 Penelitian 2 : Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci jantan Strain New Zealand.....	36
4.6.2.1 Produksi Abpo- α Prol-1	36
4.6.2.2 Purifikasi IgG dari Abpo- α Prol-1	39
4.6.2.3 Pengukuran Titer Abpo- α Prol-1	40
4.6.3 Penelitian 3 : Produksi Abpo- α Prol pada Kambing jantan..	41
4.6.3.1 Produksi Abpo- α Prol	41
4.6.3.2 Purifikasi IgG dari Abpo- α Prol	45
4.6.3.3 Uji Spesifisitas Abpo- α Prol Metoda <i>Dot Blotting</i>	45
4.6.3.4 Pengukuran Titer Abpo- α Prol	46
4.6.3.5 Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda <i>Biuret</i>	47
4.6.4 Penelitian 4: <i>Challenge test</i> dari Abpo- α Prol pada ayam arab fase <i>moulting</i>	48
4.6.4.1 Kemampuan Menghambat Proses <i>Moulting</i>	50
4.6.4.2 Kemampuan Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur.....	50
4.7 Analisis Data	51
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	53
5.1 Data Penelitian	53
5.1.1 Penelitian 1: <i>Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum darah ayam arab fase moulting</i>	53
5.1.2 Penelitian 2: Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci jantan strain New Zealand	58
5.1.3 Penelitian 3: Produksi Abpo- α Prol pada Kambing jantan	61
5.1.3.1 Uji Spesifisitas Abpo- α Prol terhadap Prolaktin (Sigma L-6520) dan Isolat Prolaktin Metoda <i>Dot Blotting</i>	62
5.1.3.2 Pengukuran Titer Abpo- α Prol	64
5.1.3.3 Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda <i>Biuret</i>	67
5.1.4 Penelitian 4: <i>Challenge test</i> dari Abpo- α Prol pada ayam arab fase <i>moulting</i>	68
5.1.4.1 Kemampuan Menghambat Proses <i>Moulting</i>	70
5.1.4.2 Kemampuan Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur.....	72
5.2 Analisis Hasil Penelitian	73
5.2.1 Analisis Statistik Profil Abpo- α Prol-1 Hasil Induksi Prolaktin (Sigma L-6520) pada Kelinci Jantan	73
5.2.2 Analisis Statistik Profil Abpo- α Prol Hasil Induksi Isolat Prolaktin pada Kambing Kacang Jantan	75
5.2.3 Analisa Statistik Kemampuan Menghambat Proses	

	<i>Moulting</i>	76
	5.2.4 Analisa Statistik Kemampuan Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur	77
BAB 6	PEMBAHASAN	79
	6.1 Penelitian Pertama	79
	6.1.1 Purifikasi serum darah	79
	6.1.2 Karakterisasi molekul prolaktin	81
	6.1.3 Uji Spesifisitas Protein Serum Metoda <i>Western Blotting</i>	84
	6.1.4 Isolasi dan Purifikasi Prolaktin Metoda <i>ELUSI</i>	86
	6.1.5 Uji Spesifisitasi Protein Isolat Prolaktin Metoda <i>Western Blotting</i>	87
	6.1.6 Kadar Total Protein Isolat Prolaktin Metoda <i>Biuret</i>	88
	6.2. Penelitian 2 dan 3	89
	6.2.1 Poduksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci dan Abpo- α Prol pada Kambing	89
	6.2.1.1 Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci	93
	6.2.1.2 Produksi Abpo- α Prol pada Kambing	95
	6.2.2 Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda <i>Biuret</i>	98
	6.3 Penelitian 4: <i>Challenge test</i> Abpo- α Prol pada Ayam Arab Fase <i>Moulting</i> Awal	98
	6.3.1 Kemampuan Abpo- α Prol Menghambat Proses <i>Moulting</i>	99
	6.3.2 Kemampuan Abpo- α Prol Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur	101
BAB 7	PENUTUP	105
	7.1 Kesimpulan	105
	7.2 Saran	106
	DAFTAR PUSTAKA	107
	LAMPIRAN	114

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Perbandingan Keunggulan/ Kelemahan Ayam Arab dan Ayam Buras	9
2.2	Kadar Prolaktin dalam darah ayam (<i>Gallus domesticus</i>)	16
4.1	Jadwal Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci dari prolaktin (Sigma L-6520)	39
4.2	Jadwal Produksi Abpo- α Prol pada Kambing dari isolat prolaktin	44
5.1	Kadar Total Protein dari Isolat Prolaktin dengan metoda <i>Biuret</i>	57
5.2	Titer positif dari Abpo- α Prol-1 di atas 2 kali COV pada Kelinci	59
5.3	Pembentukan Abpo- α Prol-1 untuk pertama kali setelah penyuntikan prolaktin (Sigma L-6520) pada Kelinci	60
5.4	Titer Abpo- α Prol-1 pengenceran 1/160 dari 12 <i>bleeding</i> pada Kelinci	61
5.5	Titer positif dari Abpo- α Prol di atas 2 kali COV pada Kambing	64
5.6	Pembentukan Abpo- α Prol untuk pertama kali setelah penyuntikan isolat prolaktin pada Kambing	65
5.7	Titer Abpo- α Prol pengenceran 1/160 dari 12 X <i>bleeding</i> pada Kambing	66
5.8	Kadar Total Protein dari Abpo- α Prol dengan metoda <i>Biuret</i>	68
5.9	Lama <i>moulting</i> (hari) yaitu dihitung dari rontok 1 helai bulu primer nomor satu dari sayap sampai tumbuh bulu lengkap di daerah sayap	71
5.10	Kecepatan Mulai Bertelur (hari) dihitung dari fase <i>moulting</i> yang dihambat setelah bulu sayap tumbuh lengkap sampai ayam mulai bertelur	72
5.11	Rangkuman analisis varian satu arah terhadap titer Abpo- α Prol-1 antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (<i>Bleeding ke-</i>).....	74
5.12	Rataan titer Abpo- α Prol-1 dari kelinci pengenceran 1/160 pada <i>bleeding ke-1</i> sampai ke-12	74
5.13	Rangkuman analisis varian satu arah terhadap titer Abpo- α Prol antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (<i>Bleeding ke-</i>).....	75
5.14	Rataan titer Abpo- α Prol dari kambing pengenceran 1/160 pada <i>bleeding ke-1</i> sampai ke-12	76
5.15	Rangkuman analisis varian satu arah terhadap lama <i>moulting</i> antara kelompok kontrol dan kelompok yang diimmunisasi Abpo- α Prol	76
5.16	Rataan Lama <i>moulting</i> (hari) kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunitasi Abpo- α Prol	77
5.17	Rangkuman analisis varian satu arah terhadap kecepatan mulai bertelur antara kelompok kontrol dan kelompok yang diimmunisasi Abpo- α Prol.....	78
5.18	Rataan Kecepatan Mulai Bertelur (hari) kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunitasi Abpo- α Prol	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Ayam Arab Jantan dan Betina	7
2.2 Gambar Bulu Primer dan Sekunder dari Sayap	11
2.3 Gambar Proses Perontokan bulu sampai tumbuh bulu lengkap	12
2.4 Rantai tunggal Prolaktin dengan 3 jembatan disulfida	15
2.5 Sekuen asam amino dari Prolaktin.....	15
2.6 Sifat, kerja dan fungsi hormon prolaktin	17
4.1 Pengambilan darah pada vena axilaris dari ayam arab fase <i>moulting</i> ..	29
4.2 Bagan Rancangan Penelitian 1	31
4.3 Imunisasi aktif pada kelinci di beberapa tempat secara <i>sub cutan</i>	36
4.4 Bagan Rancangan Penelitian 2	37
4.5 Proses <i>bleeding</i> pada vena <i>auricularis</i> dari telinga kelinci.....	38
4.6 Bagan Rancangan Penelitian 3	42
4.7 Imunisasi aktif pada kambing di beberapa tempat secara <i>intra cutan</i> .	43
4.8 Proses <i>bleeding</i> pada vena <i>jugularis</i> kambing.....	43
4.9 Bagan Rancangan Penelitian 4	49
4.10 Kerangka Operasional (Bagan Rancangan Penelitian 1 - 4)	52
5.1 Pita Prolaktin Hasil Isolasi dari Serum Ayam Arab fase <i>Moulting</i> Metode SDS-PAGE 12 %.....	53
5.2 Uji Spesifisitas Serum ayam arab fase <i>moulting</i> dengan Abpo- α Prol-I Hasil induksi prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci menggunakan Metode <i>Western Blotting</i>	54
5.3 Pita prolaktin Hasil <i>Elektroelusi</i> dari hasil SDS-PAGE 12%	55
5.4 Uji Spesifisitas Isolat prolaktin dengan Abpo- α Prol-I hasil induksi prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci menggunakan Metode <i>Western Blotting</i>	56
5.5 Uji Spesifisitas Isolat prolaktin dengan Abpo- α Prol, hasil imunisasi aktif isolat prolaktin pada kambing dengan Metode <i>Western Blotting</i>	57
5.6 Profil Abpo- α Prol-I yang diproduksi pada kelinci dari prolaktin (Sigma L-6520)	60
5.7 Uji Spesifisitas Abpo- α Prol dengan prolaktin (Sigma L-6520) Menggunakan Metode <i>Dot Blotting</i>	63
5.8 Uji Spesifisitas Abpo- α Prol dengan Isolat prolaktin Menggunakan Metode <i>Dot Blotting</i>	63
5.9 Profil Abpo- α Prol yang diproduksi pada kambing dari isolat prolaktin.....	67
5.10 Bulu ayam pada fase <i>moulting</i>	69
5.11 Bulu ayam yang tumbuh lengkap	69
5.12 Perbandingan ayam arab fase bertelur dan fase <i>moulting</i>	70
5.13 Diagram batang lama <i>moulting</i> (hari) pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunisasi pasif Abpo- α Prol.....	71
5.14 Diagram batang kecepatan mulai bertelur (hari) pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunisasi pasif Abpo- α Prol.....	73
6.1 Respon antibodi sekunder dan primer	98

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1	Pembuatan Reagensia 114
2.1	Volume darah dan serum dari 1 x <i>bleeding</i> pada ayam arab fase <i>moulting</i> 117
2.2	Volume darah dan serum kelinci pada 12 kali <i>bleeding</i> 117
2.3	Volume darah dan serum kambing pada 12 kali <i>bleeding</i> 119
3	Diagram Alur Percobaan 121
3.1	Diagram alur Isolasi dan Purifikasi Serum Ayam Arab fase <i>Moulting</i> ... 122
3.2	Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE 123
3.3	Uji <i>Western Blotting</i> terhadap Serum dengan Abpo- α Prol-1 dan terhadap Isolat Prolaktin dengan Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol 124
3.4	Pengukuran Kadar Total Protein Metoda <i>Biuret</i> dari Isolat Prolaktin dan Abpo- α Prol..... 125
3.5	<i>Isolasi dan Purifikasi</i> Abpo- α PI dan Abpo- α Prol..... 126
3.6	Uji Dot Blotting Abpo- α Prol dengan Prolaktin (Sigma L-6520) atau Isolat Prolaktin 127
4	Data Titer Abpo- α Prol-1 pada Kelinci 128
4.1	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-1 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA I pada Kelinci... 128
4.2.	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-2 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA I pada Kelinci... 128
4.3	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-3 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA I pada Kelinci... 129
4.4	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-4 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA I pada Kelinci.. 129
4.5	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-5 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA II pada Kelinci. 130
4.6	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-6 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA II pada Kelinci. 130
4.7	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-7 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA II pada Kelinci. 131
4.8	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-8 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA II pada Kelinci. 131
4.9	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-9 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA III pada Kelinci 132
4.10	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-10 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA III pada Kelinci 132
4.11	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-11 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA III pada Kelinci 133
4.12	Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-12 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan <i>booster</i> IFA III pada Kelinci 133
5	Data Titer Abpo- α Prol pada Kambing 134
5.1	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-1 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA I pada Kambing 134
5.2	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-2 setelah

	penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA I pada Kambing	134
5.3	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-3 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA I pada Kambing	135
5.4	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-4 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA I pada Kambing	135
5.5	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-5 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA II pada Kambing	136
5.6	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-6 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA II pada Kambing	136
5.7	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-7 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA II pada Kambing	137
5.8	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-8 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA II pada Kambing	137
5.9	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-9 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA III pada Kambing	138
5.10	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-10 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA III pada Kambing	138
5.11	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-11 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA III pada Kambing	139
5.12	Titer Abpo- α Prol dengan ELISA <i>indirect</i> pada <i>bleeding</i> ke-12 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan <i>booster</i> IFA III pada Kambing	139
6.1	Lampiran 6.1. Penentuan Berat Molekul Prolaktin	140
6.2	Penentuan Dosis Prolaktin (<i>Sigma L-6520</i>) untuk produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci	142
6.3	Perhitungan Dosis Abpo- α Prol dari Serum Kambing untuk <i>Challenge test</i>	143
7	Analisis Statistik Abpo- α Prol-1 dari Kelinci	144
8	Analisis Statistik Abpo- α Prol dari Kambing	148
9	Analisis Statistik Lama <i>Moulting</i> (Hari)	152
10	Analisis Statistik Kecepatan Mulai Bertelur (Hari)	153

DAFTAR SINGKATAN

Ab	: Antibodi
Ag	: Antigen
Abpo- α P	: Antibodi Poliklonal Anti Prolaktin (hasil induksi isolat prolaktin)
Abpo- α P1	: Antibodi Poliklonal Anti Prolaktin (hasil induksi prolaktin produksi Sigma-L6520)
AP	: Alkaline Phosphatase
APS	: Amonium Persulfat
BM	: Berat Molekul
BNT	: Beda Nyata Terkecil
BSA	: Bovine Serum Albumin
CFA	: Complete Freund's Adjuvant
CBB G-250	: Commassie Brilliant Blue G-250
CPM	: Count per minute
Da	: Dalton
ELISA	: Enzyme Linked Imuno Absorbant Assay
FA	: Freund's Adjuvant
HCl	: Asam Chlorida
H ₂ O ₂	: Peroksida
IFA	: Incomplete Freund's Adjuvant
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
Im	: Intra muskuler
kDa	: Kilo Dalton
M	: Molar
MHC II	: Major Histocompatibility Complex II
ml	: Milli liter
Moulting	: Rontok bulu tahunan yang ditandai dengan rontoknya bulu primer, sekunder dan axial dari sayap serta berhenti bertelur selama sekitar 80 hari
n	: besar sampel tiap ulangan
ng	: nano gram
NaCl	: Natrium Chloride
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphat Buffer Saline
PBS-T	: Phosphat Buffer Saline-Tween
p-NPP	: para-Nitrophenyl Phosphatase
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
Rf	: Retardation Factor
SAS	: Saturation Ammonium Sulphate
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	: N,N,N,N-Tetra Methyl Diamine
TBS	: Tris buffer saline
μ g	: Mikro gram

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Ayam arab (*Brakel kriel silver*) sudah dikembangkan di Jawa Timur sejak tahun 1990, terutama di Malang, Jember, Blitar, Kediri dan Tulungagung. Semula budidaya ayam arab kurang diminati, namun setelah mengenal dan mengetahui bahwa kemampuan produksi telurnya lebih banyak daripada ayam bukan ras (buras) serta perawatannya lebih mudah dan ekonomis, maka banyak orang mulai tertarik untuk mengembangkannya. (Marhiyanto, 2000).

Menurut berbagai penelitian, ayam arab mempunyai beberapa keunggulan yaitu mempunyai kemampuan produksi telur yang relatif lebih tinggi dibanding ayam buras, kebutuhan pakan lebih sedikit dan ketahanan terhadap penyakit lebih kuat dibanding ayam ras. Telur ayam arab bisa dijual per butir, sedangkan telur ayam ras dijual per kilo. Keunggulan lain dari telur ayam arab adalah mempunyai bentuk, warna dan kandungan gizi yang mirip dengan ayam kampung. Kondisi ini sangat menguntungkan para peternak ayam arab, karena kecenderungan masyarakat di dalam negeri lebih menyukai telur ayam kampung dibandingkan telur ayam ras (Darmana dan Sitanggang, 2002).

Ayam arab betina siap bertelur pada umur 4-5 bulan. Periode bertelur ayam arab sama dengan periode bertelur ayam ras, yaitu 3 kali periode produksi selama 30 bulan. Setelah periode bertelur, pada umur 14-16 bulan ayam arab mengalami fase *moulting* (rontok bulu) yang pertama. Fase *moulting* ini berjalan selama 60-75 hari. Selama siklus kehidupannya ayam arab mengalami fase *moulting* sebanyak 3 kali, *moulting* pertama dimulai umur 14-16 bulan, kedua

pada umur 24 bulan dan ketiga pada umur 30-32 bulan. Selama fase *moulting* ayam akan berhenti bertelur (Darmana dan Sitanggang, 2002; Marhiyanto, 2000), bila keadaan ini dibiarkan secara alamiah maka akan memerlukan waktu yang lama untuk bertelur kembali yaitu sekitar 80 hari (Marhiyanto, 2000; Indarto, 1989; Jull, 1982).

Menurut Hafez (2000) dan Knobil (1988), *moulting* disebabkan oleh tingginya kadar hormon prolaktin dalam darah. Prolaktin merupakan hormon protein dengan berat molekul (BM) 24-27 kDa (Yamamoto and Tanaka, 2003; Bedecarrats *et al.*, 1999; March, *et al.*, 1999) dan kandungan asam amino sebanyak 199 (Jabbour and Kelly, 1997). Tingginya kadar hormon prolaktin dalam darah dapat menyebabkan terjadinya regresi ovarium (Ramesh *et al.*, 2001). Prolaktin dapat digolongkan ke dalam bahan yang bersifat imunogen karena BM yang lebih besar dari 10.000 Da, sehingga bila disuntikkan secara berulang pada hewan dapat menginduksi timbulnya antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol) (Fitzgerald, 2004; Agrisera, 2004; Upstate, 2002). Pemberian Abpo- α Prol diharapkan dapat bekerja secara spesifik terhadap prolaktin dengan cara menetralkan kerja prolaktin dalam darah, sehingga proses *moulting* dapat dihambat dan ayam dapat berproduksi telur kembali.

Menurut Bell and Kuney (2003) dan Avma (2003) ada tiga cara untuk mengatasi rontok bulu di *United States*, yaitu (1). Tidak memberi makan atau membatasi makan dan minum, (2). Memberi makan rendah nutrisi seperti protein, kalsium dan natrium, (3). Penggunaan obat dan logam methalibure, chlormadinane, yodium dosis tinggi, diet aluminium dan seng.

Beberapa negara termasuk Indonesia, untuk mengatasi *moulting* menggunakan cara pertama dan kedua, pemuasaan dan pembatasan pakan tersebut dilakukan selama sekitar 30 hari (Sainsbury, 1995; Barton, 2003; Poultry, 2003). Hanya saja penggunaan kedua cara di atas banyak ditentang oleh beberapa organisasi keselamatan dan penyanggah binatang seperti *United Poultry Concern* dan *The Association of Veterinarians di United States* (Allen, 2002). Organisasi tersebut mengajukan permohonan pada *United States Departemen of Agriculture and Food and Drug* untuk tidak menggunakan pemuasaan dan pembatasan pakan dalam mengatasi *moulting*. Hal ini didasari bahwa pemuasaan dan pembatasan pakan dalam waktu lama dapat menyebabkan stress yang berakibat penurunan fungsi imun sehingga ayam mudah terserang penyakit (Alodan and Mashaly, 1999). Salah satu penyakit yang sering mengikuti induksi *moulting* tersebut adalah *Salmonella Enteridis* (SE) (Poultry, 2003; Fact, 2001; Webster, 1999), oleh karena itu sejak tahun 2000 telah dilarang pembatasan pakan untuk mengatasi *moulting* (Avma, 2003).

Menurut Butcher and Miles (2002), pembatasan pakan dalam upaya mengatasi *moulting* pada ayam petelur akan menurunkan jumlah sel T didalam peredaran darah. Dengan adanya penurunan sel T dalam darah, sehingga menyebabkan penurunan reaksi kekebalan dan meningkatkan kepekaan terhadap suatu penyakit, terutama SE. Menurut Fact, (2001); dan Webster, (1999), SE ini sangat berbahaya, karena bersifat *zoonosis*. Oleh karena itulah *Macdonald'S Corporation* sejak tahun 2000 yang diikuti *Raja Burger* dan *Wendy'S Internasional* pada tahun 2001 melarang pembelian telur dari induk ayam yang mendapat pembatasan pakan dalam mengatasi *moulting* (Avma, 2003).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini ditujukan untuk menghambat proses *moulting* tanpa menimbulkan penderitaan dan penurunan respon imun pada ayam, yaitu melalui pemberian Abpo- α Prol. Abpo- α Prol ini dapat diproduksi dengan cara menyuntikan isolat prolaktin yang berasal dari serum darah ayam arab fase *moulting* pada kambing (Agrisera, 2004), sehingga harapan untuk dapat meningkatkan produksi telur dan populasi ayam arab secara cepat dapat terlaksana tanpa menyakiti atau menyiksa dan menurunkan fungsi imunnya.

1.2. Rumusan Masalah

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

Apakah Abpo- α Prol dari kambing yang diinduksi isolat prolaktin mampu menghambat proses *moulting* pada ayam arab petelur (*Brakel kriel silver*)?

Adapun penjabaran dari rumusan masalah atau sebagai sub rumusan masalah adalah

- 1.2.1. Apakah molekul prolaktin dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari serum ayam arab fase *moulting*?
- 1.2.2. Apakah spesifisitas isolat prolaktin dapat ditentukan sebelum atau sesudah dilakukan purifikasi?
- 1.2.3. Apakah prolaktin (Sigma-L6520) dapat menginduksi terbentuknya Abpo- α Prol-I pada kelinci?
- 1.2.4. Apakah isolat prolaktin dapat menginduksi terbentuknya Abpo- α Prol pada kambing?

BAB 2

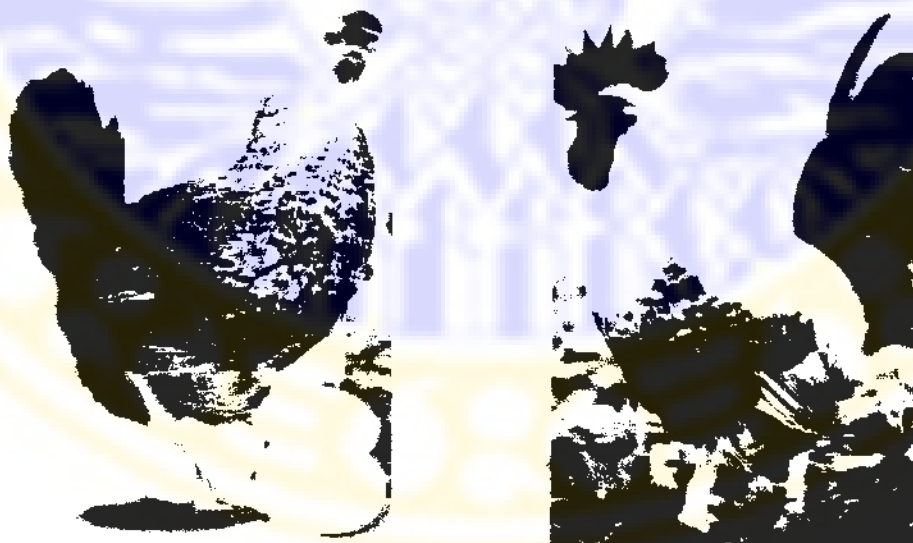
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ayam Arab

Ayam arab atau *Brakel kriel-silver* adalah termasuk galur ayam buras yang tergolong unggul di Belgia. Pamor ayam brakel sebagai ayam buras unggul di Belgia mungkin bisa disamakan dengan pelung atau kedu bagi masyarakat Indonesia. Produktivitas ayam arab setara dengan ayam *leghorn* (ayam ras), rata-rata bisa mencapai 80-90% dari populasi. Bedanya, kebutuhan pakan ayam *eghorn* sekitar hari rata-rata 100 g/ekor, sedangkan ayam arab hanya 80 g/ekor (Sarwono, 2002).

Klasifikasi ayam arab berdasar aturan taksonomi menurut Sudrajat (1991) adalah:

Kingdom	Animalia
Filum	Chordata
Kelas	Aves
Ordo	Cathiformes
Familia	Phasianidae
Genus	Brakel
Spesies	<i>Brakel kriel-silver</i> (ayam arab)



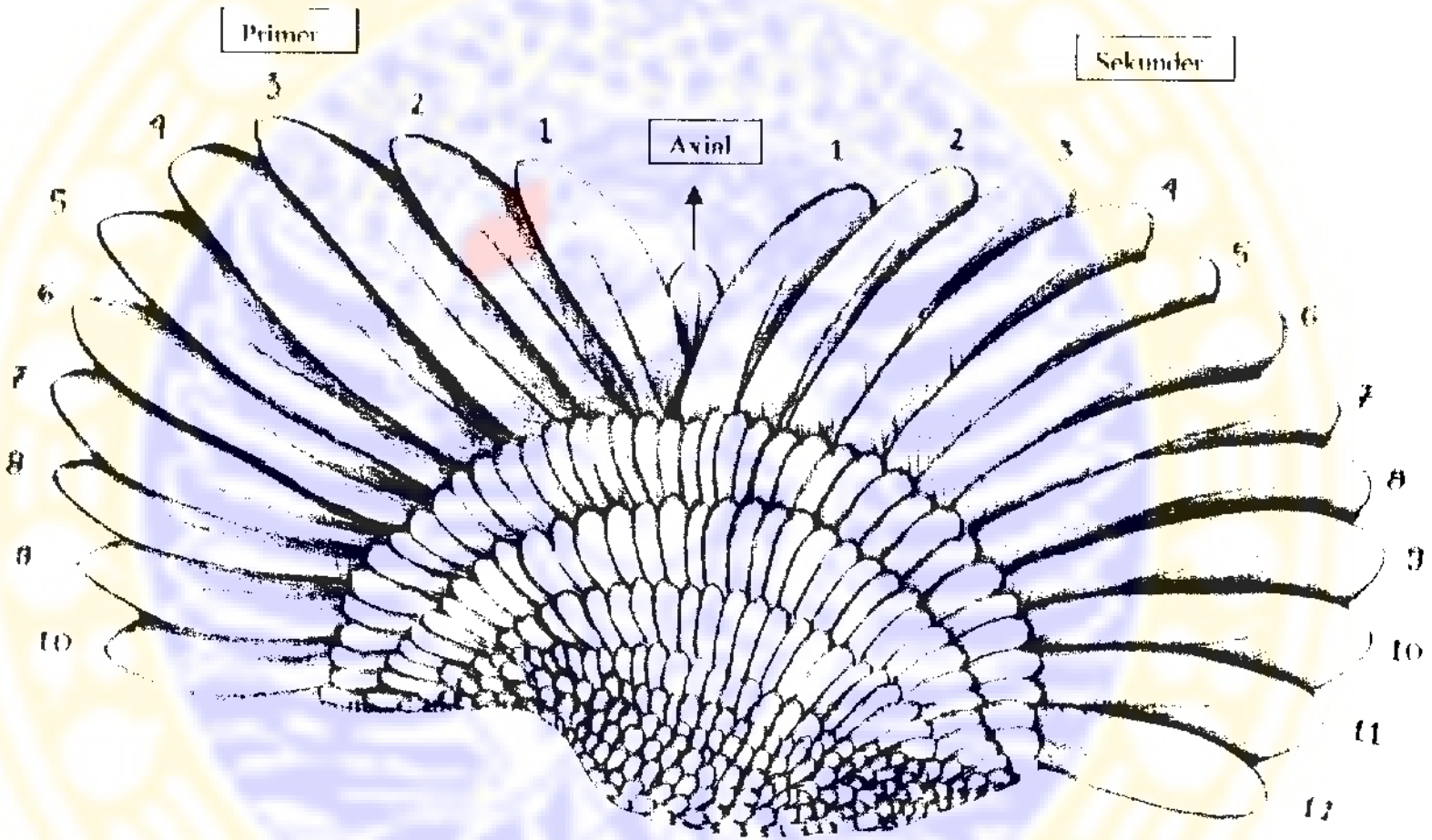
Gambar 2. Ayam Arab Betina dan Jantan (Sumber: Sarwono, 2002)

Penampilan ayam arab sangat cantik sebagai ayam hias di pekarangan rumah. Sifatnya lincah, gemar bercengkerama, dan rajin bergerak. Sosok dan warna bulu ayam arab sangat menarik. Pola warna bulunya sangat indah dan berbeda dengan pola warna ayam buras yang sering terlihat di Indonesia. Bulu dari kepala sampai leher, polanya kecil-kecil memanjang berwarna putih. Sekilas, dilihat dari jauh, ayam itu tampak seperti memakai jilbab (kerudung) putih yang menjumbai di tengkuk dan belakang leher. Itulah sebabnya, ayam asal Belgia ini juga dikenal dengan sebutan "ayam berjilbab" (Darmana dan Sitanggang, 2002)

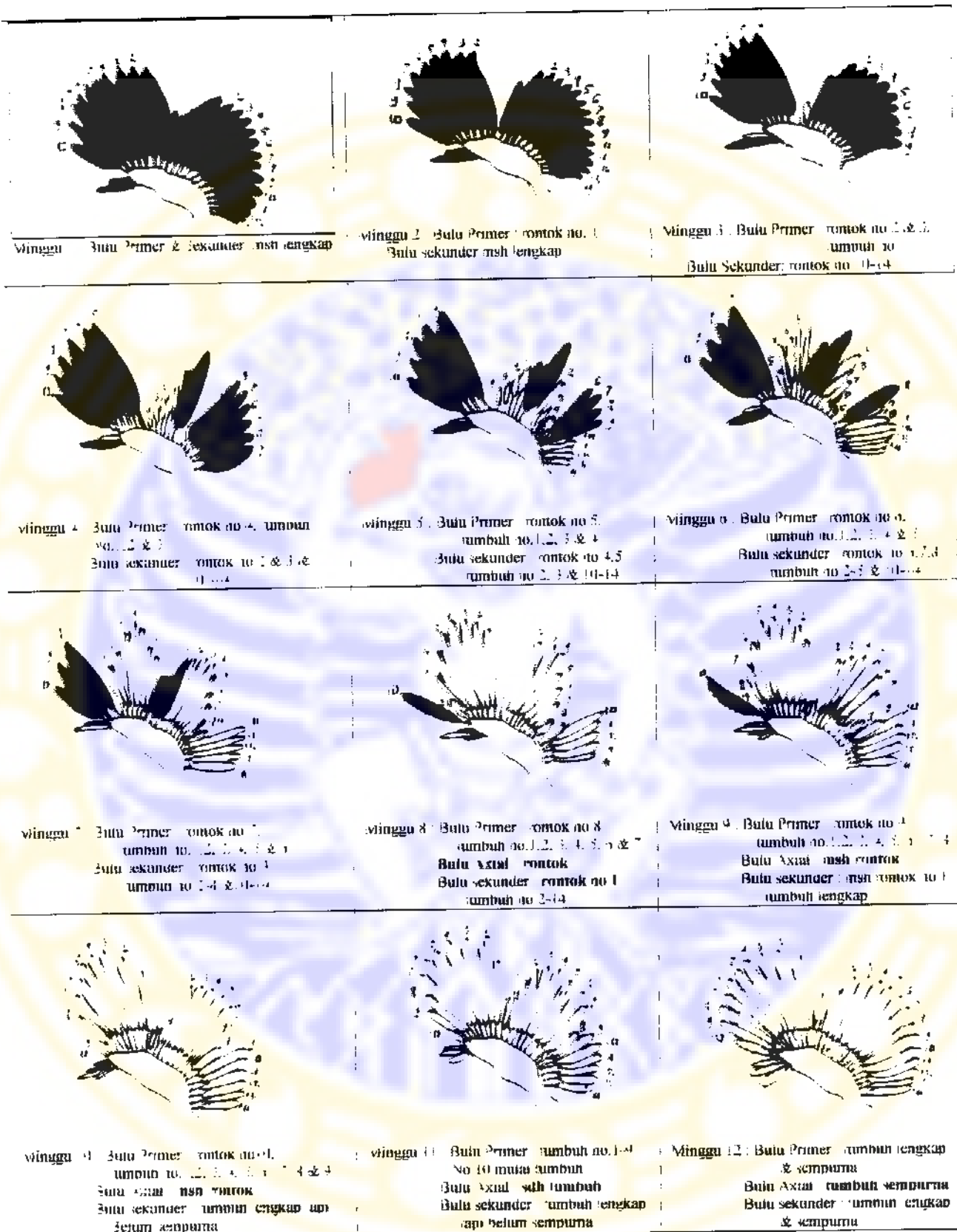
Ayam arab jantan mempunyai daya seksual yang tinggi. Perilakunya gemar kawin. Jika disodori ayam betina, tidak sampai 5 menit pasti ayam itu sudah dikawini. Selama waktu 15 menit ayam arab jantan bisa tiga kali kawin, karena daya seksualnya yang tinggi itulah, digelari ayam arab (Sarwono, 2002). Ayam arab jantan dewasa tumbuh tegak setinggi 30 cm. Bobot dewasa 1,5-1,8 kg. Jengger tunggal, tubuh berbentuk segi empat mirip kotak dan berbulu tebal. Warna bulu dari leher sampai kepala putih berjumbai, badan hingga ekor bertotol-totol hitam dan mempunyai suara nyaring ketika berkokok (Sudiro, 1991).

Ayam arab betina dewasa tumbuh setinggi 22-25 cm, dengan bobot dewasa 1,1-1,2 kg. Kepala berjengger dan berpial merah. Badan berbulu tebal dan indah. Selama usia produktif, ayam betina dewasa rajin bertelur, hampir setiap hari menghasilkan telur. Potensinya menjanjikan jika dikembangkan menjadi ayam petelur komersial, yaitu bisa mencapai 80-90% perhari dari populasi yang dipelihara (Sarwono, 2002).

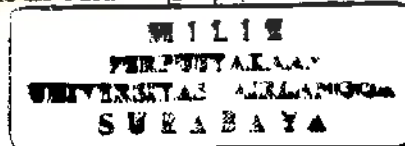
Keunikan ayam arab, yaitu mempunyai sifat yang lincah dan agak liar sehingga sulit untuk dideteksi. Walaupun sudah lama dipelihara, sifat itu tak bisa



Gambar 2.2 Gambar Bulu Primer dan Sekunder dari Sayap (Sumber Indarto, 1990 dan Jull, 1982)



Gambar 2.3 Gambar Proses Perontokan bulu sampai tumbuh bulu lengkap (Sumber : Indarto, 1999 dan Jull, 1982)



memasuki fase *moulting* jika 1 helai bulu primer yang nomor 1 dari sayap mengalami rontok. Jumlah bulu primer, sekunder dan axial di daerah sayap, masing-masing adalah 10, 14 dan 1 helai dimasing-masing sayap. Jadi jika semua bulu primer, sekunder dan axial di daerah sayap mengalami rontok dikedua sayap, ayam tersebut dikatakan telah mengalami masa *moulting* yang sempurna. Menurut Blakely and Bade (1998), selain bulu sayap yang mengalami kerontokan, bulu di daerah lain seperti ekor juga mengalami kerontokan. Akan tetapi untuk kerontokan bulu didaerah lain tidak menunjukkan pola yang spesifik.

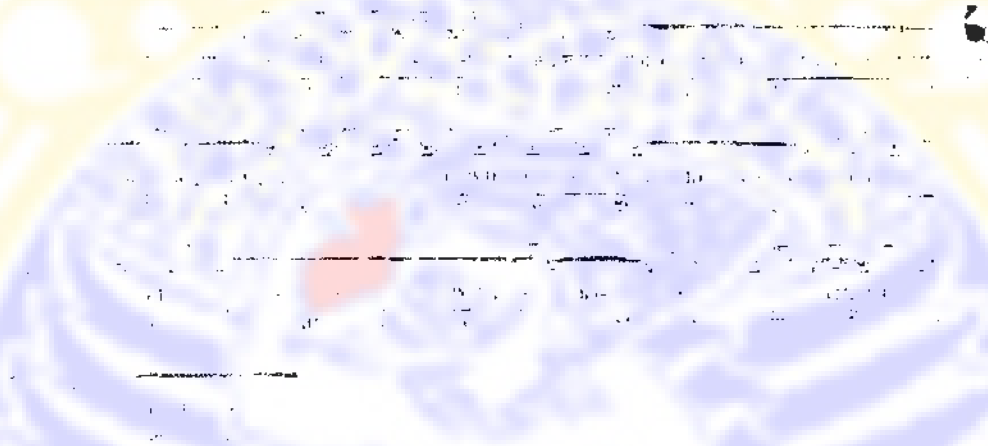
Fase *moulting* ini memakan waktu sekitar 60-75 hari (Martiyanto, 2000; Darmana dan Sitanggang, 2002; Jull, 1982). Selanjutnya seekor ayam dikatakan memasuki fase bertelur jika kesemua bulu primer, sekunder dan axial di daerah sayap tersebut tumbuh lengkap dan sempurna. Waktu dari berhentinya *moulting* (semua bulu primer, sekunder dan axial tidak lagi rontok) sampai tumbuh lengkap dan kemudian berproduksi telur kembali membutuhkan waktu sekitar 10-14 hari (Darmana dan Sitanggang, 2002; Jull, 1982)

Fase *moulting* yang ditandai dengan berhentinya produksi telur untuk beberapa waktu yang lama yaitu sekitar 80 hari (Martiyanto, 2000; Indarto 1989; Jull, 1982), jika dibiarkan secara alamiah akan sangat merugikan peternak dari segi bisnis dan waktu. Karena itu perlu dilakukan upaya-upaya untuk mempercepat atau bahkan menghambat proses *moulting* itu sendiri.

2.3. Prolaktin

Cole and Cupps (1977), Knobil (1988) dan Hafez (2000), mengatakan bahwa proses *moulting* pada ayam dibawah pengaruh sistem hormonal. Hormon

Protaktan adalah hormon protein dengan rantai tunggal yang dihubungkan dengan tiga jembatan disulfida. Hormon ini tidak berisi residu dari karbohidrat, dengan struktur kimianya mirip Growth Hormon. Jembatan disulfida terletak diantara asam amino Cys-4-11, 58-173 dan 190-198 (gambar 2.4 dan 2.5.).



Gambar 2.4. Rantai tunggal Protaktan dengan 3 jembatan disulfida
(Sumber: PDBSum, 2002)

PROLACTIN	199	199	LEU	ARG	LEU	ARG	PRO	GLY	ASP	ARG	VAL	ARG	GLN	GLN	VAL
PROLACTIN	1	199	VAL	LEU	ARG	ASP	LEU	THR	ASP	ARG	ALA	VAL	VAL	LEU	SER
PROLACTIN	1	199	ARG	THR	GLN	ARG	ASN	LEU	SER	LEU	VAL	THR	SER	SER	GLN
PROLACTIN	1	199	THR	ARG	LEU	ARG	THR	THR	GLN	GLY	ARG	GLY	SER	GLY	THR
PROLACTIN	1	199	LEU	ARG	LEU	LEU	THR	THR	ARG	ARG	THR	SER	SER	LEU	ALA
PROLACTIN	1	199	ARG	ARG	GLN	GLY	THR	VAL	ALA	GLN	VAL	MET	ASN	ASN	ARG
PROLACTIN	1	199	ARG	THR	LEU	LEU	LEU	LEU	THR	GLN	LEU	LEU	ARG	LEU	THR
PROLACTIN	1	199	ASN	GLY	PRO	GLY	THR	ARG	LEU	VAL	THR	GLN	VAL	ARG	GLN
PROLACTIN	1	199	THR	GLN	GLY	ALA	PRO	LEU	ALA	GLY	LEU	THR	THR	ALA	THR
PROLACTIN	1	199	GLN	THR	GLN	VAL	GLN	THR	VAL	ARG	THR	LEU	GLN	LEU	THR
PROLACTIN	1	199	LEU	ARG	LEU	ARG	SER	GLY	VAL	ARG	ASN	THR	THR	LEU	THR
PROLACTIN	1	199	ASN	THR	LEU	THR	PRO	VAL	THR	THR	GLY	LEU	GLN	SER	THR
PROLACTIN	1	199	VAL	THR	VAL	ASP	LEU	THR	SER	ARG	LEU	THR	ALA	THR	THR
PROLACTIN	1	199	ASN	LEU	LEU	GLN	THR	LEU	ARG	ARG	ASP	SER	GLY	LEU	LEU
PROLACTIN	1	199	LEU	ARG	THR	LEU	THR	LEU	LEU	THR	THR	ARG	LEU	LEU	THR
PROLACTIN	1	199	ASN	ASN	ASN	THR									

Gambar 2.5. Sequen asam amino dari Prolaktin (Sumber : Keeler *et al.*, 2003)

Sutrisar and Kelly (1997), menyatakan bahwa terdapat perbedaan jumlah asam amino dari hormon prolaktin. Jumlah asam amino prolaktin manusia adalah 219, Domba 198, Sapi 198, dan ayam 199 asam amino. Demikian juga untuk

BMnya: pada manusia 23 KD, Domba 24 KD, Sapi 26 KD dan Ayam 24-27 KD (Yamamoto and Tanaka, 2003; Bedecarrats *et al.*, 1999; March *et al.*, 1999).

Target organ dari prolaktin pada unggas betina adalah pada ovarium (Ramesh *et al.*, 2001); epitel tembolok, jaringan kulit dan otak (Hardjopranto, 2003 dan Ramachandran *et al.*, 2003). Menurut Ramesh *et al.*, (2001), kadar prolaktin yang tinggi atau *hyperprolactinemia* pada fase *moulting* menyebabkan terjadinya regresi dari ovarium sehingga tidak terjadi pertumbuhan folikel, yang akibatnya tidak akan terjadi produksi telur. Fungsi prolaktin pada unggas betina yang lain adalah penurunan suhu rektum (Tachibana *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2000; Kim and Wentworth, 1998), pembentukan *brooding patch*, produksi susu tembolok, mendorong sifat mengerami telur, menggertak tingkah laku migrasi, efek somatotropin dan mempengaruhi metabolisme lemak (Hardjopranto, 2003; Ramachandran *et al.*, 2003; Ramesh *et al.*, 2001).

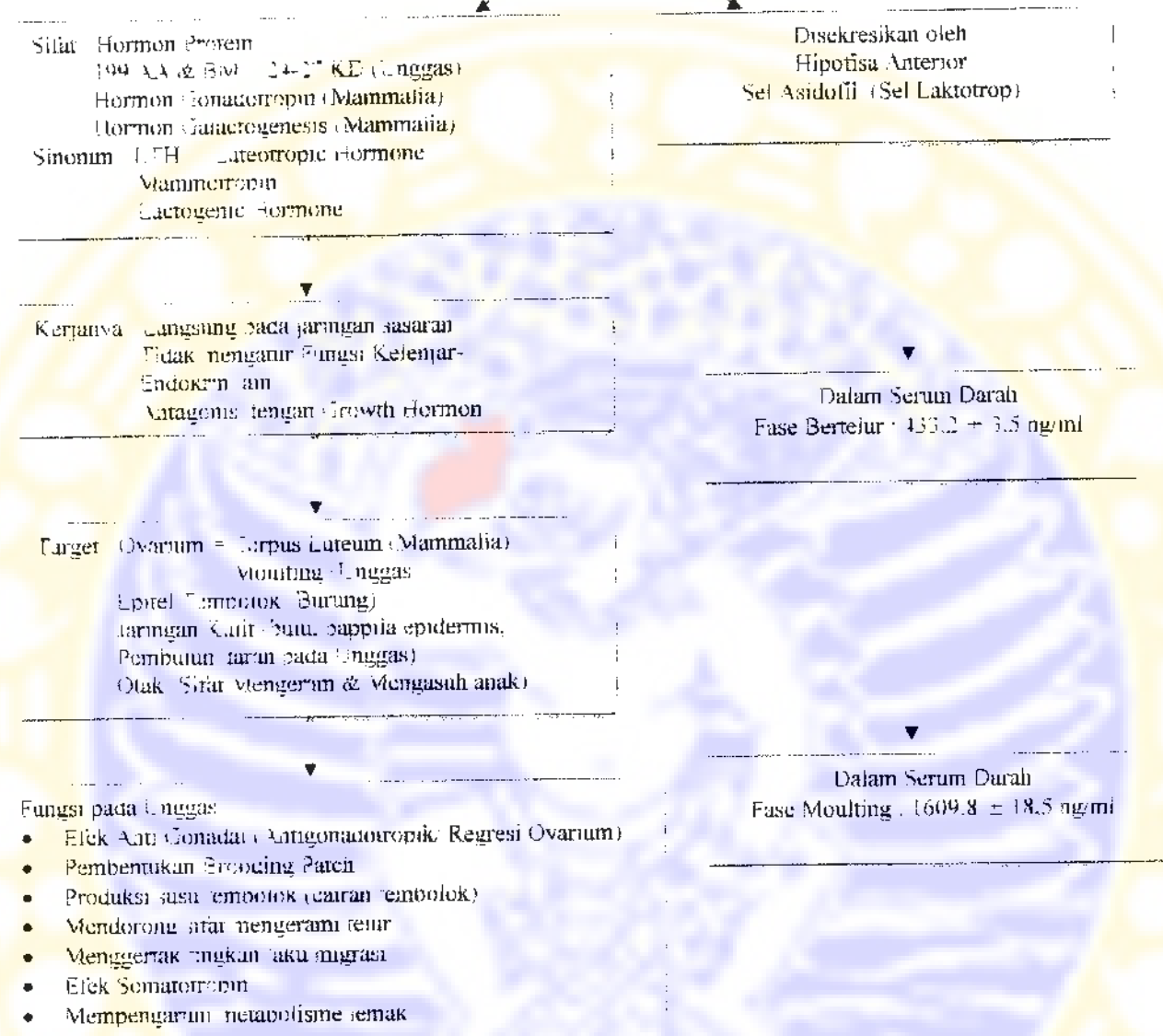
Amador (2003) melaporkan dari hasil penelitiannya, bahwa ayam petelur fase *moulting* mempunyai kadar prolaktin dalam darah sebesar $1609,8 \pm 18,5$ ng/ml. Kadar tersebut hampir 4 kali lipat dari kadar prolaktin dalam darah pada ayam fase bertelur yang hanya $433,2 \pm 5,5$. Seperti yang tertera pada tabel 2.2.

Tabel 2.2. Kadar Prolaktin dalam darah ayam (*Gallus domesticus*)

	Kadar rata-rata (ng/ml)
Selain ayam petelur	$12,1 \pm 1,5$
Fase bertelur	$433,2 \pm 5,5$
Fase Moulting	$1609,8 \pm 18,5$
Ayam jantan muda	$2,9 \pm 0,4$

Sumber Amador (2003)

PROLAKTIN



Gambar 2.6. Sifat, kerja dan fungsi hormon prolaktin

2.4. Mengatasi Fase Moulting

Menurut Bell and Kuney (2003) dan Cortex (2003), cara umum yang digunakan untuk mengatasi *moulting* adalah dengan pemuaan dan pembatasan pakan yang dilakukan selama sekitar 30-60 hari. Adapun langkah-langkah yang dilakukan menurut Rasyaf, 1994; Barton, 2003; Holt, 2003 adalah : tidak memberi

makan ayam selama 3 hari berturut-turut setelah terlihat tanda-tanda *moulting*, air minum tetap diberikan secukupnya tanpa perlu dicampur obat-obatan. Selanjutnya pada hari keempat sampai hari ke tiga puluh dilakukan pengurangan porsi makan, dengan ransia tanpa diberi pakan mengandung protein sampai hari ke sepuluh (hanya pakan mengandung karbohidrat), hari kesebelas mulai diberikan protein dengan kadar yang terus ditingkatkan sampai hari ke-25, sedang kadar karbohidrat dikurangi seiring dengan peningkatan kadar protein. Selanjutnya hari ke-25 sampai 30 diberi pakan dengan kadar protein tetap dan pakan dengan kadar karbohidrat ditingkatkan. Pada saat ayam kembali normal dan bulu-bulu mudanya sudah tumbuh lengkap, maka pemberian pakan tidak perlu diubah-ubah lagi. Air minum sudah boleh diberi obat yang mengandung vitamin dan asam amino.

Pemberian Antibodi Poliklonal Terhadap Prolaktin merupakan suatu alternatif yang bisa diaplikasikan, dengan harapan mampu untuk menghambat terjadinya proses *moulting* tanpa menimbulkan penderitaan dan stres yang dapat menurunkan kekebalan pada ayam.

2.5. Antibodi Poliklonal

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

Menurut Smith (1995) faktor-faktor yang terlibat dalam mengoptimalkan respon imun adalah sifat alam imunogen, pelarut, hewan, rute injeksi dan protokol

dosis. Polipeptida besar dan protein dengan berat molekul lebih besar dari 5000 Dalton (D) atau 5 Kilo Dalton (kDa) dapat merangsang respon imun yang kuat. Sedangkan Chard (1982) menyebutkan bahwa preparat hormon dengan berat molekul yang besar mempunyai sifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antigen untuk dapat menginduksi timbulnya antibodi spesifik terhadap antigen tersebut. Prolaktin pada unggas merupakan hormon protein dengan berat molekul 24- 27 kDa, termasuk antigen potensial yang dapat menstimulasi pembentukan antibodi (Fitzgerald, 2004; Agrisera, 2004; Upstate, 2002).

Pelarut Freund lengkap masih dianggap sebagai salah satu dari pelarut paling kuat yang dikenal. Pelarut Freund terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi, baik dengan micobakteria (pelarut Freund lengkap) atau tanpa micobakteria (pelarut Freund tidak lengkap). Pelarut Freund lengkap merangsang respon antibodi yang kuat untuk waktu yang lama dengan jalan membebaskan tetes-tetes emulsi secara perlahan dan merangsang fungsi makrofag (Smita, 1995).

Pemilihan pelarut sangat mempengaruhi rute injeksi. Bila menggunakan pelarut yang diserap lambat terutama pelarut minyak seperti Freund, harus diusahakan agar penderitaan hewan dibuat minimum. Dosis imunogen yang dianjurkan untuk kelinci atau hewan coba adalah 50-1000 µg per immunisasi (Harlow and Lane, 1988), sedangkan Kerr and Thorpe (1994) menyebutkan dosis yang lebih spesifik untuk kelinci, yaitu 50-250 µg per immunisasi. Menurut Agrisera (2004), dosis imunogen yang dianjurkan untuk kambing adalah 20-500 µg per immunisasi, sedangkan menurut Kerr and Thorpe (1994), 250 µg-1000 µg per immunisasi.

Keberadaan antibodi terhadap prolaktin diidentifikasi dengan uji ELISA. Prinsip ELISA didasarkan pada dua pengamatan yaitu pertama, antibodi dan beberapa antigen dapat menempel pada piringan plastik polistirin dan kemampuan imunologisnya tetap terjaga secara penuh. Kedua, antigen dan antibodi dapat diikatkan pada enzim dan kompleks yang terbentuk masih tetap berfungsi penuh, baik secara imunologis maupun enzimatis. Reaksi antara antigen dan antibodi pada ELISA dipengaruhi oleh kerja enzim. Enzim yang digunakan di dalam ELISA meliputi β -Galaktosidase, glucose oksidase, peroksidase dan alkaline fosfatase (Anonimus 1996; Pelczar *et al.*, 1988).



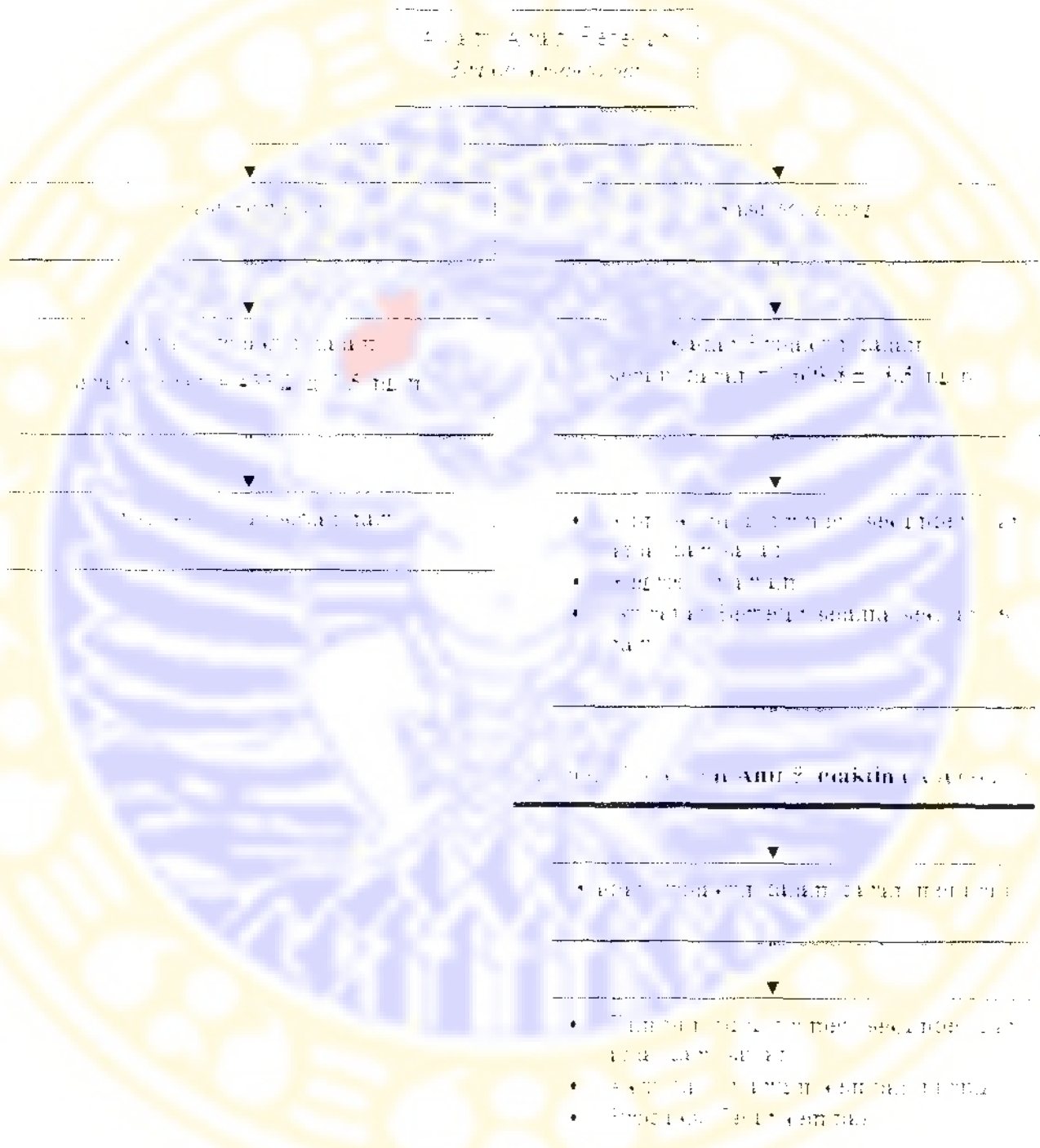
BAB 3

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN**

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual



Ayam arab petelur termasuk salah satu ayam buras penghasil telur yang cukup potensial dibandingkan dengan ayam buras petelur lainnya, yakni produksinya bisa mencapai 70-80% dari populasi (Marhiyanto, 2000). Namun demikian, tingginya angka produktivitas tersebut dapat ditingkatkan lagi jika dapat ditentukan cara yang tepat untuk mengatasi fase *moulting* yang merupakan masa istirahat bertelur.

Fase *moulting* adalah fase dimana ayam mengalami rontok bulu primer, sekunder dan axial di daerah sayap, dan menggantinya dengan bulu-bulu yang baru. Fase ini diikuti dengan berhentinya ayam memproduksi telur untuk beberapa waktu sekitar 80 hari. Setelah bulu-bulu yang baru tumbuh sempurna maka barulah ayam akan memproduksi telur kembali. (Marhiyanto, 2000; Darmana dan Sitanggang, 2002 dan Jul, 1982). Selama siklus kehidupannya, ayam mengalami masa *moulting* sebanyak 3 kali, *moulting* pertama pada umur 14-16 bulan, kedua pada umur 24 bulan dan terakhir pada umur 30-32 bulan (Parkhurst and George, 1988 dan Sainsbury, 1995)

Menurut Hafez (2000) dan Knobil (1988), *moulting* disebabkan oleh tingginya kadar hormon prolaktin dalam darah ayam. Prolaktin yang tinggi dapat menyebabkan regresi ovarium sehingga tidak terjadi pertumbuhan folikel dan ayam berhenti bertelur (Ramesh *et al.* 2001). Prolaktin merupakan hormon protein dengan berat molekul 24-27 kDa (Yamamoto and Tanaka, 2003; Bedecarrats, *et al.* 1999; March, *et al.* 1999) sehingga bersifat imunogen, dengan demikian prolaktin dapat menginduksi timbulnya antibody anti prolaktin (Fitzgerald, 2004; Agrisera, 2004; Upstare, 2002).

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, kajian teori dan kerangka konseptual penelitian, maka hipotesis penelitian adalah :

Pembertan Abpo- α ProI yang diproduksi pada kambing mampu menghambat proses *moulting* pada ayam arab petelur (*Brakel kriel- silver*).

Adapun penjabaran dari hipotesis ini atau sebagai sub hipotesis adalah :

- 3.2.1. Molekul prolaktin dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari serum ayam arab fase *moulting*.
- 3.2.2. Spesifitas isolat prolaktin dapat ditentukan baik sebelum atau sesudah dilakukan purifikasi
- 3.2.3. Prolaktin (Sigma-L6520) mampu menginduksi terbentuknya Abpo- α ProI-1 pada kelinci.
- 3.2.4. Isolat prolaktin mampu menginduksi terbentuknya Abpo- α ProI pada kambing.
- 3.2.5. Spesifitas dan sensitifitas Abpo- α ProI dapat ditentukan
- 3.2.6. Abpo- α ProI mampu menghambat proses *moulting*.
- 3.2.7. Abpo- α ProI dapat mempengaruhi kecepatan mulai bertelur.



BAB 4
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium eksploratif dengan tahapan penelitian, yaitu :

1. *Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum ayam arab fase moulting*
2. *Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci jantan strain New Zealand*
3. *Produksi Abpo- α Prol pada kambing lokal jantan*
4. *Challenge test Abpo- α Prol pada ayam arab fase moulting awal.*

4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel

- 4.2.1. *Penelitian 1. Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum ayam arab fase moulting*

Sampel pada penelitian ini berupa isolat prolaktin yang berasal dari serum ayam arab fase *moulting*. Ayam yang digunakan pada penelitian ini sebanyak sembilan ekor.

- 4.2.2. *Penelitian 2: Produksi Abpo- α Prol-1 pada kelinci jantan strain new Zealand*

Sampel pada penelitian ini berupa serum hiperimun (Abpo- α Prol-1) hasil produksi prolaktin produksi *Sigma Co Alderich*, dengan nomor seri L6520, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) yang diimunitasikan aktif pada kelinci jantan strain New Zealand. Kelinci yang dipakai pada penelitian ini sebanyak 6 ekor dengan rincian 5 ekor untuk perlakuan (produksi Abpo- α Prol-1) dan 1 ekor untuk kontrol.

4.2.3. Penelitian 3: Produksi Abpo- α Prol pada kambing lokal jantan.

Sampel pada penelitian ini berupa serum hiperimun (Abpo- α Prol) hasil induksi isolat prolaktin (yang diperoleh dari hasil karakterisasi pada penelitian 1), *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) yang diimunisasikan aktif pada kambing lokal jantan dewasa. Kambing yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 6 ekor dengan rincian 5 ekor untuk perlakuan (produksi Abpo- α Prol) dan 1 ekor untuk kontrol.

4.2.4. Penelitian 4: *Challenge test* dari Abpo- α Prol pada ayam arab fase *moulting*, awal

Pada penelitian tahap ini digunakan 40 ekor ayam arab (*brakel kriel silver*) betina pada fase *moulting* yang pertama (umur 14 bulan) dan sedang memasuki awal *moulting* (rontok satu helai bulu primer nomor satu didaerah sayap).

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi Variabel

Variabel penelitian ini dibedakan menjadi :

1. Variabel bebas atau variabel berpengaruh (*Independent variable*) meliputi: Dosis Abpo- α Prol untuk imunisasi pasif pada ayam arab fase *moulting*.
2. Variabel tergantung atau variabel tidak bebas (*dependent variabel*)

meliputi: Kecepatan mulai timbulnya antibodi (dari kelinci dan kambing), titer antibodi tertinggi (dari kelinci dan kambing), berhentinya *moulting* dan kecepatan mulai bertelur kembali.

3. Variabel kendali atau variabel kontrol meliputi: Umur ayam, status produksi (*moulting* beberapa), pakan dan kandang.

4.3.2. Definsi Operasional Variabel

- Produksi Abpo- α Prol adalah antibodi dari kambing yang timbul setelah diimunisasi secara aktif dengan menggunakan isolat prolaktin (350 $\mu\text{g/ml}$) yang berasal dari serum ayam arab fase *moulting* dalam pelarut *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 pada hari ke 0 dan diulang (*booster*) tiga kali yaitu pada hari ke-12, 43 dan 74 dengan isolat prolaktin (350 $\mu\text{g/ml}$) dalam pelarut *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1 (lihat jadwal imunisasi pada tabel 4.2.).
- Dosis Abpo- α Prol yang diimmunisasikan secara pasif pada ayam arab fase *moulting* adalah 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 200 $\mu\text{g/ml}$ yang disuntikkan secara *intra muscular* pada awal fase *moulting* yang pertama (umur 14 bulan, ditandai rontok satu helai bulu primer nomor satu di daerah sayap).
- Waktu terbentuknya antibodi dan Titer antibodi tertinggi dari pemeriksaan *ELISA indirect* adalah waktu mulai munculnya antibodi dan titer tertinggi berdasarkan pemeriksaan Optical Density panjang gelombang 405 nm
- Hambatan proses *moulting* adalah waktu (dalam hari) dimana fase *moulting* dapat dihentikan dengan pemberian Abpo- α Prol, dihitung mulai dari imunisasi pasif pada ayam yang mengalami rontok satu helai bulu

4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik FKH-Unair, Laboratorium In-vitro FKH-Unair, Laboratorium Biologi Molekuler F-MIPA Unbrau dan kandang hewan coba FKH-Unair. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan Maret sampai dengan bulan November 2004.

4.6. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.6.1. Penelitian 1: *Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum darah ayam arab fase moulting*

4.6.1.1. *Isolasi protein serum*

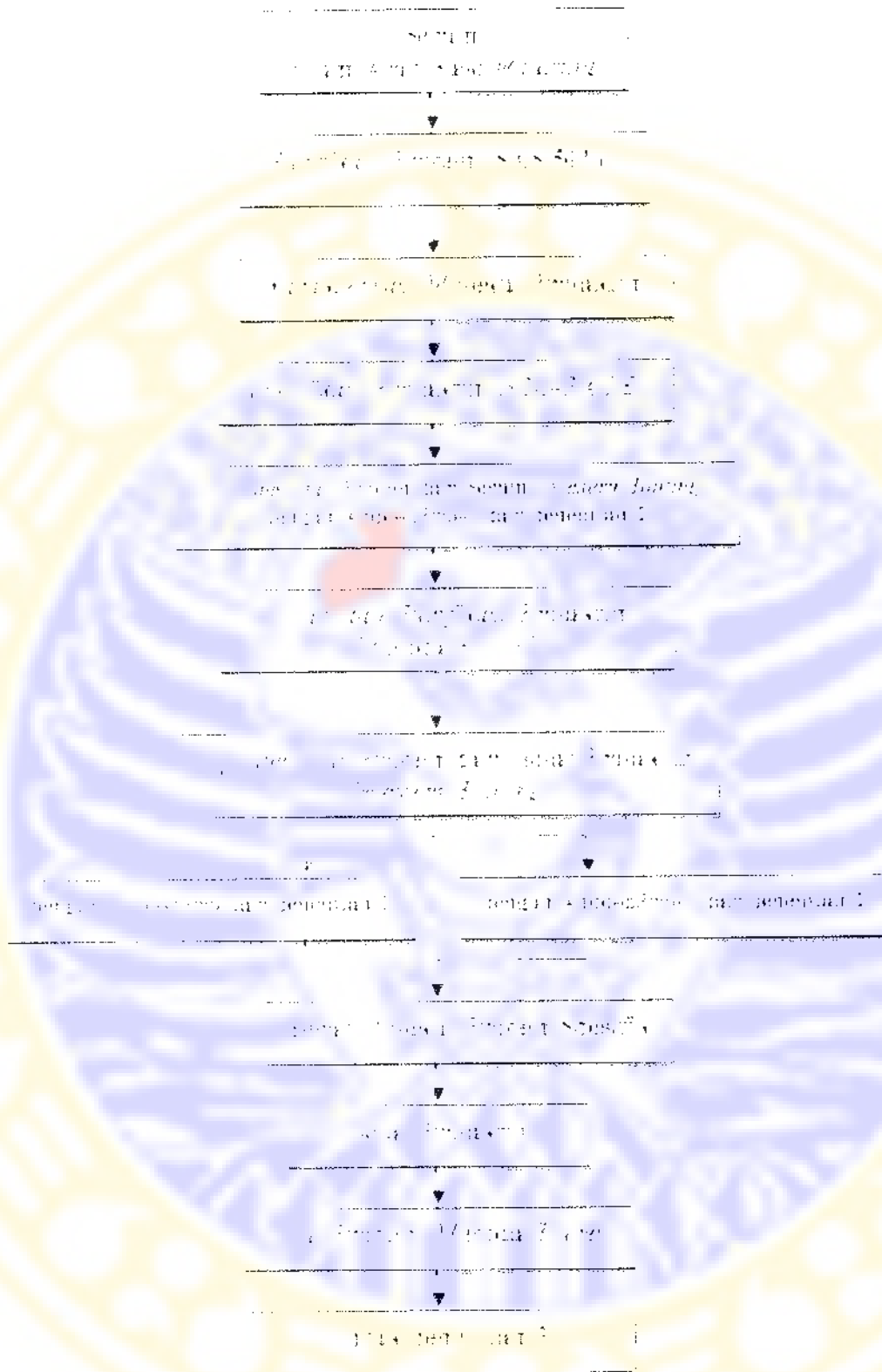
Penelitian ini diawali dengan *purifikasi* dari serum darah ayam arab fase *moulting* dengan metoda SAS 50% untuk memisahkan antara protein dengan serum (lampiran 1.1). Serum didapat dengan cara pengambilan darah pada vena *axillaris* di daerah sayap dari ayam (gambar 4.1.).



Gambar 4.1. Pengambilan darah pada vena *axillaris* dari ayam arab fase *moulting*

Selanjutnya darah ditampung pada tabung venojack, diletakkan miring 45° dan dibekukan mengencap pada suhu kamar, kemudian dilakukan *sentrifuge* untuk mendapatkan serum yang dimaksud. Serum yang didapat ditambahkan *Saturation Ammonium Sulfat* (saturasi SAS) 50 % dengan perbandingan volume yang sama

antara serum dengan SAS 50 %, dilakukan *homogenisasi* dengan pengadukan selama 1 menit, didiamkan selama 10 menit pada suhu 5 °C dan dilakukan tiga kali pengulangan. Serum ini kemudian *disentrifugasi* dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. *supernatan* dibuang, pada *presipitat* ditambahkan SAS 50 % sepuluh kali volume serum, *dihomogenkan* kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama selama 30 menit. *Supernatan* dibuang, *presipitat* ditambahkan *buffer Fosfat* 0,05 M pH 7 dengan volume yang sama, dimasukkan ke dalam *selofan*, diberi label, kemudian diklar. Selanjutnya direndam dalam *buffer Fosfat* 0,01 M pH 7, *dihomogenkan* dalam keadaan dingin (suhu $\pm 5^{\circ}$ C) selama 24 jam, kemudian *buffer* diganti dengan *buffer Fosfat* 0,01 M yang baru dan dibiarkan selama 6 jam. Larutan luar *selofan* kemudian diuji dengan larutan $BaCl_2$ (apabila sudah tidak terbentuk endapan putih $BaSO_4$ maka *dialisis* dapat dihentikan). Hasil *dialisis* kemudian diangkat dan disimpan pada suhu $- 20^{\circ}$ C. Selanjutnya dilakukan *karakterisasi* hormon prolaktin, yaitu diawali dengan *identifikasi* untuk menentukan berat molekulnya dengan metoda *SDS-PAGE*, kemudian dilakukan uji *spesifisitas* terhadap serum yang telah diidentifikasi dengan metoda *Western Blotting* dan dilanjutkan dengan melakukan *isolasi* dan *purifikasi* terhadap isolat prolaktin dengan metoda *ELUSI*. Selanjutnya dilakukan uji *spesifisitas* dengan metoda *Western Blotting*. Tahap akhir dari penelitian 1 ini adalah dilakukan pengukuran kadar total protein dengan metoda *Biuret* dari isolat prolaktin yang telah *dipurifikasi* dengan metoda *ELUSI*.



Gambar 4.2. Bagan Rancangan Penelitian 1
isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum darah ayam arab fase moulting

4.6.1.2. Identifikasi Prolaktin dengan SDS-PAGE

Identifikasi prolaktin dengan SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran protein yang berupa *persentase area (band-band)* pita-pita dari protein). Beberapa tahapan yang harus dikerjakan adalah sebagai berikut: dimasukkan *running gel (separating gel)* ke dalam *plate SDS-PAGE* melalui dinding kira-kira kurang dari batas atas. Kemudian ditambahkan aquadest sampai batas atas supaya *separating gel* rata, selanjutnya aquadest diserap dengan tissue. Langkah berikutnya ditambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh dan setelah itu dimasukkan *comb* (pencetak sumuran dari gel) dan ditunggu sampai betul-betul *set* (terbentuk gel). Selanjutnya *comb* diambil dan dibersihkan sisa-sisa gel dengan tissue. Cetakan gel yang sudah jadi dipindahkan dan dimasukkan dalam *chamber*, kemudian direndam dalam *running buffer*. Selanjutnya diletakkan cetakan penuntun cairan sampel yang akan *dirunning*. Cairan sampel (serum ayam fase *mouthing*) sebanyak 35 μ l dimasukkan ke lubang cetakan dengan tip 200 μ l. Langkah berikutnya *chamber* dihubungkan dengan alat *biorad*, *power supply* diyalakan dengan kekuatan 130 V, 30mA selama 1,5 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan, *plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya hasilnya yang berupa lembaran berbentuk gel *distaining* (diwarnai) dengan *coomassie blue* dan di *sacker* (digoyang). 30 menit kemudian dientas dan ditambahkan cairan *Destaining* kemudian di *sacker* lagi selama 30 menit, jika cairan sudah terlihat berwarna biru diganti dengan cairan *destaining* yang baru, begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasil yang berupa *band-band* BM akan dapat terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE (Rantam, 2003), lebih jelas dapat dilihat diagram alur tahapannya pada lampiran 3.2.

4.6.1.3. Uji Spesifisitas Protein Serum Metode *Western Blotting*

Metoda *Western Blotting* pada penelitian ini digunakan untuk uji spesifisitas dalam penentuan apakah protein hasil *SDS-PAGE* sebelumnya adalah benar-benar protein prolaktin yang dimaksud. Teknik *Western Blotting* dapat digunakan untuk konfirmasi Berat Molekul (BM) dari protein yang dimaksud. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan konfirmasi dari hasil *Western Blotting*, *SDS-PAGE*, jika BM yang muncul dari kedua metode itu sama, maka dapat dikatakan bahwa protein tersebut adalah benar-benar prolaktin yang dimaksud (lampiran 3.3.).

Serum ayam fase *moulting* yang diduga mengandung prolaktin *dirunning* dalam *SDS-PAGE* 12% dalam kondisi *tereduksi* dan satu *sumuran* adalah *marker* dan *ditransferkan* pada membran *Nitroselulosa*. Membrane diblok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-Cl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama 1 jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung BSA 1% dengan Abpo- α Prol-1 yang diproduksi pada kelinci sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (Anti Rabbit Anti Ig G Alkaline Phosphatase conjugated, pengenceran 1:2500) dan ditambahkan substrat *western blue*. Pita yang muncul adalah pita prolaktin sehingga bisa diketahui BM prolaktin dari serum (Upstate 2002; Bedecerrats *et al.*, 1999 dan Choy *et al.*, 1997).

4.6.1.4. Isolasi dan Purifikasi Prolaktin Metode *Elusi*

Gel hasil *SDS-PAGE* (*gel acrilamid*) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan *gel* dimasukkan ke

Pernitungan: Kadar Total Protein (gr%) = $AS/AST \times KS$

Keterangan: AS = Hasil pemeriksaan tabung S

AST = Hasil pemeriksaan tabung ST

KS = Konsentrasi standar protein (6.2)

4.6.2. Penelitian 2: Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol-1) pada Kelinci jantan strain New Zealand

4.6.2.1. Produksi Abpo- α Prol-1

Produksi antibodi poliklonal dari prolaktin dapat dilakukan dengan beberapa cara imunisasi pada hewan coba seperti kelinci (Zymed, 2004; Cortex, 2003 dan Progen, 2000). Jadwal produksi Abpo- α Prol-1 dapat dilihat pada tabel 4.1. Pada penelitian ini prolaktin yang digunakan adalah produksi *Sigma Aldrich* dengan nomor seri L-6520 (Sigma, 2000).

Prosedur pembuatan Abpo- α Prol-1 adalah sebagai berikut: Sebanyak 5 ekor kelinci jantan jantan strain *New Zealand* diimunisasi aktif yang pertama pada hari ke-0. Imunisasi dilakukan pada beberapa tempat secara sub kutan (gambar 4.3) dengan 0,2 ml (100 μ g) prolaktin (Sigma-L-6520) dalam 0,2 ml pelarut *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan 1 ekor kelinci jantan sebagai kontrol. Lainnya disuntik 0,2 ml PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dalam 0,2 ml pelarut CFA



Gambar 4.3. Imunisasi aktif pada kelinci di beberapa tempat secara *sub cutan*.



Gambar 4.4. Bagan Rancangan Penelitian 2
Produksi Abpo-αProl-1 pada kelinci jantan strain New Zealand

Sebelum serangkaian imunisasi pertama dilakukan pengambilan darah (*bleeding pre-immun*) pada vena *auricularis* telinga kelinci (gambar 4.5.). Dua belas hari kemudian dilakukan *booster* yang pertama dengan penyuntikkan 0,2 ml (100 µg) prolaktin (Sigma-L-6520) dalam 0,2 ml pelarut (*Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) pada lima ekor kelinci perlakuan, sedangkan 1 ekor kelinci kontrol hanya diimunisasi 0,2 ml PBS dalam IFA dengan perbandingan 1 : 1. *Booster* kedua dilakukan pada hari ke-43 dengan penyuntikkan prolaktin (Sigma-L-6520) dalam IFA (pada lima ekor kelinci perlakuan) dan dengan PBS dalam IFA (pada 1 ekor kelinci kontrol). *Booster* ketiga dilakukan pada hari ke-74 dengan penyuntikkan prolaktin (Sigma-L-6520) dalam IFA (pada lima ekor kelinci perlakuan) dan dengan PBS dalam IFA (pada 1 ekor kelinci kontrol).



Gambar 4.5. Proses *bleeding* pada vena *auricularis* dari telinga kelinci.

Semua minggu setelah *booster* pertama, kedua dan ketiga dilakukan pengambilan darah (*bleeding*). 2-3 ml sampel darah diambil secara intravena dari masing-masing kelinci. Darah yang didapat dibiarkan mengendap dan diambil serumnya. selanjutnya serum yang diperoleh dari kelima kelinci tersebut dipurifikasi dengan metoda SAS 50% kemudian dilakukan analisis titer antibodi dengan *ELISA indirect*. Tujuan pemeriksaan ELISA yaitu untuk dapat diketahui

kanan mulai terbentuknya dan titer tertinggi dari antibodi. Selanjutnya titer tertinggi dari Abpo- α Prol-1 ini digunakan untuk uji *spesifisitas* dengan metoda *Western Blotting* terhadap serum ayam fase *moulting* yang diduga mengandung prolaktin dan isolat prolaktin yang didapat dari hasil *electroelusi*.

Tabel 4.1. Jadwal produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci dari prolaktin (Sigma-L-6520) (Zymed, 2004; Cortex, 2003; Progen, 2000) .

Hari	Prosedur	Adjuvan/ Keterangan
-1	<i>Bleeding pre-imun</i>	-
0	Imunisasi pertama = 0,2 ml prolaktin (100 μ g)	CFA= 0,2 ml
12	Imunisasi kedua (<i>Booster I</i>) = 0,2 ml prolaktin (100 μ g)	IFA ke-1 = 0,2 ml
19	<i>Bleeding ke-1</i>	-
26	<i>Bleeding ke-2</i>	-
33	<i>Bleeding ke-3</i>	-
40	<i>Bleeding ke-4</i>	-
43	Imunisasi ketiga (<i>Booster II</i>) = 0,2 ml prolaktin (100 μ g)	IFA ke-2 = 0,2 ml
50	<i>Bleeding ke-5</i>	-
57	<i>Bleeding ke-6</i>	-
64	<i>Bleeding ke-7</i>	-
71	<i>Bleeding ke-8</i>	-
74	Imunisasi keempat (<i>Booster III</i>)=0,2ml prolaktin(100 μ g)	IFA ke-3 = 0,2 ml
81	<i>Bleeding ke-9</i>	-
88	<i>Bleeding ke-10</i>	-
95	<i>Bleeding ke-11</i>	-
102	<i>Bleeding ke-12</i>	-

4.6.2.2. Purifikasi Ig G dari Abpo- α Prol-1

Purifikasi Ig G dari Abpo- α Prol-1 dilakukan dengan penambahan SAS 50% pada serum dari kelinci 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% (10 x volume pelet), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex.

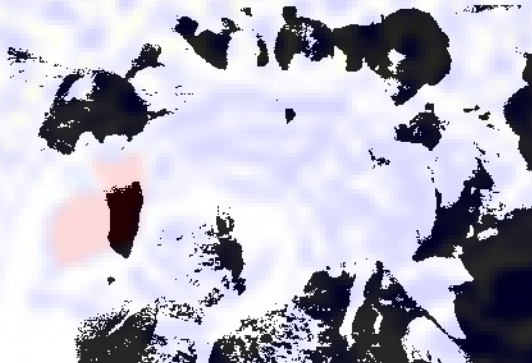
Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7 pada volume 1 ml dimasukkan ke dalam *selofan*, diberi label, kemudian diikat. Dilanjutkan dialisis dalam 0,01 M buffer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4°C (lampiran 3.5.).

4.6.2.3. Pengukuran Titer Abpo- α Prol-1

Abpo- α Prol-1 yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA *indirect*, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari ELISA *reader*. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut: Antigen (prolaktin produksi Sigma L-6520) dengan kadar 100 μ g/ml dilarutkan dalam bufer Carbonat-Bicarbonat (*Coating buffer*) dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada 4° C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit dan diblok dengan *Blocking buffer* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit.

Setelah itu direaksikan dengan Antibodi primer dari kelinci (Antibodi poliklonal Anti Prolaktin/ Abpo- α Prol-1) yang dilarutkan ke dalam blocking buffer BSA 1% dengan seri pengenceran yaitu 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 dan 1/10240 kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu

Prosedur pembuatan Abpo- α Prol adalah sebagai berikut: Sebanyak 5 ekor kambing lokal jantan diimunisasi aktif yang pertama pada hari ke-0. Imunisasi ini dilakukan di beberapa tempat secara intra kutan (gambar 4.7.) dengan 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml) dari serum ayam arab fase *moulting* dalam 1 ml pelarut *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan 1 ekor kambing sebagai kontrol, hanya disuntik 1 ml PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dalam 1 ml pelarut CFA.



Gambar 4.7. Imunisasi aktif pada kambing di beberapa tempat secara *intra cutan*.

Sehari sebelum imunisasi pertama dilakukan pengambilan darah (*bleeding*) *pre*-imun pada vena jugularis di daerah leher dari kambing (gambar 4.8.). Dua belas hari kemudian dilakukan *booster* yang pertama dengan 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml) dari serum ayam arab fase *moulting* dalam 1 ml pelarut *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) pada kelima ekor kambing perlakuan, sedangkan 1 ekor kambing kontrol hanya diimunisasi PBS dalam IFA 1 : 1.



Gambar 4.8. Proses *bleeding* pada vena *jugularis* kambing.

Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7 pada volume 1 ml dimasukkan ke dalam *selofan*, diberi label, kemudian diikat. Dilanjutkan dialisis dalam 0,01 M buffer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4°C (lampiran 3.5.).

4.6.2.3. Pengukuran Titer Abpo- α Prol-1

Abpo- α Prol-1 yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA *indirect*, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari ELISA *reader*. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut: Antigen (prolaktin produksi Sigma L-6520) dengan kadar 100 μ g/ml dilarutkan dalam bufer Carbonat-Bicarbonat (*Coating buffer*) dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada 4° C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit dan diblok dengan *Blocking buffer* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit.

Setelah itu direaksikan dengan Antibodi primer dari kelinci (Antibodi poliklonal Anti Prolaktin/ Abpo- α Prol-1) yang dilarutkan ke dalam blocking buffer BSA 1% dengan seri pengenceran yaitu 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 dan 1/10240 kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu

4°C selama semalam, kemudian microplate dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit.

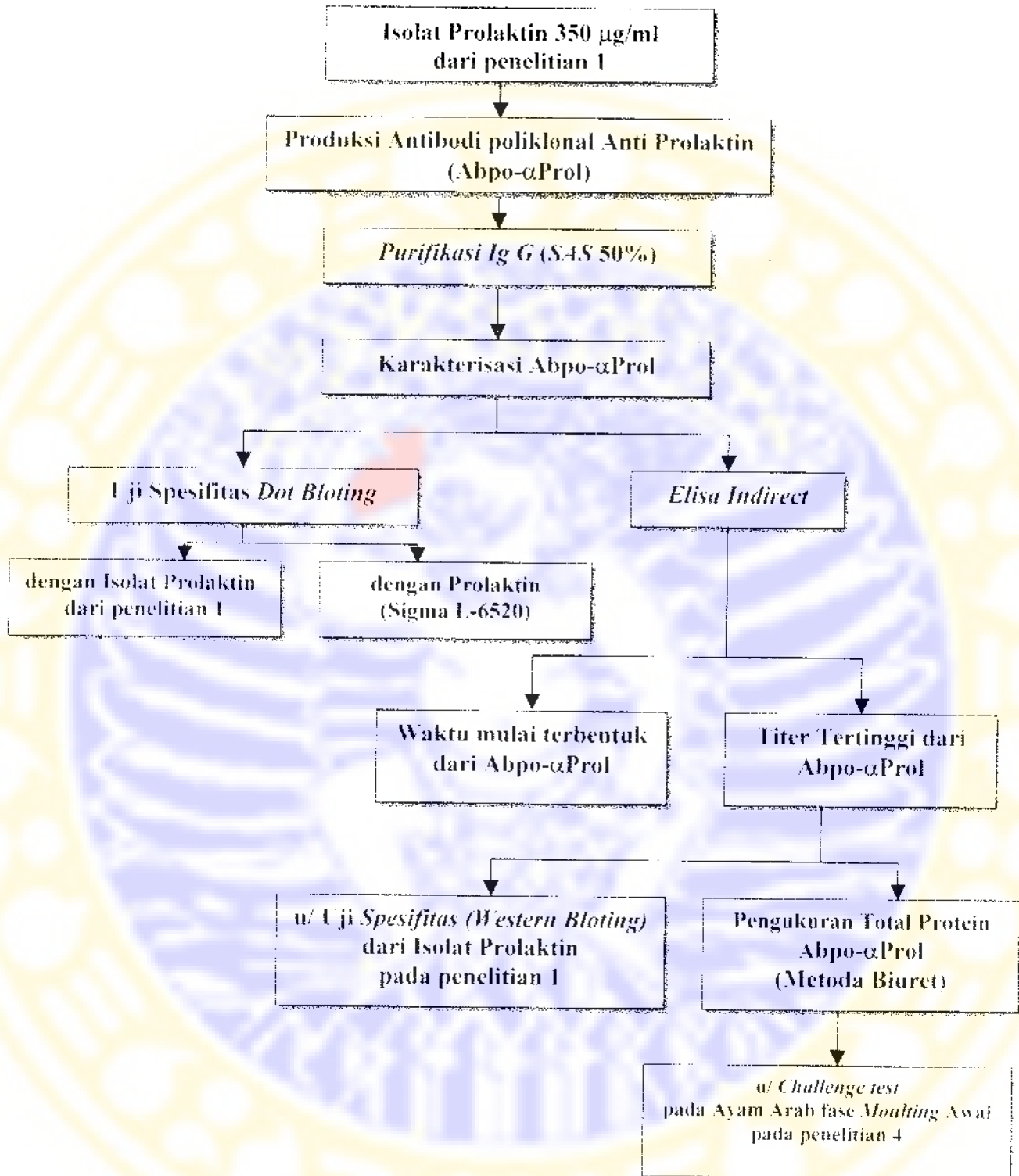
Selanjutnya di *coating* dengan Antibodi sekunder (*Anti Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugated*) yang dilarutkan dalam TBS Tween-20 dengan pengenceran 1/2500, dimasukkan pada microplate sebanyak 50 µl tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit

Setelah itu ditambahkan substrat pNPP dalam diethanolamine 10%, dimasukkan pada microplate sebanyak 50 µl tiap sumuran, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan gelap dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan dengan penambahan NaOH 3 M (*Stop Reaction*) sebanyak 50µl tiap sumuran. Setelah itu diukur titer dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Kontrol dipakai sumuran yang tidak berisikan antigen atau tanpa *dicoating* dengan prolaktin-Sigma L-6520 (Suwarno dkk, 2003).

4.6.3. Penelitian 3: Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo-αProl) pada Kambing lokal jantan

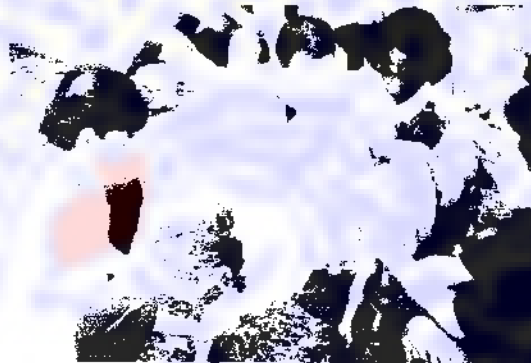
4.6.3.1. Produksi Abpo-αProl

Produksi antibodi poliklonal dari isolat prolaktin dapat dilakukan dengan beberapa kali imunisasi pada hewan coba seperti kambing (Goldsby and Osborne, 2000; Biosystem, 1999). Jadwal produksi Abpo-αProl dapat dilihat pada tabel 4.2. Isolat prolaktin yang digunakan pada penelitian ini adalah hasil *isolasi* dan *karakterisasi* serum ayam fase *moulting* pada penelitian 1.



Gambar 4.6. Bagan Rancangan Penelitian 3
Produksi Abpo-αProl pada kambing lokal jantan

Prosedur pembuatan Abpo- α Prol adalah sebagai berikut: Sebanyak 5 ekor kambing lokal jantan diimunisasi aktif yang pertama pada hari ke-0. Imunisasi ini dilakukan di beberapa tempat secara intra kutan (gambar 4.7.) dengan 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml) dari serum ayam arab fase *moulting* dalam 1 ml pelarut *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan 1 ekor kambing sebagai kontrol, hanya disuntik 1 ml PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dalam 1ml pelarut CFA.



Gambar 4.7. Imunisasi aktif pada kambing di beberapa tempat secara *intra cutan*.

Sehari sebelum imunisasi pertama dilakukan pengambilan darah (*bleeding*) *pre*-imun pada vena jugularis di daerah leher dari kambing (gambar 4.8.). Dua belas hari kemudian dilakukan *booster* yang pertama dengan 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml) dari serum ayam arab fase *moulting* dalam 1 ml pelarut *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) pada kelima ekor kambing perlakuan, sedangkan 1 ekor kambing kontrol hanya diimunisasi PBS dalam IFA 1 : 1.



Gambar 4.8. Proses *bleeding* pada vena *jugularis* kambing.

Booster kedua dilakukan pada hari ke-43 dengan penyuntikkan isolat prolaktin dalam IFA (pada lima ekor kambing perlakuan) dan dengan PBS dalam IFA (pada 1 ekor kambing kontrol). *Booster* ketiga dilakukan pada hari ke-74 dengan penyuntikkan isolat prolaktin dalam IFA (pada lima ekor kambing perlakuan) dan dengan PBS dalam IFA (pada 1 ekor kambing kontrol).

Tabel 4.2. Jadwal dan Prosedur produksi Abpo- α Prol pada Kambing dari isolat prolaktin (Goldsby and Osborne, 2000; Biosystem, 1999)

Hari	Prosedur	Adjuvan/ Keterangan
-1	<i>Bleeding pre-imun</i>	-
0	Imunisasi pertama = 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml)	CFA = 1 ml
12	Imunisasi kedua (<i>Booster I</i>) = 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml)	IFA ke-1 = 1 ml
19	<i>Bleeding ke-1</i>	-
26	<i>Bleeding ke-2</i>	-
33	<i>Bleeding ke-3</i>	-
40	<i>Bleeding ke-4</i>	-
43	Imunisasi ketiga (<i>Booster II</i>) = 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml)	IFA ke-2 = 1 ml
50	<i>Bleeding ke-5</i>	-
57	<i>Bleeding ke-6</i>	-
64	<i>Bleeding ke-7</i>	-
71	<i>Bleeding ke-8</i>	-
74	Imunisasi keempat (<i>Booster III</i>) = 1 ml isolat prolaktin (350 μ g/ml)	IFA ke-3 = 1 ml
81	<i>Bleeding ke-9</i>	-
88	<i>Bleeding ke-10</i>	-
95	<i>Bleeding ke-11</i>	-
102	<i>Bleeding ke-12</i>	-

Setiap minggu setelah *booster* pertama, kedua dan ketiga dilakukan pengambilan darah (*bleeding*), 20 ml sampel darah diambil secara intra vena dari masing-masing kambing. Darah yang didapat dibiarkan mengendap dan diambil serumnya. Serum *dipurifikasi* dengan metoda SAS 50%, selanjutnya dilakukan analisis titer antibodi dengan *ELISA indirect*. Tujuan penggunaan metoda *ELISA indirect* adalah untuk dapat diketahui kapan mulai terbentuknya dan titer tertinggi dari antibodi. Selanjutnya titer tertinggi yang didapat digunakan untuk uji

spesifisitas protein dengan metoda *western blotting* pada isolat prolaktin pada penelitian pertama. Pada penelitian tahap 3 ini juga dilakukan pengukuran kadar prolaktin yang nantinya akan digunakan sebagai dasar perhitungan dosis pada challenge test pada ayam arab fase *moulting* awal.

4.6.3.2. Purifikasi Ig G dari Abpo- α Prol

Purifikasi Ig G dari Abpo- α Prol dilakukan dengan penambahan SAS 50% pada serum dari kambing dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortexer*. 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% (10 x 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 pada volume 1 ml dimasukkan ke dalam *selofan*, diberi label, kemudian diikat. Dilanjutkan dialisis dalam 0,01 M buffer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4°C..

4.6.3.3. Uji Spesifisitas Abpo- α Prol Metoda *Dot Blotting*

Antigen (isolat prolaktin dan prolaktin) ditotolkan pada membran nitroselulosa yang dirangkaikan pada *dot blotter* dan dibiarkan selama 30 menit. Antigen diinkubasi dalam *blocking buffer* selama 1 jam, dan dicuci tiga kali dengan PBS Tween 20. Kemudian diberi antibodi primer (Abpo- α Prol) yang diproduksi pada kambing, diinkubasi selama 2 jam dan dicuci tiga kali dengan

PBS Tween 20. Kemudian diberi antibodi sekunder (*Anti Goat Ig G Alkaline Phosphatase Conjugated*) yang dicencerkan dengan TBS (Tris Buffered Saline) dengan perbandingan 1:2500 dan diinkubasi 30 menit. Terakhir dalam substrat Western Blue selama 30 menit dalam ruang gelap (lampiran 3.6.).

4.6.3.4. Pengukuran Titer Abpo- α Prol

Abpo- α Prol yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA *indirect*, berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dari ELISA *reader*. Adapun prosedur kerjanya sebagai berikut: Antigen (isolat prolaktin) dengan kadar 100 μ g/ml dilarutkan dalam bufer Carbonat-Bicarbonat (*Coating buffer*) dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada 4° C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit dan diblok dengan *Blocking buffer* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit.

Setelah itu direaksikan dengan Antibodi primer dari kambing (Antibodi poliklonal Anti Prolaktin/ Abpo- α Prol) yang dilarutkan ke dalam blocking buffer BSA 1% dengan seri pengenceran yaitu 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 dan 1/10240 kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam, kemudian *microplate* dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit.

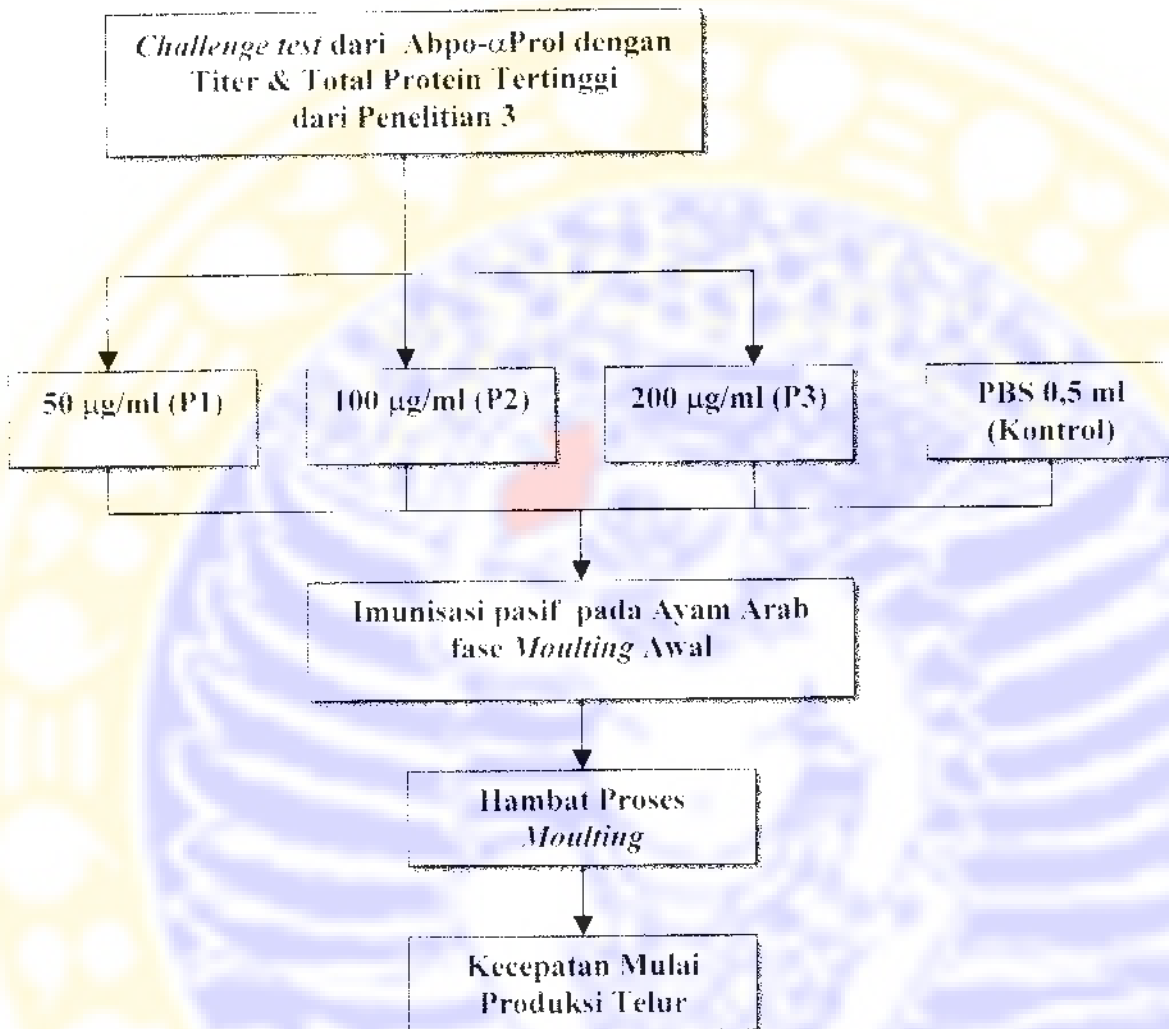
Selanjutnya di *coating* dengan Antibodi sekunder (*Anti Goat IgG Alkaline Phosphatase Conjugated*) yang dilarutkan dalam TBS Tween-20 dengan pengenceran 1/2500, dimasukkan pada microplate sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 4 kali @ 3 menit

Setelah itu ditambahkan substrat pNPP dalam diethanolamine 10%, dimasukkan pada microplate sebanyak 50 μ l tiap sumuran, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan gelap dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan dengan penambahan NaOH 3 M (*Stop Reaction*) sebanyak 50 μ l tiap sumuran. Setelah itu diukur titer dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Kontrol dipakai sumuran yang tidak berisikan antigen atau tanpa *dicoating* dengan isolat prolaktin (Suwarno dkk., 2003).

4.6.3.5. Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda *Biuret*

Pengukuran kadar total protein dengan metoda biuret dalam penelitian ini digunakan spektrofotometer untuk menentukan total protein berdasarkan nilai absorbansi yang terbaca pada alat spektrofotometer.

Kadar total protein ditentukan menggunakan reagen *biuret* (lampiran 3.4.) dengan penambahan larutan standar protein (BSA). Dipersiapkan tiga kuvet spektrofotometer, kuvet pertama diberi tanda S sebagai kuvet sample yang akan diukur. Dalam kuvet S dimasukkan 0,05 ml Abpo- α Prol dan 2,5 ml pereaksi biuret. Kuvet kedua diberi tanda ST sebagai kuvet standar, dimasukkan 0,05 ml larutan standar protein, 2,5 ml pereaksi biuret. Pada kuvet ketiga (diberi tanda Bl.)



Gambar 4.9. Bagan Rancangan Penelitian 4
Challenge test dari Abpo-αProl pada ayam arab fase moulting awal

4.6.4.1. Kemampuan Menghambat Proses *Moulting*

Uji ini meliputi uji kemampuan Abpo- α Prol dalam menetralkan kerja prolaktin pada fase *moulting* sehingga proses *moulting* dapat dihambat (Bulu primer, axial dan sekunder di daerah sayap tidak rontok lagi) sampai ketiga jenis bulu di daerah sayap tersebut tumbuh lengkap. Prosedur kerjanya sebagai berikut:

Empat puluh ekor ayam arab fase *moulting* yang pertama (umur 14 bulan) dan sedang memasuki awal *moulting* (rontok 1 helai bulu primer nomor satu di daerah sayap) dikelompokkan dan ditempatkan pada kandang baterai. secara acak menjadi empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan mendapat sepuluh ulangan sebagai berikut:

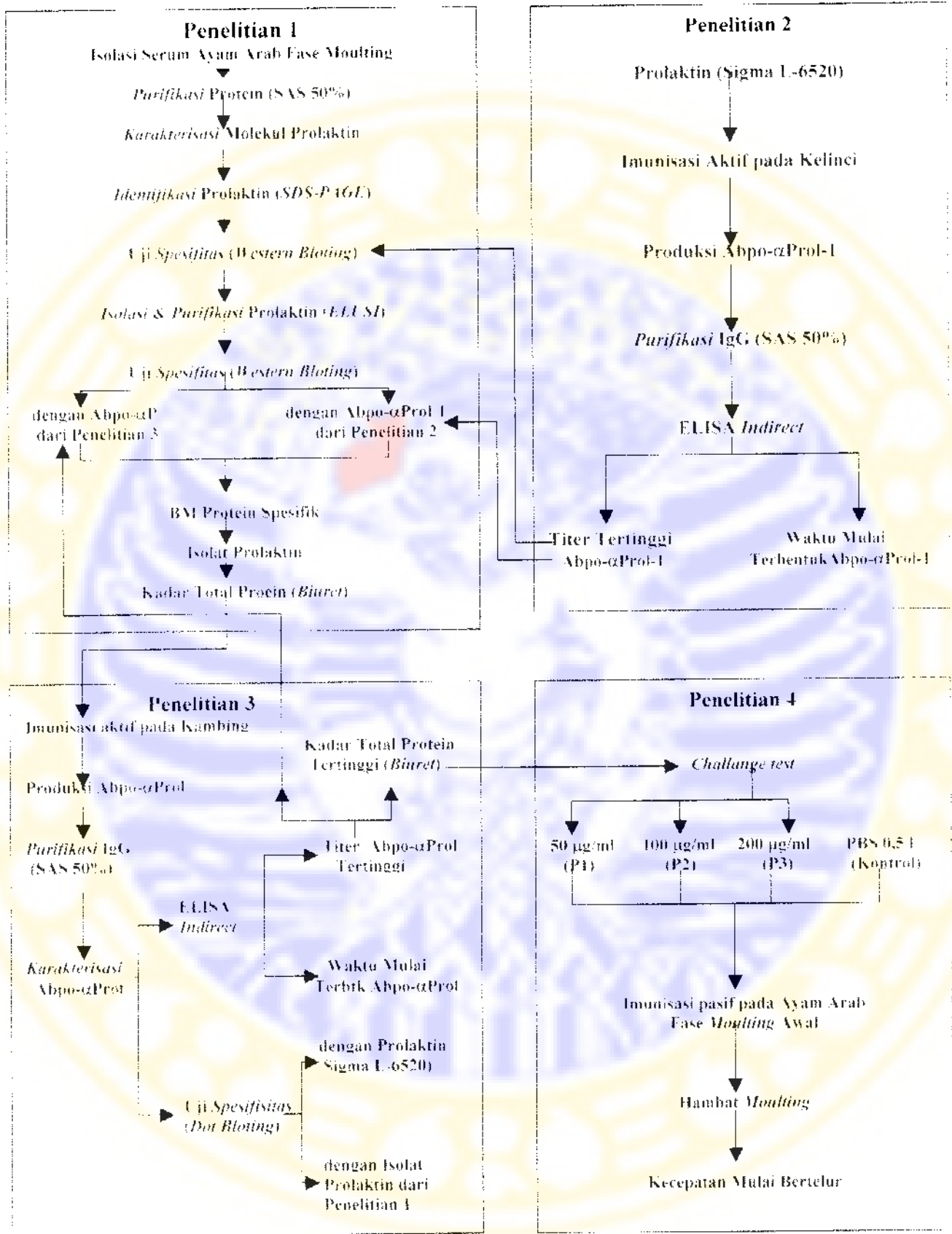
- PO (kontrol) : Sepuluh ekor ayam arab fase *moulting* tanpa mendapat immunisasi Abpo- α Prol dan diganti dengan PBS sebanyak 0,5 ml.
- P1 : Sepuluh ekor ayam arab fase *moulting* diimmunisasi pasif secara intra muscular dengan Abpo- α Prol 50 μ g/ml pada awal *moulting*
- P2 : Sepuluh ekor ayam arab fase *moulting* diimmunisasi pasif secara intra muscular dengan Abpo- α Prol 100 μ g/ml pada awal *moulting*
- P3 : Sepuluh ekor ayam arab fase *moulting* diimmunisasi pasif secara intra muscular dengan Abpo- α Prol 200 μ g/ml pada awal *moulting*

4.6.4.2. Kemampuan Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur

Kecepatan mulai bertelur dihitung dalam hari mulai dari tumbuh bulu di daerah sayap secara lengkap sampai mulai produksi telur kembali. Penghitungan berapa hari waktu yang diperlukan untuk memulai produksi telur kembali dilakukan setelah prosedur penghentian *moulting* dilakukan.

4.7. Analisis Data

Rancangan dalam penelitian ini yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Data kemampuan menghentikan proses *moulting* (lama *moulting* dalam hari) dan kecepatan mulai bertelur dianalisa dengan menggunakan *Analisis of Variant (ANOVA)* dan dilanjutkan dengan uji BNT 5% (Beda Nyata Terkecil) apabila terdapat perbedaan (Steel and Torrie, 1995). Data mengenai waktu mulai terbentuk dan titer tertinggi yang dapat dicapai dari Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol diketahui melalui penggunaan *ELISA indirect* (Suwarno dkk., 2003). Data *bleeding* pada produksi Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji SNK 5% (*Student New Keuls*) apabila terdapat perbedaan (Steel and Torrie, 1995).



Gambar 4.10. Kerangka Operasional (Bagan Rancangan Penelitian 1 - 4)



BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

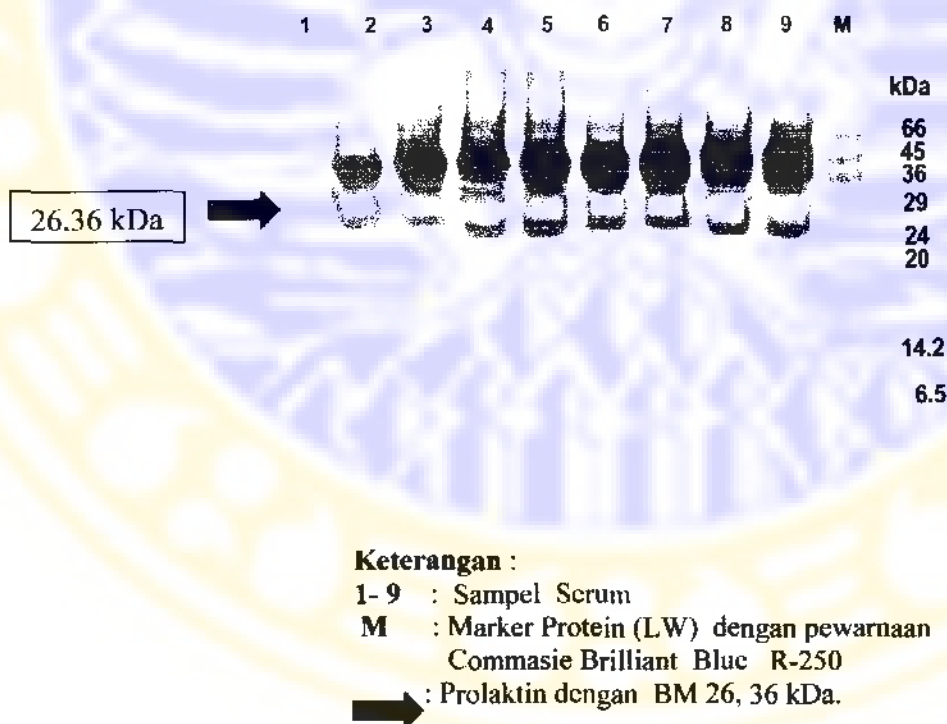
BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Data Penelitian

5.1.1. Penelitian 1: *Isolasi, karakterisasi, purifikasi, uji spesifisitas dan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin serum darah ayam arab fase moulting*

Penelitian pertama dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa molekul prolaktin dapat *diisolasi* dan *dikarakterisasi* dari serum ayam arab fase *moulting*. Volume darah dan serum yang didapat dari satu kali *bleeding* pada ke-9 ekor ayam dapat dilihat pada lampiran 2.1. Serum yang didapat dilakukan purifikasi dengan metoda SAS 50%, dikarakterisasi dan diidentifikasi terhadap prolaktin. Identifikasi prolaktin dilakukan berdasarkan penentuan Berat Molekul (BM) dengan metoda SDS-PAGE 12%. Hasil SDS-PAGE 12% terhadap serum yang diidentifikasi dapat dilihat pada gambar 5.1.



Keterangan :

1- 9 : Sampel Serum

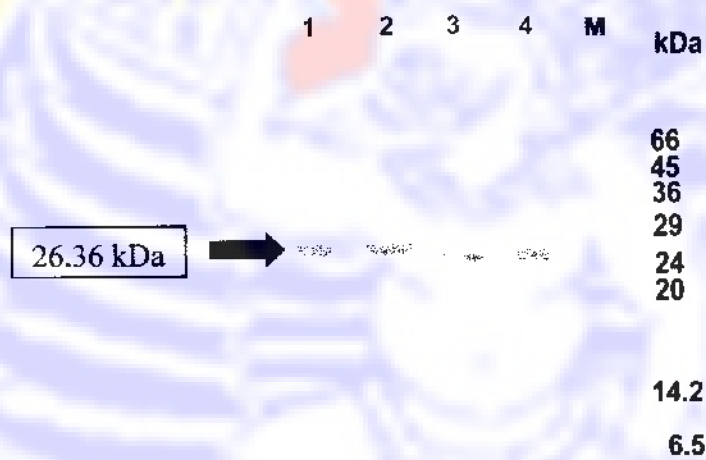
M : Marker Protein (LW) dengan pewarnaan
Commasie Brilliant Blue R-250

➔ : Prolaktin dengan BM 26, 36 kDa.

Gambar 5.1. Pita Prolaktin Hasil Isolasi dari Serum Ayam Arab fase *Moulting* Metode SDS-PAGE 12 %.

Hasil western blotting pada gambar 5.2. menunjukkan bahwa Abpo- α Prol-1 yang diproduksi dari prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci mengenali suatu protein prolaktin dari serum darah ayam arab fase *moulting* pada berat molekul 26,36 kDa.

Isolasi dan purifikasi dilakukan untuk mendapatkan molekul protein dengan BM 26,36 kDa, yang diyakini sebagai molekul prolaktin dengan metoda *elektroelusi (ELUSI)*. Pelaksanaan *elektroelusi* tersebut berasal dari hasil SDS-PAGE 12 % dan didapatkan hasil seperti gambar 5.3.



Keterangan : pewarnaan Commasic Brilliant Blue R-250

S : Sampel

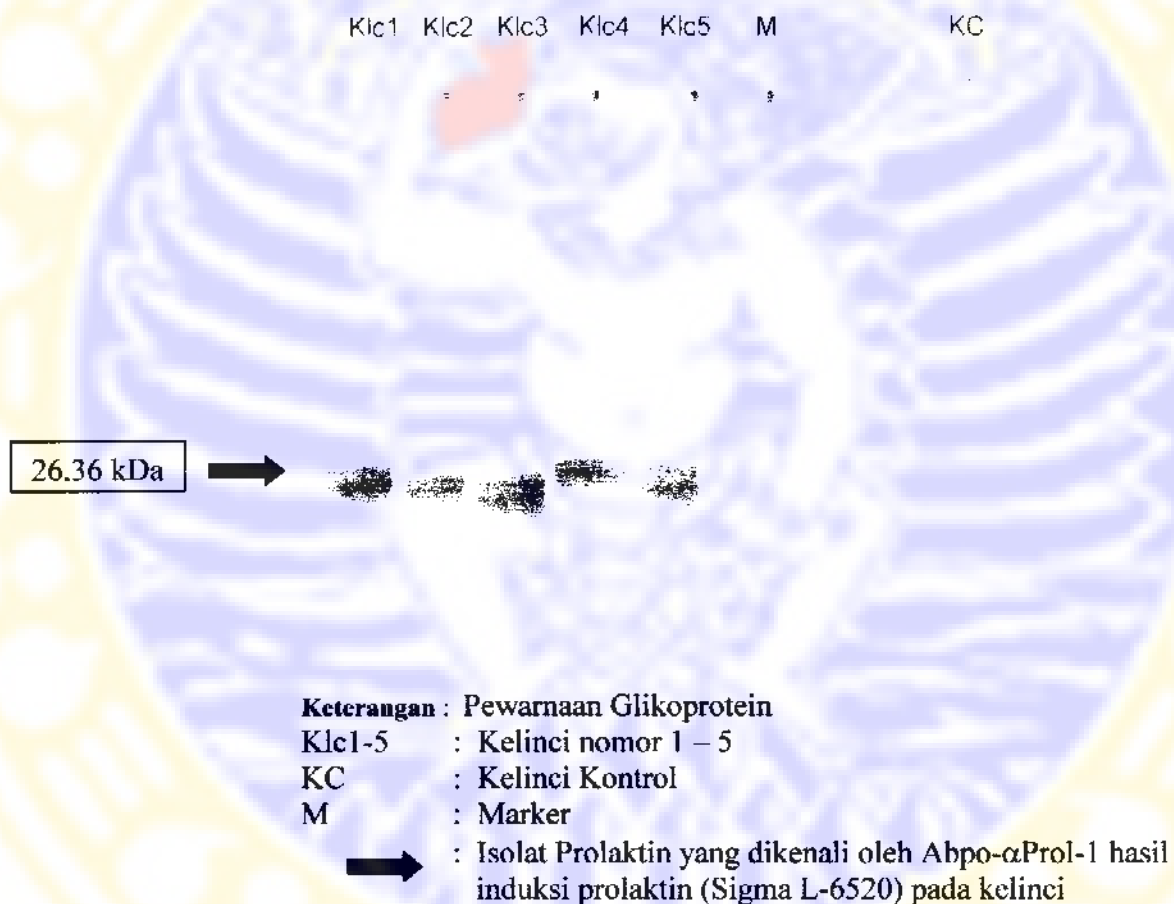
M : Marker Protein

➔ : Prolaktin dengan BM 26,36 kDa.

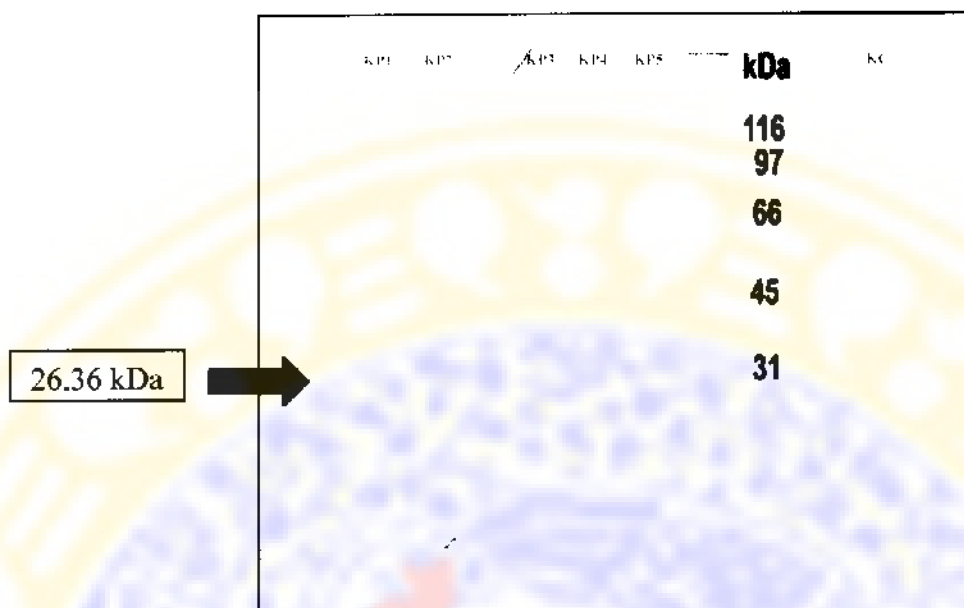
Gambar 5.3. Pita prolaktin Hasil *Elektroelusi* dari hasil SDS-PAGE 12%

Metoda *western blotting* dilakukan sebagai uji spesifisitas untuk mengetahui molekul prolaktin dari isolat prolaktin yang mempunyai berat molekul 26,36 kDa bereaksi spesifik dengan Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol. Metoda ini menggunakan antibodi konjugat (anti - Rabbit - IgG - AP dan anti - Goat - IgG-AP) sebagai

antibodi sekundernya. Hasil uji *western blotting* nampak seperti gambar 5.4. dan 5.5., Abpo- α Prol-1 yang diproduksi dari prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci mengenali suatu protein prolaktin dari isolat tersebut pada berat molekul 26,36 kDa, demikian juga untuk Abpo- α Prol yang diproduksi dari induksi isolat prolaktin pada kambing mengenali prolaktin dari isolat tersebut juga dengan berat molekul 26,36 kDa, sedangkan potongan membran KC (sebagai kontrol) tidak menunjukkan adanya pita.



Gambar 5.4. Uji Spesifisitas Isolat prolaktin dengan Abpo- α Prol-1 hasil induksi prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci menggunakan Metode *Western Blotting*.



Keterangan : Pewarnaan Commasie Brilliant Blue R-250

KP 1 – 5 : Kambing nomor 1 – 5

KC : Kambing Kontrol

M : Marker

→ : Isolasi Prolaktin yang dikenali oleh Abpo- α Prol hasil induksi isolat prolaktin pada kambing

Gambar 5.5. Uji Spesifisitas Isolasi prolaktin dengan Abpo- α Prol, hasil imunisasi aktif isolat prolaktin pada kambing dengan Metode *Western Blotting*

Setelah dilakukan uji spesifisitas protein dari isolat dengan metoda *western blotting*, maka dilanjutkan dengan pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin tersebut dengan metoda *Biuret*. Hasil pengukuran kadar total protein dapat dilihat pada tabel 5.1. di bawah ini :

Tabel 5.1 Kadar Total Protein dari Isolasi Prolaktin dengan metoda *Biuret*

Sampel	Volume Serum (ml)	Konsentrasi (ppm)	Kadar Total Protein (μ g/ml)
1	4,3	350	350
2	4,2	557	557
3	4,4	350	350
4	4,0	531	531
5	4,0	498	498
6	4,5	350	350
7	4,2	452	452
8	4,4	350	350
9	4,5	350	350

5.1.2. Penelitian 2 : Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol-1) pada Kelinci jantan strain New Zealand

Penelitian kedua dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol-1) dapat diproduksi dari prolaktin komersial (Sigma L-6520) pada kelinci jantan strain New Zealand. Langkah awal dari tahap penelitian ini dilakukan melalui proses imunisasi aktif dengan prolaktin (Sigma L-6520) pada kelinci di beberapa tempat secara *sub cutan*. Produksi Abpo- α Prol-1 ini dilakukan pada kelinci yang telah diimunisasi aktif dengan prolaktin (Sigma L-6520) yang dilarutkan dalam *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan dibooster sebanyak 3 kali dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Kemudian dilakukan pengambilan darah (*bleeding*) sebanyak 12 kali pada vena *auricularis* di daerah telinga dari kelinci. Volume darah dan serum yang didapatkan dari 12 kali *bleeding* pada keenam ekor kelinci dapat dilihat pada lampiran 2.2. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar titer dari Abpo- α Prol-1 untuk menentukan kapan mulai terbentuk antibodi dan titer tertinggi yang dicapai. Pengukuran titer Abpo- α Prol-1 ini dilakukan dengan metoda *ELISA indirect*. Pembacaan hasil dilakukan dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Pembacaan titer antibodi bisa dipakai sebagai patokan apabila titer pada kelompok kontrol $< 0,2$ (Suwarno dkk., 2000).

Titer antibodi dapat dibaca dengan metode positif atau negatif. Titer antibodi yang dibaca melalui *reader* dari ELISA dinyatakan positif bila sampel memberikan nilai *absorban* 2 kali di atas nilai rata-rata kontrol negatif ($2x$ COV/ Cut Of Value). Nilai COV untuk besar sampel antara 10-100, ditentukan dengan rata-rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($X + 2-3$ SD) (Suwarno dkk., 2000). Data lengkap angka titer Abpo- α Prol-1 dari *ELISA reader* pada panjang gelombang 405

nm dapat dilihat pada lampiran 4.1.- 4.12. Data tersebut kemudian diringkas dalam bentuk tabel 5.2. di bawah ini :

Tabel 5.2. Titer positif dari Abpo- α P1 di atas 2 kali COV pada kelinci

Bleeding ke-	Titer pada 2 x COV	Titer positif Abpo-APP (>2xCOV) pada pengenceran	Kelinci nomor	Keterangan
1	0,1158	1/20 - 1/1280 1/20 - 1/640	1, 3 2, 4, 5	Merupakan <i>bleeding</i> pertama kali
2	0,1266	1/20 - 1/2560 1/20 - 1/1280	1, 3 2, 4, 5	Terjadi peningkatan titer positif dari <i>bleeding</i> ke-1
3	0,1296	1/20 - 1/10240 1/20 - 1/5120	1, 3 2, 4, 5	Merupakan titer positif tertinggi setelah dilakukan <i>booster</i> IFA ke-1
4	0,1078	1/20 - 1/640 1/20 - 1/320	1, 3 2, 4, 5	Terjadi penurunan yang tajam titer positif dari <i>bleeding</i> ke-3 dan angka rata-rata titer < daripada <i>bleeding</i> ke-1
5	0,1200	1/20 - 1/1280 1/20 - 1/640	1, 3 2, 4, 5	Titer positif meningkat lagi setelah <i>booster</i> IFA ke-2. Angka rata-rata titer hampir mendekati <i>bleeding</i> ke-3
6	0,1250	1/20 - 1/2560 1/20 - 1/1280	1, 3 2, 4, 5	Titer positif meningkat dari <i>bleeding</i> ke-5. Angka rata-rata titer lebih tinggi daripada <i>bleeding</i> ke-3
7	0,1240	1/20 - 1/5120 1/20 - 1/2560	1, 3 2, 4, 5	Terjadi peningkatan titer positif dari <i>bleeding</i> ke-6. Angka rata-rata titer sedikit lebih tinggi daripada <i>bleeding</i> ke-6
8	0,1111	1/20 - 1/640 1/20 - 1/320	1, 3 2, 4, 5	Terjadi penurunan titer positif yang tajam dari <i>bleeding</i> ke-7 tetapi sedikit di atas titer rata-rata <i>bleeding</i> ke-1
9	0,1360	1/20 - 1/5120 1/20 - 1/2560	1, 3 2, 4, 5	Terjadi peningkatan angka titer positif setelah dilakukan <i>booster</i> IFA ke-3
10	0,1390	1/20 - 1/10240 1/20 - 1/5120	1, 3 2, 4, 5	Angka rata-rata titer paling tinggi dibandingkan dengan <i>bleeding</i> yang lain.
11	0,1330	1/20 - 1/5120 1/20 - 1/2560	1, 3 2, 4, 5	Terjadi penurunan titer positif dari <i>bleeding</i> ke-10. Angka rata-rata titer = pada <i>bleeding</i> ke-9
12	0,0985	1/20 - 1/1280 1/20 - 1/640	1, 3 2, 4, 5	Titer positif lebih menurun dari <i>bleeding</i> ke-11. Angka rata-rata titer = pada <i>bleeding</i> ke-3 dan ke-5

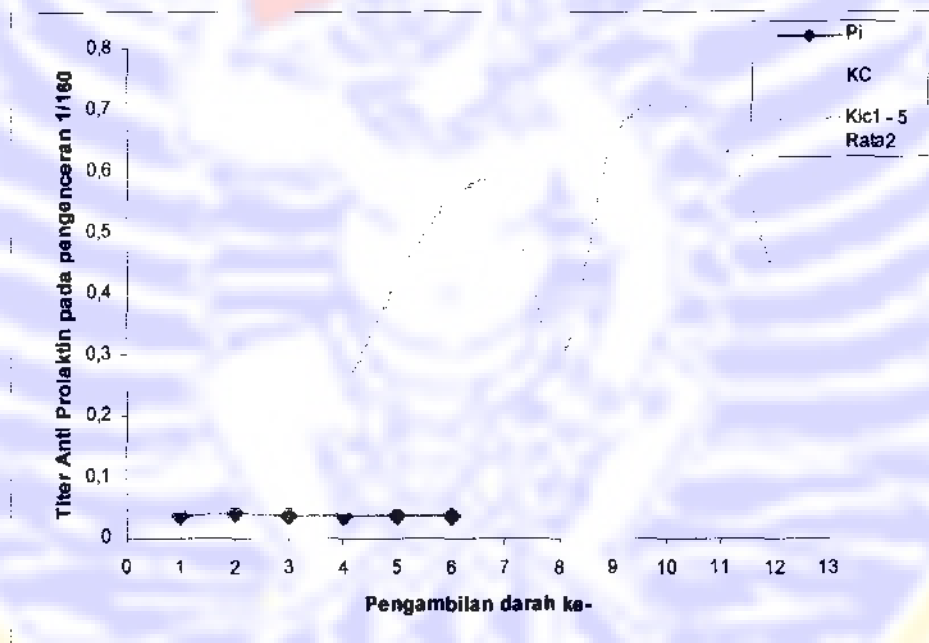
Berdasarkan hasil pemeriksaan titer Abpo- α Prol-1 dengan uji *ELISA indirect* maka diperoleh data bahwa pada *bleeding* ke-1 setelah *booster* IFA yang pertama semua kelinci (Klc1-5) sudah menampakkan atau menunjukkan titer positif adanya Abpo- α Prol-1, yaitu di atas nilai dua kali COV (0,1158) yaitu sebesar 0,128 (Klc1); 0,130 (Klc3) pada pengenceran 1/1280 dan 0,165 (Klc2), 0,164 (Klc4) serta 0,162 (Klc5) pada pengenceran 1/640 (tabel 5.3.).

Tabel 5. 3. Pembentukan Abpo- α Prol-1 untuk pertama kali setelah penyuntikan prolaktin (Sigma L-6520) pada Kelinci

Kelinci	Mulai terbentuk Abpo- α Prol-1 Pada <i>Bleeding</i> ke-1		
	Pada pengenceran 1/640 (Titer)	Pada pengenceran 1/1280 (Titer)	2xCOV
Klc1	0,167*	0,128*	0,1158
Klc2	0,165*	0,112	
Klc3	0,160*	0,130*	
Klc4	0,164*	0,114*	
Klc5	0,162*	0,111	

* Titer positif Abpo- α Prol-1

Grafik rataan titer (profil) Abpo- α Prol-1 pada pengenceran 1/160 dari kelima kelinci perlakuan dan satu ekor kelinci kontrol pada *bleeding* ke-1 sampai ke-12 dapat ditunjukkan pada gambar 5. 6.



Keterangan : : dilakukan *booster* prolaktin (Sigma L-6520) dalam IFA

Pi : Pre imun (bleeding dari ke-6 kelinci sebelum imunisasi)

KC : Kelinci Kontrol (diimunisasi PBS dalam CFA dan IFA)

Klc1-5 Rata2 : Rata-rata titer Abpo- α Prol-1 dari ke-5 ekor Kelinci yang diimunisasi prolaktin (Sigma L-6520) dalam CFA & IFA

Gambar 5.6. Profil Abpo- α Prol-1 diproduksi pada kelinci dari prolaktin (Sigma L-6520)

Rataan titer Abpo- α Prol-1 dari *bleeding* ke-1 sampai ke-2 dan ke-3 pada tiap kelinci (Klc1-5) meningkat (tabel 5.4.). Selanjutnya pada *bleeding* ke-4 titer Abpo-

α Prol-1 menurun, kemudian meningkat lagi pada *bleeding* ke-5, 6 dan 7 setelah dilakukan *booster* prolaktin (Sigma L-6520) dalam IFA yang ke-2. Selanjutnya titer Abpo- α Prol-1 menurun lagi pada *bleeding* ke-8. Pada *bleeding* ke-9, 10 dan 11 titer prolaktin meningkat lagi setelah dilakukan *booster* prolaktin (Sigma L-6520) dalam IFA yang ketiga (tabel 5.4.). Puncak kenaikan titer Abpo- α Prol-1 dihasilkan pada *bleeding* ke-3; 6 dan 7 serta ke-9, 10 dan 11 setelah imunisasi aktif prolaktin (Sigma-L6520) dalam pelarut CFA dan IFA ke-1, IFA ke-2 serta IFA ke-3.

Tabel 5. 4. Titer Abpo- α Prol-1 pengenceran 1/160 dari 12 X *bleeding* pada Kelinci

Bleeding Ke-	Pi (Klc1-6)	KC	Klc1	Klc2	Klc3	Klc4	Klc5	Klc1-5 Rata2
1	0,038	0,051	0,293	0,292	0,295	0,291	0,290	0,292 ± 0,002
2	0,039	0,057	0,354	0,352	0,355	0,351	0,348	0,352 ± 0,002
3	0,038	0,060	0,425	0,423	0,427	0,422	0,421	0,424 ± 0,002
4	0,037	0,048	0,270	0,267	0,278	0,266	0,265	0,269 ± 0,005
5	0,038	0,054	0,423	0,420	0,422	0,418	0,417	0,420 ± 0,0025
6	0,036	0,057	0,554	0,552	0,553	0,552	0,551	0,552 ± 0,001
7		0,062	0,575	0,572	0,574	0,571	0,572	0,573 ± 0,0016
8		0,050	0,295	0,290	0,294	0,292	0,290	0,292 ± 0,002
9		0,065	0,654	0,652	0,655	0,653	0,651	0,653 ± 0,0015
10		0,064	0,712	0,710	0,711	0,709	0,709	0,710 ± 0,0013
11		0,062	0,655	0,652	0,654	0,653	0,651	0,653 ± 0,0016
12		0,47	0,425	0,422	0,424	0,423	0,422	0,423 ± 0,0013

Keterangan : Pi : Pre imun
 KC : Kelinci Kontrol
 Klc1 – 5 : Kelinci nomor 1-5

5.1.3. Penelitian 3 : Produksi Antibodi poliklonal Anti Prolaktin (Abpo- α Prol) pada Kambing lokal jantan

Penelitian ketiga dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa Abpo- α Prol dapat diproduksi dari isolat prolaktin pada kambing jantan. Dosis isolat prolaktin yang digunakan untuk imunisasi aktif ini adalah 350 μ g/ml (berdasarkan hasil perhitungan kadar total protein pada penelitian pertama). Selanjutnya dilakukan pengambilan darah (*bleeding*) pada vena jugularis di daerah leher dari kambing. *Bleeding* dilakukan sebanyak 12 kali setiap minggu setelah dilakukan booster dalam IFA 1,2

dan 3. Volume darah dan serum yang didapat dari 12 kali bleeding pada kecnam ekor kambing dapat dilihat pada lampiran 2.3.

Uji spesifisitas Abpo- α Prol yang terkandung dalam serum kambing tersebut dilakukan dengan metoda *Dot Blotting* dan diukur kadar titernya (uji sensitivitas) untuk menentukan waktu mulai terbentuk antibodi dan titer tertinggi yang dapat dicapai. Pengukuran titer antibodi (Abpo- α Prol) ini dilakukan dengan metoda *ELISA indirect*.

5.1.3.1. Uji Spesifisitas Abpo- α Prol terhadap Prolaktin (Sigma L-6520) dan Isolat Prolaktin Metoda *Dot Blotting*.

Uji spesifisitas bertujuan untuk membuktikan bahwa prolaktin (Sigma L-6520) dan isolat prolaktin mampu menginduksi dan mengenali Abpo- α Prol dari kambing. Data uji spesifisitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metoda *Dot Blotting* menggunakan alat *Dot Blotter* (BioRad), dihasilkan data berupa gambar visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (prolaktin dan isolat prolaktin) dengan antibodi (Abpo- α Prol) berupa noda biru keunguan, seperti terlihat pada gambar 5.7. dan 5.8.. Immunoblots pada gambar 5.7 dan 5.8. memperlihatkan bahwa antibodi yang berupa Abpo- α Prol mengenali protein prolaktin (Sigma L-6520) dan isolat prolaktin dari serum ayam arab fase *moulting*. Semakin tinggi konsentrasi Abpo- α Prol yang bereaksi dengan prolaktin atau isolat prolaktin maka semakin gelap warna yang dihasilkan. Gradasi warna ini dipengaruhi oleh variasi konsentrasi antigen dan individu sumber antibodi. Abpo- α Prol dari serum kambing nomor 1 – 5 dapat dikenali oleh antigen (prolaktin dan isolat prolaktin) sampai pada pengenceran 1/200.

		<i>Pure prolaktin (Sigma-L6520)</i>			
		Kambing Kontrol		Kambing Perlakuan	
		1/100	1/200	1/100	1/200
Abpo-AP dari Kambing	1			●	○
	2			●	●
	3			●	●
	4			●	●
	5			●	●
		Anti Goat-Ig G-AP Conjugate (1/2500)			

Gambar 5.7. Uji Spcsifisitas Abpo- α Prol dengan prolaktin (Sigma L-6520) Menggunakan Metode *Dot Blotting*.

		<i>Isolat prolaktin dari serum ayam fase molting</i>			
		Kambing Kontrol		Kambing Perlakuan	
		1/100	1/200	1/100	1/200
Abpo-AP dari Kambing	1			●	●
	2			●	●
	3			●	●
	4			●	●
	5			●	●
		Anti Goat-Ig G-AP Conjugate (1/2500)			

Gambar 5.8. Uji Spesifisitas Abpo- α Prol dengan Isolat prolaktin Menggunakan Metode *Dot Blotting*.

5.1.3.2. Pengukuran titer Abpo- α Prol

Pengukuran titer antibodi (Abpo- α Prol) dari serum kambing dilakukan dengan metoda *ELISA indirect*. Pembacaan hasil dilakukan dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Pembacaan titer antibodi bisa dipakai sebagai patokan apabila titer pada kelompok kontrol < 0,2 (Suwarno, dkk., 2000).

Tabel 5.5. Titer positif dari Abpo- α P di atas 2 kali COV pada kambing

Bleeding ke-	Titer pada 2 x COV	Titer positif Abpo-AP (>2xCOV) pada pengenceran	Kambing Nomor	Keterangan
1	0,1162	1/20 – 1/320 1/20 – 1/640	1, 3, 5 2, 4	Merupakan <i>bleeding</i> pertama kali
2	0,1286	1/20 – 1/1280 1/20 – 1/2560	1, 3, 5 2, 4	Terjadi peningkatan titer dari <i>bleeding</i> ke-1
3	0,1320	1/20 – 1/2560 1/20 – 1/5120	1, 3, 5 2, 4	Merupakan titer tertinggi setelah dilakukan <i>booster</i> IFA ke-1
4	0,1094	1/20 – 1/320 1/20 – 1/640	1, 3, 5 2, 4	Terjadi penurunan yang tajam angka titer dari <i>bleeding</i> ke-3 dan angka rata-rata titer mendekati angka rata-rata titer pada <i>bleeding</i> ke-1
5	0,1190	1/20 – 1/1280 1/20 – 1/2560	1, 3, 5 2, 4	Titer meningkat lagi setelah <i>booster</i> IFA ke-2. Angka rata-rata titer mendekati angka rata-rata titer pada <i>bleeding</i> ke-3
6	0,1270	1/20 – 1/2560 1/20 – 1/5120	1, 3, 5 2, 4	Titer positif meningkat dari <i>bleeding</i> ke-5. Angka rata-rata titer lebih tinggi daripada <i>bleeding</i> ke-3
7	0,1330	1/20 – 1/640 1/20 – 1/1280	1, 3, 5 2, 4	Titer positif menurun dari <i>bleeding</i> ke-6, tetapi angka rata-rata titer sedikit lebih tinggi daripada <i>bleeding</i> ke-6
8	0,1102	1/20 – 1/320 1/20 – 1/640	1, 3, 5 2, 4	Terjadi penurunan titer positif yang tajam dari <i>bleeding</i> ke-7 tetapi angka rata-rata titer sedikit di atas titer rata-rata <i>bleeding</i> ke-1
9	0,1120	1/20 – 1/320 1/20 – 1/640	1, 3, 5 2, 4	Terjadi peningkatan angka titer setelah dilakukan <i>booster</i> IFA ke-3
10	0,1340	1/20 – 1/1280 1/20 – 1/2560	1, 3, 5 2, 4	Mempunyai angka rata-rata titer tertinggi dibandingkan dengan <i>bleeding</i> yang lain.
11	0,1340	1/20 – 1/2560 1/20 – 1/5120	1, 3, 5 2, 4	Angka rata-rata titer = pada <i>bleeding</i> ke-9
12	0,0930	1/20 – 1/320 1/20 – 1/640	1, 3, 5 2, 4	Terjadi penurunan titer positif. Angka rata-rata titer = pada <i>bleeding</i> ke-3 dan ke-5

Titer antibodi yang dibaca melalui *reader* dari *ELISA* dinyatakan positif bila sampel memberikan nilai absorbansi di atas nilai rata-rata kontrol negatif (2x COV/

Cut Of Value). Besar sampel antara 10-100, COV ditentukan dengan rata-rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($X + 2-3 SD$) (Suwarno dkk., 2000). Data lengkap titer Abpo- α Prol dari *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm dapat dilihat pada lampiran 5.1 – 5. 12. Data tersebut kemudian diringkas dalam bentuk tabel 5.5. di atas.

Berdasarkan hasil pemeriksaan titer Abpo- α Prol dengan uji *ELISA indirect* maka diperoleh data bahwa pada *bleeding* ke-1 setelah *booster* IFA yang pertama semua kambing (K1-5) sudah menunjukkan titer positif adanya Abpo- α Prol, di atas dua kali COV (0,1162) yaitu sebesar 0,222 (K1), 0,221 (K3), 0,220 (K5) pada pengenceran 1/320 dan 0,117(K2), serta 0,120 (K4) pada pengenceran 1/640 (tabel 5.6.).

Tabel 5.6. Pembentukan Abpo- α Prol pada kambing untuk pertama kali setelah penyuntikan isolat prolaktin dari serum ayam arab fase *moulting*.

Kambing	Mulai terbentuk antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol) Pada kambing - pada <i>bleeding</i> ke-1		
	Pada pengenceran 1/320 (Titer)	Pada pengenceran 1/640 (Titer)	2 x COV
K1	0,152*	0,115	0,1162
K2	0,154*	0,117*	
K3	0,151*	0,114	
K4	0,156*	0,120*	
K5	0,150*	0,112	

* Titer positif Abpo- α Prol

Rataan titer Abpo- α Prol pada *bleeding* ke-1, ke-2 dan ke-3 pada tiap kambing (K1-K5) mengalami peningkatan (tabel 5.7.). Pada *bleeding* ke-4 titer Abpo- α Prol menurun, kemudian meningkat lagi pada *bleeding* ke-5, 6 dan 7 setelah dilakukan *booster* isolat prolaktin dalam IFA yang ke-2. Selanjutnya titer Abpo- α Prol menurun lagi pada *bleeding* ke-8. Pada *bleeding* ke-9, 10 dan 11 titer Abpo- α Prol meningkat lagi setelah dilakukan *booster* isolat prolaktin dalam IFA yang ketiga. Puncak kenaikan titer Abpo- α Prol dihasilkan pada *bleeding* ke-3, ke-6 dan

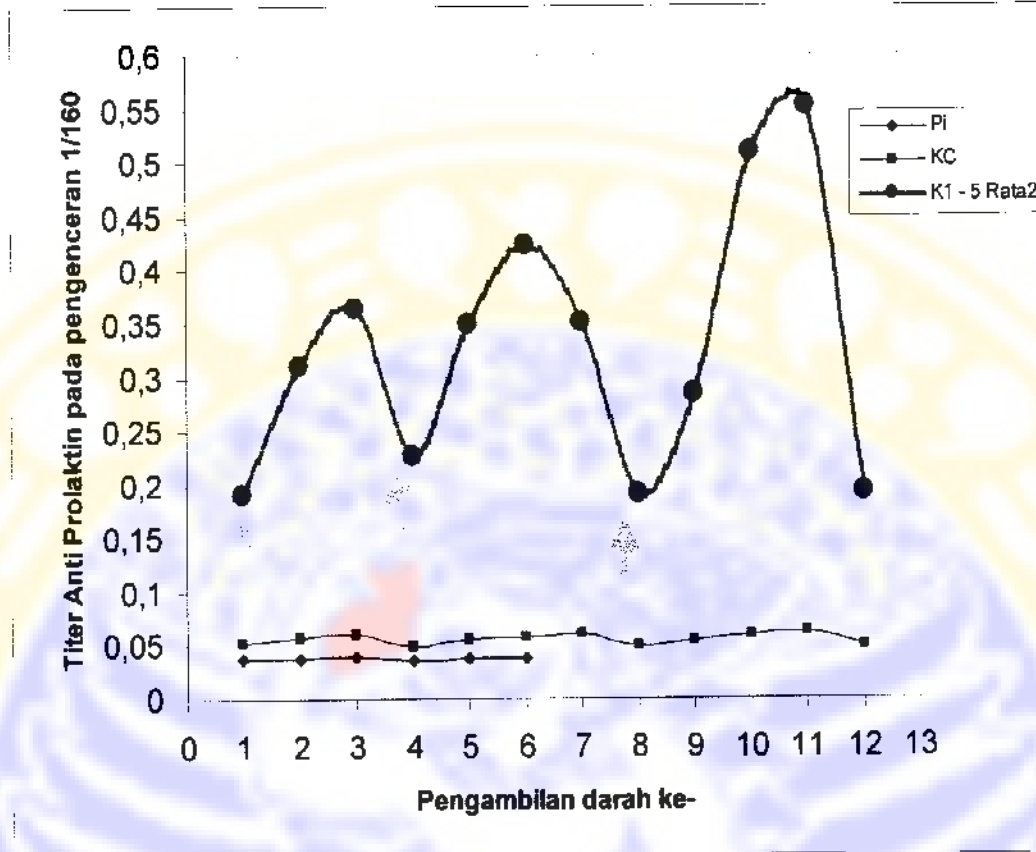
ke-11 setelah penyuntikan isolat prolaktin dalam pelarut CFA dan IFA ke-1, IFA ke-2 serta IFA ke-3.

Tabel 5.7. Titer Abpo- α Prol pengenceran 1/160 dari 12 X *bleeding* pada Kambing

Bleeding ke-	Pi (K1-6)	KC	K1	K2	K3	K4	K5	K1-5 Rata2
1	0,037	0,053	0,192	0,193	0,191	0,194	0,190	0,192 \pm 0,001
2	0,038	0,058	0,311	0,313	0,310	0,312	0,309	0,311 \pm 0,001
3	0,039	0,061	0,365	0,365	0,364	0,366	0,362	0,364 \pm 0,001
4	0,036	0,049	0,188	0,189	0,187	0,290	0,286	0,228 \pm 0,005
5	0,038	0,055	0,350	0,352	0,348	0,351	0,349	0,350 \pm 0,001
6	0,038	0,058	0,425	0,426	0,421	0,424	0,421	0,423 \pm 0,002
7		0,061	0,352	0,354	0,352	0,353	0,351	0,352 \pm 0,001
8		0,049	0,192	0,194	0,191	0,193	0,192	0,192 \pm 0,001
9		0,054	0,284	0,286	0,283	0,285	0,282	0,284 \pm 0,001
10		0,059	0,510	0,512	0,509	0,511	0,508	0,510 \pm 0,001
11		0,062	0,552	0,554	0,551	0,553	0,550	0,552 \pm 0,001
12		0,049	0,192	0,195	0,193	0,194	0,191	0,193 \pm 0,001

Keterangan : Pi : Pre imun
 KC : Kambing Kontrol
 K1 – 5 : Kambing nomor 1-5

Rataan titer Abpo- α Prol pada pengenceran 1/160 dari kambing perlakuan dan kambing kontrol pada *bleeding* ke-1 sampai ke-12 dapat ditunjukkan pada gambar 5.9.



Keterangan :

- Pi : dilakukan *booster* Isolat Prolaktin dalam IFA
- Pi : Pre imun (bleeding pada ke-6 ekor kambing sebelum dilakukan imunisasi)
- KC :Kambing Kontrol (hanya diimunisasi PBS dalam CFA dan IFA)
- K1-5 Rata2 : Rata-rata titer Abpo- α Prol dari ke-5 ekor Kambing yang diimunisasi isolat prolaktin dalam CFA dan IFA

Gambar 5.9. Profil Abpo- α Prol yang diproduksi pada kambing dari isolat prolaktin

5.1.3.3. Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda *Biuret*

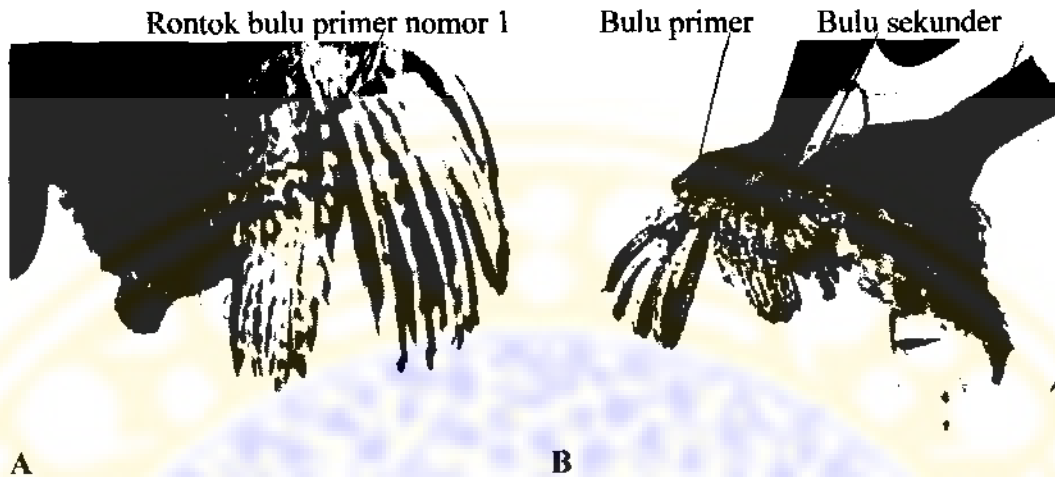
Pengukuran kadar total protein dari Abpo- α Prol dilakukan pada *bleeding* yang menghasilkan titer antibodi puncak, yaitu *bleeding* ke-3, 6, 10 dan 11 (gambar 5.9.). Hasil pengukuran kadar protein Abpo- α Prol dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5. 8. Kadar Total Protein dari Abpo- α P dengan metoda *Biuret*.

Bleeding ke-	Kambing nomor	Volume Serum (ml)	Konsentrasi (ppm)	Kadar Total Protein (mg /ml)
3	1	10	1954	1994
	2	11,5	1998	1998
	3	11	1858	1808
	4	11	1975	1875
	5	10,5	1830	1930
6	1	10	2794	2794
	2	11	2930	2930
	3	9,5	2850	2850
	4	11	2930	2930
	5	10	2930	2930
10	1	11	2050	2050
	2	11,5	2130	2130
	3	10	2028	2028
	4	11	2130	2130
	5	10,5	2138	2138
11	1	10	1872	1872
	2	11,5	1974	1974
	3	11	1894	1894
	4	11,5	1976	1976
	5	11	1958	1958

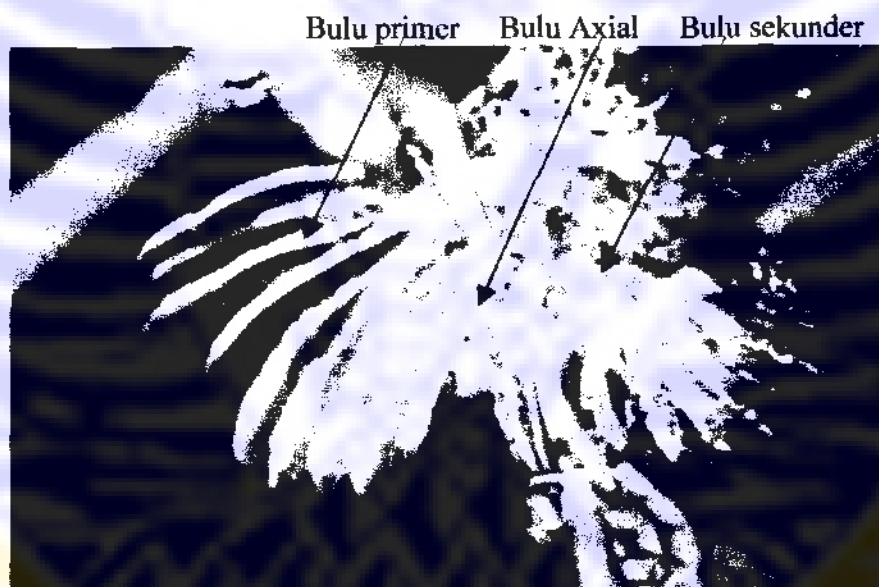
5.1.4. Penelitian 4 : *Challenge test* dari Antibodi Poliklonal Anti-Prolaktin (Abpo- α Prol) pada Ayam Arab Fase *Moulting*.

Penelitian keempat dilakukan melalui *challenge test* untuk membuktikan hipotesis bahwa Abpo- α Prol mampu menghambat proses *moulting* dan mempengaruhi kecepatan mulai bertelur. Keberhasilan *challenge test* dari Abpo- α Prol dalam menetralkan fungsi prolaktin pada ayam arab yang memasuki fase *moulting* dapat dilihat dari kemampuan Abpo- α Prol dalam menghentikan fase *moulting* yaitu bulu di daerah sayap (primer, sekunder dan axial) tidak lagi rontok sampai tumbuh bulu lengkap di daerah tersebut dan kecepatan mulai bertelur dilihat dari tumbuh bulu di daerah sayap secara lengkap sampai ayam memproduksi telur kembali. Gambar bulu sayap ayam yang mengalami *moulting* dan bulu ayam yang tumbuh lengkap berturut-turut dapat dilihat pada gambar 5. 10. dan 5. 11.



Gambar 5.10. Bulu ayam pada fase *moulting*

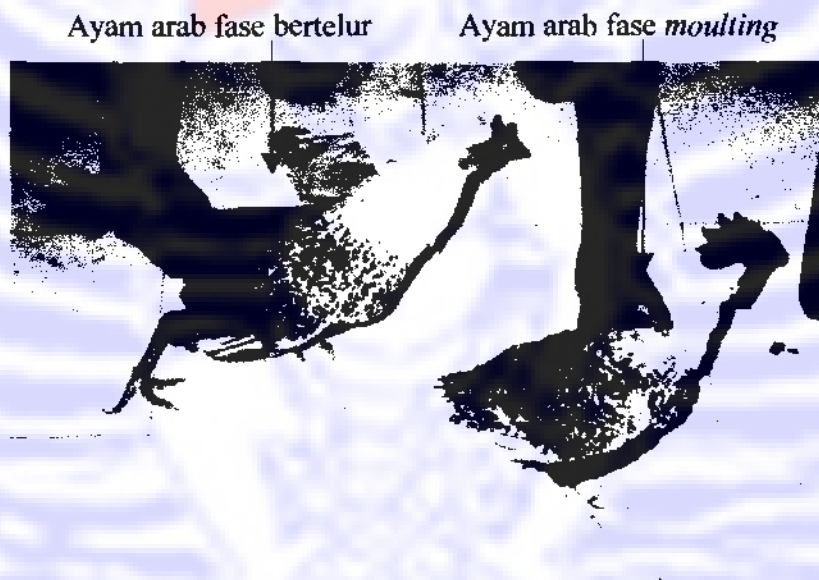
- A.** Fase *moulting* awal : ditandai rontok satu helai bulu primer yang nomor 1
B. Fase *moulting* pada minggu ke-4 : ditandai : bulu primer : rontok no 1,2,3 & 4,
 bulu sekunder : rontok no 2, 3 & 10 -14



Gambar 5.11. Bulu ayam yang tumbuh lengkap

5.1.4.1. Kemampuan Abpo- α Prol Menghambat Proses *Moult*ing

Pengamatan berhentinya fase *moult*ing dilakukan setiap hari mulai dari dilakukannya imunisasi pasif secara *intra muscular* di daerah dada yaitu pada saat rontoknya bulu primer nomor 1 dari sayap sampai tumbuh bulu lengkap dari sayap (primer, sekunder dan axial). Perbandingan antara ayam yang sudah memasuki fase bertelur setelah diimunisasi pasif Abpo- α Prol dengan dosis 200 μ g/ml dengan ayam yang masih mengalami fase *moult*ing (ayam kontrol yang hanya disuntik PBS) pada hari ke-7, dapat dilihat pada gambar 5.12.

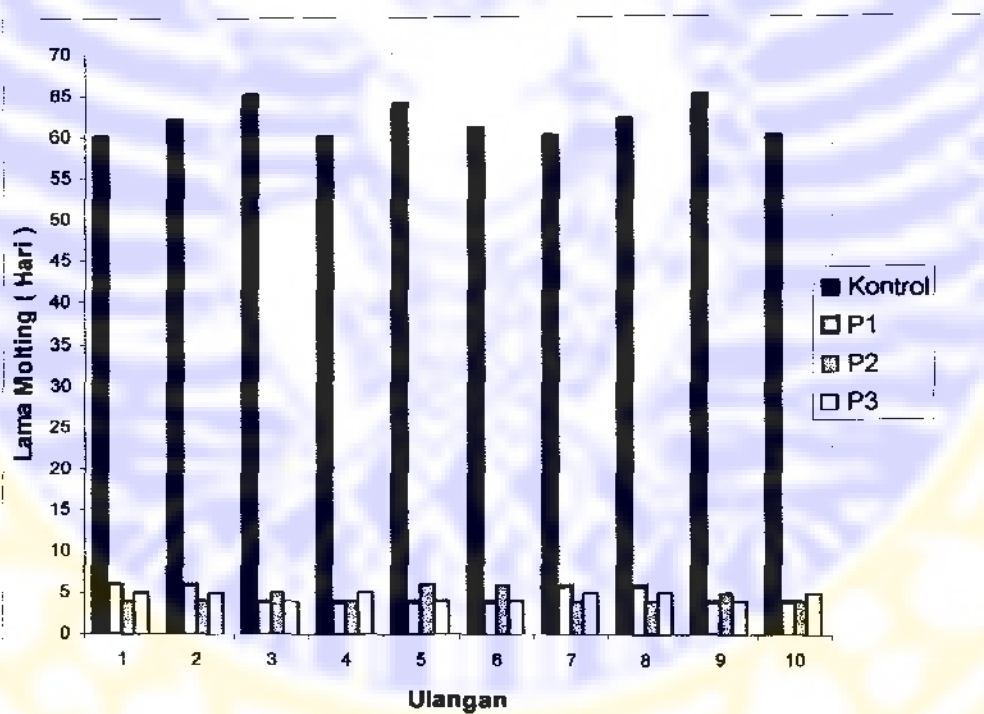


Gambar 5. 12. Perbandingan ayam arab fase bertelur dan fase *moult*ing.

Lama *moult*ing dapat dilihat pada tabel 5.9. dan gambarannya berdasarkan perbedaan pemberian Abpo- α Prol pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.13. di bawah ini:

Tabel 5.9. Lama moulting (hari) yaitu dihitung dari rontok 1 helai bulu primer nomor satu dari sayap sampai tumbuh bulu lengkap di daerah sayap

Ulangan Ayam Dorab nomor	Perlakuan			
	Kontrol (PBS)	P1(50 μ g/ml) Abpo- α Prol	P2(100 μ g/ml) Abpo- α Prol	P3(200 μ g/ml) Abpo- α Prol
1	60	6	4	5
2	62	6	4	5
3	65	4	5	4
4	60	4	4	5
5	64	4	6	4
6	61	4	6	4
7	60	6	4	5
8	62	6	4	5
9	65	4	5	4
10	60	4	4	5
Rentangan	60-65	4-6	4-6	4-5
Jumlah	619	48	46	46
Rataan	61,9 \pm 2,079	4,8 \pm 1,033	4,6 \pm 0,843	4,6 \pm 0,516



Keterangan : Kontrol : imunisasi pasif dengan PBS (Phosphat Buffer Saline)
 P1 : 50 μ g/ml Abpo- α Prol
 P2 : 100 μ g/ml Abpo- α Prol
 P3 : 200 μ g/ml Abpo- α Prol

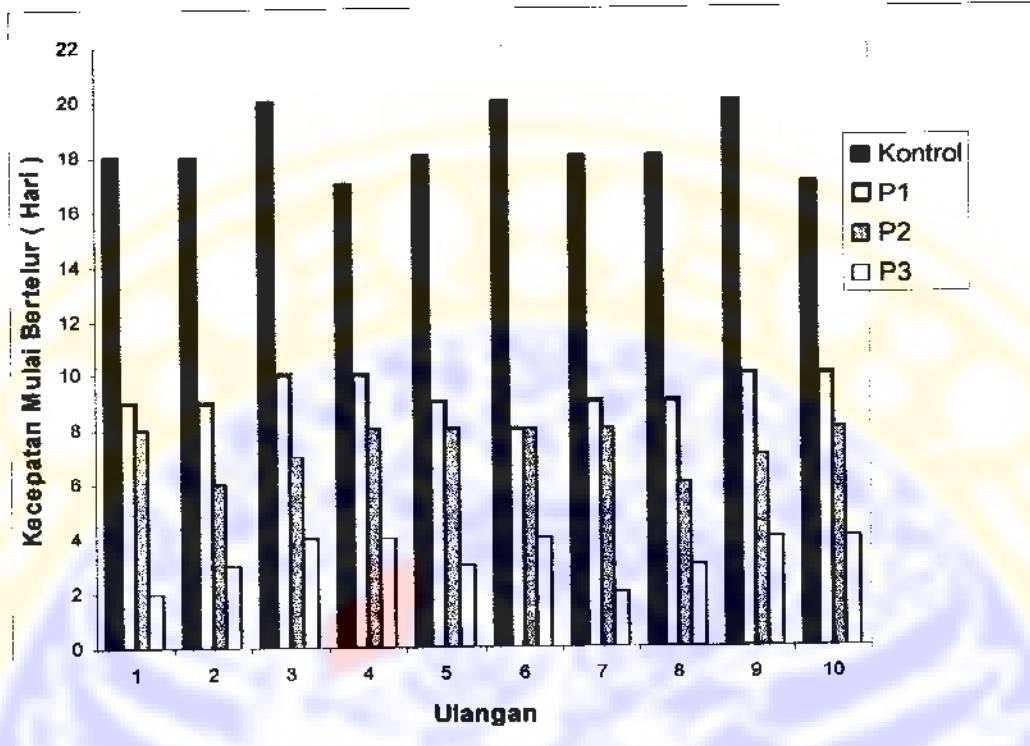
Gambar 5. 13. Diagram batang lama *moulting* (hari) pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunisasi pasif Abpo- α Prol.

5.1.4.2. Kemampuan Abpo- α Prol Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur

Pengamatan kecepatan mulai bertelur dilakukan setiap hari setelah fase *moult*ing dihambat (setelah bulu di daerah sayap tumbuh secara lengkap) sampai ayam mulai bertelur. Kecepatan mulai bertelur dapat dilihat pada tabel 5.10. dan gambarannya berdasarkan perbedaan dosis Abpo- α Prol pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan seperti terlihat pada gambar 5.14.

Tabel 5.10. Kecepatan Mulai Bertelur (hari) dihitung dari fase *moult*ing yang dihambat setelah bulu sayap tumbuh lengkap sampai ayam mulai bertelur

Ulangan Ayam Dorab nomor	Perlakuan			
	Kontrol (0,5 ml PBS)	P1(50 μ g/ml) Abpo- α Prol	P2(100 μ g/ml) Abpo- α Prol	P3(200 μ g/ml) Abpo- α Prol
1	18	9	8	2
2	18	9	6	3
3	20	10	7	4
4	17	10	8	4
5	18	9	8	3
6	20	8	8	4
7	18	9	8	2
8	18	9	6	3
9	20	10	7	4
10	17	10	8	4
Rentangan	17-20	8-10	6-8	2-4
Jumlah	184	93	74	33
Rataan	18,4 \pm 1,174	9,3 \pm 0,675	7,4 \pm 0,843	3,3 \pm 0,823



Keterangan : Kontrol: immunisasi pasif dengan PBS (Phosphat Buffer Saline)

P1 : 50 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol

P2 : 100 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol

P3 : 200 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol

Gambar 5. 14. Diagram batang kecepatan mulai bertelur (hari) pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunisasi pasif Abpo- α Prol.

5. 2. Analisis Hasil Penelitian

5.2.1. Analisis Statistik Profil Abpo- α Prol-1 Hasil Induksi Prolaktin (Sigma L-6520) pada Kelinci jantan

Berdasarkan uji statistik dengan *ANOVA (Analysis of Variant)* (lampiran 7) ternyata terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) diantara perlakuan, dengan demikian waktu pengambilan darah (*bleeding ke-*) pada kelinci dapat mempengaruhi besarnya titer Abpo- α Prol-1 yang diperoleh setelah penyuntikan prolaktin, maka selanjutnya diperlukan uji *Student-Newman-Keuls 5%* (SNK) untuk menentukan perlakuan yang paling baik dalam mendapatkan titer Abpo- α Prol-1. Rangkuman ana

lisis varian satu arah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.11.

Tabel 5.11 . Rangkuman analisis varian satu arah terhadap titer Abpo- α Prol-1 antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (*Bleeding ke-*).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	11	1,125	0,102	3,230	,002
Galat	60	1,900	3,166E-02		
Total	71	3,025			

Berdasarkan uji *Student-Newman-Keuls* 5% diperoleh hasil bahwa perlakuan pada *bleeding* ke-10 menghasilkan perbedaan titer Abpo- α Prol-1 dibandingkan waktu *bleeding* ke-1, 4 dan 8. *Bleeding* ke-1, 4 dan 8 tidak berbeda nyata dengan *bleeding* ke-2, 3, 5, 6, 7, 9, 11 dan 12. Data hasil penghitungan rata-rata titer Abpo- α Prol-1 pada *bleeding* ke-1 sampai ke-12 berdasarkan hasil uji SNK 5 % dapat diringkas seperti pada tabel 5.12.

Tabel 5. 12. Rataan titer Abpo- α Prol-1 dari kelinci pengenceran 1/160 pada *bleeding* ke-1 sampai ke-12

Perlakuan (<i>bleeding</i> ke-)	N	Rentangan	Rataa Titer Abpo- α Prol-1
1	6	0,051 - 0,295	0,25200 \pm 0,09848 ^a
2	6	0,057 - 0,355	0,30283 \pm 0,1205 ^{ab}
3	6	0,060 - 0,427	0,36300 \pm 0,14845 ^{ab}
4	6	0,048 - 0,278	0,23233 \pm 0,09043 ^a
5	6	0,054 - 0,423	0,35900 \pm 0,14944 ^{ab}
6	6	0,057 - 0,554	0,46983 \pm 0,20225 ^{ab}
7	6	0,062 - 0,575	0,48767 \pm 0,20854 ^{ab}
8	6	0,050 - 0,295	0,25183 \pm 0,09889 ^a
9	6	0,065 - 0,655	0,55500 \pm 0,240058 ^{ab}
10	6	0,064 - 0,712	0,60250 \pm 0,26381 ^b
11	6	0,062 - 0,655	0,55450 \pm 0,24128 ^{ab}
12	6	0,047 - 0,425	0,36050 \pm 0,15359 ^{ab}

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,01$)

5.2.2. Analisis Statistik Profil Abpo- α Prol Hasil Induksi Isolat Prolaktin pada Kambing jantan

Berdasarkan uji statistik dengan *ANOVA (Analysis of Variant)* (lampiran 8) ternyata terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) diantara perlakuan. Hal tersebut berarti waktu pengambilan darah (*bleeding*) pada kambing dapat mempengaruhi besarnya titer Abpo- α Prol yang diperoleh setelah imunisasi dengan isolat prolaktin, maka selanjutnya diperlukan uji *Student-Newman-Keuls 5% (SNK)* untuk menentukan perlakuan yang paling baik dalam mendapatkan titer Abpo- α Prol. Rangkuman analisis varian satu arah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan seperti terlihat pada tabel 5.13.

Tabel 5.13 . Rangkuman analisis varian satu arah terhadap titer Abpo- α Prol antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (*Bleeding ke-*).

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	11	0,685	6,223E-02	4,207	,000
Galat	60	0,888	1,479E-02		
Total	71	1,572			

Berdasarkan uji *Student-Newman-Keuls 5%* diperoleh hasil bahwa perlakuan *bleeding ke-11* menghasilkan titer Abpo- α Prol yang tertinggi yang tidak berbeda nyata dengan *bleeding ke-10*; *bleeding ke-2,3,5,6,7* dan *9* tidak berbeda nyata dengan *bleeding ke-10*, sedangkan *bleeding ke-1, 4, 8* dan *12* adalah berbeda nyata dengan *bleeding ke-11*. . Data hasil penghitungan rata-rata titer Abpo- α Prol pada *bleeding ke-1* sampai *ke-12* berdasarkan hasil uji *SNK 5%* dapat diringkas seperti pada tabel 5.14.

Tabel 5. 14. Rataan titer Abpo- α Prol dari kambing pengenceran 1/160 pada *bleeding* ke-1 sampai ke-12

Perlakuan (<i>bleeding</i> ke-)	N	Rentangan	Rataa Titer Abpo- α Prol
1	6	0,053 – 0,194	0,16883 \pm 0,05674 ^a
2	6	0,058 – 0,313	0,26883 \pm 0,1033 ^{abc}
3	6	0,061 – 0,366	0,31383 \pm 0,12387 ^{abc}
4	6	0,049 – 0,290	0,19617 \pm 0,08799 ^a
5	6	0,055 – 0,352	0,30083 \pm 0,12044 ^{abc}
6	6	0,058 – 0,426	0,3625 \pm 0,14919 ^{abc}
7	6	0,061 – 0,354	0,30383 \pm 0,11897 ^{abc}
8	6	0,049 – 0,194	0,16850 \pm 0,05855 ^a
9	6	0,054 – 0,286	0,24567 \pm 0,093908 ^{abc}
10	6	0,059 – 0,512	0,43483 \pm 0,18413 ^{bc}
11	6	0,062 – 0,554	0,47033 \pm 0,20005 ^c
12	6	0,049 – 0,195	0,16900 \pm 0,058805 ^a

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,01$)

5.2.3. Analisa Statistik Kemampuan Menghambat Proses *Moulting*

Berdasarkan uji statistik dengan anova satu arah (lampiran 9) ternyata terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan pemberian variasi dosis Abpo- α Prol (tabel 5.15.), maka selanjutnya diperlukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (lampiran 9) untuk menentukan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh terhadap lama *moulting* (paling cepat).

Tabel 5.15. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap lama *moulting* antara kelompok kontrol dan kelompok yang diimmunisasi Abpo- α Prol

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	3	24567,675	8189,225	5145,063	,000
Galat	36	57,300	1,592		
Total	39	24624,975			

Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (lampiran 9) diperoleh hasil bahwa yang paling berpengaruh terhadap lama moulting yang paling cepat adalah kelompok perlakuan dengan immunisasi 200 µg/ml Abpo-αProl (P3) yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan P2 (100 µg/ml Abpo-αProl) dan P1 (50 µg/ml Abpo-αProl), sedangkan kelompok kontrol lama moulting paling lama. Rataan berhentinya *moulting* (hari) yang diperoleh pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang mendapat immunisasi Abpo-αProl dengan dosis 50 µg/ml (P1); 100 µg/ml (P2) dan 200 µg/ml (P3) berturut-turut adalah $61,9 \pm 2,079$; $4,8 \pm 1,033$; $4,6 \pm 0,843$ dan $4,6 \pm 0,516$ (tabel 5.16.).

Tabel 5.16. Rataan Lama *Moulting* (hari) kelompok kontrol dan perlakuan dengan immunisasi Abpo-αProl

Perlakuan	N	Rentangan	Rataan
Kontrol	10	60-65	$61,9 \pm 2,079^a$
P1 (50 µg/ml Abpo-αProl)	10	4-6	$4,8 \pm 1,033^b$
P2 (100 µg/ml Abpo-αProl)	10	4-6	$4,6 \pm 0,843^b$
P3 (200 µg/ml Abpo-αProl)	10	4-5	$4,6 \pm 0,516^b$

Angka dengan superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

5.2.4. Analisa Statistik Kemampuan Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur

Berdasarkan uji statistik dengan anova satu arah (lampiran 10) ternyata terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan pemberian variasi dosis Abpo-αProl (tabel 5.17.), maka selanjutnya diperlukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (lampiran 10) untuk menentukan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh terhadap kecepatan mulai bertelur (paling cepat).

Tabel 5.17. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap kecepatan mulai bertelur antara kelompok kontrol & kelompok yang diimmunisasi Abpo- α Prol.

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	3	1220,600	406,867	505,076	,000
Galat	36	29,00	,806		
Total	39	1249,600			

Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (lampiran 10) diperoleh hasil bahwa yang paling berpengaruh terhadap kecepatan mulai bertelur (paling cepat) dari ayam adalah kelompok perlakuan dengan imunisasi 200 μ g/ml Abpo- α Prol (P3) diikuti perlakuan 2, 1 dan kontrol. Rataan kecepatan mulai bertelur (hari) yang diperoleh pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang mendapat imunisasi pasif Abpo- α Prol dengan dosis 50 μ g/ml (P1); 100 μ g/ml (P2) dan 200 μ g/ml (P3) berturut-turut adalah $18,4 \pm 1,174$; $9,3 \pm 0,675$; $7,4 \pm 0,843$ dan $3,3 \pm 0,823$ (tabel 5.18).

Tabel 5. 18. Rataan Kecepatan Mulai Bertelur (hari) kelompok kontrol dan perlakuan dengan imunisasi Abpo- α Prol

Perlakuan	N	Rentangan	Rataan
Kontrol	10	17 - 20	$18,4 \pm 1,174^a$
P1 (50 μ g/ml Abpo- α Prol)	10	8 - 10	$9,3 \pm 0,675^b$
P2 (100 μ g/ml Abpo- α Prol)	10	6 - 8	$7,4 \pm 0,843^c$
P3 (200 μ g/ml Abpo- α Prol)	10	2 - 4	$3,3 \pm 0,823^d$

Angka dengan superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)



BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat prolaktin dari serum ayam arab fase *moulting* dan membuktikan kemampuan Abpo- α Prol dalam menghambat proses *moulting* serta mempengaruhi kecepatan mulai bertelur.

6.1. Penelitian Pertama

6.1.1. Purifikasi serum darah

Purifikasi protein dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, purifikasi protein dari serum darah ayam arab fase *moulting* pada penelitian ini dilakukan melalui metoda *Saturation Amonium Sulphate* (SAS) 50%. Metoda ini dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan protein prolaktin dari unsur lain yang ada di dalam seluruh serum darah. Produk protein hasil purifikasi tersebut harus masih mempunyai aktivitas biologis. Hasil purifikasi umumnya mempunyai variasi atau kemiripan kualitas protein yang dihasilkan. Hal ini tergantung dari kemampuan menghilangkan kontaminan protein dari metoda yang digunakan. Sebagai akibatnya akan dihasilkan perbedaan dalam ukuran, bentuk, muatan, hidropobisitas, kelarutan dan aktivitas biologis (Aullanni'am, 2004). Oleh karena itu purifikasi protein dari serum penting dilakukan sebelum melakukan karakterisasinya.

Rantam (2003) menyebutkan bahwa konsentrasi amonium sulfat yang tinggi dapat menyebabkan presipitasi protein kompetisi atau melawan terhadap molekul pelarut air. Molekul air mengikat protein melalui gugusan hidrogen yang melindungi protein dalam larutan. Metoda pemurnian protein dengan fraksinasi

amonium sulfat banyak digunakan di laboratorium untuk memisahkan protein dari protein yang berbeda dan juga dengan non protein dari *crude* protein. Amonium sulfat cukup menarik air jauh dari protein, maka protein akan kehilangan air pelindungnya dan keluar dari larutan. Proses ini tanpa banyak merubah struktur protein.

Menurut Voet and Voet (1990), amonium sulfat lebih sering digunakan karena kelarutannya tinggi (3,9 M dalam air 0°C), selain itu amonium sulfat berharga murah dan umumnya tidak mempengaruhi struktur molekul protein, tidak beracun dan cenderung menstabilkan berbagai enzim.

Pada tahap ini garam amonium sulfat ditambahkan dalam serum (protein) dengan disertai pengadukkan pada suhu rendah. Endapan protein yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi dan supernatan yang dihasilkan digunakan untuk proses pemurnian berikutnya. Garam yang tersisa pada endapan protein dipisahkan dengan *dialisis* (Deustcher, 1990).

Proses *dialisis* seperti yang terlihat pada lampiran 1.4., merupakan proses pemisahan molekul yang lebih kecil dari yang lebih besar melalui suatu membran *semipermeable*, membran ini dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil saja tetapi tidak untuk molekul-molekul besar. Membran *dialisis* yang sering digunakan adalah *selofan* yang berukuran 10-100µm. Membran jenis ini sering digunakan untuk memisahkan protein dengan BM lebih besar dari 12.000 Da. Sampel dimasukkan dalam membran *selofan* yang sudah diikat bagian bawah dan atasnya, kemudian kantong *selofan* dimasukkan beaker glass yang berisi bufer. Bahan-bahan dengan berat molekul rendah seperti garam dan beberapa bahan biologis seperti asam amino, koenzim dan karbohidrat dapat dihilangkan dengan

cara dialisis dari makromolekul seperti protein, asam nukleat dan polisakarida. Difusi garam satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga menyebabkan garam terpisah dari protein (Mulder, 1991).

Penghentian proses *dialisis* dilakukan apabila telah tercapai keadaan keseimbangan. Keadaan keseimbangan tercapai pada konsentrasi bahan yang dapat mengalami *dialisis* adalah sama antara di luar dan di dalam kantong *dialisis*. Penggantian terhadap larutan yang berada diluar kantong dilakukan untuk mengurangi konsentrasi yang ada di dalam kantong setelah tercapai keseimbangan dan siklus dapat diulang beberapa kali (Robbyt, 1989).

6.1.2. Karakterisasi molekul prolaktin

Karakterisasi dilakukan dengan tujuan melakukan identifikasi terhadap prolaktin, yaitu berdasarkan BM (berat molekul). Identifikasi molekul prolaktin pada penelitian ini menggunakan metoda SDS-PAGE 12%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rantam (2003), yang menyebutkan bahwa *karakterisasi* protein dari suatu antigen dapat dilakukan dengan beberapa metoda elektroforesis. Salah satu metoda elektroforesis yang digunakan adalah elektroforesis satu dimensi, yaitu SDS-PAGE. PAGE protein dipisahkan secara migrasi melalui matrik dengan elektrik. Matrik mempunyai beberapa fungsi yaitu memisahkan protein sesuai dengan ukuran, bentuk dan muatan listrik.

Metoda SDS-PAGE menggunakan *poliakrilamid* sebagai matrik. Poliakrilamid merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang

mempunyai berat molekul antara 500- 250.000 Da. Pori-pori pada matrik dibentuk oleh rantai *cross-linking linear polyacrilamid* dengan *bis acrylamide*. Ukuran pori-pori berkurang sesuai dengan peningkatan total persentasi *acrylamid* atau peningkatan derajat persentasi konsentrasi campuran dengan *bis acrylamide*. Pembuatan atau pemilihan total konsentrasi *acrylamid* yang tepat akan menentukan pula ukuran yang tepat terhadap ukuran protein yang diinginkan. Semakin tinggi total persentasi *acrylamid* akan menghalangi pergerakan protein ke dalam gel, begitu juga terlalu rendah total persentasi *acrylamid* akan mengakibatkan pergerakan protein menjadi terlalu cepat bergerak melalui gel yang mengakibatkan didapatkan protein spesifik rendah dan tidak sesuai dengan protein yang diinginkan (Goers, 1993).

Elektroforesis protein pada SDS-PAGE, terjadi dalam detergen ionik, yaitu Sodium Dodecyl Sulphonat (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-komplek bermigrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya (Rantam, 2003).

Elektroforesis adalah gerakan partikel (koloid) yang bermuatan listrik melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik. Pergerakan molekul pada suatu medan listrik dipengaruhi oleh ukuran, bentuk, muatan dan sifat biologi dan kimia molekul tersebut. Apabila pemisahan dilakukan dengan kecepatan konstan, gaya yang bekerja pada molekul tersebut merupakan hasil dari besarnya muatan partikel dan voltase listrik yang digunakan. Gerak molekul di dalam suatu medium ditahan oleh adanya koefisien antara molekul dengan medium.

Pergerakan suatu partikel bermuatan pada suatu medan listrik didefinisikan sebagai kecepatan per unit medan listrik. *Elektroforesis* ini dapat digunakan untuk menentukan titik isoelektrik dan berat molekul dari protein. Molekul yang besar, muatannya juga besar, tetapi bila muatan dibuat sama maka mobilitas elektroforesis dari kompleks tergantung ukuran molekul protein dan plot dari berat molekul terhadap mobilitas reaktifnya atau *Retardation factor* (Rf) memberikan garis lurus. Berat molekul protein ditentukan dengan membandingkan mobilitasnya terhadap serangkaian marker protein-protein. (Aulanni'am, 2004).

Hasil SDS-PAGE 12% seperti terlihat pada gambar 5.1. didapatkan pita protein yang diidentifikasi sebagai molekul prolaktin yaitu pada BM 26,36 kDa. BM protein molekul prolaktin diantara spesies sangat bervariasi, pada unggas BM prolaktin dari hasil penelitian Yamamoto and Tanaka (2003); Bedecarrats, *et al.*, (1999) dan March *et al.*, (1999) adalah sekitar 24-27 kDa, oleh karena itu molekul prolaktin dengan BM 26,36 yang teridentifikasi pada penelitian ini adalah sesuai dengan hasil beberapa penelitian di atas.

Sesuai dengan sekuen asam amino prolaktin pada ayam (Keeler *et al.*, 2003 dan PDBSum, 2002) (lampiran 11), bahwa prolaktin ayam tersusun atas 199 asam amino. Prolaktin merupakan protein rantai tunggal dengan 3 jembatan disulfida. Ketiga jembatan disulfida tersebut terletak diantara Cys dan Cys pada asam amino berturut-turut nomor 4 dengan 11; 58 dengan 174 dan 191 dengan 199. Molekul prolaktin ini tidak mengandung residu karbohidrat. Berat molekul protein prolaktin secara perhitungan adalah 26,36 kDa, sedangkan berdasarkan SDS-PAGE mempunyai berat molekul antara 24-29 kDa (perhitungan terlampir

pada lampiran 6.1.). Hasil perhitungan pada penelitian ini sesuai dengan hasil SDS-PAGE (gambar 5.1.), untuk lebih meyakinkan hasil yang didapat, dilakukan uji spesifitas protein metoda *western blotting* dari serum hasil SDS-PAGE tersebut.

6.1.3. Uji Spesifitas Protein Serum Metoda *Western Blotting*.

Serum yang telah diidentifikasi melalui metoda SDS-PAGE pada umumnya mengandung banyak protein yang berbeda dan tidak spesifik, oleh karena itu diperlukan *chemical assay* atau uji spesifitas secara kimiawi untuk mengukur molekul prolaktin sebagai *single* protein spesifik. Salah satu metoda uji spesifitas yang bisa digunakan adalah metoda *western blotting* (Murray *et al.*, 2003; dan Parslow *et al.*, 2001).

Western blotting merupakan teknik untuk mentransfer pita protein, DNA atau RNA dari gel hasil elektroforesis ke matrik membrane (biasanya dipakai nitroselulosa, PVDF atau nilon). Matrik inilah yang mengikat molekul yang ditransfer (Dunbar, 1994; Noel and Krieg, 1993). Penelitian ini menggunakan membrane nitroselulosa sebagai matrik membrane.

Rantam (2003), menyatakan bahwa metoda ini sangat efektif digunakan untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan harus mempunyai spesifikasi tinggi dan mempunyai daya ikat rendah lebih baik dikerjakan dengan imunopresipitasi pada gel agar. Namun demikian protein yang spesifikasinya rendah jika dilakukan denaturasi sebelum dilakukan transfer dengan SDS akan

menyebabkan terjadinya fragmentasi protein, sehingga antibodi mampu mengenali epitop.

Menurut Dunbar (1994), metoda *western blotting* dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi terhadap spesifitas protein dengan antibodinya. Metoda ini merupakan kelanjutan identifikasi protein dengan metoda elektroforesis, karena pelaksanaan metoda ini didahului dengan running gel dengan SDS-PAGE yang dilanjutkan transfer protein pada membrane nitrocellulose.

Menurut Rantam (2003), antibodi poliklonal sering digunakan untuk *blotting*, karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen. Antibodi poliklonal mengandung antibodi yang nonspesifik berikatan dengan antigen yang tidak spesifik yang merupakan bagian dari *microbial*, oleh karena itu perlu dilakukan purifikasi terlebih dahulu. Antibodi monoklonal sangat spesifik terhadap antigen, tetapi mempunyai daya afinitas rendah (Murray et al., 2003 dan Parslow et al., 2001). Penelitian ini menggunakan antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol-1) yang telah dipurifikasi dengan metoda SAS 50% untuk mendapatkan IgG yang spesifik.

Uji spesifitas pada penelitian ini digunakan serum ayam arab fase *moulting* yang telah diidentifikasi melalui metoda SDS-PAGE (sebagai antigen yang akan diuji) dengan antibodi poliklonal (Abpo- α Prol-1) yang diproduksi pada kelinci. Gambar 5.2. menunjukkan bahwa antibodi poliklonal (Abpo- α Prol-1) menghasilkan respon positif terhadap serum hasil SDS-PAGE yang diduga mengandung prolaktin dengan BM 26,36 kDa. Hasil *western blotting* ini mengindikasikan bahwa molekul prolaktin berikatan secara spesifik dengan Abpo- α Prol-1 pada pita protein. Antibodi secara spesifik mengenali respectif

protein yang bertindak sebagai imunogen dan tidak bereaksi silang dengan protein kontrol. Abpo- α Prol-1 dapat mendeteksi protein prolaktin sebagai suatu pita dengan berat molekul 26,36 kDa (Murray *et al.*, 2003).

Berdasarkan hasil uji spesifitas dengan metoda *western blotting* antara serum yang teridentifikasi melalui SDS-PAGE yang diduga mengandung prolaktin (sebagai antigen) direaksikan dengan Abpo- α Prol-1 menunjukkan adanya reaksi positif dengan munculnya pita pada BM yang sama dibandingkan dengan kontrol yang tidak memunculkan pita (gambar 5.2.). Oleh karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE 12% adalah pita molekul prolaktin (gambar 5.1.) dengan berat molekul 26,36 kDa.

6.1.4. Isolasi dan Purifikasi Prolaktin Metoda ELUSI.

Setelah diyakini bahwa protein dapat diidentifikasi dengan metoda SDS-PAGE 12% kemudian dilakukan uji spesifitas protein prolaktin maka penelitian dilanjutkan untuk mendapatkan isolat prolaktin sesuai dengan sifat-sifatnya. Isolat prolaktin tersebut didapatkan dengan cara *isolasi* dan *purifikasi* dengan metoda *ElektroELUSI* (gambar 5.3.).

Hasil dari *isolasi* dan *purifikasi* pada penelitian ini berupa prolaktin murni dengan BM 26,36 kDa. Isolat prolaktin ini nantinya akan digunakan sebagai induksi terbentuknya anti prolaktin. Anti prolaktin yang diproduksi pada penelitian berikutnya, pada akhirnya akan digunakan sebagai *challenge test* untuk membuktikan kemampuannya menghambat proses *moulting*.

6.1.5. Uji *Spesifitas* Protein Isolat Prolaktin Metoda *Western Blotting*.

Uji spesifitas dilakukan terhadap isolat prolaktin sehingga dapat dipastikan bahwa isolat yang didapatkan adalah benar-benar mengandung molekul prolaktin yang dimaksud.

Uji *spesifitas* ini menggunakan isolat prolaktin (sebagai antigen yang akan diuji) dengan Abpo- α Prol-1 dari kelinci dan Abpo- α Prol dari kambing (sebagai antibodi), melalui metoda *western blotting* (gambar 5.4. dan 5.5.). Gambar tersebut memperjelas bahwa Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol dapat menimbulkan respon terhadap isolat prolaktin yang mempunyai BM 26,36 kDa. Hal ini sesuai pendapat Aulanni'am (2003), bahwa antibodi yang ditimbulkan terhadap peptida-peptida yang terdapat pada isolat prolaktin adalah sebagai akibat dari *conserved epitope* atau *chicken spesifik prolaktin epitope*. Hasil *western blotting* ini mengindikasikan bahwa molekul prolaktin berikatan secara spesifik dengan Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol pada pita protein (tanda panah, pada gambar 5.4. dan 5.5.) Antibodi secara spesifik mengenali protein (isolat prolaktin) yang bertindak sebagai imunogen dan tidak bereaksi silang dengan protein kontrol.

Berdasarkan hasil uji spesifitas dengan metoda *western blotting* pada gambar 5.5. antara isolat prolaktin dengan Abpo- α Prol-1 menunjukkan adanya reaksi positif dibandingkan kontrol, sehingga dapat diyakini bahwa data titer IgG yang terukur pada metoda *ELISA Indirect* pada penelitian ketiga (gambar 5.9) adalah respon dari isolat prolaktin.

Gambar 5.9. menunjukkan adanya perbedaan titer Abpo- α Prol dari hewan coba kambing lokal jantan yang mendapat imunisasi dengan isolat prolaktin dibandingkan dengan serum preimun ataupun serum kontrol. Nilai titer serum pre

imun dan kontrol tampak berupa garis datar dengan nilai absorbansi 0,036 untuk pre imun dan 0,049 – 0,062 untuk kontrol, sedangkan titer Abpo- α Prol lebih tinggi dari serum preimun dan serum kontrol.

6.1.6. Kadar Total Protein Isolat Prolaktin Metoda *Biuret*.

Pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin ditentukan dengan metoda biuret, yaitu suatu metoda yang didasarkan pada pembentukan kompleks yang berwarna ungu. Kompleks ini terbentuk apabila suatu protein yang mempunyai empat atom nitrogen yang berasal dari asam amino berikatan dengan Cu^{2+} dari CuSO_4 (Aulanni'am, 2003).

Walker (1994) menjelaskan bagaimana berlangsungnya reaksi biuret, sebagai berikut: Kupri sulfat dalam suasana basa dapat bereaksi positif dengan protein, karena itu larutan yang akan diuji terlebih dahulu dibuat bersifat alkalis, dengan penambahan NaOH dalam reagent biuret. Kupri sulfat dalam suasana basa bereaksi dengan senyawa yang mengandung 2 atau lebih ikatan peptida menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna ungu. Intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada banyaknya ikatan peptida yang terdapat dalam protein. Hal ini sebanding dengan jumlah molekul protein total yang ada pada molekul prolaktin sampel. Semakin banyak jumlah protein dalam sampel maka intensitas warna semakin besar karena adanya sejumlah ikatan peptida dalam sampel.

Pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin dalam penelitian ini ditujukan untuk penentuan dosis yang akan digunakan untuk produksi Abpo- α Prol pada kambing. Setelah hasil pengukuran kadar total protein dari isolat prolaktin didapatkan (tabel 5.1.), Selanjutnya dipilih dosis untuk produksi Abpo-

α Prol dengan kadar total protein 350 μ g/ml. Dosis 350 μ g/ml isolat prolaktin tersebut diberikan untuk setiap kali imunisasi per ekor kambing.

6.2. Penelitian 2 dan 3

6.2.1. Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci dan Abpo- α Prol pada Kambing

Prolaktin termasuk salah satu hormon reproduksi yang dihasilkan oleh hipofisa anterior. Berdasarkan struktur kimianya, hormon-hormon reproduksi dibagi menjadi tiga katagori, yaitu golongan protein, golongan steroid dan golongan asam lemak. Hormon prolaktin termasuk golongan hormon protein. Hormon protein termasuk juga peptida, polypeptida dan glycoprotein yang mempunyai berat molekul besar yaitu antara 300-700.000 Dalton (Ismudiono, 1999).

Protein secara alami bersifat imunogenik, karena senyawa ini mempunyai berat molekul yang tinggi sehingga dapat merangsang sistem imun untuk memproduksi antibodi terhadap molekul tersebut. Substansi tersebut dinamakan imunogen, yaitu suatu substansi yang dapat bereaksi dengan antibodi yang diproduksi (Entwistle and Ridd, 1995). Kemampuan untuk menghasilkan respon imun terdapat pada organ-organ limforetikuler yang letaknya tersebar diseluruh tubuh seperti sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, timus, sistem saluran napas dan saluran pencernaan (Cormack, 1994 dan Harlow and Lane, 1988).

Menurut Kresno (1996), hampir semua molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, hormon, asam nukleat dan protein dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik yang mampu merangsang aktifasi limfosit yang diperlukan untuk mengawali respon imun.

Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul polisakarida, polipeptida atau protein.

Imunogenesitas suatu substansi ditentukan oleh beberapa faktor penting, diantaranya yaitu : molekul substansi tersebut harus berukuran cukup besar, walaupun belum diketahui batas ukuran molekul yang menentukan imunogenitas. Substansi dapat dikatakan bersifat imunogen jika mempunyai berat molekul lebih dari 10.000 Dalton (Abbas *et al.*, 2000 dan Goodman, 1991).

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

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

Antibodi atau imunoglobulin adalah struktur yang berhubungan dengan glikoprotein diproduksi oleh limfosit B yang berfungsi sebagai moderator spesifik imunitas humoral. Semua antibodi umumnya mempunyai dua struktur rantai ringan (*Light chain*) dan dua struktur rantai berat (*heavy chain*) yang identik serta

dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan disulfida (Noris dan Varma, 1992; Abbas *et al.*, 2000; Crighton, 1984). Struktur imunoglobulin terdiri dari fragmen ab (*Fab*) dan fragmen c (*Fc*) kedua fragmen ini dirangkai oleh untaian dua sulfida (s-s). Bagian yang terdiri dari asam amino yang bertugas untuk mengikat antigen dikenal dengan *side binding* antigen, sedang *Fc* terdiri dari karbohidrat yang sering berikatan dengan komplemen (Rantam 2003).

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

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

Prolaktin yang terdapat dalam serum darah ayam arab fase *moulting* adalah termasuk hormon protein. Hormon protein mempunyai berat molekul yang lebih besar dari 10.000 Dalton yaitu antara 24.000-27.000 Dalton sehingga bersifat imunogen. Dengan demikian Prolaktin dapat menginduksi timbulnya antibodi terhadap Prolaktin (Fitzgerald, 2004; Agrisera, 2004; Upstate, 2002).

Langkah awal dalam pembentukan antibodi adalah terjadinya fagositosis antigen oleh makrofag. Makrofag ini memberikan antigen kepada sel-sel B dan sel-sel T pembantu. Sel-sel B yang membawa imunoglobulin pada permukaannya

yang cocok dengan antigen, dirangsang untuk berproliferasi, membentuk klon dan berdiferensiasi menjadi sel-sel plasma. Sel plasma mensintesis protein antibodi (Vilk, 1992 dan Jawetz *et al.*, 1991).

Tempat dan cara masuknya antigen dalam tubuh turut menentukan jenis respon yang dihasilkan dan hal ini tergantung pula pada jenis *Antigen Presenting Cells* (APC). Antigen yang masuk ke dalam sel akan ditangkap oleh makrofag atau sel-sel APC, kemudian masuk ke dalam sel dengan cara endositosis atau pinositosis. Antigen diproses dengan berbagai cara di dalam sel, diantaranya denaturasi atau proteolisis yang terjadi di dalam endosom. Fragmen-fragmen antigen yang terdiri dari rantai peptida dan bersifat hidrofobik dipresentasikan pada permukaan sel bersama-sama dengan *major histocompatibility complex* (MHC).

Penentuan munculnya antibodi yang diharapkan, memerlukan teknik seleksi yang cepat, sederhana dan hasilnya tidak meragukan, untuk itu uji ELISA *indirect* digunakan dalam mendeteksi titer antibodi pada penelitian ini. Interpretasi hasil ELISA dapat dilakukan secara kualitatif (visual) ataupun secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Secara semi kuantitatif atau kuantitatif, ELISA dibaca dengan fotometer (ELISA *reader*) dengan berdasarkan pada nilai absorban atau kerapatan optik (*Optical Density/ OD*) (Suwarno, 2000).

Baratawidjaja (2000) menyatakan bahwa apabila antigen masuk ke dalam tubuh untuk pertama kali, maka respon imun yang muncul disebut respon imun primer. Respon imun primer ditandai dengan munculnya Ig M beberapa hari

setelah pemaparan. Saat antara pemaparan antigen dengan munculnya Ig M disebut *lag phase*. Gambar 6.1. menunjukkan kadar Ig M mencapai puncaknya setelah kira-kira 7 hari. Enam sampai tujuh hari setelah pemaparan, dalam serum mulai dapat dideteksi Ig G, sedangkan Ig M mulai berkurang (Baratawidjaja, 2000 dan Kresno, 1996).

6.2.1.1. Produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci

Prolaktin produksi Sigma Aldrich Co nomor seri L-6520 (Sigma 2000) dengan dosis 100 μ g digunakan pada penelitian ini. Perhitungan dosis dari prolaktin dapat dilihat pada lampiran 6.2. Prolaktin dianggap sebagai benda asing yang dimasukkan ke dalam tubuh kelinci dan nantinya akan dihasilkan antibodi yang disebut Abpo- α Prol-1. Hal ini sejalan dengan pendapat, Zymed (2004), Cortex (2003), Progen (2000) dan Kerr and Thorpe (1994), yang melakukan imunisasi hormon protein untuk mendapatkan anti protein dengan satu kali penyuntikan dalam CFA dan tiga kali penyuntikan dalam IFA sebagai booster dengan selang waktu 14 minggu.

OD yang diperoleh dari uji ELISA *indirect* mengindikasikan bahwa perlakuan imunisasi pada kelinci dengan menggunakan prolaktin (Sigma L-6520) dapat menyebabkan terbentuknya Abpo- α Prol-1.

Berdasarkan hasil pemeriksaan titer Abpo- α Prol-1 dengan uji ELISA *indirect* diperoleh data bahwa pada *bleeding* ke-1 setelah *booster* IFA yang pertama semua kelinci (Klc1-5) sudah menampakkan atau menunjukkan titer positif adanya anti prolaktin, yaitu di atas nilai dua kali COV (tabel 5.4).

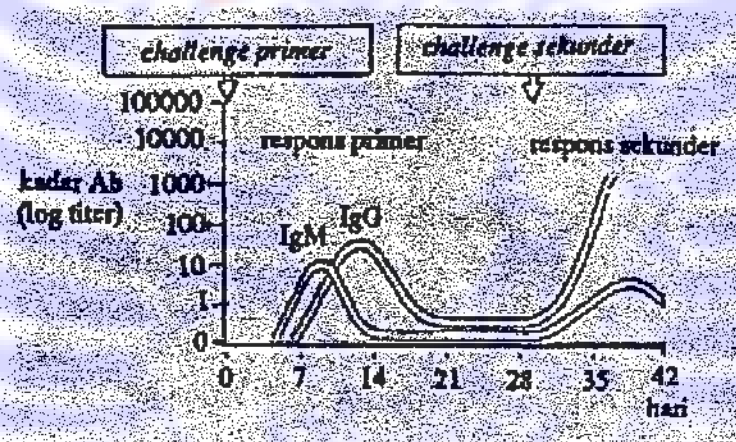
Perlakuan pada *bleeding* ke-10 menghasilkan perbedaan titer Abpo- α Prol-1 yang lebih tinggi dibandingkan waktu *bleeding* ke-1, 4 dan 8. Titer Abpo- α Prol-1 terendah terjadi pada *bleeding* ke-1, 4 dan 8 yang tidak berbeda nyata dengan *bleeding* ke-2, 3, 5, 6, 7, 9, 11 dan 12 (tabel 5.12). Perbedaan perolehan titer ini disebabkan oleh karena adanya perbedaan respon individual dalam menanggapi antigen yang masuk ke dalam tubuh. Hal ini sesuai dengan pendapat Zymed (2004), Smith (1995) dan Kerr and Thorpe (1994) bahwa respon kelinci terhadap antigen sangat bervariasi. Faktor-faktor yang dapat mengoptimalkan respon imun terhadap antigen yang masuk adalah sifat alami imunogen, adjuvan, hewan yang dipilih, cara penyuntikan dan dosis antigen yang diberikan.

Titer Abpo- α Prol-1 pada *bleeding* ke-4 sudah mengalami penurunan. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Kresno (1996), bahwa pembentukan antibodi tidak berlangsung tanpa batas, ada mekanisme kontrol yang mengendalikan dan menghentikan pembentukan antibodi berlebihan. Beberapa diantara mekanisme kontrol itu adalah : berkurangnya kadar antigen, pengaturan oleh idiotip dan penekanan oleh sel T penekan.

Titer Abpo- α Prol-1 meningkat lagi setelah dilakukan *booster* dengan isolat prolaktin dalam IFA kedua (*bleeding* ke-5). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Biosystem (1999) dan Baratawidjaja (2000) yang menyatakan bahwa peningkatan titer antibodi tersebut karena adanya respon sekunder. Respon sekunder yang terbentuk mempunyai beberapa ciri khas yaitu : (1). Pembentukan imunoglobulin berlangsung lebih cepat dan untuk waktu yang lebih lama, (2). Imunoglobulin mencapai titer yang tertinggi, (3). Imunoglobulin terutama terdiri atas IgG (gambar 6.1.).

Setelah titer antibodi dari respon sekunder menurun maka titer tersebut dapat ditingkatkan lagi yang lebih tinggi yaitu setelah diberikan respon sekunder berikutnya dan seterusnya. Hal tersebut dapat terbukti dari penelitian ini, yaitu setelah dilakukan *booster* yang ketiga dengan prolaktin (Sigma L-6520) dalam IFA ketiga (gambar 5.6.).

Menurut Biosystem (1999) dan Baratawidjaja (2000) menyatakan bahwa dengan adanya respon sekunder pertama, kedua dan seterusnya yang diberikan melalui *booster*, sel memory akan dengan cepat berproliferasi untuk membentuk titer antibodi yang lebih tinggi dan lebih lama (gambar 5.6 dan 6.1.).



Gambar 6.1. Respon antibodi sekunder dan primer

6.2.1.2. Produksi Ab α Prol pada Kambing

Isolat prolaktin yang masuk ke dalam tubuh kambing dianggap sebagai benda asing dan nantinya akan merangsang terbentuknya antibodi yang disebut Ab α Prol. Berdasarkan OD yang diperoleh dari uji ELISA *indirect* dapat dinyatakan bahwa imunisasi pada kambing dengan menggunakan isolat prolaktin

dari serum darah ayam arab fase *moulting* dapat menyebabkan terbentuknya Abpo- α Prol (gambar 5.9). Terbentuknya Abpo- α Prol juga didukung dari hasil kontrol positif yang dihasilkan. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini menggunakan prolaktin produksi Sigma (L-6520) yang diimunitasikan pada kelinci yang menghasilkan Abpo- α Prol-1 (gambar 5.6.). Abpo- α Prol-1 yang terbentuk ini juga digunakan untuk uji spesifitas protein pada saat karakterisasi molekul prolaktin pada penelitian tahap I. Hasil pemeriksaan titer Abpo- α Prol dengan uji ELISA *indirect* diperoleh data bahwa pada *bleeding* ke-1 setelah *booster* IFA yang pertama semua kambing (K1-5) sudah menampakkan atau menunjukkan titer positif adanya Abpo- α Prol, yaitu di atas nilai dua kali COV (tabel 5.6)

Perbedaan titer Abpo- α Prol diperoleh pada *bleeding* ke 11 yang tidak berbeda nyata dengan *bleeding* ke-10 (gambar 5.9.). Titer Abpo- α Prol pada *bleeding* ke-11 adalah mempunyai angka rata-rata tertinggi. Titer Abpo- α Prol pada *bleeding* ke-10 tidak berbeda nyata dengan minggu ke 9, 7, 6, 5, 3 dan 2. Titer Abpo- α Prol terendah terjadi pada *bleeding* ke-8 yang tidak berbeda nyata dengan *bleeding* ke-12, 1 dan 4. *Bleeding* ke-1, 4, 8 dan 12 adalah berbeda nyata dengan *bleeding* ke-11. Perbedaan perolehan titer ini disebabkan oleh karena adanya perbedaan respon individual dalam menanggapi antigen yang masuk ke dalam tubuh, sesuai dengan pendapat Smith (1995) dan Kerr and Thrope (1994) bahwa respon kambing sangat bervariasi terhadap antigen.

Menurut Agrisera (2004) dan Biosystem (1999), faktor-faktor yang juga dapat meningkatkan respon imun terhadap antigen yang masuk adalah periode antara imunisasi yang pertama dalam CFA dengan imunisasi *booster* dalam IFA

yang pertama, dan periode antara *booster* dalam IFA yang pertama dengan *booster* dalam IFA berikutnya.

Pemberian *adjuvant* dimaksudkan untuk memperkuat respon timbulnya antibodi, karena antigen yang masuk ke dalam tubuh akan disekresi secara perlahan, tetes demi tetes sehingga mempunyai jangka waktu yang lama dalam tubuh (Tizard, 1988).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada *bleeding* ke-4 titer Abpo- α Prol sudah mengalami penurunan. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Kresno (1996) bahwa pembentukan antibodi tidak berlangsung tanpa batas, ada mekanisme kontrol yang mengendalikan dan menghentikan pembentukan antibodi berlebihan.

Titer antibodi pada *bleeding* ke-5 meningkat lagi setelah dilakukan *booster* dengan isolat prolaktin dalam IFA kedua. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya respon sekunder seperti yang telah dijelaskan pada respon sekunder yang terjadi pada produksi Abpo- α Prol-1 pada kelinci.

Setelah titer antibodi dari respon sekunder menurun maka titer tersebut dapat ditingkatkan lagi yang lebih tinggi yaitu setelah diberikan respon sekunder kedua, ketiga dan seterusnya. Hal tersebut dapat terbukti dari penelitian ini, yaitu setelah dilakukan *booster* yang ketiga dengan isolat prolaktin dalam IFA ketiga (gambar 5.9.)

Setelah terjadi respon imun, sel-sel yang spesifik terhadap antigen bersangkutan bertambah banyak, dan sel-sel efektor bereaksi untuk menyingkirkan antigen. Setelah terbentuk antibodi, antigen dihancurkan atau dinetralkan oleh antibodi, sehingga hanya imunosit dengan afinitas reseptor yang

tinggi sajarah yang dapat mengenali antigen, dengan demikian aktivitas imunosit makin lama makin berkurang. Penurunan aktivitas ini, selain diatur oleh penurunan jumlah antigen, juga disebabkan oleh antibodi itu sendiri yang dapat memberikan umpan balik negatif (Kresno, 1996). Jadi suatu saat mekanisme pembentukan antibodi akan menurun setelah diperoleh titer tertinggi.

Menurut Byosistem (1999) dan Baratawidjaja (2000) menyatakan bahwa dengan adanya respon sekunder pertama, kedua dan seterusnya yang diberikan melalui *booster*, sel memori akan dengan cepat berproliferasi untuk membentuk titer antibodi yang lebih tinggi dan lebih lama (gambar 5.9. dan 6.1.).

6.2.2 Kadar Total Protein Abpo- α Prol Metoda *Biuret*

Pengukuran kadar total protein dengan metoda *biuret* dilakukan setelah titer Abpo- α Prol yang diproduksi pada kambing diketahui dari pembacaan ELISA *reader*. Selanjutnya kadar Abpo- α Prol diukur pada *bleeding* yang menghasilkan titer antibodi tertinggi (gambar 5.9. yaitu pada *bleeding* ke-3, 6, 10 dan 11). Hasil pengukuran kadar total protein (tabel 5.8) digunakan sebagai dasar penentuan dosis untuk challenge test. Perhitungan dosis secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 6.3.

6.3. Penelitian 4: *Challenge test* Abpo- α Prol pada Ayam Arab Fase *Moulting* Awal

Challenge test pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui secara jelas kemampuan dalam membatasi masa kerja dari prolaktin. Challenge test dari Abpo- α Prol dapat dilihat dari dihambatnya proses *moulting* dan kecepatan mulai bertelur dari ayam arab fase *moulting*.

6.3.1. Kemampuan Abpo- α Prol Menghambat Proses *Moulting*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan dan kemampuan Abpo- α Prol dalam menetralkan kerja prolaktin dan untuk menentukan peringkat netralisasi optimalnya. Respon terhambatnya *moulting* dilihat dari beberapa hari waktu yang dibutuhkan dari rontoknya satu helai bulu primer nomor 1 dari sayap sampai tumbuh bulu di daerah sayap (bulu primer, sekunder dan axial) secara lengkap.

Lama *moulting* diamati pada ayam yang mendapat imunisasi Abpo- α Prol dengan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ adalah $4,6 \pm 0,516$ hari. Lama *moulting* tersebut ternyata jauh lebih pendek dibanding kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan yang lain, yaitu berturut-turut $61,9 \pm 2,079$ hari (kontrol); $4,8 \pm 1,033$ hari (P1); $4,6 \pm 0,843$ hari (P2). Secara alamiah lama *moulting* (rontok bulu) yang dialami oleh ayam yang memasuki fase *moulting* berkisar 60-75 hari (Darmana dan Sitanggang, 2002; Marhiyanto 2000; Jull, 1982).

Secara statistik menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan dengan imunisasi 200 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol (P3) menempati peringkat netralisasi tertinggi dibanding dengan kelompok kontrol ($P < 0,01$), meski tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P1 (50 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol) dan P2 (100 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- α Prol). Hal ini menunjukkan bahwa Abpo- α Prol pada dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ atau 100 $\mu\text{g/ml}$ ataupun 50 $\mu\text{g/ml}$ mampu menetralkan efek fisiologis dari prolaktin yang ditandai dengan berhentinya kerontokan bulu sayap sampai tumbuh bulu sayap secara lengkap.

Prolaktin merupakan hormon protein yang mempunyai pengaruh antigonadal yang langsung pada gonad atau dengan cara berkompetisi dengan hormon progesteron yang dihasilkan ovarium sehingga menekan pelepasan gonadotropin yang dihasilkan oleh hipofisa anterior (Gan *et al.*, 1987). Aktivitas biologik ini menyebabkan terjadinya regresi ovarium dan ayam memasuki fase *moulting* yang ditandai dengan berhentinya ayam memproduksi telur, terjadinya kerontokkan bulu primer, sekunder dan axial pada daerah sayap (Blakely and Bade, 1998; Indarto, 1989; Jull, 1982).

Amador (2003) menyatakan bahwa kadar prolaktin pada fase *moulting* adalah hampir 4 kali lipat dibandingkan pada fase bertelur, yaitu $1609,8 \pm 18,5$ ng/ml (pada fase *moulting*) dan $433,2 \pm 5,5$ (pada fase bertelur). Target organ dari prolaktin pada unggas betina adalah pada ovarium (Remesh *et al.*, 2001); epitel tembolok, jaringan kulit dan otak (Hardjopranjoto, 2003 dan Ramachandran *et al.*, 2003). Pada ovarium, menurut Ramesh, *et al.* (2001), kadar prolaktin yang tinggi atau *hyperprolactenemia* pada fase *moulting* menyebabkan terjadinya regresi dari ovarium sehingga tidak terjadi pertumbuhan folikel sehingga berakibat tidak terjadi produksi telur.

Fungsi prolaktin pada unggas betina adalah sebagai antigonadal (Antigonadotropik/ regresi ovarium), penghambatan produksi telur dan penurunan suhu rectum (Tachibana *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2000; John and Wentworth, 1998). Fungsi lain pada unggas betina adalah pembentukkan *brooding patch*, produksi susu tembolok, mendorong sifat mengerami telur, menggertak tingkah laku migrasi, efek somatotropin dan mempengaruhi metabolisme lemak (Hardjopranjoto, 2003; Ramachandran *et al.*, 2003; Ramesh *et al.*, 2001)

Antibodi terhadap prolaktin yang terbentuk akan mengadakan perlawanan atau menetralkan terhadap biopotensi prolaktin dan reaksi *moulting* akan dihentikan. Menurut Beckman-Coulter (2001), bahwa *onset of action* dari Abpo- α Prol secara invitro adalah 48 jam. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan kadar prolaktin dalam darah secara cepat. Baratawidjaja (2000), menyatakan bahwa interaksi antara *antigenic determinant* pada permukaan antigen dan antigen *binding site* pada permukaan antibodi dapat menimbulkan salah satu reaksi yaitu: *presipitasi, aglutinasi, aktivasi komplemen* dan *netralisasi*. Penghentian fase *moulting* pada penelitian ini terjadi pada hari ke-4 sampai ke-6 (tabel 5.16.). Hilangnya proses *moulting* dapat dilihat dengan berhentinya ayam merontokkan bulu di daerah sayap sampai tumbuh bulu lengkap di daerah sayap tersebut.

6.3.2. Kemampuan Abpo- α Prol Mempengaruhi Kecepatan Mulai Bertelur

Prolaktin merupakan hormon endogen yang mempunyai efek terjadinya regresi ovarium. Terjadinya regresi ovarium merupakan proses biologis secara alamiah yang ditandai dengan rontoknya bulu primer, sekunder dan axial di daerah sayap dan berhentinya produksi telur selama ± 80 hari (Marhiyanto, 2000; Indarto 1998; Jull, 1982). Ayam petelur termasuk ayam arab yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai sifat alamiah merontokkan bulu dan istirahat bertelur sebanyak 3 kali dalam siklus kehidupannya.

Kecepatan mulai bertelur yang terjadi dalam penelitian ini semakin meningkat sesuai dengan semakin meningkatnya dosis Abpo- α Prol yang diimunisasikan pada ayam arab fase *moulting*. Kecepatan mulai bertelur tercepat

dihasilkan pada kelompok perlakuan yang diimunisasi dengan Abpo- α Prol pada dosis 200 μ g/ml yaitu selama $3,3 \pm 0,823$ hari dan yang terlama pada kelompok kontrol yaitu $18,4 \pm 1,174$ hari, sedangkan pada dosis 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml, kecepatan mulai bertelur berturut-turut adalah $9,3 \pm 0,675$ hari dan $7,4 \pm 0,675$ hari.

Berdasarkan uji statistik, bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) diantara perlakuan terhadap kecepatan mulai bertelur dari ayam. Dosis 200 μ g/ml Abpo- α Prol (P3) merupakan dosis yang paling berpengaruh terhadap kecepatan mulai bertelur dari ayam.

Kecepatan mulai bertelur pada ayam yang hanya diimunisasi dengan PBS memberikan hasil yang paling lama. PBS dalam hal ini tidak mempunyai pengaruh terhadap kerja prolaktin yang ada dalam sirkulasi darah, sehingga proses *moulting* (rontok bulu dan regresi ovarium) tetap dipertahankan dan berlangsung secara alamiah. Pemberian Abpo- α Prol pada saat ayam memasuki fase *moulting* awal, yaitu ditandai dengan rontoknya satu helai bulu primer nomor 1 di daerah sayap, mampu mempercepat terjadinya pertumbuhan dari folikel-folikel ovarium sehingga ayam dapat memproduksi telur kembali dalam waktu yang lebih singkat.

Keberhasilan produksi telur dari seekor ayam ditentukan dari jumlah folikel yang terbentuk dan diovulasikan. Folikel ayam yang tersusun sebagai *hierarki folikuler* tidak akan terbentuk selama kadar prolaktin yang sangat tinggi ada dalam darah. Mekanisme kerja prolaktin dalam meregresikan ovarium adalah secara langsung atau dengan menekan pelepasan gonadotropin yang dihasilkan oleh hipofisa anterior melalui kompetisi dengan hormon progesteron yang dihasilkan oleh ovarium (Gan *et al.*, 1987). Hal ini sesuai dengan pernyataan Cole

and Cups (1977), Knobil (1988) dan Hafez (2000), bahwa proses *moulting* pada ayam di bawah pengaruh sistem hormonal. Hormon gonadotropin seperti FSH dan LH diperlukan untuk perkembangan folikel dan oviposisi telur ayam. Rendahnya kadar FSH dan LH menyebabkan tidak terbentuknya pertumbuhan folikel dan pada akhirnya ayam tidak memproduksi telur.

Pengendalian hormonal pada irama bertelur, jumlah telur yang dihasilkan pada irama bertelur tergantung pada susunan genetik kelenjar hipofisa terutama jumlah gonadotropin yang dihasilkan. Satu hal yang menarik pada bidang reproduksi unggas adalah berkaitan dengan sistem pengendalian pada ayam yang sedang bertelur yang disebut *hierarki folikuler* yaitu gradasi berat dan ukuran folikel. Hanya satu folikel yang terbesar yang menjadi masak dan diovulasikan dalam waktu satu hari. Segera setelah folikel ini pecah, kemudian nomor dua terbesar tumbuh menjadi masak dan diovulasikan dan seterusnya.

Kontrol aliran hormon gonadotropin pada ayam sangat berbeda dibanding dengan mammalia betina. Pada mammalia betina aliran diatur untuk menyediakan gonadotropin cukup hanya menyebabkan masaknya satu folikel. Pada ayam aliran hormon gonadotropin tidak hanya satu folikel yang memiliki ukuran ovulasi pada saat itu tetapi juga untuk mempertahankan keberadaan *hirarki folikuler* (Nalbandov, 1990).

Abpo- α Prol yang diimunisasikan secara pasif akan mengikat dan menetralkan kerja prolaktin yang ada di dalam darah selama ayam istirahat bertelur dan akibatnya ayam akan dapat memproduksi telur kembali lebih cepat dari fase alamiahnya. Ayam mulai memproduksi telur kembali setelah kerontokan bulu berhenti dan tumbuh bulu lengkap. Kecepatan mulai bertelur pada penelitian ini

terjadi pertama kali setelah 2 hari dari tumbuh bulu lengkap dari sayap primer yaitu pada perlakuan P3 (200 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl) yang berbeda sangat nyata baik dengan kontrol ataupun dengan perlakuan P2 (100 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl) dan perlakuan P1 (50 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl).

Kecepatan mulai bertelur dari ketiga perlakuan di atas yang diimunisasi dengan Abpo- αProl yaitu masing-masing P1 (50 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl), P2 (100 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl) dan P3 (200 $\mu\text{g/ml}$ Abpo- αProl) adalah berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kontrol yang hanya diimunisasi PBS. Pemberian PBS disini ternyata tidak berpengaruh terhadap aktivitas ovarium, dalam hal ini ovarium tetap mengalami regresi dan tidak terjadi pertumbuhan folikel selama 60-65 hari lebih 17-20 hari. Kenyataan ini sesuai dengan pernyataan Marhiyanto (2000); Darmana dan Sitanggang (2002) serta Jull (1982), bahwa fase *moulting* sampai ayam memproduksi telur kembali membutuhkan waktu sekitar 80 hari.



BAB 7
PENUTUP

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Dari hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan seperti di bawah ini :

- 7.1.1. Isolat prolaktin dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari serum ayam arab fase *moulting* dengan metoda SDS-PAGE dan ElektroElusi
- 7.1.2. Spesifitas isolat prolaktin dapat ditentukan baik sebelum atau sesudah dilakukan purifikasi dengan metoda *western blotting*.
- 7.1.3. Prolaktin (Sigma L-6520) dapat menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol-1) pada kelinci jantan strain New Zealand.
- 7.1.4. Isolat prolaktin dapat menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal anti prolaktin (Abpo- α Prol) pada kambing lokal jantan.
- 7.1.5. Spesifitas dan sensitivitas Abpo- α Prol dapat ditentukan melalui *dot blotting* dan ELISA *indirect*.
- 7.1.6. Pemberian Abpo- α Prol dengan dosis 50 μ g/ml atau lebih dapat menghambat proses *moulting*.
- 7.1.7. Pemberian Abpo- α Prol dengan dosis 50 μ g/ml atau lebih dapat mempengaruhi kecepatan mulai bertelur.

7.2. Saran

Meskipun telah diketahui bahwa Abpo- α Prol hasil induksi isolat prolaktin dari serum ayam arab fase *moulting* pada kambing lokal jantan mampu menghentikan *moulting* dari ayam arab sehingga fase *moulting* tersebut dapat dihambat melalui netralisasi kerja prolaktin yang ada dalam darah, namun masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut bagaimana profil perubahan kadar prolaktin oleh keberadaan Abpo- α Prol sehingga mampu menetralkan kerja prolaktin. Selain itu juga perlu dilakukan pengamatan pada organ reproduksi ayam setelah diinduksi dengan Abpo- α Prol.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas KA, Liethman AH, Pober JS. 2000. *Antibodies and Antigens. Cellular and molecular immunology*. 4 th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. P. 41-62.
- Agrisera 2004. *Polyclonal Antibody Production Program Distated by Customer's Requirements*. Aves Labs, Inc. <http://www.aveslab.com/service.php4>
- Allen T. 2002 . *Information Resources on Induced Molting in Chicken 1902-2002*. Animal Welfare Information Center. Email: awic@nal.usda.gov <http://www.nal.usda.gov/awic/> Down load : 25 Januari 2004.
- Alodan M.A., and Mashaly M.M., 1999. Effect of Induced Molting in Laying Hens on Production and Immune Parameters. *Education and Production Poultry Science*. 78:171-177. Down load : 27 Januari 2004.
- Amador A.G., 2003. Pituitary Hormones levels in animals. Plasma prolactin in Chickens (*Gallus domesticus*). *J. Reprod Fert*. 2003.; 03:347-60. Down load : 25 Januari 2004.
- Anonimus. 2003. Kampung Petelur Bisnisnya Orang Kota. http://www.ristek.go.id/berita/pojok/pojok_008.htm.p.1-2
- Anonimus. 1999. Arab Countries Chicken Out. http://www.metimes.com/issue99-24/eg_arab_countries_chicken.htm.p.1.
- Anonimus 1996. Prolactin-Fluorescein-Labelled AntiprolactinAb-Anti-fluorescein antibodycoated magnetic particle complex. University of Glasgow. <http://www.waichung-demon.co.uk/webonim/proveh.htm> load:3 Mrt 2004
- Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Cetakan Pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal. 28-45
- Aulanni'am. 2003. *Analisis Antibodi Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida-3 Terdeglikosilasi (bZP3dG) untuk Pengembangan Vaksin Kontrasepsi*. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Aves L. 2004. *Custom Antibody Production Services Research Scale*. Aves Labs, Inc. <http://www.aveslab.com/service.php4> Down load: 27 April 2004
- Avma H.A. 2003 . *The Animal Welfare and Food Safety Issues Associated with the Forced Molting of Laying Birds*. AVMAHurtsAnimals: Vets Without Hcarts. United Poultry Concerns, Inc. UPC.online.org. Down load:20 Pebruari 2004.
- Baratawidjaja, KG. 2000. *Imunologi Dasar*. Ed. 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal. 275-279.

- Barton J., DVM. 2003. Molting. Palm Beach Country Poultry Fanciers Association. Florida. <http://www.metimes.com/issue99-24/eg/chicken.htm>.p. 3.
- Bedecarrats G., Guemene D., Morvan C., Kuhnlein U., Zadworny D. 1999. Quantification of Prolactin Messenger Ribonucleic Acid, Pituitary Content and Plasma Levels of Prolactin and Detection of Immunoreactive Isoform of Prolactin in Pituitaries from Turkey Embryos during Ontogeny. *Biology of Reproduction* 61, 757-763. zadworny@agradm.lan.mcgill.ca. Down load : 2 Maret 2004.
- Bell and Kuney. 2003. Forced Molting of Laying Birds. Poultry Organization. p. 8-10. Poultry.org is an educational effort of Farm Sanctuary. Down load : 2 Maret 2004.
- Beckman-Coulter. 2001. Prolactin Characteristics. www.beckmancoulter.com. Down load : 21 Oktober 2004.
- Blakely J. and Bade D.H. 1998. Ilmu Peternakan. Edisi keempat. Gadjah mada University Press. Yogyakarta. Indonesia. Hal. 537-550.
- Bollengier F., Mahler A.,Matton A and Vanhaelst. 1996. Molekular Heterogeneity and Glycosylation Modulation of Rat Pituitary Prolactin Isoform Synthesized and Secreted in vivo in Postnatal Ontogeny, Gestation, Lactation-Weaning. *Journal of Neuroendocrinology*. Vol 6 Issue 9 Page 721-Sept. <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2826.1996.05178.x> abs/ Down load: 31 Maret 2004.
- Brake J and Thaxton P. 1999. Physiological changes in caged layers during a forced molt. Gross changes in organs. *Poultry Science* 58(3):707-716. Down load : 25 Januari 2004.
- Butcher G.D. and Miles R. 2002. Salmonella Control and Molting of Egg-Laying Flocks-Are They Compatible. University of Florida. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agriculture Sciences. P. 1-3. Down load : 25 Januari 2004.
- Biosystems. 1999. Antibodies: From Design to Assay A Practical Guide. http://www.pebio.com/pa_340913.html#chapt1.htm.Download:11Sept2004
- Chard, T. 1982. An Introduction to RIA and Related Techniques. 2rd ed. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Choy V.J., Nixon A.J. and Pearson A.J. 1997. Distribution of Prolactin Receptor Immunoreactivity in Ovine Skin & Changes during the Wool Follicle Growth Cycle. *J.Endocrinology*;April;155,265-275.Down load:2 Mei 2004
- Cole. H.II and P.T. Cupps. 1977. Reproduction in Domestic Animals. 3rd ed. Academic Press, New York, San Francisco, London.

- Cornack, D.H. HAM Histologi. 1994. Edisi 1994. Edisi kesembilan. Jakarta : Binapura Aksara
- Cortex B., 2003 . Polyclonal Antibodi Anti-Prolactin. Cortex Biochem Purified Biochemicals Purification Nucleic Acid Antibodi. P. 1-2. Chem.com/objects/catalog/product/extran/pdf. Download: 3 April 2004.
- Crighton, D.B. 1984. Immunological Aspect of Reproduction In Animals. Robert Hortnall Ltd. England. P27-28.
- Darmana W. dan M. Sitanggang. 2002. Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis. Meningkatkan Produktivitas Ayam Arab Petelur. Cetakan I. Agro Media Pustaka. Jakarta. H.
- Deutscher, M.P. 1990. Guide to Protein Purification. In Methods in Enzymology. Vol 182. Academic Press Inc. San Diego.
- Dunbar, B.S., 1994. Protein Blotting A Practical Approach. Series Editors: D. Rickwood and B.D. Hames. IRL Press at Oxford University Press. Oxford New York Tokyo. P. 25-27.
- FACT. 2001. Nears Major Food Safety Goal. Chicago IL 60614 (773) 525-4952. PO BOX 14599. info@FACT.cc, www.fact.cc/sec/Main.htm. Down load : 21 April 2004
- Fitzgerald I.I., 2004 . Purified Polyclonal Antibodies. Fitzgerald Industries International, Inc. <http://www.fitzgerald-iii.com/p-p-prolactin-1.shtml>. Down load : 31 Maret 2004.
- Freeman M.E., Kanyieska B., /lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin, Structure, Function and Regulation of Secretion. *Physiol Rev.* Oct;80(4):1523-631. www.physrev.org. Down load : 19 April 2004.
- Gan. S., R. Setiabudy, U. Sjamsudin dan Z.S. Bustami. 1987. Farmakologi dan Terapi. Edisi 3. Gaya Baru, Jakarta.
- Goers J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manual. Academic Press. Harcourt Brace Joanovich. Publisher. London.
- Goodman JW. 1991. Immunogeneity and antigen specificity. Dalam Stites DP and Terr AI (eds) *Basic and Clinical Immunology* 7th ed. Norwalk Connecticut. Appleton and Lange. 101-108.
- Hafez, E.S.E, 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 6th Ed. Philadelphia : Lea & Febiger. P.
- Hardjopranjoto S. 2003. Luteotropic Hormon (LTH). Hand Out Kuliah. Mata Kuliah Endokrinologi Reproduksi. Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi. Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Harlow, E and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Indarto, P. 1989. *Beternak Unggas Berhasil*. Penerbit CV. Armico. Bandung. Hal. 63-69.
- Holt. 2003. *Forced Molting of Laying Birds*. Poultry Organization. p. 10-12. Poultry.org is an educational effort of Farm Sanctuary. Down load : 2 Maret 2004.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 38-42.
- Jawezt, J. L. Melnick and E.A.Adeberg. 1991. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology)*. Edisi 16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 198-205.
- Jabbour H.N. and Kelly P.A., 1997. *Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific Regulation of Prolactin Function*. *Journals of Reproduction and Fertility*; 2, 14-18. Down load : 25 Januari 2004.
- John P.A. and Wentworth B.C. 1998. *Pulsatile Secretion of Prolactin in Laying and Incubating Turkey Hens*. Tektran. Agriculture Research Service. Baltimore Blvd. Bldg. 200. RM. 100, Barceltsville MD 20705. Down load : 25 Januari 2004.
- Jull, M.A. 1982. *Poultry Husbandry*. TMH Edition 1972, Reprinted 1982. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi. 119-149.
- Karnen, G.B. 2001. *Imunology Dasar Edisi 4*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 22-23.
- Keeler, P.S. Dannies, M. E. Hodsdon. 2003. *The Tertiary Structure and Backbone Dynamics of Human Prolactin*. *J.Mol. Biol.* V. 328. 1105. 2003.
- Kerr, M.A. and Thorpe, R. 1994. *Immunochemistry Labfax*. Bios Scientific Publisher. Academic Press. 43-80
- Knobil, E., D. Neill, L.L. Ewing, C.L. Market, G.S. Greenwald and D.W. Pfaff. 1988. *The Physiologi of Reproduction*. Vol. 2. Raven Press, New York. P. 1379-1385.
- Kresno, SB. 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 407-414
- March J.B., Sharp P.J., Wilson P.W. and Sang H.M. 1999. *Effect of Active Immunization Against Recombinant-Derived Chicken Prolactin Fusion Protein on the Onset of Broodiness and Photoinduced Egg Laying in*

- Bantam Hens. *Journal of Reproduction and Fertility*; 101:227-233. Download : 3 April 2004.
- Marhiyanto B. 2000. *Sukses Beternak Ayam Arab*. Cetakan I. Difa Publisher. Indonesia. H. 9-11 & 88-97
- Mulder M. 1991. *Basic Principle of Membran Technology*. Klower Academic Publisher. New York.
- Murray, P.R., Baron E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 th. Ed. ASM Press. Washington DC. P.219-226.
- Noel, M.J.R. and R. Krieg. 1993. *Microbiology Concepts and Application*. MC Grow-Hill. Inc. USA. P. 501-510.
- Norris, J.R. dan A.K. Varma. 1992. *Method In Microbiology Vol 24*. Academic Press Inc. San Diego. P. 101-105.
- Parkhurst R. Carmen and George J. Mountney, 1988. *Poultry Meat and Egg Production*. Chapman dan Hall. New York. London. P. 203-205
- Parslow, T.G., Stites, D.P., Terr, A.I., Imboden, J.B. 2001. *Medical Immunology*. Tenth Edition. Lang Medical Books/ Mc Graw-Hill. Medical Publishing Division. New York Chicago SanFrancisco Lisbon London Madrid Mexico City Milan New Delhi San Juan Singapore Sydney Toronto. P. 227-228
- PDBSum. 2002. *Amino Acid sequence of Prolactin and Disulfide links*. *Reproductive Hormones*. P 1-5. [rephorm.htm](#). Download : 3 April 2004
- Pelezar, M.J., E.C.S. Chan dan M.F. Pelezar. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Poultry. O. 2003. *Forced Molting of Laying. Birds*. Poultry Organization. p. 1-7. [Poultry.org](#) is an educational effort of Farm Sanctuary. Download : 2 Maret 2004.
- Progen G.. 2000 . *Anti-Prolactin, Rabbit Polyclonal*. PROGEN GMBH: *DIAGNOSTIC Research Products Point of Care*. researchproduct@progen.de. Download : 2 April 2004.
- Ramachandran R., Kuenzel WJ., Buntin JD., Proudman JA., 2003. *Distribution of Growth Hormon and Prolaktin Containing Neurons within the Avian Brain*. *Regular Article Biology of Reproduction* 77,315-321. Download : 16 Maret 2004.
- Ramesh R., Kuenzel W.J. and Proudman J.A. 2001. *Increased Proliferative Activity and Programmed Cellular Death in the Turkey Hen Pituitary*

- Suwarno, Ernawati R., Rahardjo AP, Sianita N, Rahmahani J, Rantam FA. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya Hal. 1-10.
- Tachibana T., Saito S., Tomonaga S., Takagi T., Saito E.S., Nakanishi T., Koutoku T., Tsukada A., Ohkubo T., Boswell T., Furuse M., 2003. Effect of Central Administration of Prolactin-Releasing Peptide on Feeding in Chicks. Article in Press. Physiology and Behavior. Elsevier. E-mail:tetsu@brs.kyushu-u.ac.jp. Down load : 23 Januari 2004.
- Turner, C.D dan J.T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum. Cetakan keenam. Airlangga University Press.
- Tizard, I. 1987. Veterinary Immunology An Introduction Third Edition, W.B. Saunders Company, USA. P. 25-47.
- Upstate B. 2002. Anti-Prolactin (Rabbit Antiserum) and Immunoblot Protocol. P. 1-2. Upstate Biotechnology. Certificate of Analysis. www.upstatebiotech.com. Down load : 2 April 2004
- Vilk, W.A. 1992. Basic Microbiology 7Ed. Harper Collins Publisher Inc. USA. P. 276-277.
- Voet D. and Voet J. 1990. Biochemistry. Jhon Willey and Sons Inc. New York.
- Wahab, A.S. dan Noerjati S. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada Press. Yogyakarta. Hal. 45-49.
- Watahiki M, Tanaka M., Masuda N., Sugisaki K., Yamamoto M., Yamakawa M., Nakashima K., 1989. Primary structure of Chicken Pituitary Prolactin deduced from the cDNA sequence. Conserved and Spesifik Amino Acid Residues in the Domains of the Prolactins. J. Biol. Chem. Apr 5;264(10):5535-9. JBC Online. Entrez Pub Med. www.jbc.org. Down load : 29 April 2004.
- Webster A.B. 1999. Commercial Egg Tip-the Induced Molt: A Critical Control Point for Hazard Minimization of Salmonella Enteritidis Contamination of Eggs. Institute of Agriculture and Natural. Poultry News. Winter 1999. P.2-4. <http://ianr.arsil.edu/ianr.asdk/newslet.htm>
- Yamamoto Wakita M., and Tanaka M. 2003. Tissue Distribution of Prolactin Receptor mRNA during Late Stage Embryogenesis of the Chick. Poultry Science 82:155-157. Down load : 29 Januari 2004.
- Zymed L. 2004 . Rabbit anti-PRL-r (S1a). Zymed Laboratories Inc. Email: info@zymed.com Website: www.zymed.com. Down load: 29 April 2004.



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Pembuatan Reagensia

1. Larutan PBS (Phosphat Buffer Saline)

Ditimbang 4,0 g NaCl, 0,1 g KCL, 1,45 g Na₂HPO₄, 0,1 g KH₂PO₄, 0,03 g penicillin, 0,05 g streptomycin dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass 50 ml. Kemudian dituangkan ke labu ukur 500 ml dan diencerkan sampai volume tanda batas.

2. Reagen Biuret

Ditimbang 0,15 g CuSO₄.5H₂O dan 0,6 g NaKC₄O₆.4H₂O, dilarutkan dalam 50 ml akuades, ditambahkan 30 ml NaOH 10%, diaduk dan diencerkan dalam 100 ml akuades steril

3. Larutan Stok BSA 10.000 ppm

Ditimbang 1,00 g BSA, dilarutkan dalam 50 ml akuades, ditambahkan 3 tetes NaOH 3% dan diencerkan dalam 100 ml akuades steril.

4. Larutan APS (Amonium persulfat) 10% (w/V)

Ditimbang 0,5 g ammonium persulfat dan dilarutkan dengan 5 ml akuades, divortex kemudian disimpan pada suhu 4 °C.

5. Larutan Poliakrilamid T-Akriil

Ditimbang 2,92 g akrilamid dan 0,08 g bisakrilamida, dilarutkan dengan 7 ml akuades dengan menggunakan pengaduk magnetic, kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril.

6. Larutan Lower Gel Buffer (pH 7,0)

Ditimbang 1,8200 g Tris dan 0,04 g SDS, dilarutkan dengan 5 ml akuades dan ditambahkan HCl sampai pH 7. Kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril.

7. Running Buffer

Ditimbang 3,03 g Tris, 14,4 g glisin dan 1,0 g SDS, kemudian dilarutkan dalam 1 liter akuades steril.

8. Larutan Running Sampel Buffer (RSB)

Diambil dengan mikropipet 1,0 ml 62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 1,6 ml 10% gliserol, 1,6 ml 2% SDS, 0,4 ml 5% merkaptotanol dan 0,2 ml 0,1% bromofenol blue, kemudian diencerkan dalam 8 ml akuades steril.

9. Penyiapan Larutan Separating Gel 12 % dan Stacking Gel 3%

Tabel L 2.1. Komposisi Larutan Separating Gel 12% (1 plate)

Bahan	12% Volume (µl)
LGB	1300
T-akril	2000
dd H ₂ O	1700
APS 10%	80
TEMED	8

Tabel L 2.2. Komposisi Larutan Stacking Gel 3% (1 plate)

Bahan	12% Volume (µl)
UGB	415
T-akril	267
dd H ₂ O	975
APS 10%	20
TEMED	2

10. Larutan Staining

Ditimbang 0,25 g Comassie Brilliant Blue R-250 ditambahkan 45,4 ml Metanol absolute 9,2 ml asam asetat glacial dan akuades sampai 100 ml.

11. Larutan Destaining

Diambil dengan gelas ukur 7 ml asam asetat glacial dan 7 ml methanol absolute kedalam labu ukur 100 ml dan ditambah akuades sampai tanda batas.

12. Saturated Ammonium Sulfat 50% (SAS 50%)

Ditimbang 31,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dilarutkan dalam akuades sambil diaduk dan dipindahkan dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambah akuades sampai tanda batas.

13. Blocking Bufferg

Ditimbang 2,5 g susu tanpa lemak dan ditambah PBS sampai 50 ml.

14. PBS-Tween 20 0,05%

Dipipet dengan mikropipet 0,05 ml Tween 20 dan ditambah PBS sampai volume 100 ml.

15. Tris Buffered Saline (TBS)

Ditimbang 2,175 g NaCl dan 0,3025 g tris base, dilarutkan dalam 200 ml akuades dan diatur pHnya sampai 7,4. Apabila larutan bersifat basa, ditambah dengan HCl 0,1 N dan apabila larutan bersifat asam, ditambah dengan NaOH 0,1 N. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan akuades sampai volume 1 liter.

16. Pembuatan Pewarna CBB G-250

15 mg Comassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan dalam 10 ml asam perklorat 3,5%, kemudian disaring dengan kertas whatman No.1

17. Tabel L. 3. Komposisi Protein Standar produksi Bio-Rad

No.	Protein	Berat Molekul (kDa)
1	<i>Bovine serum albumin</i>	66
2	<i>Ovalbumin, Chicken Egg</i>	45
3	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, Rabbit Muscle</i>	36
4	<i>Carbonic Anhydrase, Bovine Erythrocytes</i>	29
5	<i>Trypsinogen, Bovine Pancreasee</i>	24
6	<i>Trypsin inhibitor, Soybean</i>	20
7	<i>α-Lactalbumin, Bovine Milk</i>	14,2
8	<i>Aprotinin, Bovine Lung</i>	6,5

LAMPIRAN 2**Lampiran 2.1.** Volume darah dan serum dari 1 x *bleeding* pada ayam arab fase *molting*

Nomor Ayam	Volume Darah (ml)	Volume Serum (ml)
1	8	3,3
2	7,5	3
3	9	3,5
4	7	2,9
5	8,5	3,5
6	7,5	3,1
7	8	3,4
8	9	3,7
9	7	2,8

Lampiran 2.2. Volume darah dan serum kelinci pada 12 kali *bleeding*

<i>Bleeding ke-</i>	Nomor Kelinci	Σ Darah (ml)	Σ Serum (ml)
1	Klc1	2,0	0,4
	Klc2	2,5	0,5
	Klc3	2,5	0,4
	Klc4	3,0	0,6
	Klc5	3,0	0,7
	KC	2,4	0,4
2	Klc1	2,4	0,4
	Klc2	3,0	0,5
	Klc3	3,0	0,7
	Klc4	2,5	0,4
	Klc5	2,4	0,4
	KC	2,5	0,5
3	Klc1	2,0	0,3
	Klc2	2,0	0,4
	Klc3	2,5	0,5
	Klc4	3,0	0,6
	Klc5	2,0	0,4
	KC	2,5	0,3
4	Klc1	2,5	0,4
	Klc2	2,5	0,4
	Klc3	2,0	0,3
	Klc4	2,0	0,4
	Klc5	2,5	0,5
	KC	2,5	0,4
5	Klc1	3,0	0,6
	Klc2	2,0	0,4
	Klc3	2,5	0,5

	Klc4	2,5	0,4
	Klc5	2,5	0,5
	KC	2,4	0,4
6	Klc1	3,0	0,7
	Klc2	3,0	0,7
	Klc3	2,5	0,5
	Klc4	2,5	0,5
	Klc5	3,0	0,6
	KC	2,5	0,5
7	Klc1	2,0	0,3
	Klc2	2,0	0,4
	Klc3	2,4	0,4
	Klc4	2,5	0,4
	Klc5	3,0	0,6
	KC	2,4	0,5
8	Klc1	2,4	0,4
	Klc2	2,4	0,4
	Klc3	2,5	0,6
	Klc4	2,5	0,5
	Klc5	3,2	0,7
	KC	2,4	0,4
9	Klc1	2,5	0,5
	Klc2	2,5	0,4
	Klc3	2,4	0,4
	Klc4	2,4	0,4
	Klc5	2,5	0,5
	KC	2,5	0,4
10	Klc1	2,0	0,3
	Klc2	2,0	0,4
	Klc3	2,5	0,5
	Klc4	2,4	0,4
	Klc5	2,4	0,5
	KC	3,0	0,7
11	Klc1	3,0	0,6
	Klc2	2,5	0,5
	Klc3	2,4	0,4
	Klc4	2,5	0,4
	Klc5	3,0	0,6
	KC	3,0	0,6
12	Klc1	3,0	0,7
	Klc2	3,0	0,6
	Klc3	2,4	0,4
	Klc4	2,5	0,5
	Klc5	2,5	0,5
	KC	2,4	0,4

Keterangan :

Klc1-5 = Kelinci nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

Lampiran 2.3. Volume darah dan serum kambing pada 12 kali *bleeding*

<i>Bleeding ke-</i>	Nomor Kelinci	Σ Darah (ml)	Σ Serum (ml)
1	K1	20	8,0
	K2	22	8,5
	K3	20	8,0
	K4	22	9,0
	K5	20	7,5
	KC	20	8,0
2	K1	20	8,0
	K2	20	8,5
	K3	20	8,0
	K4	22	9,0
	K5	22	8,5
	KC	20	7,5
3	K1	24	10
	K2	25	11,5
	K3	25	11
	K4	25	11
	K5	24	10,5
	KC	25	11
4	K1	20	8,0
	K2	24	10
	K3	24	10,5
	K4	25	11
	K5	20	8,0
	KC	25	11
5	K1	20	8,0
	K2	20	8,5
	K3	22	9,0
	K4	25	11
	K5	25	10,5
	KC	20	8,0
6	K1	25	10
	K2	25	11
	K3	24	9,5
	K4	25	11
	K5	24	10
	KC	24	10
7	K1	25	11,5
	K2	23	10
	K3	25	11
	K4	24	10
	K5	20	7,5
	KC	20	7,5
8	K1	23	9,0
	K2	23	8,5

	K3	20	7,5
	K4	20	8,0
	K5	24	10
	KC	25	10,5
9	K1	20	8,0
	K2	25	11
	K3	23	10
	K4	25	12
	K5	20	8,0
	KC	22	10
10	K1	25	11
	K2	25	11,5
	K3	24	10
	K4	25	11
	K5	24	10,5
	KC	24	10
11	K1	24	10
	K2	25	11,5
	K3	25	11
	K4	25	11,5
	K5	25	11
	KC	24	10
12	K1	20	8,0
	K2	20	8,0
	K3	20	7,5
	K4	22	8,0
	K5	20	8,0
	KC	20	7,5

Keterangan :

K1-5 = Kambing nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

LAMPIRAN 3. Diagram Alur Percobaan

Lampiran 3.1. : Diagram alur Isolasi dan Purifikasi Serum Ayam Arab fase *Moulting*

Lampiran 3.2. : Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE

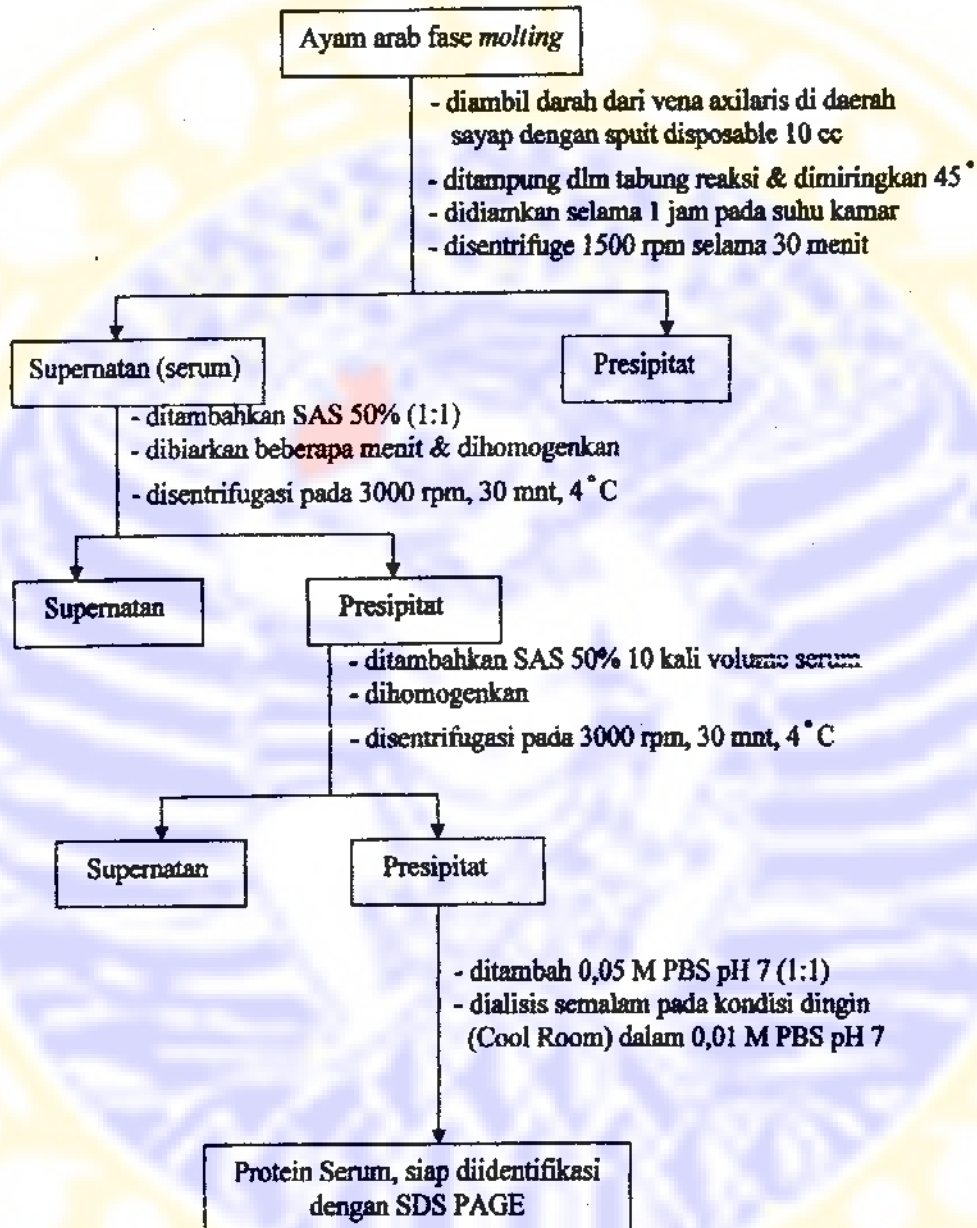
Lampiran 3.3. : Uji *Western Blotting* terhadap Serum dengan Abpo- α Prol-1 dan terhadap Isolat Prolaktin dengan Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol

Lampiran 3.4. : Pengukuran Kadar Total Protein Metoda *Biuret* dari Isolat Prolaktin dan Abpo- α Prol

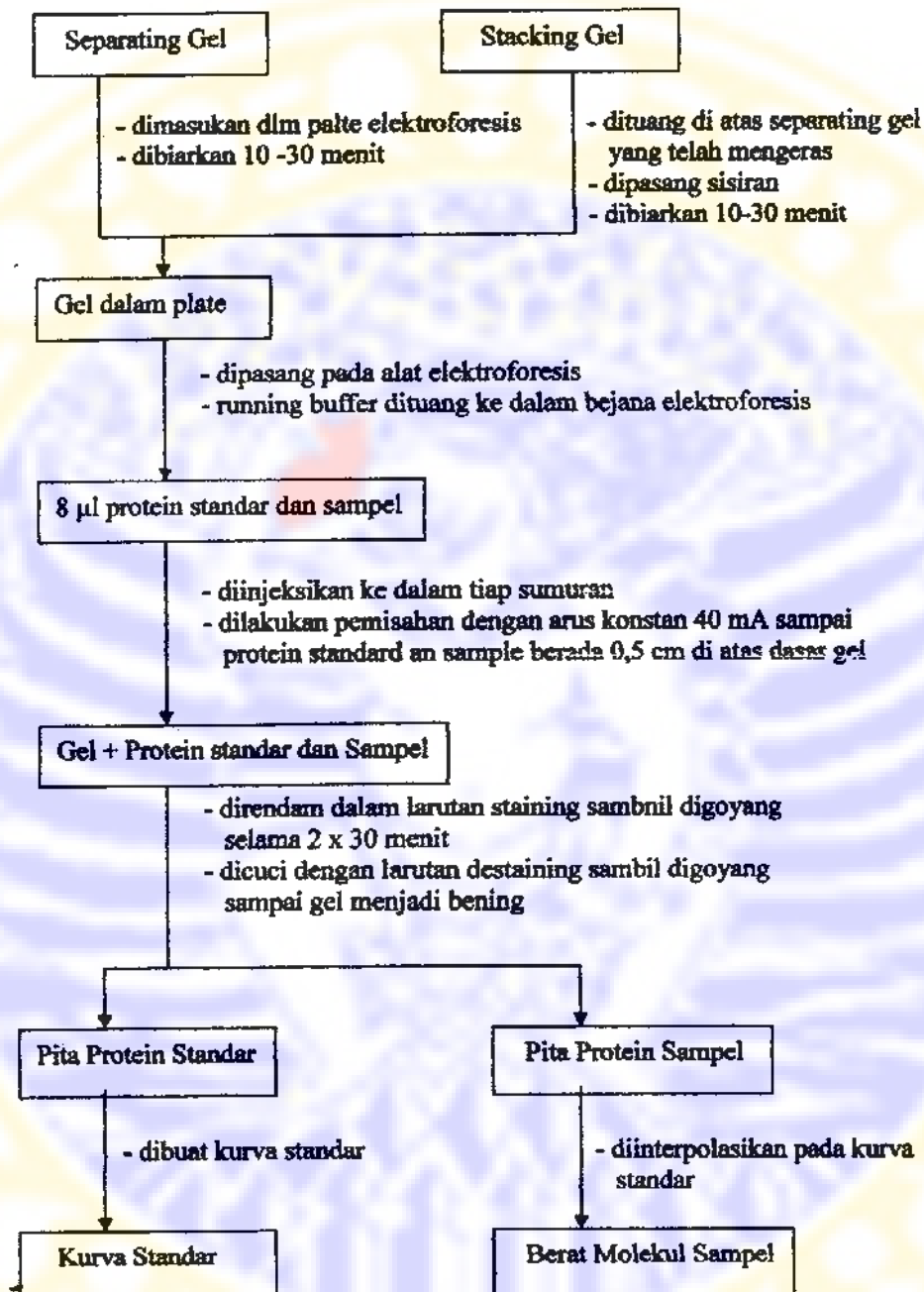
Lampiran 3.5. : *Isolasi dan Purifikasi* Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol

Lampiran 3.6. : Uji *Dot Blotting* Abpo- α Prol dengan Prolaktin (Sigma L-6520) atau Isolat Prolaktin

Lampiran 3.1. Diagram alur Isolasi dan Purifikasi Serum Ayam Arab fase *Moulting*

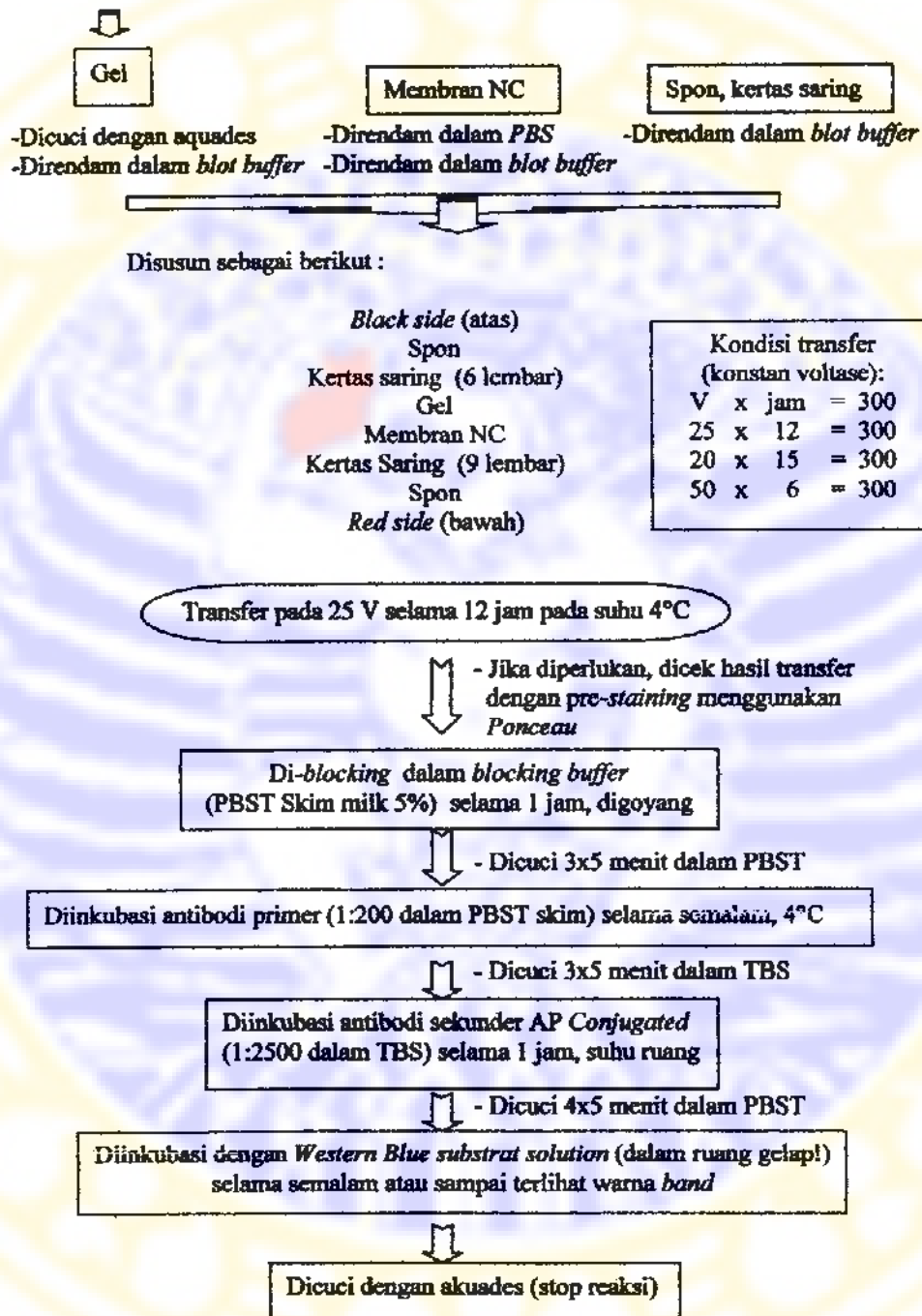


Lampiran 3.2. Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE

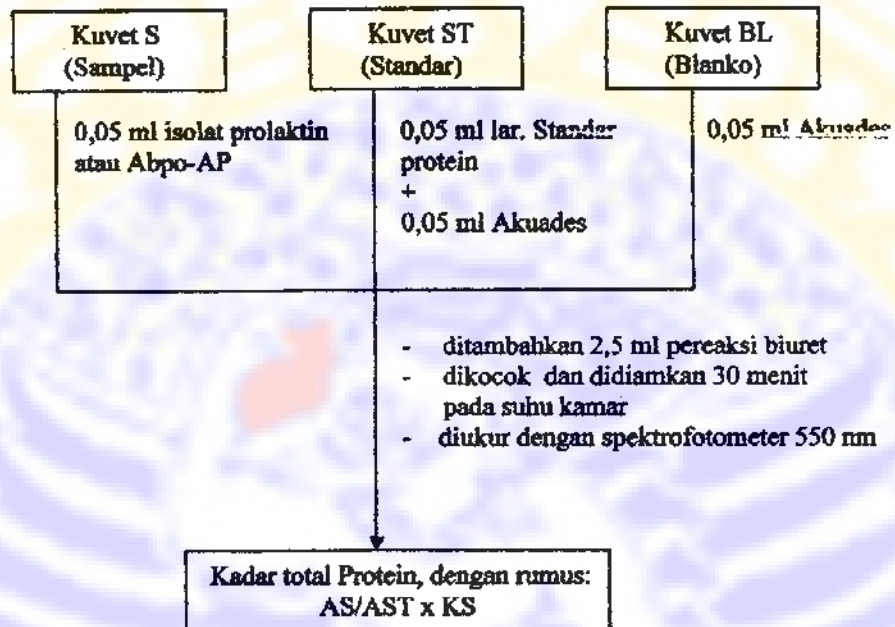


MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lampiran 3.3. Uji *Western Blotting* terhadap Serum dengan Abpo- α Prol-1 dan terhadap Isolat Prolaktin dengan Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol

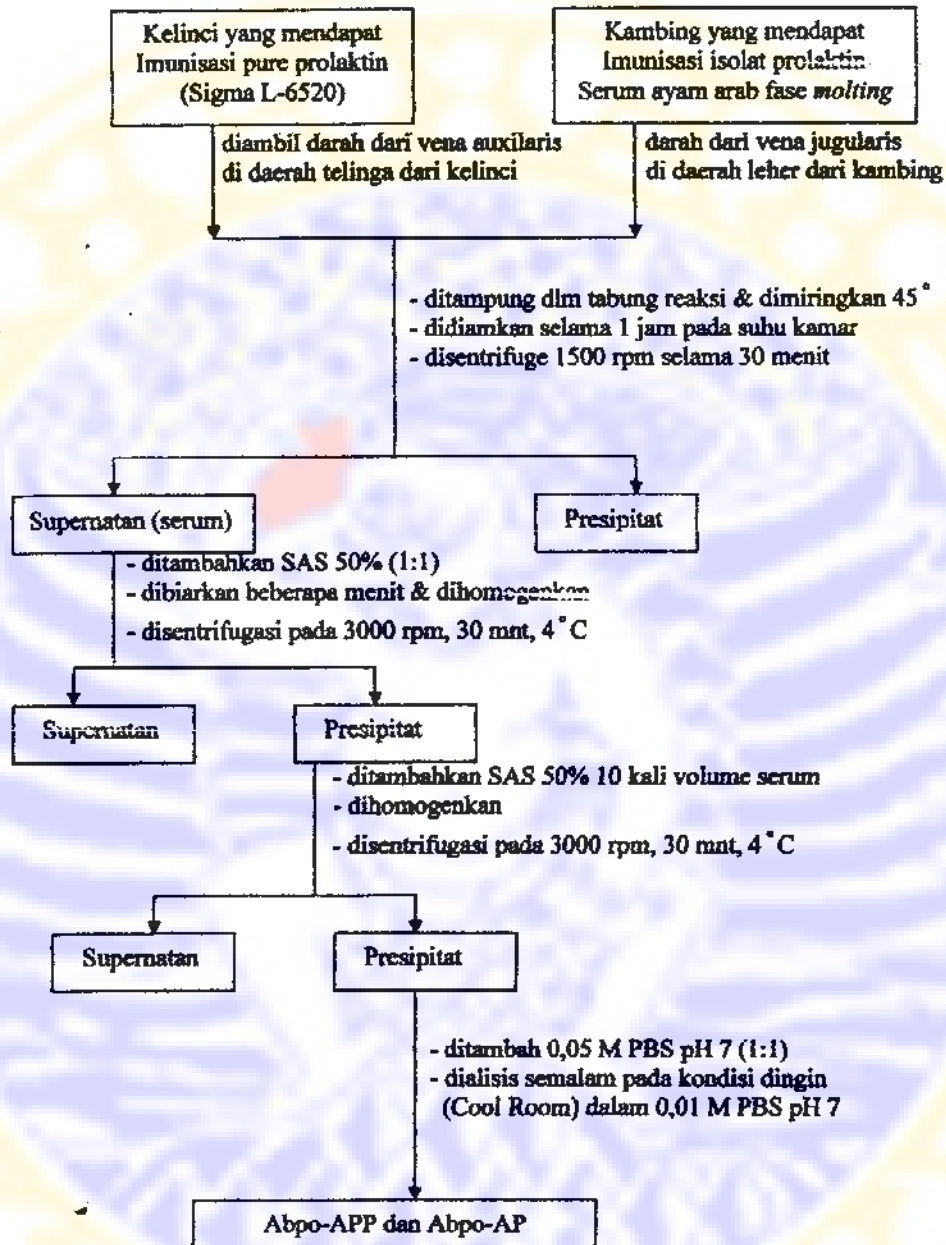


Lampiran 3.4. Pengukuran Kadar Total Protein Metoda *Biuret* dari Isolat Prolaktin dan Abpo- α Prol

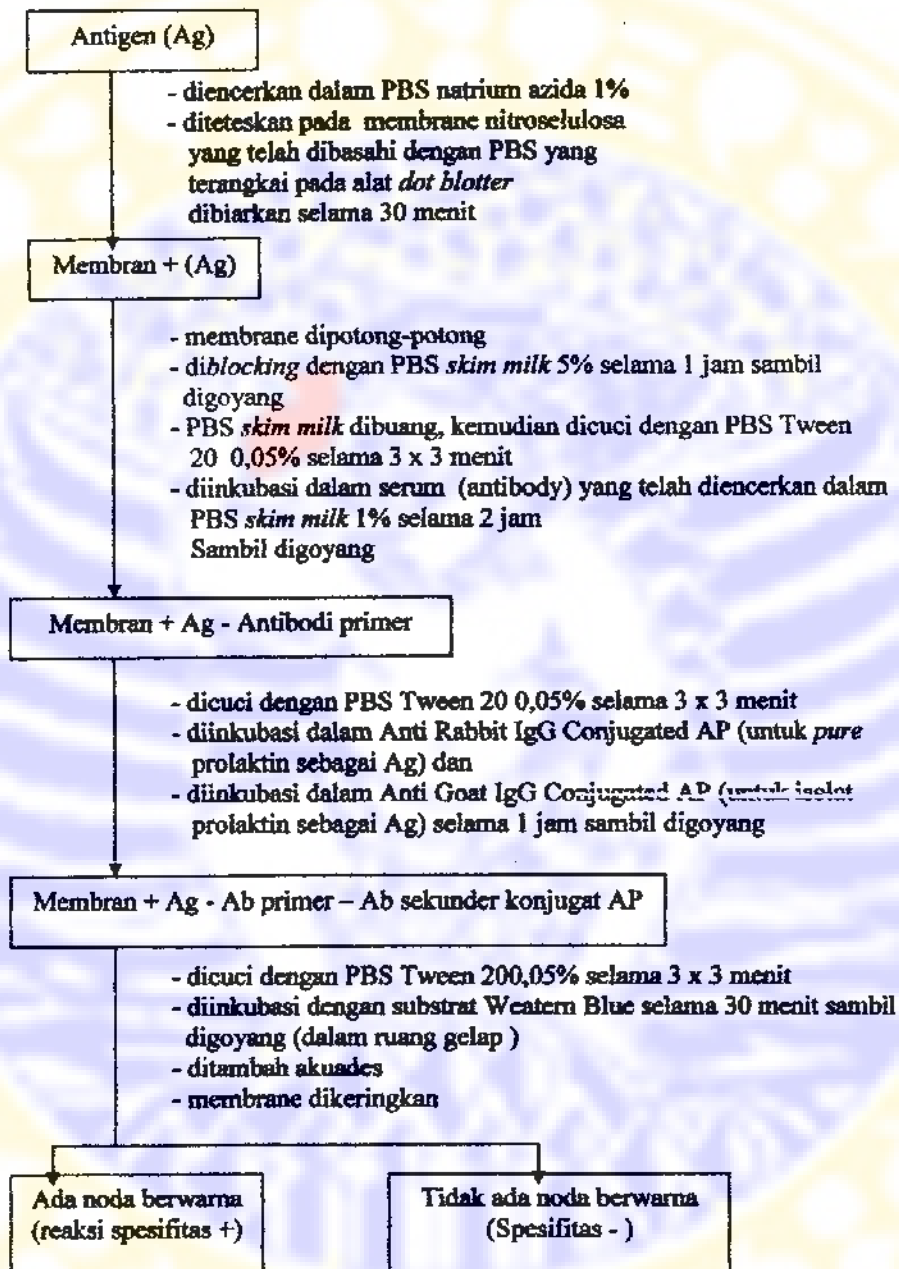


Ket : AS = Hasil pemeriksaan tabung S
AST = Hasil pemeriksaan tabung ST
KS = Konsentrasi standar protein (6,2)

Lampiran 3.5. Isolasi dan Purifikasi Abpo- α Prol-1 dan Abpo- α Prol



Lampiran 3.6. Uji Dot Blotting Abpo- α Prol dengan Prolaktin (Sigma L-6520) atau Isolat Prolaktin



Keterangan : Antigen : *pure* prolaktin dan isolat prolaktin
Antibodi primer : Abpo-AP

LAMPIRAN 4. Data Titer Abpo- α Prol-1 pada Kelinci**Lampiran 4.1. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-1 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA I pada Kelinci**

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,605*	0,486*	0,384*	0,293*	0,214*	0,167*	0,128*	0,087	0,065	0,043
Klc2	0,602*	0,482*	0,382*	0,292*	0,212*	0,165*	0,112	0,083	0,061	0,040
Klc3	0,611*	0,487*	0,386*	0,295*	0,216*	0,160*	0,130*	0,095	0,066	0,042
Klc4	0,604*	0,481*	0,380*	0,291*	0,211*	0,164*	0,114	0,070	0,057	0,036
Klc5	0,601*	0,480*	0,379*	0,290*	0,211*	0,162*	0,111	0,069	0,057	0,042
KC	0,054	0,053	0,052	0,051	0,048	0,049	0,045	0,043	0,040	0,040

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0475 \pm 0,0052 \quad \text{COV} = 0,0475 + 0,0104 = 0,0579 \quad 2X \text{ COV} = 0,1158$$

Lampiran 4.2. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-2 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA I pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,625*	0,514*	0,415*	0,354*	0,299*	0,243*	0,199*	0,130*	0,098	0,056
Klc2	0,622*	0,511*	0,412*	0,352*	0,291*	0,239*	0,194*	0,125	0,093	0,053
Klc3	0,628*	0,517*	0,417*	0,355*	0,298*	0,242	0,198*	0,129*	0,101	0,059
Klc4	0,620*	0,499*	0,411*	0,351*	0,293*	0,236*	0,192*	0,124	0,099	0,052
Klc5	0,617*	0,498*	0,399*	0,348*	0,292*	0,234*	0,190*	0,123	0,097	0,051
KC	0,057	0,057	0,056	0,057	0,051	0,050	0,048	0,044	0,042	0,041

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0503 \pm 0,0065 \quad \text{COV} = 0,0503 + 0,013 = 0,0633 \quad 2X \text{ COV} = 0,1266$$

Lampiran 4.3. Titer Abpo- α PROL-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-3 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA I pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,755*	0,625*	0,515*	0,425*	0,357*	0,319*	0,268*	0,215*	0,145*	0,130*
Klc2	0,754*	0,623*	0,511*	0,423*	0,354*	0,315*	0,264*	0,212*	0,142*	0,127
Klc3	0,756*	0,626*	0,514*	0,427*	0,356*	0,320*	0,269*	0,217*	0,146*	0,131*
Klc4	0,749*	0,621*	0,510*	0,422*	0,352*	0,316*	0,265*	0,214*	0,143*	0,125
Klc5	0,744*	0,619*	0,510*	0,421*	0,353*	0,314*	0,263*	0,213*	0,142*	0,123
KC	0,061	0,060	0,060	0,060	0,061	0,056	0,057	0,054	0,050	0,049

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0568 \pm 0,0044$$

$$COV = 0,0568 + 0,008 = 0,0648$$

$$2X COV = 0,1296$$

Lampiran 4.4. Titer Abpo- α P1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-4 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA I pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,541*	0,439*	0,359*	0,270*	0,173*	0,108*	0,089	0,067	0,045	0,033
Klc2	0,538*	0,438*	0,357*	0,267*	0,169*	0,105	0,085	0,063	0,044	0,030
Klc3	0,542*	0,442*	0,360*	0,278*	0,173*	0,109*	0,088	0,066	0,046	0,032
Klc4	0,540*	0,437*	0,356*	0,266*	0,167*	0,104	0,084	0,061	0,042	0,031
Klc5	0,538*	0,436*	0,355*	0,265*	0,166*	0,102	0,085	0,062	0,041	0,030
KC	0,049	0,048	0,049	0,048	0,048	0,047	0,044	0,042	0,039	0,037

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0451 \pm 0,0044$$

$$COV = 0,0451 + 0,0088 = 0,0539$$

$$2X COV = 0,1078$$

Lampiran 4.5. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-5 setelah menyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan booster IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,753*	0,625*	0,513*	0,423*	0,324*	0,263*	0,126*	0,115	0,097	0,046
Klc2	0,749*	0,619*	0,510*	0,420*	0,320*	0,259*	0,110	0,103	0,094	0,043
Klc3	0,752*	0,624*	0,512*	0,422*	0,325*	0,264*	0,125*	0,113	0,095	0,047
Klc4	0,748*	0,623*	0,510*	0,418*	0,319*	0,260*	0,111	0,105	0,092	0,042
Klc5	0,747*	0,618*	0,509*	0,417*	0,318*	0,258*	0,111	0,102	0,090	0,042
KC	0,057	0,054	0,055	0,054	0,052	0,051	0,049	0,046	0,044	0,044

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0506 \pm 0,0047$$

$$COV = 0,0506 + 0,0094 = 0,0593$$

$$2X COV = 0,12$$

Lampiran 4.6. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-6 setelah menyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan booster IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,865*	0,727*	0,627*	0,554*	0,477*	0,357*	0,289*	0,147*	0,143	0,127
Klc2	0,859*	0,724*	0,624*	0,552*	0,472*	0,353*	0,285*	0,123	0,140	0,124
Klc3	0,866*	0,728*	0,629*	0,553*	0,474*	0,355*	0,287*	0,146*	0,144	0,126
Klc4	0,858*	0,723*	0,622*	0,552*	0,473*	0,351*	0,284*	0,121	0,139	0,123
Klc5	0,857*	0,722*	0,622*	0,551*	0,472*	0,352*	0,281*	0,122	0,137	0,120
KC	0,057	0,057	0,058	0,057	0,056	0,054	0,052	0,050	0,047	0,045

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0533 \pm 0,0046$$

$$COV = 0,0533 + 0,0092 = 0,0625$$

$$2X COV = 0,125$$

Lampiran 4.7. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-7 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,854*	0,728*	0,617*	0,575*	0,433*	0,319*	0,230*	0,150*	0,127*	0,074
Klc2	0,852*	0,722*	0,615*	0,572*	0,432*	0,314*	0,223*	0,133*	0,123	0,067
Klc3	0,853*	0,725*	0,616*	0,574*	0,434*	0,317*	0,231*	0,151*	0,126*	0,073
Klc4	0,851*	0,723*	0,614*	0,571*	0,432*	0,313*	0,222*	0,131*	0,121	0,065
Klc5	0,850*	0,721	0,613*	0,572*	0,430*	0,312*	0,220*	0,130*	0,120	0,064
KC	0,062	0,061	0,060	0,062	0,060	0,057	0,055	0,052	0,050	0,048

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0567 \pm 0,00536$$

$$COV = 0,0566 + 0,0052 = 0,0618$$

$$2X COV = 0,124$$

Lampiran 4.8. Titer Abpo- α Prol-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-8 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,535*	0,434*	0,325*	0,295*	0,199*	0,119*	0,098	0,082	0,071	0,063
Klc2	0,533*	0,432*	0,322*	0,290*	0,194*	0,110	0,095	0,080	0,070	0,059
Klc3	0,534*	0,434*	0,324*	0,294*	0,199*	0,118*	0,099	0,081	0,072	0,062
Klc4	0,533*	0,432*	0,323*	0,292*	0,195*	0,109	0,097	0,079	0,067	0,062
Klc5	0,530*	0,430	0,321*	0,290*	0,191*	0,104	0,095	0,078	0,065	0,057
KC	0,050	0,048	0,049	0,050	0,047	0,045	0,044	0,041	0,037	0,035

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0446 \pm 0,00535$$

$$OV = 0,0446 + 0,0107 = 0,0553$$

$$2X COV = 0,111$$

Lampiran 4.9. Titer Abpo- α Prol-I dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-9 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,946*	0,849*	0,769*	0,654*	0,429*	0,322*	0,226*	0,168*	0,137*	0,084
Klc2	0,945*	0,848*	0,768*	0,652*	0,426*	0,321*	0,220*	0,141*	0,122	0,080
Klc3	0,946*	0,851*	0,769*	0,655*	0,428*	0,322*	0,227*	0,167*	0,138*	0,083
Klc4	0,944*	0,847*	0,767*	0,653*	0,424*	0,320*	0,221*	0,142*	0,122	0,079
Klc5	0,943*	0,846*	0,765*	0,651*	0,423*	0,320*	0,215*	0,139*	0,120	0,075
KC	0,067	0,064	0,065	0,065	0,064	0,064	0,063	0,062	0,060	0,059

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0633 \pm 0,0024 \quad \text{COV} = 0,0633 + 0,0048 = 0,0681 \quad 2X \text{ COV} = 0,136$$

Lampiran 4.10. Titer Abpo- α Prol-I dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-10 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,917*	0,858*	0,799*	0,712*	0,599*	0,427*	0,384*	0,317*	0,252*	0,140*
Klc2	0,915*	0,856*	0,795*	0,710*	0,597*	0,425*	0,383*	0,313*	0,250*	0,137
Klc3	0,918*	0,859*	0,798*	0,711*	0,597*	0,428*	0,385*	0,316*	0,253*	0,142*
Klc4	0,913*	0,855*	0,792*	0,709*	0,596*	0,425*	0,381*	0,310*	0,249*	0,136
Klc5	0,912*	0,852*	0,793*	0,709*	0,593*	0,424*	0,380*	0,307*	0,247*	0,134
KC	0,067	0,065	0,064	0,064	0,065	0,064	0,063	0,061	0,060	0,058

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0631 \pm 0,0032 \quad \text{COV} = 0,0631 + 0,0064 = 0,06951 \quad 2X \text{ COV} = 0,139$$

Lampiran 4.11. Titer Abpo- α ProI-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-11 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,864*	0,785*	0,715*	0,655*	0,535*	0,427*	0,355*	0,237*	0,149*	0,095
Klc2	0,860*	0,782*	0,710*	0,652*	0,532*	0,425*	0,353*	0,235*	0,132	0,090
Klc3	0,865*	0,787*	0,716*	0,654*	0,536*	0,428	0,357*	0,239*	0,149*	0,096
Klc4	0,863*	0,783*	0,713*	0,653*	0,534*	0,424*	0,354*	0,229*	0,132	0,089
Klc5	0,860*	0,782*	0,710*	0,651*	0,533*	0,422*	0,352*	0,235*	0,131	0,089
KC	0,064	0,063	0,063	0,062	0,060	0,059	0,058	0,056	0,055	0,054

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0594 \pm 0,00359 \quad \text{COV} = 0,0594 + 0,00718 = 0,0665 \quad 2X \text{ COV} = 0,133$$

Lampiran 4.12. Titer Abpo- α ProI-1 dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-12 setelah penyuntikan Prolaktin (Sigma L-6520) dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Klc1	0,725*	0,677*	0,522*	0,425*	0,323*	0,212*	0,105*	0,084	0,047	0,031
Klc2	0,723*	0,673*	0,520*	0,422*	0,321*	0,217*	0,095	0,079	0,043	0,029
Klc3	0,724*	0,675*	0,521*	0,424*	0,324*	0,210*	0,106*	0,083	0,045	0,032
Klc4	0,722*	0,674*	0,520*	0,423*	0,322*	0,216*	0,093	0,077	0,045	0,026
Klc5	0,720*	0,672*	0,518*	0,422*	0,320*	0,214*	0,093	0,065	0,043	0,025
KC	0,047	0,046	0,047	0,047	0,043	0,043	0,043	0,042	0,041	0,040

Keterangan : Klc1 – Klc5 = Kelinci Nomor 1-5

KC = Kelinci Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,044 \pm 0,00264 \quad \text{COV} = 0,044 + 0,00528 = 0,0493 \quad 2X \text{ COV} = 0,0985$$

LAMPIRAN 5. Data Titer Abpo- α Prol pada Kambing**Lampiran 5.1. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-1 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA I pada Kelinci**

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,482*	0,372*	0,272*	0,192*	0,152*	0,115	0,092	0,073	0,061	0,044
K2	0,485*	0,376*	0,274*	0,193*	0,154*	0,117*	0,098	0,077	0,065	0,053
K3	0,483*	0,371*	0,270*	0,191*	0,151*	0,114	0,090	0,071	0,059	0,042
K4	0,490*	0,377*	0,276*	0,194*	0,156*	0,120*	0,104	0,080	0,067	0,056
K5	0,480*	0,370*	0,278*	0,190*	0,150*	0,112	0,088	0,069	0,057	0,041
KC	0,053	0,054	0,050	0,053	0,049	0,048	0,046	0,043	0,040	0,039

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

 $\bar{X} = 0,0475 \pm 0,0053$ $COV = 0,0475 + 0,0106 = 0,0581$ $2X COV = 0,1162$
Lampiran 5.2. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-2 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA I pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,622*	0,502*	0,401*	0,311*	0,281*	0,249*	0,204*	0,120	0,092	0,073
K2	0,625*	0,504*	0,404*	0,313*	0,289*	0,253*	0,209*	0,133*	0,098	0,075
K3	0,620*	0,498*	0,398*	0,310*	0,279*	0,246	0,198*	0,118	0,087	0,063
K4	0,628*	0,507*	0,406*	0,312*	0,291*	0,261*	0,215*	0,141*	0,121	0,092
K5	0,618*	0,497*	0,395*	0,309*	0,276*	0,248*	0,197*	0,117	0,086	0,061
KC	0,057	0,057	0,058	0,058	0,050	0,049	0,047	0,044	0,042	0,041

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

 $\bar{X} = 0,0503 \pm 0,0070$ $COV = 0,0503 + 0,014 = 0,0643$ $2X COV = 0,1286$

Lampiran 5.3. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-3 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA I pada Ketinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,650*	0,520*	0,440*	0,365*	0,304*	0,284*	0,254*	0,205*	0,125	0,097
K2	0,655*	0,525*	0,444*	0,365*	0,307*	0,289*	0,257*	0,212*	0,138*	0,102
K3	0,649*	0,519*	0,439*	0,364*	0,305*	0,285*	0,256*	0,207*	0,121	0,095
K4	0,656*	0,526*	0,445*	0,366*	0,310*	0,291*	0,259*	0,214*	0,139*	0,105
K5	0,648*	0,517*	0,437*	0,362*	0,302*	0,283*	0,252*	0,204*	0,119	0,093
KC	0,06	0,061	0,060	0,061	0,060	0,056	0,057	0,054	0,050	0,049

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,0568 \pm 0,0045$ $COV = 0,0568 + 0,009 = 0,0658$ $2X COV = 0,132$

Lampiran 5.4. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-4 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA I pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,439*	0,338*	0,258*	0,188*	0,148*	0,108	0,078	0,063	0,054	0,049
K2	0,440*	0,339*	0,259*	0,189*	0,152*	0,112*	0,082	0,067	0,056	0,051
K3	0,436*	0,337*	0,256*	0,187*	0,146*	0,107	0,077	0,061	0,053	0,047
K4	0,440*	0,341*	0,260*	0,290*	0,153*	0,114*	0,084	0,068	0,057	0,052
K5	0,437*	0,335*	0,255*	0,286*	0,144*	0,105	0,074	0,060	0,051	0,046
KC	0,049	0,047	0,050	0,049	0,048	0,046	0,044	0,042	0,039	0,037

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,0453 \pm 0,0047$ $COV = 0,0453 + 0,0094 = 0,0658$ $2X COV = 0,1094$

Lampiran 5.5. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-5 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,649*	0,519*	0,430*	0,350*	0,270*	0,189*	0,133*	0,112	0,067	0,046
K2	0,653*	0,524*	0,433*	0,352*	0,274*	0,193*	0,145*	0,210*	0,081	0,056
K3	0,647*	0,520*	0,430*	0,348*	0,269*	0,187*	0,131*	0,111	0,065	0,043
K4	0,654*	0,524*	0,434*	0,351*	0,273*	0,195*	0,146*	0,212*	0,083	0,057
K5	0,645*	0,515*	0,426*	0,349*	0,269*	0,186*	0,130*	0,111	0,063	0,042
KC	0,054	0,055	0,054	0,055	0,052	0,050	0,048	0,046	0,044	0,043

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,0501 \pm 0,0046$

COV = $0,0501 + 0,0092 = 0,0593$

2X COV = 0,119

Lampiran 5.6. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-6 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,731*	0,624*	0,535*	0,425*	0,312*	0,254*	0,193*	0,153*	0,123	0,097
K2	0,733*	0,627*	0,538*	0,426*	0,317*	0,257*	0,199*	0,166*	0,131*	0,105
K3	0,728*	0,623*	0,532*	0,421*	0,314*	0,253*	0,192*	0,152*	0,121	0,095
K4	0,735*	0,628*	0,541*	0,424*	0,318*	0,259*	0,202*	0,167*	0,132*	0,110
K5	0,728*	0,621*	0,531*	0,421*	0,313*	0,253*	0,191*	0,151*	0,122	0,095
KC	0,057	0,057	0,058	0,058	0,056	0,054	0,051	0,049	0,047	0,043

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,053 \pm 0,0052$

COV = $0,053 + 0,0014 = 0,0634$

2X COV = 0,127

Lampiran 5.7. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-7 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,652*	0,522*	0,435*	0,352*	0,312*	0,289*	0,132	0,123	0,098	0,067
K2	0,653*	0,527*	0,437*	0,354*	0,313*	0,294*	0,137*	0,124	0,106	0,073
K3	0,651*	0,521*	0,432*	0,352*	0,311*	0,289*	0,131	0,122	0,096	0,065
K4	0,654*	0,529*	0,439*	0,353*	0,313*	0,293*	0,139*	0,127	0,108	0,074
K5	0,651*	0,520*	0,432*	0,351*	0,310*	0,287*	0,131	0,121	0,094	0,064
KC	0,062	0,062	0,061	0,061	0,059	0,057	0,055	0,052	0,049	0,048

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0566 \pm 0,00536$$

$$COV = 0,0566 + 0,0107 = 0,0673$$

$$2X COV = 0,135$$

Lampiran 5.8. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-8 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA II pada Kelinci

No	BESAR PENGENCERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,493*	0,392*	0,282*	0,192*	0,152*	0,109	0,098	0,070	0,061	0,043
K2	0,494*	0,394*	0,285*	0,194*	0,155*	0,115*	0,102	0,072	0,062	0,051
K3	0,491*	0,390*	0,381*	0,191*	0,151*	0,106	0,099	0,069	0,063	0,042
K4	0,495*	0,396*	0,286*	0,193*	0,157*	0,117*	0,105	0,074	0,065	0,054
K5	0,490*	0,390*	0,281*	0,192*	0,152*	0,104	0,094	0,065	0,059	0,041
KC	0,050	0,048	0,048	0,049	0,047	0,045	0,044	0,040	0,037	0,034

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0442 \pm 0,00545$$

$$OV = 0,0442 + 0,0109 = 0,0551$$

$$2X COV = 0,1102$$

Lampiran 5.9. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-9 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,544*	0,448*	0,368*	0,284*	0,179*	0,110	0,099	0,073	0,062	0,044
K2	0,546*	0,449*	0,369*	0,286*	0,183*	0,117*	0,110	0,075	0,064	0,045
K3	0,542*	0,447*	0,366*	0,283*	0,178*	0,109	0,098	0,069	0,059	0,042
K4	0,545*	0,451*	0,370*	0,285*	0,184*	0,119*	0,111	0,077	0,065	0,046
K5	0,542*	0,446*	0,359*	0,282*	0,174*	0,108	0,096	0,067	0,058	0,041
KC	0,055	0,054	0,053	0,054	0,053	0,052	0,049	0,047	0,045	0,043

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,0505 \pm 0,00422$ $OV = 0,0505 + 0,00844 = 0,05894$ $2X COV = 0,112$

Lampiran 5.10. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-10 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,785*	0,697*	0,615*	0,510*	0,387*	0,295*	0,194*	0,129	0,115	0,073
K2	0,787*	0,698*	0,618*	0,512*	0,389*	0,297*	0,197*	0,137*	0,121	0,075
K3	0,785*	0,694*	0,612*	0,509*	0,382*	0,292*	0,189*	0,126	0,116	0,063
K4	0,792*	0,702*	0,621*	0,511*	0,392*	0,299*	0,198*	0,139*	0,124	0,092
K5	0,782*	0,691*	0,611*	0,508*	0,380*	0,290*	0,187*	0,125	0,114	0,061
KC	0,060	0,060	0,059	0,059	0,057	0,053	0,050	0,047	0,042	0,041

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$\bar{X} = 0,053 \pm 0,0069$ $COV = 0,0531 + 0,0138 = 0,0669$ $2X COV = 0,134$

Lampiran 5.11. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-11 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,815*	0,712*	0,641*	0,552*	0,432*	0,315*	0,234*	0,164*	0,125	0,105
K2	0,814*	0,714*	0,645*	0,554*	0,434*	0,317*	0,237*	0,169*	0,139*	0,115
K3	0,812*	0,711*	0,641*	0,551*	0,431*	0,312	0,233*	0,167*	0,124	0,112
K4	0,813*	0,715*	0,646*	0,553*	0,435*	0,319*	0,239*	0,170*	0,159*	0,116
K5	0,816*	0,709*	0,640*	0,550*	0,430*	0,311*	0,227*	0,167*	0,126	0,113
KC	0,063	0,064	0,063	0,062	0,060	0,059	0,058	0,056	0,055	0,053

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,0593 \pm 0,00377$$

$$COV = 0,0593 + 0,00754 = 0,0668$$

$$2X COV = 0,134$$

Lampiran 5.12. Titer Abpo- α Prol dengan ELISA *indirect* pada *bleeding* ke-12 setelah penyuntikan Isolat Prolaktin dan *booster* IFA III pada Kelinci

No	BESAR PENGECERAN									
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
K1	0,494*	0,373*	0,272*	0,192*	0,122*	0,092	0,073	0,064	0,042	0,025
K2	0,495*	0,376*	0,276*	0,195*	0,129*	0,105*	0,079	0,069	0,047	0,024
K3	0,492*	0,372*	0,271*	0,193*	0,124*	0,091	0,073	0,063	0,041	0,021
K4	0,496*	0,378*	0,275*	0,194*	0,122*	0,109*	0,082	0,067	0,049	0,026
K5	0,491*	0,371*	0,270*	0,191*	0,121*	0,091	0,072	0,062	0,040	0,020
KC	0,046	0,045	0,050	0,049	0,043	0,043	0,043	0,042	0,041	0,040

Keterangan : K1 – K5 = Kambing Nomor 1-5

KC = Kambing Kontrol

* = Titer positif

$$\bar{X} = 0,043 \pm 0,00176$$

$$COV = 0,0453 + 0,00352 = 0,0465$$

$$2X COV = 0,093$$

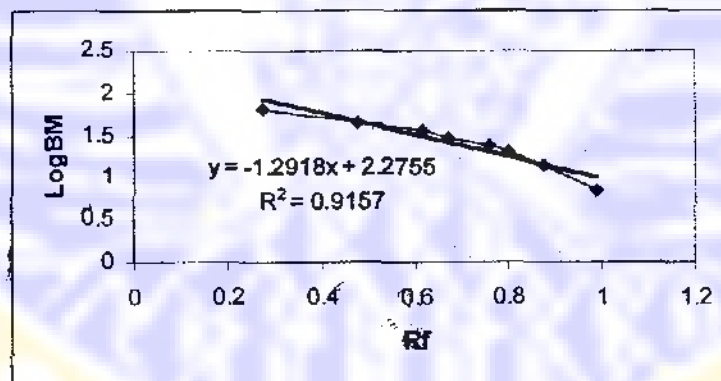
Lampiran 6.1. Penentuan Berat Molekul Prolaktin

Penentuan berat molekul antibodi dilakukan dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor) dari masing masing pita dimana

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Tabel L. 6.1. Tabel penentuan berat molekul

No.	Protein Marker	kDa	Rf	Log BM
1	<i>Bovine serum albumin</i>	66	0,275	1.8195
2	<i>Ovalbumin, Chicken Egg</i>	45	0,478	1.6532
3	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogase, Rabbit Muscle</i>	36	0,615	1.5563
4	<i>Carbonic Anhydrase, Bovine Erythrocytes</i>	29	0,659	1.4624
5	<i>Trypsinogen, Bovine Pancrease</i>	24	0,756	1.3802
6	<i>Trypsin Inhibitor, Soybean</i>	20	0,798	1.3010
7	<i>α-Lactalbumin, Bovine Milk</i>	14,2	0,875	1.1523
8	<i>Aprotinin, Bovine Lung</i>	6,5	0,985	0.838



Dari persamaan regresi linier $Y = a + bX$

$$a = 2,2755$$

$$b = - 1,2918$$

Maka $Y = 2,2755 - 1,2918X$

$$R = 0,9157$$

Perhitungan Berat Molekul Sampel Prolaktin

Perhitungan berat molekul sampel dengan mengukur harga R_f dari masing – masing sampel dengan mengkonversikan dalam persamaan regresi linier. Berikut adalah contoh perhitungan berat molekul sampel :

misalnya nilai $R_f = 0,666$, dimasukkan dalam persamaan dibawah ini :

$$Y = 2,2758 - 1,2918X , \text{ dimana } x = 0,666$$

$$Y = 2,2755 - 1,2918 (0,666)$$

$$= 1,421$$

maka berat molekul anti $\log 1.421 = 26,36 = 26,36 \text{ kDa}$

Lampiran 6.2. Penentuan Dosis Prolaktin (Sigma L-6520) untuk produksi Abpo- α Prol-1 pada Kelinci

Prolaktin (Sigma L-6520)

Sediaan 250 i.u. = 20 – 50 i.u./mg \longrightarrow Harga : 40,20 US \$ (Rp. 500.000)

1mg ∞ 20 - 50 i.u.

1000 μ g ∞ 20 - 50 i.u.

50 μ g ∞ 2,5 i.u.

100 μ g ∞ 5 i.u.

250 i.u. ∞ 10 CC (Dilarutkan dalam Akuades steril)

25 i.u. ∞ 1 CC

2,5 i.u. ∞ 0,1 CC

5 i.u. ∞ 0,2 CC = 100 mg

Lampiran 6.3. Perhitungan Dosis Abpo- α Prol dari Serum Kambing untuk *Challenge test*

Dari tabel 5.11. ditentukan salah satu dari sampel dengan kadar total protein tertinggi yaitu 2930 $\mu\text{g/ml}$. Dari kadar tersebut diambil sampel pada *bleeding* ke-6 dari kambing nomor 2.

Perhitungan dosis :

$$2930 \mu\text{g/ml} \longrightarrow 2930 \mu\text{g} / 50 \mu\text{g} = 58,6$$

$$1 \text{ ml serum} : 58,6 = 0,017 \approx 0,02 \text{ ml}$$

$$\text{Jadi : } 50 \mu\text{g} = 0,02 \text{ ml (Abpo-}\alpha\text{Prol)}$$

$$100 \mu\text{g} = 0,04 \text{ ml (Abpo-}\alpha\text{Prol)}$$

$$200 \mu\text{g} = \underline{0,08 \text{ ml}} \text{ (Abpo-}\alpha\text{Prol)}$$

$$\text{Total} = 0,14 \longrightarrow 1 \text{ ml Abpo-}\alpha\text{Prol} : 0,14 = 7$$

Jadi 1 ml Abpo- α Prol bisa digunakan untuk $7 \times 3 = 21$ ekor ayam

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor ayam sebagai *challenge test* (diimunisasi Abpo- α Prol) & 10 ekor sebagai kontrol (hanya diimunisasi PBS).

Jadi untuk 30 ekor ayam dibutuhkan Abpo- α Prol sebanyak $1,43 = 1,5$ ml.

LAMPIRAN 7. Analisis Statistik Abpo- α Pro1 dari Kelinci

Oneway

Descriptives

TITER Abpo- α Pro1

Bleeding ke-	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	,25200	9,8485E-02	4,0206E-02	,14865	,35535	,051	,295
2	6	,30283	,12046	4,9177E-02	,17642	,42925	,057	,355
3	6	,36300	,14845	6,0606E-02	,20721	,51879	,060	,427
4	6	,23233	9,0427E-02	3,6917E-02	,13744	,32723	,048	,278
5	6	,35900	,14944	6,1007E-02	,20218	,51582	,054	,423
6	6	,46983	,20225	8,2568E-02	,25759	,68208	,057	,554
7	6	,48767	,20854	8,5135E-02	,26882	,70651	,062	,575
8	6	,25183	9,8899E-02	4,0375E-02	,14805	,35562	,050	,295
9	6	,55500	,24005	9,8002E-02	,30308	,80692	,065	,655
10	6	,80250	,26381	,10770	,32565	,87935	,064	,712
11	6	,55450	,24128	9,8502E-02	,30129	,80771	,062	,655
12	6	,36050	,15359	6,2702E-02	,19932	,52168	,047	,425
Total	72	,39925	,20640	2,4324E-02	,35075	,44775	,047	,712

ANOVA

TITER TITER Abpo- α Pro1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,125	11	,102	3,230	,002
Within Groups	1,900	60	3,166E-02		
Total	3,025	71			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TITER

Student-Newman-Keuls

(I) Bleeding ke	(J) Bleeding ke	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Inter val	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5,08333E-02	,10273	1,000	-,40014	,29848
	3	-,11100	,10273	,994	-,46031	,23831
	4	1,9667E-02	,10273	1,000	-,32964	,36898
	5	-,10700	,10273	,996	-,45631	,24231
	6	-,21783	,10273	,611	-,56714	,13148
	7	-,23567	,10273	,492	-,58498	,11364
	8	1,6667E-04	,10273	1,000	-,34914	,34948
	9	-,30300	,10273	,150	-,65231	4,6310E-02
	10	-,35050*	,10273	,048	-,69981	-1,19023E-03
	11	-,30250	,10273	,152	-,65181	4,6810E-02
	12	-,10850	,10273	,995	-,45781	,24081
	2	1	5,0833E-02	,10273	1,000	-,29848
3		-6,01667E-02	,10273	1,000	-,40948	,28914
4		7,0500E-02	,10273	1,000	-,27881	,41981
5		-5,61667E-02	,10273	1,000	-,40548	,29314
6		-,16700	,10273	,893	-,51631	,18231
7		-,18483	,10273	,812	-,53414	,16448
8		5,1000E-02	,10273	1,000	-,29831	,40031
9		-,25217	,10273	,388	-,60148	9,7143E-02
10		-,29967	,10273	,161	-,64898	4,9643E-02
11		-,25167	,10273	,391	-,60098	9,7643E-02
12		-5,76667E-02	,10273	1,000	-,40698	,29164
3		1	,11100	,10273	,994	-,23831
	2	6,0167E-02	,10273	1,000	-,28914	,40948
	4	,13067	,10273	,980	-,21864	,47998
	5	4,0000E-03	,10273	1,000	-,34531	,35331
	6	-,10683	,10273	,996	-,45614	,24248
	7	-,12467	,10273	,986	-,47398	,22464
	8	,11117	,10273	,994	-,23814	,46048
	9	-,19200	,10273	,773	-,54131	,15731
	10	-,23950	,10273	,467	-,58881	,10981
	11	-,19150	,10273	,776	-,54081	,15781
	12	2,5000E-03	,10273	1,000	-,34681	,35181
	4	1	-1,96667E-02	,10273	1,000	-,36898
2		-7,0500E-02	,10273	1,000	-,41981	,27881
3		-,13067	,10273	,980	-,47998	,21864
5		-,12667	,10273	,984	-,47598	,22264
6		-,23750	,10273	,480	-,58681	,11181
7		-,25533	,10273	,369	-,60464	9,3976E-02
8		-1,9500E-02	,10273	1,000	-,36881	,32981
9		-,32267	,10273	,097	-,67198	2,6643E-02
10		-,37017*	,10273	,029	-,71948	-2,08569E-02
11		-,32217	,10273	,098	-,67148	2,7143E-02
12		-,12817	,10273	,982	-,47748	,22114
5		1	,10700	,10273	,996	-,24231
	2	5,6167E-02	,10273	1,000	-,29314	,40548
	3	-4,0000E-03	,10273	1,000	-,35331	,34531

	4	,12667	,10273	,984	-,22264	,47598
	6	-,11083	,10273	,995	-,46014	,23848
	7	-,12867	,10273	,982	-,47798	,22064
	8	,10717	,10273	,996	-,24214	,45648
	9	-,19600	,10273	,750	-,54531	,15331
	10	-,24350	,10273	,441	-,59281	,10581
	11	-,19550	,10273	,753	-,54481	,15381
	12	-1,50000E-03	,10273	1,000	-,35081	,34781
6	1	,21783	,10273	,611	-,13148	,56714
	2	,16700	,10273	,893	-,18231	,51631
	3	,10683	,10273	,996	-,24248	,45614
	4	,23750	,10273	,480	-,11181	,58881
	5	,11083	,10273	,995	-,23848	,46014
	7	-1,78333E-02	,10273	1,000	-,36714	,33148
	8	,21800	,10273	,610	-,13131	,56731
	9	-8,51667E-02	,10273	,999	-,43448	,26414
	10	-,13267	,10273	,977	-,48198	,21664
	11	-8,46667E-02	,10273	1,000	-,43398	,26464
	12	,10933	,10273	,995	-,23998	,45864
7	1	,23567	,10273	,492	-,11364	,58498
	2	,18483	,10273	,812	-,16448	,53414
	3	,12467	,10273	,986	-,22464	,47398
	4	,25533	,10273	,369	-9,39764E-02	,60464
	5	,12867	,10273	,982	-,22064	,47798
	6	1,78333E-02	,10273	1,000	-,33148	,36714
	8	,23583	,10273	,491	-,11348	,58514
	9	-6,73333E-02	,10273	1,000	-,41664	,28188
	10	-,11483	,10273	,993	-,46414	,23448
	11	-6,68333E-02	,10273	1,000	-,41614	,28248
	12	,12717	,10273	,983	-,22214	,47648
8	1	-1,66667E-04	,10273	1,000	-,34948	,34914
	2	-5,10000E-02	,10273	1,000	-,40031	,29831
	3	-,11117	,10273	,994	-,46048	,23814
	4	1,9500E-02	,10273	1,000	-,32981	,36881
	5	-,10717	,10273	,996	-,45648	,24214
	6	-,21800	,10273	,610	-,56731	,13131
	7	-,23583	,10273	,491	-,58514	,11348
	9	-,30317	,10273	,150	-,65248	4,6143E-02
	10	-,35067*	,10273	,048	-,69998	-1,35689E-03
	11	-,30267	,10273	,151	-,65198	4,6643E-02
	12	-,10867	,10273	,995	-,45798	,24064
9	1	,30300	,10273	,150	-4,63098E-02	,65231
	2	,25217	,10273	,388	-9,71431E-02	,60148
	3	,19200	,10273	,773	-,15731	,54131
	4	,32267	,10273	,097	-2,66431E-02	,67198
	5	,19600	,10273	,750	-,15331	,54531
	6	8,5167E-02	,10273	,999	-,26414	,43448
	7	6,7333E-02	,10273	1,000	-,28198	,41664
	8	,30317	,10273	,150	-4,61431E-02	,65248
	10	-4,75000E-02	,10273	1,000	-,39681	,30181
	11	5,0000E-04	,10273	1,000	-,34881	,34981
	12	,19450	,10273	,759	-,15481	,54381
10	1	,35050*	,10273	,048	1,1902E-03	,69981
	2	,29967	,10273	,161	-4,96431E-02	,64898
	3	,23950	,10273	,467	-,10981	,58881
	4	,37017*	,10273	,029	2,0857E-02	,71948
	5	,24350	,10273	,441	-,10581	,59281
	6	,13267	,10273	,977	-,21664	,48198
	7	,11483	,10273	,993	-,23448	,46414
	8	,35087*	,10273	,048	1,3569E-03	,69998

	9	4,7500E-02	,10273	1,000	-,30181	,39681
	11	4,8000E-02	,10273	1,000	-,30131	,39731
	12	,24200	,10273	,451	-,10731	,59131
11	1	,30250	,10273	,152	-4,68098E-02	,65181
	2	,25167	,10273	,391	-9,76431E-02	,60098
	3	,19150	,10273	,776	-,15781	,54081
	4	,32217	,10273	,098	-2,71431E-02	,67148
	5	,19550	,10273	,753	-,15381	,54481
	6	8,4667E-02	,10273	1,000	-,26464	,43398
	7	6,6833E-02	,10273	1,000	-,28248	,41614
	8	,30267	,10273	,151	-4,66431E-02	,65198
	9	-5,00000E-04	,10273	1,000	-,34981	,34881
	10	-4,80000E-02	,10273	1,000	-,39731	,30131
	12	,19400	,10273	,761	-,15531	,54331
12	1	,10850	,10273	,995	-,24081	,45781
	2	5,7667E-02	,10273	1,000	-,29164	,40698
	3	-2,50000E-03	,10273	1,000	-,35181	,34681
	4	,12817	,10273	,982	-,22114	,47748
	5	1,5000E-03	,10273	1,000	-,34781	,35081
	6	-,10933	,10273	,995	-,45864	,23998
	7	-,12717	,10273	,983	-,47648	,22214
	8	,10867	,10273	,995	-,24064	,45798
	9	-,19450	,10273	,759	-,54381	,15481
	10	-,24200	,10273	,451	-,59131	,10731
	11	-,19400	,10273	,761	-,54331	,15531

* The mean difference is significant at the .05 level.

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

TITER

Student-Newman-Keuls

Bleeding ke	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4	6	,23233	
8	6	,25183	
1	6	,25200	
2	6	,30283	,30283
5	6	,35900	,35900
12	6	,36050	,36050
3	6	,36300	,36300
6	6	,46983	,46983
7	6	,48767	,48767
11	6	,55450	,55450
9	6	,55500	,55500
10	6		,60250
Sig.		,084	,105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

LAMPIRAN 8. Analisis Statistik Abpo- α Prol dari Kambing**Oneway**

Descriptives

TITER Abpo- α Prol

Bleeding ke-	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Mini	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	,16883	5,6764E-02	2,3174E-02	,10926	,22840	,053	,194
2	6	,26883	,10330	4,2171E-02	,16043	,37724	,058	,313
3	6	,31383	,12387	5,0570E-02	,18384	,44383	,061	,366
4	6	,10317	8,7990E-02	3,5922E-02	,10583	,29051	,049	,290
5	6	,20083	,12044	4,9170E-02	,17444	,42723	,055	,352
6	6	,36250	,14919	6,0906E-02	,20594	,51906	,058	,426
7	6	,30383	,11897	4,8568E-02	,17898	,42868	,061	,354
8	6	,16850	5,8552E-02	2,3904E-02	,10705	,22995	,049	,194
9	6	,24567	9,3908E-02	3,8338E-02	,14712	,34422	,054	,286
10	6	,43483	,18413	7,5169E-02	,24161	,62806	,059	,512
11	6	,47033	,20005	8,1669E-02	,26040	,68027	,062	,554
12	6	,16900	5,8805E-02	2,4007E-02	,10729	,23071	,049	,195
Total	72	,26376	,14881	1,7537E-02	,24880	,31873	,049	,554

ANOVA

TITER Abpo- α Prol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,685	11	6,223E-02	4,207	,000
Within Groups	,888	60	1,479E-02		
Total	1,572	71			

LAMPIRAN 8. Analisis Statistik Abpo- α Prol dari Kambing

Oneway

Descriptives

TITER Abpo- α Prol

Bleeding ke-	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Mini	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	,16883	5,6764E-02	2,3174E-02	,10926	,22840	,053	,194
2	6	,26883	,10330	4,2171E-02	,16043	,37724	,058	,313
3	6	,31383	,12387	5,0570E-02	,18384	,44383	,061	,366
4	6	,19817	8,7990E-02	3,5922E-02	,10583	,29051	,049	,290
5	6	,30083	,12044	4,9170E-02	,17444	,42723	,055	,352
6	6	,36250	,14919	6,0906E-02	,20594	,51906	,058	,426
7	6	,30383	,11897	4,8568E-02	,17898	,42868	,061	,354
8	6	,16850	5,8552E-02	2,3904E-02	,10705	,22995	,049	,194
9	6	,24567	9,3908E-02	3,8338E-02	,14712	,34422	,054	,286
10	6	,43483	,18413	7,5169E-02	,24161	,62806	,059	,512
11	6	,47033	,20005	8,1669E-02	,26040	,68027	,062	,554
12	6	,16900	5,8805E-02	2,4007E-02	,10729	,23071	,049	,195
Total	72	,28376	,14881	1,7537E-02	,24880	,31873	,049	,554

ANOVA

TITER Abpo- α Prol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,685	11	6,223E-02	4,207	,000
Within Groups	,888	60	1,479E-02		
Total	1,572	71			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TITER

Student-Newman-Keuls

(I) Bleeding ke	(J) Bleeding ke	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.10000	7,0222E-02	,954	-.33876	,13876
	3	-.14500	7,0222E-02	,648	-.38376	9,3783E-02
	4	-2,93333E-02	7,0222E-02	1,000	-.26810	,20943
	5	-.13200	7,0222E-02	,767	-.37076	,10676
	6	-.19367	7,0222E-02	,225	-.43243	4,5097E-02
	7	-.13500	7,0222E-02	,741	-.37376	,10376
	8	3,3333E-04	7,0222E-02	1,000	-.23843	,23910
	9	-7,68333E-02	7,0222E-02	,994	-.31560	,16193
	10	-.26800*	7,0222E-02	,017	-.50476	-2,72368E-02
	11	-,30150*	7,0222E-02	,003	-.54026	-6,27368E-02
	12	-1,66667E-04	7,0222E-02	1,000	-.23893	,23860
	2	1	,10000	7,0222E-02	,954	-.13876
3		-4,50000E-02	7,0222E-02	1,000	-.28376	,19376
4		7,0667E-02	7,0222E-02	,997	-.16810	,30943
5		-3,20000E-02	7,0222E-02	1,000	-.27076	,20676
6		-9,36667E-02	7,0222E-02	,971	-.33243	,14510
7		-3,50000E-02	7,0222E-02	1,000	-.27376	,20376
8		,10033	7,0222E-02	,953	-.13843	,33910
9		2,3167E-02	7,0222E-02	1,000	-.21560	,26193
10		-.16600	7,0222E-02	,445	-.40476	7,2763E-02
11		-.20150	7,0222E-02	,179	-.44026	3,7263E-02
12		9,9833E-02	7,0222E-02	,954	-.13893	,33860
3		1	,14500	7,0222E-02	,648	-9,37632E-02
	2	4,5000E-02	7,0222E-02	1,000	-.19376	,28376
	4	,11567	7,0222E-02	,884	-.12310	,35443
	5	1,3000E-02	7,0222E-02	1,000	-.22576	,25176
	6	-4,86667E-02	7,0222E-02	1,000	-.28743	,19010
	7	1,0000E-02	7,0222E-02	1,000	-.22876	,24876
	8	,14533	7,0222E-02	,645	-9,34299E-02	,38410
	9	6,8167E-02	7,0222E-02	,998	-.17060	,30693
	10	-.12100	7,0222E-02	,850	-.35976	,11776
	11	-.15650	7,0222E-02	,536	-.39526	8,2263E-02
	12	,14483	7,0222E-02	,650	-9,39299E-02	,38360
	4	1	2,9333E-02	7,0222E-02	1,000	-.20943
2		-7,06667E-02	7,0222E-02	,997	-.30943	,16810
3		-.11567	7,0222E-02	,884	-.35443	,12310
5		-.10267	7,0222E-02	,945	-.34143	,13610
6		-.16433	7,0222E-02	,461	-.40310	7,4430E-02
7		-.10567	7,0222E-02	,933	-.34443	,13310
8		2,9667E-02	7,0222E-02	1,000	-.20910	,26843
9		-4,75000E-02	7,0222E-02	1,000	-.28628	,19126
10		-.23667*	7,0222E-02	,054	-.47543	2,0966E-03
11		-.27217*	7,0222E-02	,013	-.51093	-3,34034E-02
12		2,9167E-02	7,0222E-02	1,000	-.20960	,26793
5		1	,13200	7,0222E-02	,767	-.10676

	2	3,2000E-02	7,0222E-02	1,000	-20676	27076
	3	-1,30000E-02	7,0222E-02	1,000	-25176	22576
	4	10267	7,0222E-02	945	-13610	34143
	6	-6,16667E-02	7,0222E-02	999	-30043	17710
	7	-3,00000E-03	7,0222E-02	1,000	-24176	23576
	8	13233	7,0222E-02	764	-10643	37110
	9	5,5167E-02	7,0222E-02	1,000	-18360	29393
	10	-13400	7,0222E-02	749	-37276	10476
	11	-16950	7,0222E-02	413	-40826	6,9263E-02
	12	13183	7,0222E-02	768	-10693	37060
6	1	19367	7,0222E-02	225	-4,50966E-02	43243
	2	9,3667E-02	7,0222E-02	971	-14510	33243
	3	4,8667E-02	7,0222E-02	1,000	-19010	28743
	4	16433	7,0222E-02	461	-7,44299E-02	40310
	5	6,1667E-02	7,0222E-02	999	-17710	30043
	7	5,8667E-02	7,0222E-02	999	-18010	29743
	8	19400	7,0222E-02	223	-4,47632E-02	43276
	9	11683	7,0222E-02	877	-12193	35560
	10	-7,23333E-02	7,0222E-02	996	-31110	16643
	11	-10783	7,0222E-02	924	-34660	13093
	12	19350	7,0222E-02	226	-4,52632E-02	43226
7	1	13500	7,0222E-02	741	-10376	37376
	2	3,5000E-02	7,0222E-02	1,000	-20376	27376
	3	-1,00000E-02	7,0222E-02	1,000	-24876	22876
	4	10567	7,0222E-02	933	-13310	34443
	5	3,0000E-03	7,0222E-02	1,000	-23576	24176
	6	-5,86667E-02	7,0222E-02	999	-29743	18010
	8	13533	7,0222E-02	738	-10343	37410
	9	5,8167E-02	7,0222E-02	999	-18060	29693
	10	-13100	7,0222E-02	775	-36976	10776
	11	-16650	7,0222E-02	441	-40526	7,2263E-02
	12	13483	7,0222E-02	742	-10393	37360
8	1	-3,33333E-04	7,0222E-02	1,000	-23910	23843
	2	-10033	7,0222E-02	953	-33910	13843
	3	-14533	7,0222E-02	645	-38410	9,3430E-02
	4	-2,96667E-02	7,0222E-02	1,000	-26843	20910
	5	-13233	7,0222E-02	764	-37110	10643
	6	-19400	7,0222E-02	223	-43276	4,4763E-02
	7	-13533	7,0222E-02	738	-37410	10343
	9	-7,71667E-02	7,0222E-02	994	-31593	16160
	10	-26633*	7,0222E-02	017	-50510	-2,75701E-02
	11	-30183*	7,0222E-02	003	-54060	-6,30701E-02
	12	-5,00000E-04	7,0222E-02	1,000	-23926	23826
9	1	7,6833E-02	7,0222E-02	994	-16193	31560
	2	-2,31667E-02	7,0222E-02	1,000	-26193	21560
	3	-6,81667E-02	7,0222E-02	998	-30693	17060
	4	4,7500E-02	7,0222E-02	1,000	-19126	28626
	5	-5,51667E-02	7,0222E-02	1,000	-29393	18360
	6	-11683	7,0222E-02	877	-35560	12193
	7	-5,81667E-02	7,0222E-02	999	-29693	18060
	8	7,7167E-02	7,0222E-02	994	-16160	31593
	10	-18917	7,0222E-02	255	-42793	4,9597E-02
	11	-22467	7,0222E-02	084	-46343	1,4097E-02
	12	7,6667E-02	7,0222E-02	994	-16210	31543
10	1	26600*	7,0222E-02	017	2,7237E-02	50476
	2	16600	7,0222E-02	445	-7,27632E-02	40476
	3	12100	7,0222E-02	850	-11776	35976
	4	23667*	7,0222E-02	054	-2,09658E-03	47543
	5	13400	7,0222E-02	749	-10476	37276
	6	7,2333E-02	7,0222E-02	996	-16643	31110

	7	,13100	7,0222E-02	,775	-,10776	,36976
	8	,26633*	7,0222E-02	,017	2,7570E-02	,50510
	9	,18917	7,0222E-02	,255	-4,95966E-02	,42793
	11	-3,55000E-02	7,0222E-02	1,000	-,27426	,20326
	12	,26583*	7,0222E-02	,017	2,7070E-02	,50460
11	1	,30150*	7,0222E-02	,003	6,2737E-02	,54026
	2	,20150	7,0222E-02	,179	-3,72632E-02	,44026
	3	,15650	7,0222E-02	,536	-8,22632E-02	,39526
	4	,27217*	7,0222E-02	,013	3,3403E-02	,51093
	5	,16950	7,0222E-02	,413	-6,92632E-02	,40826
	6	,10783	7,0222E-02	,924	-,13093	,34660
	7	,16650	7,0222E-02	,441	-7,22632E-02	,40526
	8	,30183*	7,0222E-02	,003	6,3070E-02	,54060
	9	,22467	7,0222E-02	,084	-1,40966E-02	,46343
	10	3,5500E-02	7,0222E-02	1,000	-,20326	,27426
	12	,30133*	7,0222E-02	,004	6,2570E-02	,54010
12	1	1,6667E-04	7,0222E-02	1,000	-,23860	,23893
	2	-9,98333E-02	7,0222E-02	,954	-,33860	,13893
	3	-,14483	7,0222E-02	,650	-,38360	9,3930E-02
	4	-2,91667E-02	7,0222E-02	1,000	-,26793	,20960
	5	-,13183	7,0222E-02	,768	-,37060	,10693
	6	-,19350	7,0222E-02	,226	-,43226	4,5263E-02
	7	-,13483	7,0222E-02	,742	-,37360	,10393
	8	5,0000E-04	7,0222E-02	1,000	-,23826	,23926
	9	-7,66667E-02	7,0222E-02	,994	-,31543	,16210
	10	-,26583*	7,0222E-02	,017	-,50460	-2,70701E-02
	11	-,30133*	7,0222E-02	,004	-,54010	-6,25701E-02

* The mean difference is significant at the .05 level.

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

TITER

Student-Newman-Keuls

Bleeding ke	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
8	6	,16850		
1	6	,16883		
12	6	,16900		
4	6	,19817		
9	6	,24567	,24567	
2	6	,26883	,26883	,26883
5	6	,30083	,30083	,30083
7	6	,30383	,30383	,30383
3	6	,31383	,31383	,31383
6	6	,36250	,36250	,36250
10	6		,43483	,43483
11	6			,47033
Sig.		,173	,118	,078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

LAMPIRAN 9. Analisis Statistik Lama Moulting (Hari)**Oneway**

Descriptives
LAMA MOULTING

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (PBS)	10	61,9000	2,0790	,6574	60,4128	63,3872	60,00	65,00
P1(50 µg) Abpo-αProl	10	4,8000	1,0328	,3266	4,0612	5,5388	4,00	6,00
P2(100 µg) Abpo-αProl	10	4,6000	,8433	,2667	3,9968	5,2032	4,00	6,00
P3(200 µg) Abpo-αProl	10	4,6000	,5164	,1633	4,2306	4,9694	4,00	5,00
Total	40	18,9750	25,1279	3,9731	10,9387	27,0113	4,00	65,00

ANOVA
LAMA MOULTING

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24567,675	3	8189,225	5145,063	,000
Within Groups	57,300	36	1,592		
Total	24624,975	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Dependent Variable: LAMA MOLTING
LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (PBS)	P1(50 µg) Abpo-αProl	57,1000*	,5642	,000	55,9557	58,2443
	P2(100 µg) Abpo-αProl	57,3000*	,5642	,000	56,1557	58,4443
	P3(200 µg) Abpo-αProl	57,3000*	,5642	,000	56,1557	58,4443
P1(50 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-57,1000*	,5642	,000	-58,2443	-55,9557
	P2(100 µg) Abpo-αProl	,2000	,5642	,725	-,9443	1,3443
	P3(200 µg) Abpo-αProl	,2000	,5642	,725	-,9443	1,3443
P2(100 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-57,3000*	,5642	,000	-58,4443	-56,1557
	P1(50 µg) Abpo-αProl	-,2000	,5642	,725	-1,3443	,9443
	P3(200 µg) Abpo-αProl	,0000	,5642	1,000	-1,1443	1,1443
P3(200 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-57,3000*	,5642	,000	-58,4443	-56,1557
	P1(50 µg) Abpo-αProl	-,2000	,5642	,725	-1,3443	,9443
	P2(100 µg) Abpo-αProl	,0000	,5642	1,000	-1,1443	1,1443

* The mean difference is significant at the .05 level.

LAMPIRAN 10. Analisis Statistik Kecepatan Mulai Bertelur (Hari)**Oneway**Descriptives
LAMA BERTELUR

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol (PBS)	10	18,4000	1,1738	,3712	17,5603	19,2397	17,00	20,00
P1(50 µg) Abpo-αProl	10	9,3000	,6749	,2134	8,8172	9,7828	8,00	10,00
P2(100 µg) Abpo-αProl	10	7,4000	,8433	,2667	6,7968	8,0032	6,00	8,00
P3(200 µg) Abpo-αProl	10	3,3000	,8233	,2603	2,7111	3,8889	2,00	4,00
Total	40	9,5000	5,6605	,8950	7,7897	11,4103	2,00	20,00

ANOVA
LAMA BERTELUR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1220,600	3	406,867	505,076	,000
Within Groups	29,000	36	,806		
Total	1249,600	39			

Post Hoc TestsMultiple Comparisons
Dependent Variable: LAMA BERTELUR
LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (PBS)	P1(50 µg) Abpo-αProl	9,1000*	,4014	,000	8,2860	9,9140
	P2(100 µg) Abpo-αProl	11,0000*	,4014	,000	10,1860	11,8140
	P3(100 µg) Abpo-αProl	15,1000*	,4014	,000	14,2860	15,9140
P1(50 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-9,1000*	,4014	,000	-9,9140	-8,2860
	P2(100 µg) Abpo-αProl	1,9000*	,4014	,000	1,0860	2,7140
	P3(200 µg) Abpo-αProl	6,0000*	,4014	,000	5,1860	6,8140
P2(100 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-11,0000*	,4014	,000	-11,8140	-10,1860
	P1(50 µg) Abpo-αProl	-1,9000*	,4014	,000	-2,7140	-1,0860
	P3(200 µg) Abpo-αProl	4,1000*	,4014	,000	3,2860	4,9140
P3(200 µg) Abpo-αProl	Kontrol (PBS)	-15,1000*	,4014	,000	-15,9140	-14,2860
	P1(50 µg) Abpo-αProl	-6,0000*	,4014	,000	-6,8140	-5,1860
	P2(100 µg) Abpo-αProl	-4,1000*	,4014	,000	-4,9140	-3,2860

* The mean difference is significant at the .05 level.