



# LAPORAN PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III



Judul Penelitian

**PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK EQUINE CHORIONIC  
GONADOTROPIN (eCG) MICROTITRE STRIP  
UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI  
PADA KUDA**

Oleh :

**Prof. MAS'UD HARIADI, Ph.D., M.Phil., Drh.  
TRI WAHYU SUPRAYOGI, M.Si., Drh.  
TJUK IMAM RESTIADI, M.Si., Drh.**

009307141

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
DESEMBER 2005**



**HALAMAN PENGESAHAN HIBAH PENELITIAN  
PROYEK DUE-LIKE BATCH V**

---

Judul : PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK EQUINE CHORIONIC  
GONADOTROPIN (eCG) MICROTITRE STRIP  
UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI PADA KUDA

Ketua Peneliti

Nama : Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh.  
Jenis Kelamin : Laki-laki  
Pangkat/ Golongan : Pembina/ IVA  
NIP : 130 531 863  
Jabatan : Guru Besar  
Fakultas/ Jurusan/ Puslit : Kedokteran Hewan/ Reproduksi Veteriner  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan  
Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,00

---


Surabaya, 2 Desember 2005

Ketua Peneliti

Mengetahui  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Surabaya

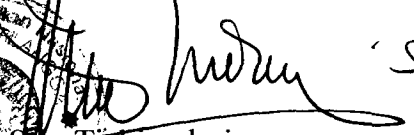


D. Ismudiono, MS., Drh.  
NIP. 130 687 297




Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh.  
NIP. 130 531 810

Menyetujui  
Direktur Eksekutif



M. Tjahjandarie  
NIP. 131 801 627



## RINGKASAN

Judul : PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK EQUINE CHORIONIC  
GONADOTROPIN (eCG) MICROTITRE STRIP

KETUA PENELITIAN : Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh.

ANGGOTA PENELITIAN : Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.  
Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh.

TAHUN : Desember 2005, 62 halaman

### PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) MICROTITRE STRIP UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI PADA KUDA

Perkembangan populasi kuda di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan Di Jawa Timur pada tahun 2001 terjadi penurunan populasi ternak kuda sebesar 5,66 % (Anonimous, 2001).

Kendala yang sering dihadapi peternak kuda adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai. Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah : mengidentifikasi *Equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) dari serum kuda bunting umur 7-19 minggu dan menentukan tingkat keberhasilan diagnosa kebuntingan berdasarkan adanya eCG dalam serum kuda.

Penelitian ini dilakukan di peternakan kuda di surabaya untuk mendeteksi dan mengidentifikasi eCG pada kuda yang diperkirakan bunting. Serum darah diambil dari vena jugularis dan serum dipisahkan untuk digunakan dalam idendifikasi adanya eCG. Pemisahan protein dengan steroid yang ada pada serum darah dilakukan dengan penambahan methanol (1:5). Protein serum yang sudah

bebas dari steroid diidentifikasi adanya eCG dengan menggunakan SDS-PAGE. Setelah ditemukan protein eCG pada pita SDS-PAGE yang disesuaikan dengan berat molekul dari protein marker maka dilanjutkan untuk memotong protein eCG dengan teknik elektroelusi. Hasil dari elektroelusi diuji spesifisitasnya dengan Western Blot ditera kadar proteinnya dengan metode biuret. Peubah yang diamati adalah adanya eCG serum darah kuda dan tingkat keberhasilan dalam deteksi kebuntingan. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji BNT.

Pita-pita protein serum darah kuda bunting muda yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker ada tiga pita yaitu 42,7 kDa, 55,6 kDa dan 66,4 kDa, sedangkan pada uji spesifitas dengan Western Blot diperoleh berat molekul 55,6-66,4 kDa. Pita-pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul eCG yang berkisar 45-65 kDa. Rataan kadar protein eCG serum darah kuda bunting pada umur kebuntingan 7 minggu, 11 minggu, 15 minggu dan 19 minggu masing-masing adalah  $7412 \pm 1865,94 \mu\text{g/ml}$ ,  $9112 \pm 1532,88 \mu\text{g/ml}$ ,  $16696 \pm 1885,02 \mu\text{g/ml}$  dan  $5636 \pm 1245,67 \mu\text{g/ml}$ . Titer antibodi poliklonal anti-eCG sudah nampak mulai hari ke 14 setelah penyuntikan eCG dalam CFA. Titer ini makin meningkat setelah dilakukan *booster* 1, 2 dan 3. Uji kebuntingan kuda bahwa dari 7 ekor kuda yang diduga bunting 2 dan 3 bulan menunjukkan hasil 5 ekor dinyatakan positif dan 2 ekor negatif (100%).

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa *Equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) dapat dideteksi pada kuda bunting pada umur kebuntingan 7 -19 minggu dengan kadar tertinggi pada umur kebuntingan 15 minggu dan dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini pada kuda.

Saran yang dapat diajukan adalah keberadaan eCG dapat digunakan pemeriksaan kebuntingan secara laboratoris, namun supaya pemeriksaan kebuntingan dapat lebih praktis diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuat tes kebuntingan paper strip berdasarkan reaksi imunologis dari eCG dan anti-eCG yang dapat digunakan dengan mudah dilapangan.

## SUMMARY

### **PRODUCTION OF DIAGNOSTIC KIT OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) MICROTITRE STRIP FOR EARLY PREGNANCY DETECTION IN MARE**

The population of horses in Indonesia have been decreasing gradually, and in 2001 their population have reduced as high as 5.66%. This reduction was particularly related to the problems in management of reproduction such as long calving interval, infertility, poor estrous detection and poor of pregnancy detection. Early and accurate detection of pregnancy will contribute to shorten calving interval and preventing the lost of time due to the infertility problems. This research was aimed to identify equine chorionic gonadotropin (eCG) from serum of 7 to 19 weeks of pregnancy in mares, and to determine the success rate of pregnancy detection based on the level of eCG in the serum of pregnant mares.

The research was carried out at stud around Surabaya, and the laboratory works were held in the Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University. Initially 2 to 5 months pregnancy of 5 mares were used for identifying the level of eCG in the serum. Blood samples were collected from jugular vein of the mares and serum were separated and then stored frozen until used. Equine chorionic gonadotropin in serum was prepared using SDS-PAGE, then it was identified by Western Blott technique. The eCG then was isolated by using electroelution, total protein in the isolate was determined by biuret reaction. In the 2<sup>nd</sup> step, polyclonal antibody anti-eCG was developed in the rabbits and it was purified with saturated ammonium sulphate (SAS). This purified antibody anti-eCG was determined by indirect sandwich ELISA for the production of kit diagnostic of early pregnancy in mares.

The results showed that from the SDS-PAGE was found protein bands in between molecular weight (MW) 42.7 to 66.4 KD, result test of western blott showed that there was a protein band with MW 55.6 KD. The results from biuret method showed that the protein level in was increase garadually from week 7 to weeks 11, 15 by  $7412 \pm 1865,94 \mu\text{g/ml}$ ,  $9112 \pm 15.3288 \mu\text{g/ml}$ ,  $16696 \pm 1885.02$



$\mu\text{g/ml}$  and then decreasing sharply in week 19 by  $5636 \pm 1245.67 \mu\text{g/ml}$ . Titer of polyclonal antibody anti-eCG increased after 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> booster. The result of pregnancy detection for 7 mares with suspected 2 and 3 months pregnancy were all positively right.

It was concluded that the level of eCG in serum of 7 to 19 weeks of pregnancy in mares was useful for the detection of pregnancy, and the success rate was 100%.



## KATA PENGANTAR

Syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan berkah dan rahmatNya sehingga penulisan laporan penelitian dengan judul “ Produksi Kit Diagnostik *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Microtitre Strip* Untuk Tes Kebuntingan Dini Pada Kuda” dapat selesai sesuai dengan waktu yang ditentukan.

Pada kesempatan ini kami sampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Panitia Proyek Hibah Penelitian Proyek Due-Like Batch III FKH Unair yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian dengan dana Due-Like Batch III tahun 2005.

Terima kasih pada sejawat anggota peneliti atas kerjasamanya dan juga kepada peternak kuda di Surabaya yang dengan rela hati memberikan fasilitas ternaknya untuk kelancaran proses penelitian ini.

Kami sadari bahwa penulisan ini masih perlu disempurnakan, oleh karena itu masukan yang sangat berguna demi perbaikan penulisan penelitian ini sangat kami harapkan. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi kita semuanya.

Surabaya, Desember 2005

Peneliti



## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
SUMMARY .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	1
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Subyek Penelitian.....	2
1.3. Lokasi Penelitian .....	3
1.4. Hasil yang diharapkan.....	3
1.5. Rumusan Masalah.....	3
1.6. Hipotesis .....	3
<b>BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....</b>	4
2.1. Tujuan Penelitian .....	4
2.2. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB III TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	5
3.1 Siklus Reproduksi.....	5
3.1.1. Pubertas.....	5
3.1.2. Birahi.....	6
3.1.3. Perkawinan.....	6
3.1.4. Kebuntingan.....	7
3.1.5. Diagnosa Kebuntingan .....	8
3.2. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) .....	11
3.3. Pengujian Equine Chorionic Gonadotropin .....	12
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>	14
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
4.2. Materi Penelitian .....	14
4.2.1. Bahan Penelitian .....	14
4.2.2. Alat Penelitian.....	14
4.3. Metode Penelitian .....	15
4.3.1. Pengambilan & Pemisahan eCG Serum Darah Kuda Bunting..	15
4.3.2. Preparasi eCG dengan SDS-PAGE .....	15
4.3.3. Identifikasi eCG dengan Western Blot .....	16



4.3.4.	Isolasi eCG dengan Elektroelusi .....	16
4.3.5.	Pemeriksaan Isolate eCG dengan Biuret .....	16
4.3.6.	Pembuatan Antibodi Poliklonal Anti-eCG.....	16
4.3.7.	Purifikasi Antibodi Poliklonal Anti-eCG dengan Saturated Ammonium Sulfat (SAS) .....	17
4.3.8.	Pemeriksaan <i>Optical Density</i> Antibodi Poliklonal Anti-eCG Dengan ELISA <i>Indirect</i> .....	17
4.3.9.	Deteksi eCG dengan Indirect Sandwich ELISA untuk Pembuatan Kit eCG <i>Microtitre Strip</i> .....	17
4.3.10.	Uji Lapangan .....	17
4.4.	Peubah Penelitian .....	18
4.5.	Analisis Data .....	18
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
5.1	Preparasi eCG dengan SDS-PAGE.....	19
5.2	Identifikasi eCG dengan Western Blot .....	19
5.3.	Pemeriksaan Protein eCG dengan Metode Biuret .....	19
5.4.	Pemeriksaan Kadar Antibodi Poliklonal Anti-eCG Dengan ELISA <i>Indirect</i> .....	22
5.5.	Uji Lapangan .....	30
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
6.1	Kesimpulan .....	32
6.2	Saran .....	32
DAFTAR PUSTAKA	.....	34
LAMPIRAN		

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Hasil pemeriksaan kadar protein isolat eCG dengan metode biuret .....	20
2	Rataan kadar protein eCG serum darah kuda bunting muda.....	20
3	Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA <i>reader</i> 14 hari setelah penyuntikan eCG dalam CFA (hari ke 14).....	22
4	Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA <i>reader</i> 7 hari setelah <i>booster</i> pertama (hari ke 21).....	22
5	Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA <i>reader</i> 7 hari setelah <i>booster</i> kedua (hari ke 28).....	23
6	Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA <i>reader</i> 7 hari setelah <i>booster</i> ketiga (hari ke 35).....	23
7	Titer antibodi poliklonal anti - eCG pada empat ekor kelinci pada <i>bleeding</i> I,II,III dan IV .....	24
8	Perubahan Warna Kekuningan Hasil Reaksi eCG dan Antibodi Poliklonal Anti-eCG pada Pengenceran 160.....	30

## DAFTAR LAMPIRAN

### Lampiran

- 1 Hasil Analisis Statistik ANOVA dan BNT dari eCG Serum Darah Kuda Bunting .....
- 2 Hasil Identifikasi Protein eCG dengan Metode SDS-PAGE dan Uji Spesifisitas Protein eCG dengan Metode Western Blot  
Gambar 1: Pita-pita protein dari serum darah kuda bunting muda  
Gambar 2: Pita Protein eCG hasil Uji Spesifisitas dengan Western Blotting.....
- 3 Hasil Uji ELISA *Indirect* Antibody Poliklonal Anti eCG  
Grafik Garis *Optical Density* Anti-eCG...
- 4 Hasil Uji Serum Kuda yang Diduga Bunting dengan Antibodi Poliklonal Anti-eCG.....
- 5 Kuda Bunting dan Pengambilan Darah Kuda Melalui Vena Jugularis
- 6 Metode Penelitian  
Preparasi eCG dengan SDS-PAGE  
Identifikasi ECG dengan Western Blott  
Isolasi eCG dengan Elektroelusi  
Pemeriksaan Isolat eCG dengan Biuret  
Pembuatan Antibodi Poliklonal Anti eCG  
Purifikasi Antibodi poliklonal Anti eCG dengan Saturated Ammonium Sulphate (SAS)  
Pemeriksaan Optcal Density Antibodi Poliklonal Anti-eCG dengan ELISA *Indirect*
- 7 Rataan OD Antibodi Poliklonal Anti-eCG
- 8 ISOLASI DAN IDENTIFIKASI EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) DARI SERUM KUDA BUNTING  
Redi Prihatmanto  
ABSTRAK  
  
PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-eCG PADA KELINCI  
Riffan Rizallah  
ABSTRAK  
  
PEMBUATAN KIT DIAGNOSTIK UNTUK TES KEBUNTING-AN DINI PADA KUDA DENGAN METODE MICROTITRE STRIP  
Mareta Margalin  
ABSTRAK

## BAB I

### PENDAHULUAN



#### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Perkembangan populasi kuda di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan Di Jawa Timur pada tahun 2001 terjadi penurunan populasi ternak kuda sebesar 5,66 % (Anonymous, 2001). Kendala yang sering dihadapi peternak kuda adalah menyangkut bidang reproduksi, seperti panjangnya calving interval dan rendahnya tingkat kebuntingan sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai. Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi deteksi birahi, perkawinan yang tepat dan diagnosa kebuntingan yang tepat. Diagnosa kebuntingan dini diperlukan setelah terjadinya perkawinan untuk identifikasi lebih awal sehingga kehilangan waktu produksi sebagai akibat infertilitas dapat dikurangi.

Diagnosa kebuntingan dapat dilakukan dengan berbagai cara. Pada kuda cara yang paling praktis dan dapat diandalkan adalah diagnosa melalui palpasi rektal, selain itu dapat juga dilakukan secara uji biologis (Toelihere, 1985; Hunter, 1995), uji imunologis atau secara ultrasonografi (USG).

Pemeriksaan kebuntingan pada kuda dengan cara palpasi rektal beresiko tinggi terhadap keselamatan si pemeriksa. Uji biologis untuk deteksi kebuntingan pada kuda seperti Ascheim Zondek atau Cuboni pelaksanaannya kurang praktis dan membutuhkan waktu yang relatif lama. Demikian pula uji imunologis seperti

pemeriksaan substansi spesifik atau uji lainnya dengan memeriksa substansi non spesifik (estrogen atau progesteron) dengan cara *radioimmunoassay* (RIA) atau *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) masih bersifat laboratoris dan belum dapat dilaksanakan secara cepat di lapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA maupun ELISA (Anonymous, 1984).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka perlu diupayakan untuk mendapatkan suatu cara deteksi kebuntingan pada kuda yang lebih praktis dan dapat dengan mudah dilakukan di lapangan. Pada penelitian ini dilakukan deteksi adanya hormon *equine chorionic gonadotropin* (eCG) pada serum yang secara teoritis terdapat didalam semua darah kuda pada kebuntingan umur 40 s.d 150 hari.

## 1.2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah eCG serum darah kuda bunting 7 - 19 minggu dan anti eCG yang diperoleh serum darah kelinci yang mendapat suntikan berulang dengan eCG serum darah kuda bunting 7 - 19 minggu. Titer anti eCG yang ada dalam serum darah diukur dengan menggunakan ELISA *indirect*.

Penelitian ini meliputi aspek :

- Isolasi dan identifikasi eCG serum darah kuda bunting 7 s/d 19 minggu dengan menggunakan SDS-PAGE dan Elusi
- Pembuatan poliklonal anti eCG
- Pembuatan kit diagnostik kebuntingan dini eCG *Microtitre Strip*



### 1.3. Lokasi Penelitian

- Peternakan Kuda di Surabaya
- Laboratorium Fertilisasi in Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Unair
- Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Hewan Unair

### 1.4. Hasil Yang Diharapkan

- Produksi eCG dari serum darah kuda bunting 7-19 minggu
- Produksi antibodi poliklonal anti- eCG
- Produksi kit diagnostik kebuntingan dini dengan eCG

*Microtitre Strip*

### 1.5. Rumusan Masalah

- Apakah *Equine Chorionic Gonadotropin* dapat dideteksi pada umur kebuntingan kuda 7-19 minggu ?
- Apakah *Equine Chorionic Gonadotropin microtitre strip* dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini pada kuda ?

### 1.6. Hipotesis

- *Equine Chorionic Gonadotropin* dapat dideteksi pada umur kebuntingan kuda 7-19 minggu.
- *Equine Chorionic Gonadotropin microtitre strip* dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini pada kuda.

## BAB II

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 2.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

- Mengidentifikasi *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG)* dari serum kuda bunting umur 7-19 minggu.
- Menentukan tingkat keberhasilan diagnosa kebuntingan berdasarkan adanya eCG dalam serum kuda.

#### 2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi :

- Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan eCG serum darah kuda sebagai bahan tes diagnostik kebuntingan dini pada kuda.
- Peternak kuda, tes ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk mendeteksi kebuntingan secara dini pada kuda sehingga dapat mengukur tingkat reproduktifitasnya.

## **BAB III**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **3.1. Siklus Reproduksi**

Siklus reproduksi adalah suatu rangkaian kejadian biologis hewan betina yang telah mencapai dewasa kelamin sejak hewan tersebut melahirkan sampai melahirkan kembali. Sedangkan siklus birahi adalah perubahan-perubahan fisiologis sistem reproduksi hewan betina secara teratur yang dikendalikan oleh kerja hormon hipofisa dan ovarium. Periode birahi merupakan perubahan terpenting di dalam siklus birahi, yaitu pada saat hewan betina bersedia dikawini oleh hewan jantan dan segera sesudah itu terjadi pelepasan telur dari indung telur. Sepanjang siklus birahi beberapa bagian dari saluran reproduksi betina mengalami perubahan-perubahan yang dikendalikan oleh hormon hipofisa dan hormon-hormon yang berasal dari ovarium. Selain hormon sebagai penyebab diawalinya periode perkawinan, hormon juga mempersiapkan alat reproduksi untuk menerima spermatozoa, menghasilkan ova dan membantu terjadinya kebuntingan, implantasi dan pemberian makanan pada embrio serta fetus (Patodiharrdjo, 1992).

##### **3.1.1. Pubertas**

Bila ternak jantan atau betina telah mampu memproduksi benih untuk yang pertama kalinya dan mampu berkopulasi, maka ternak mulai memasuki masa pubertas atau dewasa kelamin yang mana pada periode ini proses-proses reproduksi mulai terjadi (Partodihardjo, 1992). Di Indonesia kuda mengalami

pubertas pada umur antara 10-24 bulan (Toelihere, 1985). Selanjutnya ternak yang telah dewasa kelamin akan memulai siklus birahi.

### **3.1.2. Birahi**

Birahi adalah tingkah laku seksual dimana sapi betina dalam keadaan siap secara fisiologis untuk berproduksi jika dikawinkan dengan pejantan (Partodihardjo,1992), lama birahi pada kuda 4,5-7,5 hari (Toelihere, 1985) sedangkan siklus birahi yang merupakan interval antara timbulnya satu periode birahi ke permulaan periode birahi berikutnya yang mana interval-interval ini disertai oleh suatu seri perubahan fisiologis di dalam saluran kelamin betina dan lamanya pada kuda biasanya kurang lebih 19-23 hari (Hafez, 2000).

### **3.1.3. Perkawinan**

Selain harus diketahui cara inseminasi yang paling baik, perlu juga diperhatikan waktu inseminasi yang tepat. Oleh karena banyak sekali faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk berhasilnya program inseminasi ini, seperti umur ovum yang pendek, begitu juga dengan daya hidup spermatozoa yang terbatas Walaupun umur spermatozoa lebih panjang dari pada umur ovum akan tetapi spermatozoa di dalam saluran alat kelamin betina perlu mengalami perubahan-perubahan terlebih dahulu sebelum spermatozoa itu dapat membuahi ovum (Toelihere,1985). Waktu optimum yang dianjurkan untuk perkawinan kuda adalah 2-4 hari sebelum akhir birahi atau hari ke 2-3 setelah tanda-tanda birahi tampak.

### 3.1.4. Kebuntingan

Kehidupan baru dimulai pada waktu pembuahan, yaitu pada waktu bersatunya dua sel kelamin, sel telur dan sel spermatozoa dari individu yang berlainan jenis. Pembuahan terjadi di dalam ampulla atau sepertiga proksimal dari tuba falopii. Pada umumnya peternak menganggap bahwa berhentinya tanda-tanda birahi sesudah perkawinan alam atau inseminasi buatan merupakan suatu tanda akan terjadinya kebuntingan. Akan tetapi tidak berarti seratus persen akan terjadi kebuntingan.

Lama kebuntingan kuda berkisar 301-371 hari. Lama kebuntingan ditentukan secara genetik walaupun dapat dipengaruhi faktor-faktor maternal, fetal dan lingkungan (Toelihere, 1985).

Umur induk mempengaruhi lama kebuntingan pada berbagai jenis hewan, fetus yang banyak pada hewan monotocus juga mempunyai lama kebuntingan yang lebih pendek. Kelamin fetus juga menentukan lama kebuntingan. Anak jantan dari kuda kikandung satu sampai dua hari lebih lama dari anak betina. Lingkungan fisik terutama yang berkaitan dengan suhu dan makanan sangat mempengaruhi lama kebuntingan kuda. Suhu yang dingin menyebabkan penundaan implantasi dan makanan yang kurang memperpanjang lama kebuntingan (Toelihere, 1985).

Selama masa kebuntingan placenta bertambah besar melalui proses proliferasi aktif dari sel-sel trophoblast. Selama pertengahan kebuntingan placenta mencapai ukuran yang hampir maksimum, yang bertepatan dengan pertumbuhan cepat fetus dan sesudah itu akan menetap relatif konstan.



palpasi rectal, selain itu dapat juga dilakukan secara uji biologis (Toelihere, 1985; Hunter, 1995).

Prinsip diagnosa kebuntingan melalui palpasi rectal pada kuda hampir sama dengan sapi. Namun perlu diingat bahwa koruna uteri kuda melegok kedalam dan masa kebuntingan pada kuda jauh lebih lama dari pada sapi. Kebuntingan paling mudah didiagnosa per rectal pada umur 30-45 hari, semasa uterus dan isinya masih berada di dalam rongga pelvis dan dapat digenggam seluruhnya. Suatu pembesaran yang bundar dan jelas batas-batasnya pada koruna uteri hampir pasti menandakan adanya kebuntingan. Bundaran tersebut adalah kantong chorioallantois yang mengembung dan terdapat pada sepertiga bagian ujung koruna uteri.

Uji Ascheim Zondek merupakan suatu cara diagnosa kebuntingan pada kuda secara biologik dan didasarkan pada adanya eCG di dalam darah kuda selama kebuntingan muda. Serum darah kuda yang diperkirakan bunting disuntikkan pada tikus betina dan setelah 72 jam dilakukan pembedahan untuk melihat bintik-bintik hemoragik bekas ovulasi pada ovarium dan edema pada uterus menandakan adanya kebuntingan kuda. Uji ini sangat tepat bila dilakukan pada umur 50-80 hari masa kebuntingan.

Diagnosa kebuntingan pada kuda dapat pula dilakukan dengan uji imunologis. Adanya eCG dalam darah kuda bunting muda antara 50-100 hari akan mencegah aglutinasi sel-sel darah merah yang telah disensitifkan oleh anti-eCG. Uji cuboni dapat dilakukan setelah umur kebuntingan 120 hari.

Pemeriksaan kebuntingan dini pada kuda telah dilakukan oleh beberapa peneliti dengan metoda yang berlainan. Rose and Hodgson (1993) melakukan pemeriksaan dini adanya kebuntingan pada kuda dengan *ultrasonografi* (USG). Pemeriksaan ini dapat dilakukan pada umur kebuntingan 14-20 hari. Pemeriksaan kebuntingan pada kuda dengan menggunakan USG untuk melihat *embryonic vesicle* dapat dilakukan pada 9 hari setelah perkawinan dengan tingkat keberhasilan 100 % (Powis, 1986., Pierson *et al.*, 1988., Taverne and Williemse, 1989., Kahn *et al.*, 1994). Mahaputra (1994) melakukan pemeriksaan kebuntingan dini pada kuda pada umur kebuntingan 35 hari dengan melihat kadar hormon progesteron darah dengan teknik RIA, sedangkan England *et al.* (1997) melakukan pemeriksaan progesteron pada kuda bunting umur 20 hari dengan menggunakan teknik ELISA. Pemeriksaan progesteron dengan ELISA dapat mendeteksi 77 % kebuntingan dini dan 100 % tidak bunting (Kaul and Prakash, 1994). Sasser *et al.* (1986) melakukan pemeriksaan kebuntingan dini pada sapi dengan melihat protein spesifik B (bPSPB) pada umur kebuntingan 24 hari dengan teknik RIA, sedangkan Miaolon *et al.* (1994) melakukan pemeriksaan kebuntingan dini dengan melihat adanya protein spesifik (PSP60) pada serum hewan bunting umur 28 hari. Pemeriksaan kebuntingan dini pada kuda dapat juga dilakukan dengan melihat estron sulfat pada plasa darah setelah 17 hari perkawinan atau pada feses (Choi *et al.*, 1987).

### 3.2. *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG)*

Kuda termasuk golongan poliestrus bermusim, yaitu golongan hewan yang menunjukkan gejala birahi beberapa kali dalam satu musim kelamin, biasanya pada bulan Juni dan Juli. Lama siklus birahi pada kuda 21-22 hari dengan lama birahi 4,5 – 7,5 hari dan lama kebuntingan 350 hari (Toelihere, 1985).

*Equine Chorionic Gonadotropin* dapat ditemukan di dalam darah kuda bunting pada umur kebuntingan 40-150 hari. *Equine Chorionic Gonadotropin* dihasilkan oleh endometrial cups dan diperlukan untuk pembentukan korpus luteum sekunder selama kuda bunting dan dipertahankan sampai umur kebuntingan 150 hari. Setelah umur kebuntingan tersebut eCG mulai menghilang seiring dengan berfungsinya plasenta dalam memproduksi progesteron yang berfungsi untuk memelihara kebuntingan (Hafez, 2000).

Menurut Knobill *et al.* (1988) eCG mulai muncul berada dalam peredaran darah induk pada umur kebuntingan 40 hari. Konsentrasi eCG meningkat terus sampai umur kebuntingan 55-65 hari dan kemudian menurun perlahan sampai menghilang pada umur kebuntingan 150 hari.

*Equine Chorionic Gonadotropin* mempunyai berat molekul 45 sampai dengan 65 KD dan molekulnya terdiri dari rantai alfa dan beta subunit. Subunit alfa mengandung 96 asam amino dan subunit beta mengandung 145 asam amino dengan kandungan karbohidrat sebesar 43% dan asam sialat 10,4% (Knobil *et al.*, 1988).

*Equine Chorionic Gonadotropin* mempunyai sifat biologik yang mirip dengan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*)

meskipun efek FSH terlihat lebih dominan (Nalbandov,1990). Cara kerja eCG melalui reseptor yang terdapat dalam sel-sel granulosa ovarium, jika sel granulosa telah menjadi peka maka adanya LH *surge* akan mengakibatkan terjadinya ovulasi (Hunter,1995).

Faktor-faktor yang mempengaruhi produksi eCG adalah ukuran tubuh, paritas, jumlah fetus dan genetik. Kandungan eCG lebih banyak ditemukan pada kuda jenis Poni, bunting kembar dan sudah sering beranak (Cole and Cupps, 1977).

Korpus luteum yang berkembang sesudah proses ovulasi (korpus luteum primer) dipertahankan sampai umur kebuntingan 40 hari s/d 3 bulan. Korpus luteum sekunder terbentuk pada umur kebuntingan 40-60 hari oleh pengaruh eCG. Korpus luteum sekunder ini dipertahankan sampai umur kebuntingan 4-5 bulan dimana fungsi untuk memproduksi progesterone telah diganti oleh plasenta (Cole and Cupps, 1977).

### **3.3. Pengujian *Equine Chorionic Gonadotropin***

Pengujian *equine Chorionic Gonadotropin* serum dapat dilakukan secara biologi dan imunologis. Pengujian secara biologi dilakukan dengan cara membandingkan respon ovarium tikus atau mencit yang belum dewasa terhadap serum kuda bunting. Sedangkan pengujian imunologis dapat dilakukan dengan menggunakan tes inhibisi-hemaglutinasi dan mikrotiter strip. Tes inhibisi-hemaglutinasi dilakukan dengan mengekstraksi serum kuda bunting dengan acetone, hasil ekstraksi direaksikan dengan eritrosit yang diformalin dan dilapisi

eCG bersama dengan antiserum eCG. Hasil reaksi menunjukkan positif bunting bila tidak terjadi aglutinasi (Hunter, 1995). Sedangkan mikrotiter strip didasarkan pada uji ELISA sandwich. Prinsip dasar ELISA sandwich adalah dengan menggunakan dua antibodi. Antibodi pertama (antibodi penangkap) biasanya menggunakan antibodi monoklonal yang dilapiskan pada mikroplate dan selanjutnya direaksikan dengan antigen. Antibodi kedua sebagai indikator yang dibuat tetap dengan menggunakan antibodi terkonjugasi spesifik (Smith, 1995).





## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di peternakan kuda di wilayah Surabaya, penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Nopember 2005.

#### 4.2. Materi Penelitian

##### 4.2.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah serum darah kuda bunting, methanol, PBS, *running gel*, butanol, *whatman paper*, *stacking gel*, *e buffer*, *laimli buffer*, *pewarna silver*, *BSA*, *pereaksi biuret*, *aquades*, *complete freund adjuvant (CFA)*, *incomplete freund adjuvant (IFA)*, membran *nitrocellulose*, konjugat *goat-anti-rabbit*, enzim alkalin fosfatase, *buffer blocking*, *buffer blocking*, NaCl-Triton, *buffer coating*, Substrat 4-NPP (*Nitro Phenyl Phosphate*), *buffer substrat*, larutan *stopper* (NaOH) dan anti-eCG.

##### 4.2.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *disposable syringe*, tabung reaksi, sentrifuge, *miliphore*, vial, *freezer*, SDS PAGE, *comb*, kuvet spektrofotometer, spektrofotometer Bausch-Lombs, mikroplat, *ELISA reader*,

### **4.3. Metode Penelitian**

#### **4.3.1. Pengambilan dan Pemisahan eCG Serum Darah Kuda Bunting**

Sebanyak 5 ekor kuda bunting muda (2-5 bulan) digunakan dalam penelitian ini. Darah diambil dari vena jugularis dengan menggunakan disposable syringe 50 ml, kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan  $45^{\circ}$  dan didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang didapat lalu disaring menggunakan milipore  $0,22 \mu\text{m}$ . Serum yang didapat ditampung pada vial dan disimpan dalam freezer dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  atau dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan methanol dengan perbandingan 1:5 dan dikocok selama 3 menit kemudian didiamkan 15-20 menit sampai terdapat 2 lapisan cairan. Supernatan diambil dengan disposable syringe sebanyak 5 ml dan dimasukkan dalam vial 10 ml untuk dibuat sediaan kering beku. Sebelum digunakan untuk uji selanjutnya perlu ditambahkan PBS sebanyak 5 ml.

#### **4.3.2. Preparasi eCG dengan SDS-PAGE**

Identifikasi eCG di dalam serum darah kuda bunting dilakukan dengan metode SDS-PAGE, dimana eCG mempunyai BM antara 45 s/d 65 KD. Cara kerja SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 6

#### **4.3.3. Identifikasi eCG dengan Western Blot**

Untuk mengetahui spesifisitas eCG maka protein dari SDS-PAGE dikarakterisasi dengan teknik Western Blot, teknik pelaksanaannya dapat dilihat pada Lampiran 6

#### **4.3.4. Isolasi eCG dengan Elektroelusi**

Isolasi eCG dilakukan dengan cara memotong gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai sepanjang pita yang dikehendaki, adapun cara kerjanya dapat dilihat pada Lampiran 6

#### **4.3.5. Pemeriksaan Isolat ECG dengan Biuret**

Kadar total protein ditentukan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar protein (BSA). Walaupun kadar total protein tidak secara tepat atau langsung menggambarkan kadar eCG namun pada dasarnya dapat dipakai sebagai indikasi naik turunnya kadar eCG dalam serum secara proporsional (Lampiran 6).

#### **4.3.6. Pembuatan Antibodi Poliklonal Anti-eCG**

Antibodi poliklonal anti-eCG diperoleh dengan jalan mengadakan imunisasi kelinci dengan eCG ( ). Prosedur pelaksanaannya dapat dilihat pada lampiran 6

#### **4.3.7. Purifikasi Antibodi Poliklonal Anti-eCG dengan *Saturated Ammonium Sulphate* (SAS)**

Selanjutnya antibodi poliklonal anti eCG yang diperoleh dari imunisasi kelinci tersebut diatas dimurnikan dengan SAS dan cara kerjanya dapat dilihat pada lampiran 6

#### **4.3.8. Pemeriksaan Optical Density Antibodi Poliklonal Anti-eCG dengan *Elisa Indirect***

Antibodi poliklonal yang sudah dipurifikasi ditera adengan ELISA indirect, cara kerjanya dapat dilihat pada lampiran 6

#### **4.3.9. Deteksi eCG dengan *Indirect Sandwich ELISA* untuk Pembuatan Kit Diagnostik eCG *Microtitre Strip***

Pembuatan kit diagnostik eCG microtitre strip pada prinsipnya mekanisme kerjanya menggunakan teknik ELISA dengan menggunakan antibodi monoklonal untuk coatingnya, prosedur kerjanya dapat dilihat pada lampiran 6

#### **4.3.10. Uji Lapangan**

Sebanyak 7 ekor kuda betina tidak bunting (kontrol) dan 7 ekor kuda betina yang diduga bunting muda (2-5 bulan) diambil darahnya untuk dilakukan uji kebuntingan dengan mikrotiter strip.

#### **4.4. Peubah Penelitian**

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar protein eCG yang diperiksa dengan metode biuret dan kejadian kebuntingan kuda.

#### **4.5. Analisis Data**

Data yang didapat ditabulasikan dan dianalisis dengan menggunakan uji F yang dilanjutkan dengan uji BNT.





## **BAB V**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **5.1. Identifikasi eCG dengan SDS-PAGE**

Hasil SDS-PAGE dari serum darah kuda bunting dapat dilihat pada Lampiran 2 Gambar 1. Pita-pita protein serum darah kuda bunting muda yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker ada tiga pita dengan BM antara 42,7 dan 66,4 kDa. Pita-pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul eCG yang berkisar 45-65 kDa. Pita-pita protein dengan berat molekul antara 42,7 dan 66,4 kDa dielektroelusi supaya terpisah dengan protein lain dan selanjutnya dilakukan identifikasi dengan western blot dan pemeriksaan kadar protein tersebut dengan metode biuret.

#### **5.2. Identifikasi Protein eCG dengan *Western Blot***

Pada uji spesifisitas ini didapatkan hasil pita protein eCG dengan berat molekul antara 55,6 – 66,4 kDa seperti yang terlihat pada Lampiran 2 Gambar 2

#### **5.3. Pemeriksaan Protein eCG dengan Metode Biuret**

Hasil pemeriksaan protein isolat eCG dengan metode biuret dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kadar protein isolat eCG dengan metode biuret

Kuda	Umur Kebuntingan							
	7 Minggu		11 Minggu		15 Minggu		19 Minggu	
	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP	Abs	KP
1	0,332	6640	0,407	8140	0,956	19120	0,360	7200
2	0,257	5140	0,526	10520	0,836	16720	0,331	6620
3	0,504	10080	0,346	6920	0,834	16680	0,208	4160
4	0,415	8300	0,512	10240	0,692	13840	0,248	4960
5	0,345	6900	0,487	9740	0,856	17120	0,262	5240
Rata-rata	0,371	7412	0,456	9112	0,835	16696	0,282	5636

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

Berdasarkan Tabel 1 di atas didapatkan rata-rata absorbansi protein eCG serum darah kuda bunting 7 minggu, 11 minggu, 15 minggu dan 19 minggu masing-masing 0,371, 0,456, 0,835 dan 0,282 sedangkan rata-rata kadar protein eCG serum darah kuda bunting masing-masing adalah 7412  $\mu\text{g/ml}$ , 9112  $\mu\text{g/ml}$ , 16696  $\mu\text{g/ml}$  dan 5636  $\mu\text{g/ml}$ .

Rataan dan simpangan baku kadar protein eCG serum darah kuda bunting muda dapat dilihat pada Tabel dibawah ini :

Tabel 2. Rataan kadar protein eCG serum darah kuda bunting muda

No.	Umur Kebuntingan	N	Rataan
1	7 minggu	5	<sup>ab</sup> 7412,00 $\pm$ 1865,94
2	11 Minggu	5	<sup>b</sup> 9112,00 $\pm$ 1532,88
3	15 Minggu	5	<sup>c</sup> 16696,00 $\pm$ 1885,02
4	19 Minggu	5	<sup>a</sup> 5636,00 $\pm$ 1245,67

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0.05$ ).

Berdasarkan analisis statistik ANOVA (Lampiran 1) terdapat perbedaan kandungan kadar protein eCG serum darah sesuai umur kebuntingan kuda. Kadar protein eCG semakin meningkat pada umur kebuntingan 7 minggu sampai umur kebuntingan 15 minggu, namun setelah umur kebuntingan 19 minggu kadarnya mulai turun. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Knobill *et al.* (1988) bahwa eCG mulai muncul berada dalam peredaran darah induk pada umur kebuntingan 40 hari. Konsentrasi eCG meningkat terus sampai umur kebuntingan 55-65 hari dan kemudian menurun perlahan sampai menghilang pada umur kebuntingan 150 hari.

Secara statistik kadar protein eCG pada umur kebuntingan 7 minggu tidak berbeda dengan umur kebuntingan 11 minggu dan 19 minggu. Sedangkan antara umur kebuntingan 11 minggu dan 19 minggu terdapat perbedaan yang nyata. Kadar protein eCG pada umur kebuntingan 15 minggu didapatkan tertinggi dibandingkan dengan umur kebuntingan 7 minggu, 11 minggu dan 19 minggu serta secara statistik berbeda secara nyata.

Perbedaan kadar protein eCG ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu ukuran tubuh, paritas, jumlah fetus dan genetik. Kandungan eCG lebih banyak ditemukan pada kuda jenis Poni, bunting kembar dan sudah sering beranak (Cole and Cupps, 1977).

#### 5.4. Pemeriksaan Kadar Antibodi Poliklonal Anti- eCG dengan Elisa *Indirect*

Nilai Optical Density (OD) dari antibodi poliklonal anti-eCG dapat dilihat pada Tabel 3, 4, 5 dan 6.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA *reader* 14 hari setelah penyuntikan eCG dalam CFA (hari ke 14)

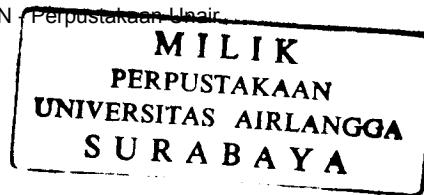
NO	BESAR PENGECERAN											
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
I	0,581	0,514	0,385	0,343	0,225	0,223	0,204	0,248	0,273	0,121	0,119	0,118
II	0,817	0,706	0,549	0,384	0,383	0,240	0,288	0,179	0,176	0,179	0,154	0,186
III	0,827	0,707	0,628	0,492	0,420	0,280	0,259	0,204	0,213	0,155	0,138	0,120
IV	1,207	0,922	0,920	0,744	0,730	0,549	0,385	0,307	0,289	0,209	0,169	0,221
V	0,198	0,195	0,197	0,181	0,168	0,130	0,169	0,157	0,149	0,137	0,123	0,157

Keterangan : I-IV : kelinci perlakuan 1-4  
V : kelinci kontrol

Tabel 4. Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA *reader* 7 hari setelah *booster* pertama (hari ke 21)

NO	BESAR PENGECERAN											
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
I	1,000	0,823	0,611	0,523	0,330	0,324	0,257	0,286	0,299	0,142	0,139	0,135
II	1,344	1,146	0,917	0,624	0,578	0,366	0,361	0,240	0,208	0,218	0,177	0,212
III	1,346	1,199	1,052	0,823	0,674	0,445	0,352	0,261	0,254	0,181	0,160	0,138
IV	1,988	1,588	1,571	1,189	1,110	0,825	0,603	0,395	0,382	0,252	0,201	0,252
V	0,291	0,292	0,269	0,259	0,242	0,165	0,202	0,398	0,227	0,154	0,140	0,177

Keterangan : I-IV : kelinci perlakuan 1-4  
V : kelinci kontrol



Tabel 5. Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA reader 7 hari setelah *booster* kedua (hari ke 28)

NO	PENGECERAN											
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
I	1,357	1,104	0,849	0,690	0,429	0,410	0,323	0,328	0,328	0,164	0,159	0,152
II	1,854	1,606	1,264	0,868	0,768	0,510	0,451	0,284	0,242	0,243	0,202	0,238
III	1,857	1,677	1,429	1,129	0,911	0,611	0,462	0,326	0,296	0,206	0,184	0,157
IV	2,713	2,270	2,190	1,673	1,500	1,117	0,805	0,533	0,468	0,313	0,244	0,289
V	0,389	0,370	0,341	0,338	0,319	0,200	0,241	0,420	0,250	0,172	0,158	0,198

Keterangan : I-IV : kelinci perlakuan 1-4  
 V : kelinci kontrol

Tabel 6. Hasil pemeriksaan antibodi poliklonal anti-eCG dengan ELISA reader 7 hari setelah *booster* ketiga (hari ke 35)

NO	PENGECERAN											
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
I	1,639	1,344	1,041	0,835	0,524	0,495	0,367	0,362	0,351	0,183	0,177	0,167
II	2,297	1,956	1,554	1,069	0,921	0,610	0,521	0,321	0,271	0,264	0,224	0,260
III	2,320	2,058	1,741	1,380	1,099	0,744	0,562	0,381	0,334	0,224	0,204	0,174
IV	2,865	2,784	2,706	2,043	1,800	1,338	0,981	0,659	0,539	0,357	0,281	0,321
V	0,465	0,439	0,398	0,409	0,387	0,229	0,271	0,439	0,271	0,188	0,175	0,215

Keterangan : I-IV : kelinci perlakuan 1-4  
 V : kelinci kontrol

Rataan nilai OD antibodi poliklonal anti-eCG *bleeding* I-IV pada pengenceran 20 – 40960 terlihat pada Tabel 7.



Titer antibodi dinyatakan positif apabila nilai OD antibodi lebih besar dari nilai *Cut of Value* (COV). COV dihitung dari 1,5-2 kali nilai rata-rata kontrol. Hasil titer positif pada *bleeding* I diperoleh pada pengenceran 20 – 640. Sedangkan pada *bleeding* II, III dan IV titer positif diperoleh pada pengenceran 20 – 1280 (lihat juga Lampiran 3).

Tabel 7. Titer antibodi poliklonal anti - eCG pada empat ekor kelinci pada *bleeding* I,II,III dan IV

<i>Bleeding</i>	Titer antibodi positif pada pengenceran							COV
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	
I	0,850	0,712	0,621	0,491	0,440	0,323	-	0,284
II	1,420	1,189	1,038	0,790	0,673	0,490	0,393	0,353
III	1,950	1,664	1,433	1,090	0,902	0,662	0,510	0,425
IV	2,280	2,036	1,761	1,332	1,086	0,797	0,608	0,486

Antibodi atau immunoglobulin (Ig) adalah protein yang diproduksi untuk merespon adanya molekul asing didalam tubuh. Antibodi mempunyai sifat yang unik dibanding protein lain karena terbuat dengan jutaan bentuk yang berbeda, masing-masing tempat pengikatan berbeda yang hanya mengenali molekul tertentu (antigen) yang menginduksi dan merangsang pembuatannya (Male, 1991; Albert *et al.*, 1994).

Antibodi poliklonal anti-eCG sudah dapat dideteksi pada hari ke 14 setelah penyuntikan eCG dalam *complete freund adjuvant*. Setelah *booster* 1, 2 dan 3 terlihat adanya peningkatan kadar antibodi (Tabel 8.).



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 (Baratawidjaja, 2000). Sedangkan Tizard (1988) menyatakan bahwa kekhususan antibodi yang dihasilkan oleh suatu limfosit adalah identik dengan reseptor antigennya. Respon imun terhadap unsur-unsur patogen sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenal molekul-molekul asing atau antigen yang terdapat pada permukaan unsur patogen dan kemampuan untuk melakukan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan antigen (Kresno, 1996).

Kemampuan untuk menghasilkan respon imun terdapat pada organ-organ limforetikuler yang letaknya tersebar di seluruh tubuh seperti sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, thymus, system saluran napas, saluran pencernaan. Antigen yang dapat menginduksi respon antibodi, baik respon seluler maupun respon humoral disebut sebagai imunogen (Harlow and Lane, 1988 ; Cormack, 1994). Ciri penting dari imunogen adalah kemampuannya untuk menyulut respon imun dengan bantuan limfosit T. Imunogen sedikitnya memiliki 2 determinan atau epitop untuk dapat merangsang pembentukan antibodi dan sedikitnya 1 epitop untuk dapat merangsang limfosit T (Kresno, 1996).

Bila sistem imun terpapar oleh zat yang dianggap asing, maka akan terjadi dua jenis respon yaitu respon imun non spesifik dan respon imun spesifik. Respon imun non spesifik umumnya merupakan imunitas bawaan dalam arti bahwa respon

imun terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut. Sedangkan respon imun spesifik merupakan respon didapat yang timbul terhadap antigen tertentu, yang mana tubuh pernah terpapar sebelumnya (Kresno, 1996).

Limfosit T yang bertanggungjawab untuk respon selular dirangsang untuk memproduksi sejumlah zat yang diperlukan untuk memacu berbagai reaksi, sedangkan aktivasi sel B mengakibatkan sel B berproliferasi dan berdeferensiasi. Sel B akan mengenali epitop antigen sehingga merangsang dan memproduksi antibodi (Baratawidjaya, 2000).

Menurut Kresno (1996) tempat dan cara masuknya antigen ke 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. Di dalam sel antigen diproses dengan berbagai cara, 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).

Pemrosesan antigen merupakan proses yang penting untuk stimulasi limfosit selanjutnya, karena reseptor limfosit akan mengenal antigen berdasarkan susunan asam amino dalam rantai peptida (Nossal, 1993). Sedangkan menurut Tizard (1988) dan Fischer *et al.* (1992) menyatakan bahwa antigen yang terikat pada reseptor limfosit dengan cepat merangsangnya untuk memulai berkembang

biak dan berdeferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori. Peptida yang terikat molekul MHC *haplotype* tertentu membentuk struktur yang dapat dikenal oleh reseptor T (TcR) dan inilah yang menentukan spesifitasnya (Kresno, 1996).

Interaksi antara antigen yang dipresentasikan oleh sel APC dengan limfosit T-penolong (Th) merupakan tahap awal terjadinya respon imun selular maupun humoral. Aktivasi sel APC berlangsung cepat dan dapat diinduksi oleh unsur antigen atau imunogen itu sendiri. Aktivasi APC terjadi melalui sitokin yang diproduksi oleh sel T, diantaranya yang paling penting adalah *interferon-gamma* (IFN-gamma), *granulocyte-macrophage colony stimulation factor* (GM-CSF) dan *tumor necrose factor* (TNF) (Kresno, 1996).

Aktivasi limfosit mengakibatkan terjadinya 2 proses yaitu proliferasi dan diferensiasi sel menjadi sel efektor (Tizard, 1988). Sel-sel efektor yang terbentuk pada fase terminal mempunyai kemampuan membentuk antibodi dengan spesifitas tinggi. Aktivasi sel T, khususnya limfosit Th dimulai dengan interaksi antara reseptor sel T dengan kompleks antigen-MHC kelas II yang terdapat pada permukaan APC. Selain menyajikan antigen, APC juga memproduksi interleukin-1 yang mampu merangsang pertumbuhan sel T. Interaksi ini merangsang berbagai reaksi biokimia di dalam sel T, diantaranya perombakan fosfatidilinositol dan peningkatan konsentrasi ion kalsium, serta aktivasi protein kinase-C yang diperlukan sebagai katalisator pada fosforilasi berbagai jenis protein. Reaksi-reaksi tersebut mengakibatkan serangkaian reaksi-reaksi yang menghasilkan reseptor IL-2 dan produksi IL-2 diperlukan untuk proliferasi sel selanjutnya.

Sebagian sel T selanjutnya berfungsi sebagai sel T *helper-inducer* untuk membantu sel B, sebageian lagi kembali dalam keadaan istirahat menjadi sel memori. Aktivasi sel B dapat terjadi atas rangsangan antigen T-independen tipe I, antigen T-independen tipe II dan antigen T-dependen. Antigen T-independen tipe I dalam konsentrasi tinggi mampu merangsang sel B secara poliklonal tanpa melihat spesifisitas reseptor permukaan sel B. Antigen T-independen tipe II adalah antigen yang tidak segera dirombak dalam tubuh yang mampu merangsang sel B tanpa bantuan sel Th. Sedangkan antigen T-independen merangsang pembentukan IgM (Kresno, 1996).

Sel T yang diaktivasi oleh antigen dapat memproduksi IL-2 yang diperlukan untuk proliferasi sel T sendiri tetapi sel T juga memproduksi berbagai faktor atau limfokin yang dapat merangsang perubahan pada berbagai jenis sel antara lain sel B, sel T sitotoksik, makrofag dan lain-lain karena itu sel itu disebut sebagai sel T *inducer*. Beberapa jenis limfokin yang diproduksi oleh sel T dan digunakan untuk merangsang sel B adalah *B-cell stimulatory factor* (IL-4), *B-cell growth factor* (IL-6), *B-cell differentiation factor-mu* (BCDF-mu), BCDF-gama serta *gamma-interferon*. Dengan rangsangan limfokin diatas sel B berproliferasi dan berdeferensiasi lebih lanjut menjadi sel plasma dan memproduksi imunoglobulin. BCDF-mu merangsang produksi IgM sedangkan BCDF-gama menyebabkan perubahan kelas (*class-switch*) IgM menjadi IgG, selanjutnya sintesis dan sekresi imunoglobulin oleh sel plasma (Kresno, 1996).

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. eCG merupakan hormon glikoprotein dengan berat molekul 45.000-65.000, termasuk antigen potensial yang dapat menstimulasi pembentukan antibodi.

Pada penelitian ini, eCG dianggap sebagai benda asing yang dimasukkan ke dalam tubuh kelinci dan nantinya akan dihasilkan antibodi yang disebut anti eCG. Produksi antibodi dengan memasukkan antigen pada tubuh secara berulang ulang disebut sebagai produksi serum hiperimun atau antibodi poliklonal (Smith, 1995). Cara pembuatan antibodi anti-eCG adalah seperti yang dilakukan oleh Kikutani (1987) yaitu dengan menyuntikan eCG dalam pelarut Freund *complete* dan diulang sebanyak 3 kali dengan penyuntikan eCG dalam pelarut Freund *incomplete* dengan selang waktu ulangan 7 hari dan pada hari ke 35 didapatkan serum dengan titer antibodi yang paling tinggi. Untuk menginduksi timbulnya antibodi terhadap antigen diperlukan dosis 50-1000 µg dengan penyuntikan secara sub kutan (Smith, 1995).

Pemeriksaan titer antibodi dengan ELISA menggunakan antigen sebesar 2,5 I.U. eCG yang merupakan antigen standar untuk mendeteksi timbulnya antibodi seperti yang dilakukan oleh Supriatna dkk. (1998) dan pembacaan hasil dilakukan 15 – 60 menit setelah inkubasi dari reagen. Hasil pemeriksaan dikatakan positif apabila menunjukkan nilai lebih dari 1,5-2 dari rata-rata kontrol negatif dan titer pada kelompok kontrol negatif kurang dari 0,2 (Paolucci, 1986).



### 5.5. Uji Lapangan

Hasil dari reaksi serum darah kuda yang diduga bunting dengan antibodi poliklonal anti-eCG yang diproduksi pada kelinci menunjukkan perubahan warna kekuningan, sedangkan pada serum kuda yang tidak bunting setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-eCG tidak menunjukkan perubahan warna. Hal ini membuktikan serum darah kuda yang diduga bunting mengandung eCG. Adanya eCG dalam serum darah kuda membuktikan bahwa kuda tersebut bunting. Sebaliknya kuda yang tidak bunting di dalam serum darahnya tidak mengandung eCG sehingga setelah ditambahkan antibodi poliklonal anti-eCG tidak terjadi reaksi antigen-antibodi dan tidak menimbulkan perubahan warna. Perubahan warna hasil reaksi antigen eCG dengan antibodi poliklonal anti-eCG pada kuda-kuda yang diduga bunting dapat dilihat pada Table 8.

Tabel 8. Perubahan Warna Kekuningan Hasil Reaksi eCG dan Antibodi Poliklonal Anti-eCG pada Pengenceran 160

Kuda	Tidak Bunting	Diduga Bunting 2 Bulan	Diduga Bunting 3 Bulan
1	-	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	+
7	-	+	+
Jumlah	7 (100 %)	5 (71,4 %)	5 (71,4 %)



Sedangkan perubahan warna kekuningan pada mikroplat dapat dilihat pada Lampiran 4.

Antigen (eCG) yang telah di coating pada plastik polistirin (mikroplat) bila ditambahkan antibodi (antibodi poliklonal anti-eCG), setelah diinkubasikan bila antibody tersebut homolog dengan antigen maka akan terikat pada antigen yang sudah dibuat tidak bergerak pada sumuran mikroplat. Antibodi berlabel enzim (goat anti rabbit berlabel alkalin pospatase) ditambahkan ke dalam sumuran mikroplat akan terikat pada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk. Bila substrat enzim ditambahkan dan hidrolisis berkaitan dengan perubahan warna yang sebanding dengan konsentrasi antibodi. Perubahan warna ini dapat dilihat secara visual atau dengan kolorimeter.

Hasil perubahan warna kekuningan pada reaksi antigen-antibodi pada kuda yang diduga bunting 2 dan 3 bulan menunjukkan 5 ekor (71,4 %) terjadi perubahan warna kekuningan pada mikroplat. Hal ini mengindikasikan bahwa dari ke tujuh kuda tersebut dinyatakan positif bunting sebanyak 5 ekor, setelah dikonfirmasi dengan palpasi rectal, maka keberhasilan deteksi kebuntingan mencapai 100 %.

perubahan warna kekuningan pada mikroplat. Hal ini mengindikasikan bahwa dari ke tujuh kuda tersebut dinyatakan positif bunting sebanyak 5 ekor, setelah dikonfirmasi dengan palpasi rectal, maka keberhasilan deteksi kebuntingan mencapai 100 %.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

- Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa *Equine Chorionic Gonadotropin (eCG)* dapat dideteksi pada kuda bunting pada umur kebuntingan 7 -19 minggu.
- Keberhasilan deteksi kebuntingan dengan mikrotiter strip pada kuda bunting mencapai 100%

#### 6.2.S a r a n

Saran yang dapat diajukan adalah keberadaan eCG dapat digunakan pemeriksaan kebuntingan secara laboratoris, namun supaya pemeriksaan kebuntingan dapat lebih praktis diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuat tes kebuntingan paper strip berdasarkan reaksi imunologis dari eCG dan anti-eCG yang dapat digunakan dengan mudah dilapangan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alberts, B., D. bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. *Biologi Molekuler Sel*. Edisi kedua. Jakarta : Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Anonimous. 1984. *Laboratory Training Manual on RIA in Animal Reproduction*. Technical Report. Seris No. 233. IAEA. Vienna, Austria.
- Anonimous. 2001. *Jawa Timur Dalam Angka 2001*. Badan Statistik Propinsi Jawa Timur. Hal. 163.
- Baratawidjaja, K.G. *Imunologi Dasar*. 2000. Edisi 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Choi H.S., E. Keisenhofer, H. Gantner, J. Hois and E. Bamberg. 1987. *Pregnancy Diagnosis in Sows by Estimation of Oestrogens in Blood, Urine or Feces*. *Anim. Reprod. Sci.* 15: 209-216.
- Cole, H.H. and P.T. Cupps. 1977. *Reproduction in Domestic Animals*. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press, New York. P. 415-417.
- England I.V., E. Ropstad, O. Andresen and L.O. Eik. 1997. *Pregnancy Diagnosis in Dairy Goats Using Progesterone Assay*. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 237-243.
- Fischer, H., H.S.H. Seifert and A. Bittner. 1992. *Higiene dan Penyakit Ternak*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincutt Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Hunter, R.P.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit Universitas Udayana. Hal. 353-357.
- Kahn W., R. Kenney and D. Volkmann. 1994. *Veterinary Reproductive Ultrasonography*. Mosby-Wolfe, London.
- Kaul V. and B.S. Prakash. 1994. *Accuracy of Pregnancy/No Pregnancy Diagnosis in Zebu and Crossbreed Cattle and Murrah Buffaloes by Milk Progesterone Determination Post Insemination*. *Trop. Anim. Health Prod.* 26 : 187-192.

- Kikutani, M., M. Ishiguro., T. Kitagawa., S. Imamura and S. Muira. 1987. Enzyme Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin Employing  $\beta$ -Galaktosidase as Label. *J. Obst and Gyn.*
- Knobil, E., D. Neill, L.L. Ewing, C.L. Market, G.S. Greenwald and D.W. Pfaff. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2. Reven Press New York. p. 2122-2124.
- Kresno, S.B. 1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Mahaputra, L. 1994. *Ilmu Kebidanan Veteriner*. Edisi Lima. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Male, D. 1991. *Immunology an Illustrated Outline*. 2<sup>nd</sup> ed. London-New York : Gower Medical Publishing.
- Mialon M.M., G. Renan, S. Camous, J. Martal and F. Menissier. 1994. Detection of Pregnancy by Radioimmunoassay of a Pregnancy Serum Protein (PSP60) in Cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 34 : 65-72.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Reproduction Physiology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, London
- Nossal, G.J.V. 1993. Life, Death and the Immune System. *Scientific American*. 269 (3) : 21-28.
- Paolucci, F., M. Piechaczyk, T. Chardes, M. Cot, H. Rogier, Mc. Cot, B. Pau and J.M. Bastide. 1986. Monoclonal Antibody Screening. In *Methods of Enzymatic Analysis*. 3<sup>rd</sup> Ed. Weinhim Reprint from Bergmeyer, VCH. pp 44-58.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Pierson R.A., J.P. Kastelic and O.J. Ginther. 1988. Basic Principles and Techniques for Transrectal Ultrasonography in Cattle and Horses. *Theriogenology*. 29 : 3-20.
- Powis R.L. 1986. *Ultrasound Science for the Veterinarian*. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2 : 3-27.
- Rose, R.J and D.R. Hodgson. 1993. *Manual of Equine Practice*. W.B. Saunders Company Philadelphia.

- Sasser R.G., C.A. Ruder., K.A. Ivani, J.E. Butler and W.C. Hamilton. 1986. Detection of Pregnancy by Radioimmunoassay of a Novel Pregnancy-Specific Protein in Serum of Cows and a Profile of Serum Concentrations During Gestation. *Biol Reprod.* 35 : 936-942.
- Smith, J.R. 1995. Produksi Serum Hiperimun, Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. James Cook University of North Queensland, G.W. Burgess Ed.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Taverne M.A.M. and A.A. Willemse. 1989. Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction. Kluwer Academic Publishers, London.
- Tizard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.





## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil analisis statistik ANOVA dan BNT dari eCG serum darah kuda bunting

#### Oneway

##### Descriptives

ECG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
bunting 7 mg	5	7412.00	1865.94	834.47	5095.13	9728.87	5140.00	10080.00
bunting 11 mg	5	9112.00	1532.88	685.53	7208.68	11015.32	6920.00	10520.00
bunting 15 mg	5	16696.00	1885.02	843.00	14355.45	19036.56	13840.00	19120.00
bunting 19 mg	5	5636.00	1245.67	557.08	4089.30	7182.70	4160.00	7200.00
Total	20	9714.00	4582.26	1024.63	7569.44	11858.57	4160.00	19120.00

##### ANOVA

ECG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	355200080.000	3	118400026.667	43.305	.000
Within Groups	43745600.000	16	2734100.000		
Total	398945680.000	19			



## Post Hoc Tests

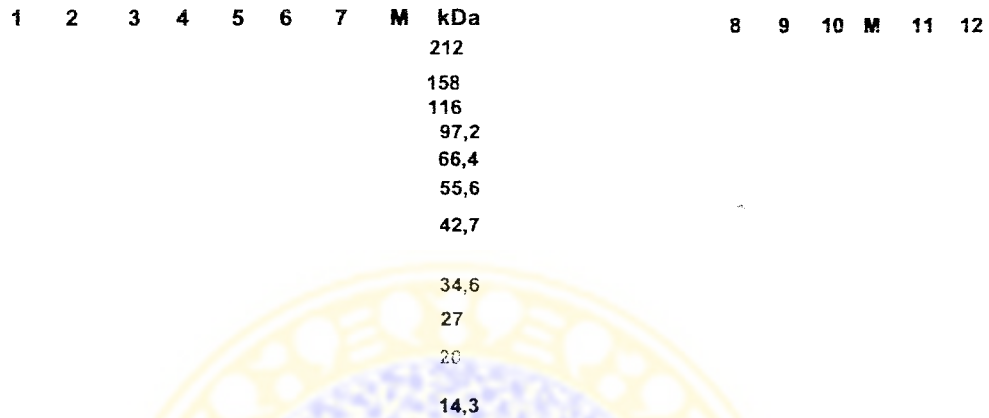
### Multiple Comparisons

Dependent Variable: ECG  
LSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
bunting 7 mg	bunting 11 mg	-1700.00	1045.77	.124	-3916.94	516.94
	bunting 15 mg	-9284.00(*)	1045.77	.000	-11500.94	-7067.06
	bunting 19 mg	1776.00	1045.77	.109	-440.94	3992.94
bunting 11 mg	bunting 7 mg	1700.00	1045.77	.124	-516.94	3916.94
	bunting 15 mg	-7584.00(*)	1045.77	.000	-9800.94	-5367.06
	bunting 19 mg	3476.00(*)	1045.77	.004	1259.06	5692.94
bunting 15 mg	bunting 7 mg	9284.00(*)	1045.77	.000	7067.06	11500.94
	bunting 11 mg	7584.00(*)	1045.77	.000	5367.061	9800.94
	bunting 19 mg	11060.00(*)	1045.77	.000	8843.06	13276.94
bunting 19 mg	bunting 7 mg	-1776.00	1045.77	.109	-3992.94	440.94
	bunting 11 mg	-3476.00(*)	1045.77	.004	-5692.94	-1259.06
	bunting 15 mg	-11060.00(*)	1045.77	.000	-13276.94	-8843.06

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

Lampiran 2. Hasil Identifikasi Protein eCG dengan Metode SDS-PAGE dan Uji Spesifisitas Protein eCG dengan Metode Western Blot



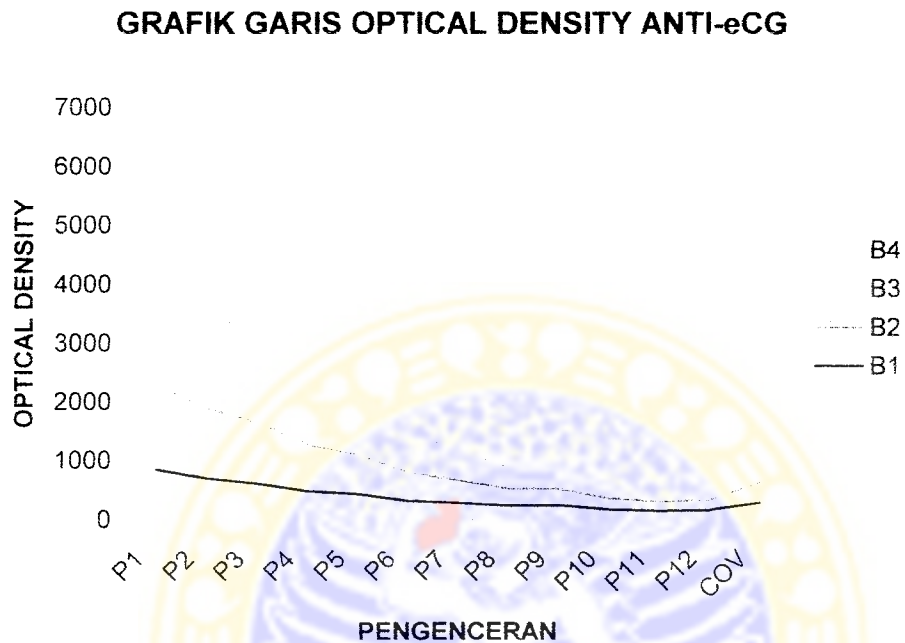
Gambar 1. Pita-pita protein dari serum darah kuda bunting muda

Keterangan : M : Marker  
 1. 2. 3 : Kuda bunting 7 minggu  
 4. 5. 6 : Kuda bunting 11 minggu  
 7. 8. 9 : Kuda bunting 15 minggu  
 10. 11. 12 : Kuda bunting 19 minggu



Gambar 2. Pita Protein eCG hasil Uji Spesifisitas dengan Western Blotting

Keterangan : 1.1. – 1.3. : Kuda bunting umur 2 bulan  
 2.1. – 2.3. : Kuda bunting umur 3 bulan  
 3.1. – 3.3. : Kuda bunting umur 4 bulan

Lampiran 3. Hasil Uji ELISA *Indirect* Antibodi Poliklonal Anti-eCGGambar 3. Grafik Garis dari *Optical Density* Antibodi Poliklonal Anti-eCG

Keterangan :

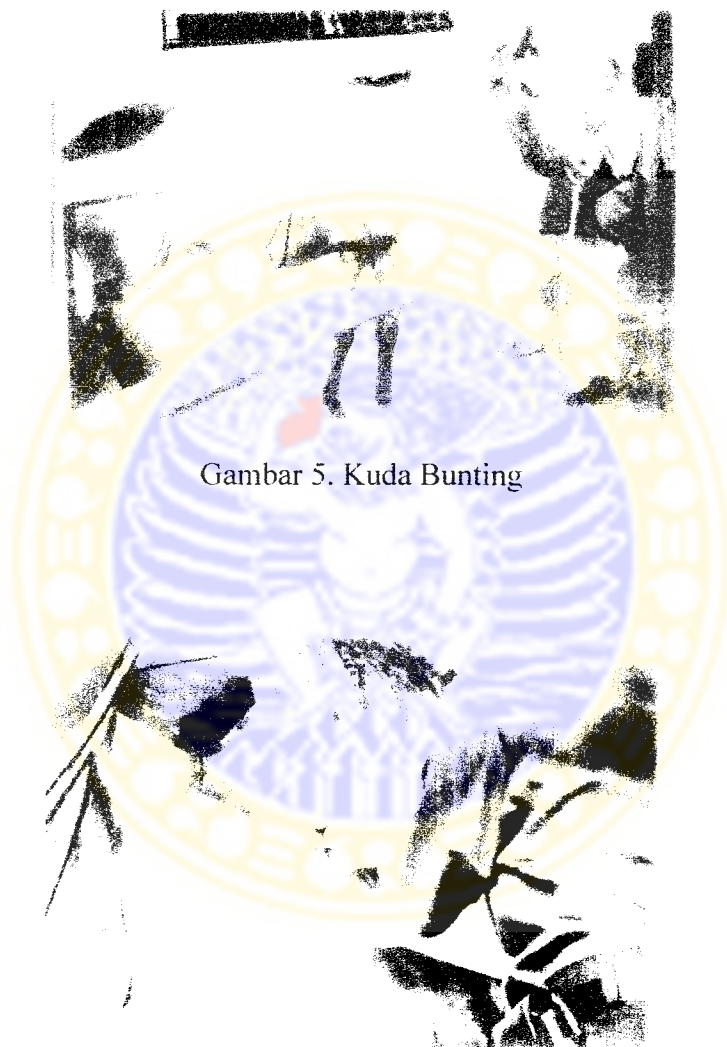
P1	: Pengenceran 20 kali	P7	: Pengenceran 1280 kali
P2	: Pengenceran 40 kali	P8	: Pengenceran 2560 kali
P3	: Pengenceran 80 kali	P9	: Pengenceran 5120 kali
P4	: Pengenceran 160 kali	P10	: Pengenceran 10240 kali
P5	: Pengenceran 320 kali	P11	: Pengenceran 20480 kali
P6	: Pengenceran 640 kali	P12	: Pengenceran 40960 kali
COV	: Cut Of Value	B1-B4	: Bleeding 1-4

Lampiran 4. Hasil Uji Serum Kuda Yang Diduga Bunting Dengan Antibodi poliklonal Anti-eCG



Gambar 4. Perubahan Warna Kekuningan Hasil Reaksi eCG dan Antibodi poliklonal Anti-eCG

Lampiran 5. Kuda Bunting dan Pengambilan Darah Kuda Melalui Vena Jugularis



Gambar 5. Kuda Bunting

Gambar 6. Pengambilan Darah Kuda Melalui Vena Jugularis

## Lampiran 6: Metode Penelitian

### Preparasi eCG dengan SDS-PAGE

Masukkan running gel ke dalam alat SDS-PAGE melalui dinding kira-kira kurang dari batas atas. Tambahkan butanol kira-kira 1 ml dan biarkan selama 25 menit. Kemudian butanol dibuang setelah gel membeku dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan *Whatman paper*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* melewati dinding sampai penuh dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul set (25 menit). Selanjutnya *comb* diambil dan bersihkan sisa-sisa gel dengan e buffer. Sampel (serum kuda bunting) sebanyak 15  $\mu$ l dan dicampur dengan 5  $\mu$ l laimli buffer dan dipanaskan 100 °C selama 5 menit. Kemudian 10  $\mu$ l sampel dimasukkan ke lubang cetakan dengan plastik tip 200  $\mu$ l. Cetakan dimasukkan ke alat biorad, power supply di starter dengan kekuatan 125 V, 40 mA selama 1 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan *buffer* dan hasilnya divisualisasikan dengan pewarnaan silver.

Keberadaan eCG dilihat dari terbentuknya pita-pita protein yang terbentuk yang sesuai dengan BM dari ECG setelah dibandingkan dengan marker.

### Identifikasi eCG dengan Western Blot

Protein dari SDS-PAGE dikarakterisasi dengan teknik Western Blot. Setelah proses running selesai, gel ditransfer pada membran nitroselulose dengan cara semi-dry electrophoresis. Pada anode electroblotting transfer apparatus berturut-turut dimasukkan 5 lembar kertas absorben, 1 lembar nitroselulose, gel, 5



lembar kertas absorben, kemudian dituangkan transfer buffer (15,15 g Tris aminomethan, 72 g glisin, 1000 ml methanol dalam 5000 ml aquades pH 8,3), kemudian dinyalakan dengan tegangan 5 V dan kuat arus 45 mA selama 60 menit.

Membran nitroselulose (blot) kemudian diblocking dengan 1 % BSA selama 20 menit dan dicuci 2 kali 5 menit dengan PBS-tween, selanjutnya ditambahkan antibodi poliklonal rabbit-anti eCG sebanyak 1:500 selama 3 jam. Blot kemudian dicuci 4 kali 5 menit dan berikutnya ditambahkan konjugat goat anti rabbit yang berlabel enzim alkalin fosfatase dengan perbandingan 1 : 10.000 selama 1 jam. Setelah berlalu blot dicuci 3 kali 5 menit dan dilakukan pewarnaan dengan fast-red (200 mM Tris-HCl ph 8,0; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 12 mg/ml fast-red; 0,8 mg/ml p-NPP dalam 50 ml aquades). Blot dicuci lagi dengan PBS selama 5 menit dan dikeringkan.

#### **Isolasi eCG dengan Elektroelusi**

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong nilon. Kemudian dimasukkan dalam block glass yang mengandung PBS dan dilanjutkan dengan steerer selama 24 jam, setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan perwarnaan silver, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Setelah itu dilakukan uji Biuret untuk mengetahui kadar dari protein yang terelusi tersebut.





### Pemeriksaan Isolat ECG dengan Biuret

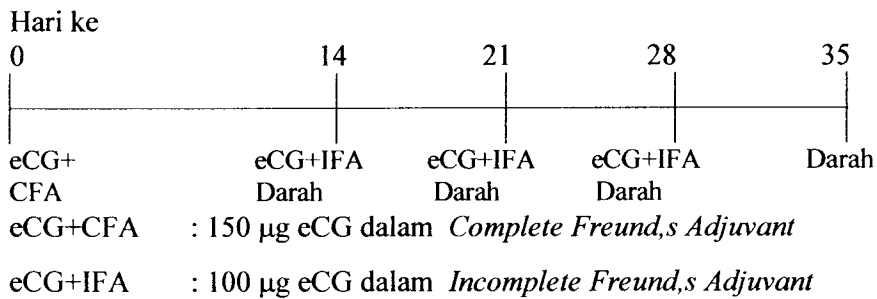
Kadar total protein ditentukan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar protein (BSA). Dipersiapkan tiga kuvet spektrofotometer, kuvet pertama diberi tanda S sebagai kuvet sample yang akan diukur. Dalam kuvet S dimasukkan 0,05 ml isolat eCG dan 2,5 ml pereaksi biuret. Kuvet kedua diberi tanda ST sebagai kuvet standar, dimasukkan 0,05 ml larutan standar protein dan 2,5 ml pereaksi biuret. Kuvet ketiga diberi tanda BL (blanko) dimasukkan 2,5 ml pereaksi biuret dan 0,05 ml aquades. Ketiga kuvet tersebut didiamkan selama 30 menit dan kemudian dibaca pada spektrofotometer Bausch-Lombs spektronik 20 dengan panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan : Kadar total protein ( $\mu\text{g/ml}$ )  $\Rightarrow Y = 5 \cdot 10^{-5} X$

Keterangan : Y = Nilai absorbansi  
X = Kadar protein ( $\mu\text{g/ml}$ )

### Pembuatan Antibodi Poliklonal Anti-eCG

- Sebanyak 5 ekor kelinci jantan strain New Zealand disuntik secara sub kutan dengan 150  $\mu\text{g}$  eCG dalam pelarut Freund's *complete* dan satu kelinci sebagai kontrol, tanpa mendapat suntikan eCG.
- Penyuntikan ulang dilakukan setiap seminggu sekali dengan 100  $\mu\text{g}$  eCG dalam pelarut Freund's *incomplete* sampai 4 kali ulangan.
- Satu minggu setelah penyuntikan ulang ke empat, sampel darah diambil dari masing-masing kelinci sebanyak 5 cc melalui vena auricularis untuk dianalisa titer antibodi terhadap eCG dengan menggunakan ELISA *indirect*.

**Jadwal pelaksanaan pembuatan anti-eCG**

**Purifikasi Antibodi Poliklonal Anti- eCG dengan *Saturated Ammonium Sulphate* (SAS)**

- Jernihkan cairan serum anti- eCG dari kontaminan-kontaminan lainnya dengan jalan sentrifugasi pada 17.000 g selama 15 menit, 4 °C. Ambil supernatan yang jernih dan biarkan di dalam es.
- Tambahkan pelan-pelan dengan volume yang sama ammonium sulfat jenuh, biarkan pada 4 °C selama 2 jam.
- Pindahkan cairan tadi ke dalam tabung sentrifuse dan putar pada 1000 rpm, 10 menit, 4 °C.
- Pellet dari endap yang didapat dicuci 2 kali dengan 50 % ammonium sulfat dingin. Pencucian dapat dilakukan dengan melarutkan pellet tadi ke dalam air dan selanjutnya diulangi presipitasi dengan 50 % ammonium sulfat.
- Pellet dilarutkan dalam aquades dengan 1/10 volume cairan semula.
- Pindahkan larutan tersebut ke dalam tabung dialisis yang sudah dipersiapkan dan dialisa terhadap PBS pada 4 °C dengan 2 kali pergantian volume.
- Sentrifuse dan pisahkan presipitat, aliquot dalam volume kecil dan disimpan pada – 70 °C.

### **Pemeriksaan Optical Density Antibodi Poliklonal Anti-eCG dengan Elisa *Indirect***

- eCG serum darah kuda diencerkan dengan *buffer coating* sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 5 unit/100  $\mu$ l. 100  $\mu$ l larutan tersebut dimasukkan kedalam setiap sumuran mikroplat ELISA.
- Larutan dalam mikroplat diinkubasi semalam ( $\pm$  18 jam) pada suhu 4  $^{\circ}$ C.
- Setiap sumuran mikroplat dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.
- *Buffer blocking* (BSA) sebesar 150  $\mu$ l ditambahkan kedalam setiap sumuran mikroplat.
- Sumuran mikroplat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37  $^{\circ}$ C.
- Setiap sumuran mikroplat dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.
- Antibodi kelinci anti-eCG diencerkan dengan *buffer blocking* pada 1/10 dengan menggunakan tabung mikro. Pengenceran antibodi tersebut dilanjutkan sehingga diperoleh pengenceran 1/20, 1/40, 1/80, ... 1/40960 dengan menggunakan mikroplat lain (bukan mikroplat ELISA). Masing-masing pengenceran dipindahkan dengan urutan sebagai berikut :
  - Ab1 diisikan pada baris A
  - Ab2 diisikan pada baris B
  - Ab3 diisikan pada baris C
  - Ab4 diisikan pada baris D
  - Ab5 (kontrol negatif) diisikan pada baris E
  - Kontrol PBS diisikan pada baris G

- Mikroplat diinkubasi selama 1jam pada suhu 37 °C.
- Setiap sumuran mikroplat dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.
- Konjugat *goat-anti-rabbit* yang dilabel enzim alkalin fosfatase diencerkan dengan buffer blocking sehingga diperoleh pengenceran 1/2000, kemudian 100 µl larutan tersebut ditambahkan kedalam setiap sumuran mikroplat.
- Sumuran mikroplat diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C.
- Setiap sumuran mikroplat dicuci dengan NaCl-Triton sebanyak 5 kali.
- Substrat 4-NPP (*Nitro Phenyl Phosphate*) dilarutkan dengan *buffer substrat*, kemudian 100 µl larutan tersebut ditambahkan ke dalam setiap sumuran mikroplat.
- Sumuran mikroplat yang mengandung larutan diatas diinkubasi selama 30-90 menit dalam ruang gelap pada suhu kamar (37°C).
- Larutan *stopper* (NaOH) sebanyak 50 µl diberikan pada setiap sumuran mikroplat untuk menghentikan reaksi.
- Pembacaan nilai absorban dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm.

#### **Deteksi eCG dengan Indirect Sandwich ELISA untuk Pembuatan Kit Diagnostik eCG *Microtitre Strip***

- Encerkan antibodi monoclonal anti eCG dengan buffer coating pada pengenceran 1: 160 Masukkan pengenceran tersebut sebanyak 100 µl/sumuran ke dalam mikroplate ELISA. Inkubasi selama 18 jam pada suhu 4 °C
- Cuci dengan NaCl-Tween 5 kali

- Tambahkan buffer blocking (BSA) sebanyak 150  $\mu$ l pada setiap sumuran.  
Inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C
- Cuci dengan NaCl-Tween 5 kali
- Encerkan serum kuda bunting dengan buffer blocking pada pengenceran 1:50 sampai 1:100, tambahkan masing-masing 100  $\mu$ l / sumuran pada baris A, C, E dan G. Pada baris B, D, F dan H diisi dengan kontrol (serum kuda tidak bunting). Inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C
- Cuci dengan NaCl-Tween 5 kali
- Tambahkan antibodi anti eCG dari serum kelinci sebanyak 100  $\mu$ l pada setiap sumuran. Inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C
- Encerkan konjugat goat anti rabbit yang dilabel enzim Alkaline Phosphatase pada 1:2500 dengan *buffer blocking* dan tambahkan 100  $\mu$ l pada setiap sumuran. Inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C
- Cuci dengan NaCl-Tween 5 kali
- Larutkan substrat 4-NPP dengan buffer substrat dan tambahkan 100  $\mu$ l pada setiap sumuran.
- Inkubasi 30-90 menit dalam ruang gelap pada suhu 37 °C
- Hentikan reaksi dengan menambahkan larutan stopper sebanyak 50  $\mu$ l pada setiap sumuran.
- Baca nilai absorben pada panjang gelombang 405 nm dengan ELISA reader dan intepretasikan hasilnya.

Lampiran 7 :

**Rataan OD antibodi poliklonal anti - eCG**

Pengenceran	<i>Bleeding</i>			
	I (hari ke 14)	II (hari ke 21)	III (hari ke 28)	IV (hari ke 35)
1/20	0,850 ± 0,259*	1,420 ± 0,412*	1,950 ± 0,563*	2,280 ± 0,387*
1/40	0,712 ± 0,167*	1,189 ± 0,314*	1,664 ± 0,478*	2,036 ± 0,590*
1/80	0,621 ± 0,223*	1,038 ± 0,400*	1,433 ± 0,561*	1,761 ± 0,696*
1/160	0,491 ± 0,180*	0,790 ± 0,294*	1,090 ± 0,428*	1,332 ± 0,524*
1/320	0,440 ± 0,211*	0,673 ± 0,325*	0,902 ± 0,447*	1,086 ± 0,533*
1/640	0,323 ± 0,153*	0,490 ± 0,229*	0,662 ± 0,314*	0,797 ± 0,375*
1/1280	0,284 ± 0,076	0,393 ± 0,148*	0,510 ± 0,206*	0,608 ± 0,263*
1/2560	0,235 ± 0,043	0,296 ± 0,069	0,368 ± 0,112	0,431 ± 0,154
1/5120	0,242 ± 0,059	0,286 ± 0,074	0,334 ± 0,096	0,374 ± 0,115
1/10240	0,171 ± 0,040	0,198 ± 0,047	0,232 ± 0,063	0,257 ± 0,074
1/20480	0,145 ± 0,022	0,169 ± 0,026	0,197 ± 0,036	0,222 ± 0,044
1/40960	0,161 ± 0,051	0,184 ± 0,056	0,209 ± 0,066	0,231 ± 0,074
KONTROL	0,189 ± 0,067	0,235 ± 0,074	0,283 ± 0,091	0,324 ± 0,109
COV(1,5 x X)	0,284	0,353	0,425	0,486

- OD positip



Lampiran 8:

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN  
(eCG) DARI SERUM KUDA BUNTING

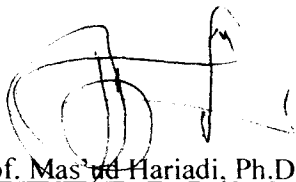
Rendi Prihatmanto

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi protein eCG yang ada dalam serum darah kuda bunting. Sampel kuda yang digunakan sebanyak 5 ekor dari jenis Toro Breed yang ada di wilayah Surabaya dengan umur kebuntingan 2-4 bulan.

Pengambilan darah dilakukan pada vena jugularis dengan menggunakan disposable syringe 10 cc. Serum diambil setelah darah didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam dan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 g selama 10 menit. Serum diambil dan dilakukan pemeriksaan protein eCG dengan menggunakan metode SDS-PAGE.

Pita-pita protein serum darah kuda bunting muda yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker ada tiga pita yaitu 42,7 kDa, 55,6 kDa dan 66,4 kDa. Pita-pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul eCG yang berkisar 45-65 kDa. Pita-pita protein dengan berat molekul 42,7-66,4 kDa dielektroelusi supaya terpisah dengan protein lain dan selanjutnya dilakukan uji spesifisitas dengan western blot dan pemeriksaan kadar protein tersebut dengan metode biuret. Pada uji spesifisitas ini didapatkan hasil pita protein eCG dengan berat molekul antara 55,6 – 66,4 kDa. Rataan kadar protein eCG serum darah kuda bunting masing-masing adalah 7412 µg/ml, 9112 µg/ml, 16696 µg/ml dan 5636 µg/ml.



Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D.M.Phil.,Drh.  
Pembimbing I

Mengetahui,



Sulistyaningsih Guntoro, M.Kes.,Drh.  
Pembimbing II



## PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-eCG PADA KELINCI

Riffan Rizallah

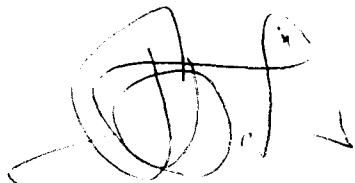
### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk pembuatan antibody poliklonal anti eCG, yang diproduksi pada hewan coba kelinci. Sebanyak 5 ekor kelinci jantan strain New Zealand disuntik secara sub kutan dengan 150 µg eCG dalam pelarut Freund's *complete* dan satu kelinci sebagai kontrol, tanpa mendapat suntikan eCG. Penyuntikan ulang dilakukan setiap seminggu sekali dengan 100 µg eCG dalam pelarut Freund's *incomplete* sampai 4 kali ulangan. Satu minggu setelah penyuntikan ulang ke empat, sampel darah diambil dari masing-masing kelinci sebanyak 5 cc melalui vena auricularis untuk dianalisa titer antibodi terhadap eCG dengan menggunakan ELISA tidak langsung.

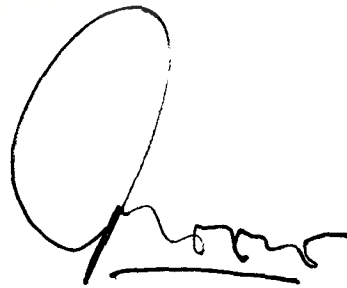
Titer antibodi dinyatakan positif apabila nilai OD antibodi lebih besar dari nilai Cut of Value (COV). COV dihitung dari 1,5-2 kali nilai rata-rata kontrol. Hasil titer positif pada bleeding I diperoleh pada pengenceran 20 – 640. Sedangkan pada bleeding II, III dan IV titer positif diperoleh pada pengenceran 20 – 1280.

Antibodi poliklonal anti-eCG sudah dapat dideteksi pada serum darah kelinci, yaitu pada hari ke 14 setelah penyuntikan eCG dalam *complete freund adjuvant*. Setelah booster 1, 2 dan 3 yang terlihat adanya peningkatan kadar antibodi

Mengetahui,



Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D.M.Phil.,Drh.  
Pembimbing I



Prof. Dr. Ismudiono, M.S. Drh..  
Pembimbing II

## PEMBUATAN KIT DIAGNOSTIK UNTUK TES KEBUNTINGAN DINI PADA KUDA DENGAN METODE MICROTITRE STRIP

Mareta Margalin

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk pembuatan kit diagnostik untuk tes kebuntingan dini pada kuda dengan metode mikrotitre strip.


Metode dalam penelitian ini yaitu : sebanyak 7 ekor kuda betina tidak bunting dan 7 ekor kuda betina bunting muda (2-3 bulan) diambil darahnya untuk dilakukan uji kebuntingan dengan mikrotiter strip. Kelompok kontrol, terdiri dari 7 ekor kuda tidak bunting; Perlakuan pertama (P1), 7 ekor kuda dengan umur kebuntingan 2 bulan; Perlakuan kedua (P2), 7 ekor kuda dengan umur kebuntingan 3 bulan;

Hasil penelitian ini dinyatakan positif jika terjadi perubahan warna kekuningan pada mikroplat yang digunakan. Perubahan warna kekuningan tersebut menandakan telah terjadi reaksi antara antigen (eCG dari serum kuda bunting) dengan antibodi yang dibuat pada penelitian sebelumnya. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa 5 ekor kuda (71,4%) menunjukkan perubahan warna kekuningan pada mikroplat. Hal ini mengindikasikan bahwa dari ke tujuh kuda tersebut dinyatakan positif bunting sebanyak 5 ekor atau keberhasilan deteksi kebuntingan mencapai 100 %.

Mengetahui,



Indah Norma Triana, M.Si., Drh.  
Pembimbing I



Prof. Dr. Sri Subekti, DEA, Drh..  
Pembimbing II